

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos



Tese

**CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS DO ARMAZENAMENTO DE AMÊNDOAS
COM PELÍCULAS E DESPELICULADAS SOBRE PROPRIEDADES DAS
FRAÇÕES PROTEICA E LIPÍDICA DE CASTANHA-DO-BRASIL**

JOANA MARIA LEITE DE SOUZA

PELOTAS, 2013

JOANA MARIA LEITE DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS DO ARMAZENAMENTO DE AMÊNDOAS
COM PELÍCULAS E DESPELICULADAS SOBRE PROPRIEDADES DAS
FRAÇÕES PROTEICA E LIPÍDICA DE CASTANHA-DO-BRASIL**

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

Orientador: Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias
Co-Orientadores: Prof. Dr. Manoel Artigas Schirmer
Prof. Dr. Maurício de Oliveira

PELOTAS, 2013

Catálogo na fonte:
Gabriela Machado Lopes, CRB: 10/1842

S719c Souza, Joana Maria Leite de

Caracterização e efeitos do armazenamento de amêndoas com películas e despelculadas sobre propriedades das frações proteica e lipídica de castanha-do-brasil / Joana Maria Leite de Souza; Moacir Cardoso Elias, orientador, Manoel Artigas Schirmer e Mauricio de Oliveira, co-orientadores. – Pelotas, 2013.

127f.: il.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1. *Bertholletia excelsa* Bonpl. 2. Qualidade 3. Proteínas 4. Aminoácidos 5. Óleo 6. Comportamento térmico. I Elias, Moacir Cardoso, orient. II. Título.

CDD

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias (orientador)

Prof. Dr. Álvaro Renato Guerra Dias

Profª Drª Ana Paula Walli Valim

Prof. Dr. William Peres

Profª Drª Elessandra da Rosa Zavareze

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos

Eddinho, Dudu, Juninho e Gigia,
razões da minha vida e do meu esforço maior;
Jaci, Elvira, Edmundo, tio Mário (*in memoriam*).

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Sem dúvidas agradeço, em primeiro lugar, ao Criador de todas as coisas. Obrigada Deus por nossa existência!

Aos meus filhos Eddie, Eduardo, Edmundo Junior e Giovana pelo amor, companhia, paciência, parceria e compreensão durante a minha ausência para dedicar-me aos estudos. As minhas irmãs e irmãos, sobrinhas(os) pelo incentivo, apoio e torcida incondicionais durante esta missão. A minha outra família, Souza, para sempre vocês serão especiais. Obrigado a todos por cuidarem dos meus meninos.

A minha família gaúcha em Porto Alegre e Novo Hamburgo, Shirley Nascimento (Didi) e Rosângela, Roni, Eny e Thiago, Robson e Silvia, que há 25 anos nos adotaram e nos fizeram sentir em casa novamente, sabíamos que vocês estavam torcendo por nós, de Norte a Sul.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa e a Embrapa Acre pela liberação e apoio para a realização deste trabalho, especialmente ao Dr. Judson Ferreira Valentim e a Dra. Lucia Helena de Oliveira Wadt, pela confiança e incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias cuja confiança, compreensão, incentivos e ensinamentos foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho. Poucas pessoas têm a habilidade de ensinar, motivar e ouvir como tu fizeste, Professor. Poder aprender, ser motivada e poder falar, foi um desafio para mim! Obrigada, Professor Moacir pelo carinho, amizade e espírito de humanidade dedicados a mim e aos meus filhos.

Aos co-orientadores, Professor PhD. Manoel Artigas Schirmer e Professor Dr. Maurício de Oliveira, que me fizeram aprender a pensar, organizar os pensamentos para meu desenvolvimento profissional, entendimento científico e até pessoal, uma vez que o convívio com a maturidade de um e a juventude do outro, ajudaram-me a descobrir o maravilhoso mundo das proteínas, que um dia ameacei abandonar. Posso dizer-lhes que essa aventura está apenas começando.

A Universidade Federal de Pelotas, aos professores do PPGCTA/DCTA, Professores Doutores Jorge Adolfo Silva, Cesar Rombaldi, Angela Fiorentini, Alvaro Dias, Leonardo Nora, Rui Zambiasi, Celso Medina, Wladmir Padilha, Marcia Gularte, Elessandra Zavarese, Fabio Clasen, e a todos que contribuíram para meu aperfeiçoamento profissional, seus ensinamentos serão de grande valia para o desenvolvimento de novos projetos e atuação multidisciplinar. As bibliotecárias e demais colaboradores. Obrigada a todos.

Aos colegas do Laboratório de Pós-Colheita, industrialização e Qualidade de Grãos da UFPEL, Vania Pinto, Bruna Klein, Rafael Schiavon, Cristiano Dietrich, Diego Zeni, Nathan Vanier, Ricardo Paraginski, Ricardo Scherer Pohndorf, Shanise Melo, Rosana Colussi, Magda Santos, Alexandra Morás, Lucia Borges, Tatiane Zanata, Josiane Bartz, Flavia Paiva, Monica de Los Santos, Vera Bortolini, Daniel Rutz, Jardel Casaril, Bruna Arns, Wagner Schellin, Angelica Nicoletti, Nelisa Lamas, Jarine Amaral, Ismael Bertinetti, Franciene Villanova, Vinicius Rosinha. Vocês me fizeram sentir em casa e, de uma ou outra forma, muito me ajudaram durante as análises e convívio nestes quase quatro invernos. Muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Frutas e Hortaliças e Microbiologia, Isadora Rubim, Renata Moura, Tanize Acunha, Vagna Freire a convivência com vocês me possibilitou conhecer outros temas importantes e possibilitará futuros arranjos.

Aos colegas da Biotecnologia, Alceu Gonçalves Junior, Carol Lopes, Prof. Dr. Fabio Leivas Leite, pela atenção e ensinamentos sobre eletroforese e mais proteínas. E, a Professora Dra. Juliana Fernando, da Fisiologia Vegetal, que me fez lembrar as aulas de botânica e fisiologia vegetal que eu tanto gosto. Tua simplicidade e interesse em ajudar a entender as microestruturas da amêndoa de castanha-do brasil resultaram em um grande aprendizado.

A Prof. Dra. Ana Paula Wally Valim, que didaticamente foi ensinando-me a enxergar as proteínas no gel e assim aumentar minha curiosidade e vontade de conhecer mais a fundo essas proteínas. Grande pessoa e excelente professora. Bom saber que, pelo Prof. Artigas Schirmer e pelas proteínas, ganhei uma amiga.

A Embrapa Clima Temperado, aos colegas Luis Antonio Suita de Castro, Nara E. Rocha e Walter L. Abrantes (Laboratório de Imunologia e Microscopia), Jorge Schafhauser Junior, Jamir S. da Silva, Roberto P. de Oliveira, Rosângela Mattos (Dadá), Raquel Louzada (Laboratório de Bromatologia), Ana Cristina Krolow (Laboratório de Tecnologia de Alimentos), Cristina Silveira e Nubia Ferri (Central Analítica), Eliana Mariete da Luz Silveira, Antonio Carlos Maximino Junior (Bem-estar), a interação com vocês não poderia ter sido mais oportuna e produtiva.

Aos amigos e colegas de trabalho na Embrapa Acre que direta ou indiretamente contribuíram para que essa tese se concretizasse, em especial Cleisa Cartaxo, Lucia Wadt, Virgínia Álvares, Clarissa Cunha, Jacson Negreiros, Aurenny Lunz, Luis Claudio de Oliveira, Renata Chagas. Certamente eu não conseguiria listar todos os nomes, mas cada um sabe o quanto foi importante para que esse momento se tornasse realidade. Obrigada a todos pelo incentivo e torcida.

A COOPERACRE, especialmente a RT/Eng. Agr. Felicia Leite, e extrativistas de castanha-do-brasil, a vivência com vocês proporcionou muito conhecimento e vontade de contribuir de alguma forma para a melhoria da cadeia produtiva da castanha-do-brasil.

A Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE e SEBRAE Acre pelo apoio financeiro concedido para a realização deste projeto.

RESUMO

SOUZA, Joana Maria Leite. Caracterização e efeitos do armazenamento de amêndoas com películas e despelculadas sobre propriedades das frações proteica e lipídica de castanha-do-brasil. 2013. 146f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Castanha-do-brasil (*Betholletia excelsa* Bonpl.) tipo *broken* com películas e despelculadas foram analisadas. Obteve-se farinha parcialmente desengordurada, isolado protéico e frações albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas e material não solubilizado que foram avaliados quanto às características físico-químicas, bioquímicas, aminoácidos, eletroforese em gel SDS-PAGE, comportamento térmico. O óleo extraído por prensagem hidráulica foi avaliado quanto às características físico-químicas, perfil de ácidos graxos, comportamento termogravimétrico. Amêndoas e farinha desengordurada foram avaliadas por microscopia ótica e de transmissão. As frações albuminas (41,34%) e glutelinas (36,35%) apresentaram as maiores concentrações, seguidas pelas frações globulinas (19,02%) e prolaminas, que apresenta valores menores que 0,5%. Eletroforese SDS-PAGE da FPD, IP, frações (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado, indicou sua complexidade. A matriz castanha-do-brasil é rica em proteínas, as quais possuem peso molecular entre 9,32kDa a 52,04kDa. Os aminoácidos essenciais do isolado protéico e frações mantêm as características da matriz farinha desengordurada. Análises de DSC demonstraram que a desnaturação das proteínas é maior na farinha desengordurada que no isolado protéico, menor nas frações albuminas e globulinas e mais acentuada nas frações prolaminas e glutelinas e material não solubilizado, as quais apresentam entalpia (ΔH) de 0,67; 5,16; 14,25; 0,37; 5,44; 8,01; 0,15 e 0,94 J.g⁻¹, respectivamente. Compostos fenólicos diferiram com o tempo e nos tratamentos, sendo que a castanha-do-brasil *broken* com película apresentaram valores de 136,07mgAG100g⁻¹ e 123,62mgAG100g⁻¹ no início e após doze meses de armazenamento, respectivamente. A prensagem hidráulica a frio permitiu obter óleo com características físico-químicas (índices de acidez, peróxidos e saponificação) de acordo com a legislação vigente no país para outros óleos comestíveis. O perfil de ácidos graxos demonstrou que a remoção da película marrom promove alterações qualitativas no óleo, que apresentou diferenças significativas quando comparado ao óleo de castanha-do-brasil *broken* despelculada. O comportamento termogravimétrico (TG/DTG) dos óleos analisados apresentou um único evento de perda de massa, que ocorreu a partir da T°C de pico a 409,41°C com perda de massa de 99,59%, no caso da castanha-do-brasil com película e 420,00°C e perda de massa de 100%, para a castanha-do-brasil despelculada, no início do armazenamento, comportamento foi atribuído à presença de maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados no tempo zero para as amêndoas com película, os quais são muito suscetíveis a oxidação e, quando presentes reduzem a estabilidade como um todo. No caso das amêndoas despelculadas, no início do armazenamento já foi observada a redução desses ácidos. Análises de microscopia (ótica e de transmissão), revelaram que a película

marrom que envolve as amêndoas de castanha-do-brasil parece possuir alguns compostos secundários (compostos fenólicos, p. ex.) que mantêm a estrutura celular organizada. Na castanha-do-brasil tipo *large* com películas, estruturas como parede celular e oleossomos aparecem bem mais preservados do que aqueles observados na castanha-do-brasil tipo *broken* com películas, porém, nas castanhas despeliculadas estas estruturas parecem não existir ou estão muito mais desorganizadas. A manutenção da película marrom que envolve a castanha-do-brasil, notadamente as do tipo *broken* utilizadas nesta pesquisa, pode contribuir para maior organização do conteúdo celular, possibilitando uma maior proteção das características físico-químicas e estabilidade do óleo.

Palavras-chave: *Bertholletia excelsa* Bonpl., qualidade, proteínas, aminoácidos, óleo, comportamento térmico.

ABSTRACT

SOUZA, Joana Maria Leite. Characterization and Effects of storage of almonds with skins and dehulled on properties of lipid and protein fractions of Brazil nut. 2013. 146f. Thesis (Doctorate) – Graduate Program in Agroindustrial Science and Technology. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) broken type with skins and dehulled were analysed. Obtained defatted flour (BNDF), protein isolate (BNPI), albumin, globulin, prolamin and glutelin protein fractions and non solubilized material that were evaluated as characteristics physicochemical, biochemical, amino acids, electrophoresis SDS-PAGE, thermal behaviour. The extracted oil from hydraulic cold pressing were evaluated as characteristics physicochemicals, fatty acids profile, thermogravimetric behaviour. Nuts and defatted flour were evaluated by optical microscopy and electron microscopy. Albumin (41.34%), glutelin (36.35%) fractions presented highest concentration, followed for globulin (19.02%) and the prolamin fractions, that presents lowest values than 0.5%. The electrophoretic profiles of BNDF, BNPI, albumin, globulin, prolamin, glutelin fractions and non solubilized material indicated your complexity. The Brazil nut matrix is rich in proteins, which have molecular weight between 9.32kDa and 52.04kDa. The essential amino acids from protein isolate and fractions maintains characteristics of the defatted flour matrix. DSC analysis shows that proteins denaturation of defatted flour is highest than protein isolate, lowest than in the albumin and globulin fractions and highest in the prolamin and glutelin fraction and non solubilized material, which shows enthalpies (ΔH) of 0.67 J.g⁻¹; 12.89 J.g⁻¹; 7.75 J.g⁻¹; 0.26 and 0.94 J.g⁻¹, respectively. Phenolic compounds were different in the time and in treatments, being that Brazil nut broken type with skin presented values of 136.07 mg AG 100 g⁻¹ at the beginning of storage time and 123.62 mg AG 100 g⁻¹ in final time storage at twelve months. Hydraulic cold pressing allowed obtain oil with characteristics (acidity, peroxides and saponification) according to Brazilian legislation to others edible oils. The fatty acids profile shows that removal brown skin promoted qualitative changes in the oil that presented significant differences when compared to dehulled Brazil nut broken type oil. The thermogravimetric behaviour (TG/DTG) of the oil analysed presents one only event mass loss, that occurs from peak temperature at 409.41°C with mass loss of 99.59%, in the case of the Brazil nut with skin and 420.00°C and mass loss of 100% to dehulled Brazil nut, in the beginning of storage time. This behaviour was attributed to presence of higher amounts of polyunsaturated fatty acids in the zero time to nuts with skin, which are very sensitive to oxidation process and, when presents reduce the stability as a whole. In the case of dehulled nuts at the beginning of storage has been observed to reduce these acids. Optical and electron microscopies analyses revealed that brown skin that involves the almonds of Brazil nuts seems to possess some secondary compounds (for example, phenolic compounds) that maintain the cellular structure organized. In the Brazil nut large type with skin, structures with cell wall and oleosomes appears much preserved than observed in the Brazil nut broken type with skins. In the Brazil nut dehulled this structures not seem to exist or are much more disorganized. The maintenance of the brown skin that involves Brazil nut almond, notably the broken type used in this research can contribute to

better organization of the cell contents, providing greater protection of physical and chemical characteristics and stability of the oil.

Keywords: *Bertholletia excelsa* Bonpl., quality, protein, amino acids, oil, thermal behaviour.

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Castanheira-do-brasil.....	20
FIGURA 2	Ouriços de castanha-do-brasil amontoadas na floresta.....	21
FIGURA 3	Controle e cronograma de coleta.....	23
FIGURA 4	Sistema de armazenagem comunitária.....	24
FIGURA 5	Curva de decomposição térmica de um material.....	51
FIGURA 6	Castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e despeliculada	53
FIGURA 7	Fluxograma de obtenção do isolado proteico de castanha-do-brasil.....	55
FIGURA 8	Fluxograma de fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película; parte 1 - obtenção da fração albuminas.....	56
FIGURA 9	Fluxograma de fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película; parte 2 - obtenção da fração globulinas.....	57
FIGURA 10	Fluxograma de fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película; parte 3 - obtenção da fração prolaminas.....	57
FIGURA 11	Fluxograma de fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película; parte 4 - obtenção da fração glutelinas.....	58
FIGURA 12	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	68
FIGURA 13	Determinação da FDP, IP, frações proteicas (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado.	71
FIGURA 14	Termograma de DSC da farinha parcialmente desengordurada (FPD) de desengordurada de castanha-do-brasil.....	76
FIGURA 15	Termograma de DSC do isolado protéico de castanha-do-brasil	77
FIGURA 16	Termograma de DSC da fração albuminas de castanha-do-brasil.....	78
FIGURA 17	Termograma de DSC da fração globulinas de castanha-do-brasil.....	78
FIGURA 18	Termograma de DSC da fração prolaminas de castanha-do-brasil.....	79
FIGURA 19	Termograma de DSC da fração glutelinas de castanha-do-brasil.....	80
FIGURA 20	Termograma de DSC do material não solubilizado do fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil.....	81
FIGURA 21	Teor de lipídeos das farinhas parcialmente desengorduradas de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e castanha-do-brasil despeliculada armazenadas a 16°C durante 12 meses em embalagens aluminizadas sob vácuo.....	84
FIGURA 22	Índice de acidez de óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película (T1) e castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculada (T2) armazenadas a 16°C durante 12 meses.....	86

FIGURA 23	Índice de peróxidos do óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculada armazenadas a 16°C durante 12 meses	87
FIGURA 24	Índice de saponificação do óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculada armazenadas a 16°C durante 12 meses	89
FIGURA 25	Ácidos graxos palmítico - C16:0 (A), esteárico - C18:0 (B), oléico - C18:1 (C) e linoléico - C18:2 (D) (%) em função dos tempos de armazenamento na castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e despeliculada	91
FIGURA 26	Curvas/Termogramas TG do óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com películas (T1), obtido por prensagem hidráulica a frio armazenadas durante doze meses a 16°C; t1 – tempo 0; t2 – 3 meses; t3 – 6 meses; t4 – 9 meses; t5 – 12 meses	96
FIGURA 27	Curvas/Termogramas DTG do óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com películas (T1), obtido por prensagem hidráulica a frio, armazenadas durante doze meses a 16°C; t1 – tempo 0; t2 – 3 meses; t3 – 6 meses; t4 – 9 meses; t5 – 12 meses	97
FIGURA 28	Curvas TG do óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculada (T2), obtido por prensagem hidráulica a frio, armazenadas durante doze meses a 16°C; t1 – tempo 0; t2 – 3 meses; t3 – 6 meses; t4 – 9 meses; t5 – 12 meses	98
FIGURA 29	Curvas DTG do óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculada (T2), obtido por prensagem hidráulica a frio, armazenadas durante doze meses a 16°C; t1 – tempo 0; t2 – 3 meses; t3 – 6 meses; t4 – 9 meses; t5 – 12 meses	98
FIGURA 30	Corte transversal de amêndoa de castanha-do-brasil tipo <i>large</i> (<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.) evidenciando os tecidos distintos ..	100
FIGURA 31	Cortes transversais de amêndoas de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película evidenciando a preservação dos tecidos distintos. A – T1t0; B – T1t4; a – Película	102
FIGURA 32	Grau de umidade das castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com películas (T1) e despeliculada (T2) obtido por prensagem hidráulica a frio, armazenadas durante doze meses a 16°C	103
FIGURA 33	Cortes transversais de amêndoas de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculadas evidenciando a ausência de tecidos distintos	105
FIGURA 34	Micrografias de células do endosperma de castanha-do-brasil desidratada tipo <i>large</i> , com 1,7% de umidade, visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão	106
FIGURA 35	Micrografias de células do endosperma de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película, visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão	107
FIGURA 36	Micrografias de células do endosperma de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculadas, visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão	109

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Composição nutricional da amêndoa integral de castanha-do-brasil, resultados em g 100 g ⁻¹ de amostra integral.....	28
TABELA 2	Composição de ácidos graxos (%) do óleo de castanha-do-brasil determinado por GLC em comparação com outros óleos .	45
TABELA 3	Equivalência das medidas usadas em microscopia	47
TABELA 4	Composição química inicial (% b.s) das amêndoas, da farinha desengordura e do isolado proteico de castanha-do-brasil.....	65
TABELA 5	Composição de frações proteicas do isolado protéico da castanha-do-brasil.....	67
TABELA 6	Massas moleculares das proteínas de farinha parcialmente desengordurada, isolado protéico, frações (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado de castanha-do-brasil.....	71
TABELA 7	Composição de aminoácidos essenciais na farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil (FPD), isolado protéico (IP), frações protéicas (albuminas, globulinas, prolaminas, globulinas), material não-solubilizado e da proteína de referência da FAO/WHO	72
TABELA 8	Calorimetria diferencial de varredura da farinha parcialmente desengordurada, do isolado protéico, das frações (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado do fracionamento obtidos da castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película	75
TABELA 9	Compostos fenólicos totais determinados em FPD de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculada	
TABELA 10	Índice de peróxidos do óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> despeliculada durante doze meses de armazenamento a temperatura de 16°C	81
TABELA 11	Ácidos graxos palmítico - C16:0, esteárico - C18:0, oléico - C18:1 e linoléico - C18:2 (%) em função dos tempos de armazenamento na castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e despeliculada	90
TABELA 12	Ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (%) em função dos tempos de armazenamento na castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película e despeliculada.....	93
TABELA 13	Dados termogravimétricos do óleo de castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com películas (T1) e despeliculadas (T2), obtido por prensagem hidráulica, armazenado durante doze meses a 16°C	95

SUMÁRIO

	Página
COMISSÃO EXAMINADORA	2
DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. CASTANHA-DO-BRASIL: CARACTERÍSTICAS.....	18
2.2 CASTANHA-DO-BRASIL: IMPORTÂNCIA AMBIENTAL, SOCIAL E ECONÔMICA	20
2.3 MANEJO E ARMAZENAMENTO DE CASTANHA-DO-BRASIL	21
2.4 VALOR NUTRITIVO E BENEFÍCIOS À SAÚDE	26
2.5 PROTEÍNAS VEGETAIS.....	29
2.6 AMINOÁCIDOS.....	32
2.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE	33
2.8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	35
2.9 COMPOSTOS FENÓLICOS	36
2.10 ÓLEO DE CASTANHA-DO-BRASIL E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	38
2.11 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES DO ÓLEO DE CASTANHA-DO-BRASIL	41
2.12 ÁCIDOS GRAXOS	44
2.13 MICROSCOPIA ÓTICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	46
2.14 TERMOGRAVIMETRIA/TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 MATERIAL	52
3.2 MÉTODOS	52
3.2.1 Despeliculação das castanhas e condições de armazenamento	52
3.2.2 Obtenção de farinha parcialmente desengordurada de amêndoas de castanha-do-brasil com película (FPD)	53
3.2.2.1 Obtenção do isolado protéico de castanha-do-brasil (IP).....	54
3.2.2.2 Composição centesimal	55
3.2.2.3 Fracionamento das proteínas.....	56
3.2.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	58
3.2.2.5 Aminoácidos.....	59
3.2.2.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	60
3.2.2.7 Compostos fenólicos	60

3.2.3 Método de extração de óleo	61
3.2.3.1 Obtenção de óleo de amêndoas de castanha-do-brasil	61
3.2.3.2 Características físico-químicas e propriedades do óleo de castanha-do-brasil	61
3.2.3.3 Perfil de ácidos graxos	63
3.2.3.4 Microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão	63
3.2.3.5 Termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG)	64
3.2.4 Delineamento experimental e análise estatística	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 ESTUDO 1: CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DESENGORDURADA E ISOLADO PROTÉICO DE CASTANHA-DO-BRASIL	65
4.1.1 Composição centesimal da castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película, farinha parcialmente desengordurada de amêndoas de castanha-do-brasil (FPD) e do isolado proteico de castanha-do-brasil (IP)..	65
4.1.2 Fracionamento das proteínas	67
4.1.3 Eletroforese SDS-PAGE.....	68
4.1.4 Aminoácidos.....	72
4.1.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	74
4.1.6 Compostos fenólicos.....	81
4.2. ESTUDO 2: EFEITOS DO ARMAZENAMENTO DE AMÊNDOAS DE CASTANHA-DO-BRASIL COM PELÍCULA E DESPELICULADA SOBRE A ESTABILIDADE E QUALIDADE DO ÓLEO	83
4.2.1 Método de extração.....	83
4.2.2 Características físico-químicas e propriedades do óleo de castanha-do-brasil	85
4.2.3 Perfil de ácidos graxos	90
4.2.4 Termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG)	94
4.2.5 Microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão	99
4.2.5.1 Microscopia ótica.....	99
4.2.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	104
5 CONCLUSÕES	110
5.1 ESTUDO 1	110
5.2 ESTUDO 2	111
6 REFERÊNCIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia brasileira caracteriza-se pela grande biodiversidade e riqueza de sua flora e fauna, e a preservação desse bioma é de grande importância, para tanto, há necessidade da valorização de suas potencialidades.

Dentre tais potencialidades, destaca-se a castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl., Lechytidaceae), conhecida popularmente como castanheira-do-brasil ou castanheira-do-pará e, mais recentemente, castanheira-da-amazônia, uma das árvores-símbolo da Amazônia. Apresenta importância social, ecológica e econômica para a região, já que milhares de famílias de extrativistas e produtores familiares utilizam as sementes da castanheira como importante fonte de renda.

A castanha-do-brasil, fruto da castanheira, é um produto bastante conhecido e apreciado nos EUA e na Europa e tem como principais países produtores, o Brasil, a Bolívia e o Peru. Até a década de 90 o Brasil dominava o mercado mundial, porém a Bolívia fez diversos investimentos em suas indústrias e hoje detém 59% do mercado mundial da castanha sem casca, enquanto o Brasil é responsável apenas por 22%, mas ainda líder no mercado da castanha em casca. Por se tratar de um produto sem padrões de mercado bem definidos, as variações de preço são imprevisíveis, por aaspecto, a qualidade passou a ser um aspecto determinante para a comercialização, principalmente onde a amêndoa é consumida *in natura* e qualquer contaminação na origem pode ser levada até o consumidor final.

As castanhas são consideradas boa fonte de proteínas, óleo, minerais e fibra alimentar. A composição nutricional da castanha-do-brasil apresenta alto conteúdo de lipídios (60 a 70%) e proteínas (15 a 20%), que apresentam características diferenciadas no teor do aminoácido sulfurado metionina, que é deficiente em inúmeras proteínas de origem vegetal, principalmente em fabáceas. O elevado teor proteico das amêndoas tem despertado o interesse em aplicações como ingrediente na forma de concentrado ou isolado nos setores de alimentação e farmacêutico, porém as características e funcionalidades de suas proteínas são pouco estudadas e conhecidas. A fração lipídica constitui-se aproximadamente de 70% de ácidos graxos insaturados de grande importância nutricional, especialmente oleico e o linoleico.

A qualidade nutricional de uma proteína está relacionada à sua digestibilidade e capacidade de satisfazer as necessidades de aminoácidos essenciais para síntese protéica, promoção de crescimento normal em crianças e manutenção no adulto. Estudos referentes ao aspecto alimentar e nutricional da castanha-do-brasil disponíveis na literatura tratam apenas da composição centesimal, de minerais, caracterização dos lipídeos, composição em aminoácidos e propriedades funcionais das proteínas totais. No entanto, observa-se significativa falta de informações sobre características e propriedades de proteínas da castanha-do-brasil, notadamente no que se refere ao conteúdo de compostos fenólicos, as suas frações, valor nutritivo, comportamento térmico e, conseqüentemente, da viabilidade de sua utilização como alimento.

Por isso o valor nutricional e qualidade desta fração devem ser preservados durante o armazenamento das amêndoas, porém são escassos estudos relacionados a conservação e conservabilidade, principalmente quanto aos efeitos da película sobre a conservabilidade das amêndoas. Diante da potencialidade da amêndoa de castanha-do-brasil e de seu crescente consumo é importante que os estudos com a mesma sejam intensificados, uma vez que se trata de um alimento vegetal que oferece potenciais benefícios para a saúde, além da sua aplicação em diversos ramos da indústria, gastronomia, etc. Em virtude da importância social, ambiental e econômica da castanha-do-brasil, este trabalho propõe um estudo sobre os efeitos do armazenamento de amêndoas de castanha-do-brasil com e sem película sobre a qualidade e estabilidade do óleo.

A castanha-do-brasil é conhecida pelo alto conteúdo de óleo em comparação com amêndoas (53%), nozes (55%). O óleo de coloração amarelo claro e sabor agradável, tem seu uso mundial limitado devido principalmente ao desconhecimento de suas características, que são mais caracterizadas neste estudo, que consta de tocoferóis, esteróis e fosfolipídeos, sua utilização pode ser ampliada. O alto teor em ácidos graxos insaturados com predominância dos ácidos oléico e linoléico, e também β -tocoferol e β -sitosterol confere à castanha-do-brasil interessantes propriedades antioxidantes e de prevenção e manutenção dos níveis colesterol.

A amêndoa de castanha-do-brasil é classificada como oleaginosa em função de seu elevado teor de óleo (68 a 70%). Esse óleo apresenta possibilidades de aplicação não somente na indústria alimentícia, como também na de cosméticos,

farmacêutica, oleoquímica, entre outras. No setor alimentício, destaca-se o interesse nos ácidos graxos ω -3, que não podem ser sintetizados pelo organismo humano, devendo por tanto serem obtidos pela dieta.

Deve-se considerar que o conhecimento dessas propriedades da amêndoa de castanha-do-brasil é primordial para seu aproveitamento no sentido mais amplo, favorecendo o seu desenvolvimento sustentável, evitando os riscos de sua extinção, aumentando a renda dos extrativistas, fornecendo matéria-prima para a agroindústria e alimentos para a população. Diante dos aspectos levantados o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros de qualidade e estabilidade físico-química, química, bioquímica e comportamento térmico das frações protéicas e lipídica de castanha-do-brasil armazenadas com e sem película, durante 12 meses, visando ampliar os conhecimentos e o seu aproveitamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CASTANHA-DO-BRASIL: CARACTERÍSTICAS

A área de ocorrência da castanheira abrange as regiões amazônicas, estendendo-se da Bolívia, Peru e Brasil, até o escudo das Guianas, compreendendo o Suriname, as Guianas e o sul da Venezuela (Figura 15.8), na região do Rio Negro (Mori e Prance, 1990; Corrêa, 1931). No Brasil, as principais áreas de ocorrência estão nos Estados do Acre, Amazonas, Pará, Amapá, Rondônia, Roraima, Mato Grosso e Maranhão. Mais especificamente, a espécie ocorre no Pará (próximo aos rios Trombetas, Tapajós, Xingu, Tocantins e afluentes), Amazonas (próximo aos rios Amazonas, Madeira, Negro, Purus e afluentes), Acre (próximos aos rios Acre, Purus, Iaco e Abunã), Maranhão (área constituída da Amazônia Legal) e Mato Grosso (próximo ao rio Araguaia) (WADT E KAINER, 2012).

No Acre, situado no extremo sudoeste da Amazônia Brasileira, entre as latitudes de 07°07S e 11°08S, e as longitudes de 6630W e 74WGr relevo compõe-se de rochas sedimentares formando uma plataforma com cotas que descem de 300m na fronteira com países andinos até um pouco acima dos 110m próximo ao Estado do Amazonas. Na Regional do Baixo Acre os Argissolos distribuem-se em mais da metade do território. Os Latossolos ocupam cerca de 21% do território. Já na regional do Alto Acre, é mais homogênea que a regional do Baixo Acre em relação à distribuição das ordens de solos. Os Argissolos se distribuem por cerca de 90% do território, ocorrendo em grandes extensões nos municípios. A regional do Purus, onde se localiza o município de Sena Madureira, caracteriza-se pela presença de solos com argilas ativas e quimicamente férteis. Nessa regional observa-se a ocorrência dos Vertissolos, até então desconhecidos para as condições acreanas e pouco prováveis para o ambiente amazônico predominando em 9% da regional, além dos Argissolos, 33% de toda a área. Os solos acreanos, de origem sedimentar, abrigam uma vegetação natural composta basicamente de florestas, divididas em dois tipos: Tropical Densa e Tropical Aberta, que se caracterizam por sua heterogeneidade florística, constituindo-se em grande valor econômico para o Estado. O clima é do tipo equatorial quente e úmido, caracterizado por altas temperaturas, elevados índices de precipitação pluviométrica e alta umidade relativa

do ar. A temperatura média anual está em torno de 24,5°C, enquanto a máxima fica em torno de 32°C, aproximadamente uniforme para todo o Estado (ZEE, 2006).

A castanha-do-brasil, *Bertholletia excelsa* Bonpl., é uma angiosperma da classe Dicotiledônea, ordem Myrtiflorae e família Lecythidaceae. Descrita por Bonpland, no ano de 1807, a partir de um exemplar cultivado no sul da Venezuela. É considerada uma espécie da família Myrtaceae até 1825, quando as Lecythidaceae passaram a constituir uma família à parte (MORI; PRANCE, 1990). Trata-se da única espécie do gênero, embora exista um registro no Jardim Botânico de Nova York de outra espécie (*Bertholletia nobilis*), descrita por William J. Burchell, em 1827, a qual foi considerada como uma sinonímia de *Bertholletia excelsa*. Alguns autores consideram a *Bertholletia excelsa* como única espécie do gênero. Referem, entretanto, que no estado do Acre os extrativistas reportam a existência de dois tipos de castanheiras: as brancas e as vermelhas. De acordo com as características citadas pelos produtores a diferença entre os dois tipos são: a cor da madeira, o potencial produtivo, o aspecto geral e o porte das árvores, além da forma e tamanho dos frutos e sementes (MORI; PRANCE, 1990; FERNANDES, 2007; LEITE, 2008). As árvores destacam-se pelo grande porte, sobressaindo-se no dossel da floresta, onde podem alcançar até 50m de altura e dois metros de diâmetro (Figura 1). Seu caule é cilíndrico, liso, desprovido de ramos até a fronde, copa densa, folhas esparsas, oblongas (WADT et al., 2005).

Conhecido como ouriço, seu fruto é uma cápsula globosa, quase esférica, medindo de 8 a 15cm de diâmetro (Figura 2A), sendo visível, na parte superior, o vestígio do cálice (Figura 2B). Sua casca é espessa, lenhosa, dura e de cor castanha (Figura 2C). Segundo descrição de Moritz (1984), o fruto apresenta geralmente cinco lóculos contendo cinco óvulos cada um, totalizando um número máximo de 25 sementes por fruto, porém avaliações de campo mostram uma variação comum de 10 a 25 sementes por fruto, com média de 17 a 18. No Peru, Cornejo (2004) registrou uma média de 18,5 sementes por fruto, porém com máximo de 36 e mínimo de seis sementes. As sementes da castanheira são angulosas, estreitas, compridas, com o tegumento duro, com rugosidade transversal, e apresentam um tecido meristemático circundando a amêndoa. É comum receber denominações segundo o lugar de origem, por exemplo, no Brasil é conhecida também por castanha-do-maranhão e castanha-do-pará. Já nos países da Amazônia Legal como Bolívia e Peru, França, demais países da Europa, Estados Unidos e

outros países pode receber nomenclaturas como *Iniá, Niá, Nhá, Eray, Tocary, Tucá, Turury, Yá e Yuvia, almendras, noce del Brazile, paranuss, Brazil nuts, Para nuts, Nigger To, noix du Bresil, noix du Para, chataigne du Bresil e nuez de Brazil*. No entanto, constata-se que, na maioria das denominações, mantém-se a origem primaria, ou dos locais de produção, do-brasil, do-pará etc. (ENRIQUEZ et al., 2003; SANTOS, 2012).



FIGURA 1. Castanheira-do-brasil (Arquivo pessoal, Felicia Leite, 2013)



FIGURA 2A. Ouriços de castanha-do-brasil, amontoados na floresta; B – Ouriço em detalhe; C) - Ouriço aberto, mostrando casca espessa e organização interna das sementes.

Corner (1976) e Camargo et al. (2000) observaram que a semente da castanheira apresenta um embrião do tipo hipocotilar e dois tegumentos. Embrião hipocotilar também foi observado em pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), em que o hipocótilo tem função de acumular material de reserva (BARRADAS, 1973), observando-se, ao redor do hipocótilo, um anel de tecido procambial, que apresenta grande capacidade regenerativa, sendo também para sementes de castanheira.

Barroso (1978) considera o embrião do gênero *Bertholletia* como sendo conferruminado, descrevendo-o como uma estrutura ovóide, elipsóide ou claviforme, sem delimitação de cotilédones nem de eixo hipocótilo-radícula, o que foi confirmado por Beltrati (1990). Prance e Mori (1978) definiram-no como sendo do tipo macropodial, sem presença de cotilédones diferenciados e com sua maior parte constituída pelo hipocótilo.

Para Joly (1979) a castanheira-do-brasil, pertencente a família *Lecythidaceae*, possui fruto seco, indeiscente, em geral um pixídio com sementes não-aladas e que não se abrem. A semente de castanheira (*B. excelsa* Bonpl.) corresponde morfológicamente ao hipocótilo, que cresce muito e se enche de reservas. Curiosamente, o autor relata que o que se come é o próprio embrião cheio de reservas.

Camargo et al. (2000) realizaram estudo histológico em amêndoas de castanha-do-brasil e observaram a presença de seis tecidos ou grupos de células distintas. Após a retirada do tegumento, as amêndoas apresentavam uma película marrom que em determinados locais ficava aderida ao tegumento, expondo o tecido interior. A película apresenta um tecido lignificado, composto por células mortas que

não apresentavam distinção visível entre si e eram pouco aderidas ao tecido adjacente.

Para Vaughan (1970) esse tecido denomina-se perisperma. Entretanto, perisperma é um termo que designa tecido de reserva com origem no nucelo (MAUSETH, 1988; BELTRATI, 1990). Possivelmente, essa película faça parte do tegumento da semente, pois em Lecytidaceae ocorre a presença de óvulos e sementes bitegmentadas, sendo necessário um estudo de ontogênese da germinação desde a fecundação até a maturação de da semente (CORNER, 1976; CAMARGO et al., 2000).

O tecido adjacente seguinte apresenta-se como um camada epidérmica, bisseriada, com células tabulares e paredes celulares espessas, o que para Corner (1976) pode ser o endosperma que pode ter de duas a três camadas de células com função de proteção, sendo diferenciadas e sem capacidade de multiplicação, uma vez que se rompe durante a germinação nos locais de protusão de raiz e parte aérea (CAMARGO et al, 2000).

Adjacente a este tecido, internamente há uma camada de células globosas, arredondadas, tamanhos irregulares, paredes delgadas e corpos de óleo. A primeira camada desse tecido é unisseriada, composta por células circulares, menores e mais uniformes. Trata-se de um tecido parenquimático que compõe a maior parte da amêndoa da castanha-do-brasil, cujas células são pouco especializadas e com potencial para retomada da atividade meristemática, cujas funções entre outras são desempenhas atividades funcionais e armazenar material de reserva. A presença de corpos de óleo de tamanhos variáveis foi detectada nas células dos tecidos parenquimáticos (CORNER, 1976; CAMARGO et al., 2000).

2.2 CASTANHA-DO-BRASIL: IMPORTÂNCIA AMBIENTAL, SOCIAL E ECONÔMICA

A dinâmica econômica e social da Amazônia Brasileira originou-se principalmente a partir do período da borracha, quase um século atrás. Desde o colapso da indústria da borracha no início da década de 1990, a castanha-do-brasil se tornou uma das principais fontes de geração de empregos e atividade econômica na região. A castanheira é amplamente reconhecida como um modelo de produto florestal não-madeireiro que contribui para a promoção da conservação das florestas tropicais, pois praticamente toda a produção é oriunda de florestas primárias e

continua experimentando um sucesso econômico no mercado internacional (WADT, 2005; SANTOS et al., 2002).

A espécie é responsável pela proteção de milhares de hectares de florestas tropicais, pois teve papel fundamental na inclusão dessas florestas na Categoria VI (áreas protegidas por recursos manejados) no Sistema de Classificação das Áreas Protegidas da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais). Essa categoria foi criada principalmente para legitimar as Reservas Extrativistas (Resex) como um modelo de conservação pautado no uso sustentável dos recursos naturais. A castanheira e a seringueira foram espécies-chave nesse processo (WADT; KAINER, 2012). Segundo estas autoras, a castanha-do-brasil é produzida quase que exclusivamente pelo sistema extrativista, sendo atualmente a principal atividade econômica de milhares de famílias que vivem na Amazônia. A produção vem apresentando uma tendência de queda, embora os preços médios apresentem uma tendência de aumento.

Se para a Amazônia, o agronegócio da castanha-do-brasil incluindo as etapas de transporte, armazenamento, comercialização na parte da produção primária e processamento no setor secundário, estes se tornam relevantes, sobretudo por ser a coleta de castanha a mais importante atividade econômica de centenas de comunidades extrativistas, que aumentam a geração de renda e emprego na cadeia na região. As potencialidades da castanha-do-brasil despertam o interesse de pesquisadores no Brasil e em outros países como Índia, China, Suécia, Holanda, França e Estados Unidos, por reunir em sua composição constituintes importantes como valor nutricional, qualidade das proteínas e do óleo e possibilidade de aplicação em diferentes segmentos das indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (LOTT e BUTTROSE, 1977; CARDARELLI e OLIVEIRA, 2000; WADT et al., 2005; COLLINSON et al., 2000; CHUNHIENG et al., 2004; WELNA et al., 2008; CHUNHIENG et al., 2008; SHARMA et al., 2009; JOHN e SHAHIDI, 2010; SANTOS, 2012).

Conforme estudo realizado no Acre sobre os custos de produção para a castanha-do-brasil, considerando o sistema tradicional, a atividade é viável financeiramente, proporcionando uma considerável remuneração para a mão de obra familiar (SANTOS et al., 2002). Nesse estudo, a renda líquida anual verificada foi de R\$ 1.805,85 (dados de 2003, quando o preço médio da lata de castanha foi de R\$ 3,50), com uma remuneração da mão de obra de R\$ 36,75 por dia. A partir de

2005, o preço da lata de castanha aumentou consideravelmente, chegando a R\$ 17,00 em 2006. Depois, o preço foi reduzido para R\$ 14,00 em 2007 e R\$ 11,00 em 2008.

2.3 MANEJO E ARMAZENAMENTO DE CASTANHA-DO-BRASIL

Quando grãos oleaginosos ou não, são armazenados adequadamente, no máximo podemos preservar suas qualidades iniciais, sendo inevitáveis as perdas de origem fisiológicas, entendendo-se que mesmo sob as melhores condições possíveis de armazenamento, a qualidade das sementes não pode ser melhorada e que a velocidade das transformações degenerativas depende das condições as quais as sementes são expostas no campo, antes e durante a colheita, na secagem, durante o beneficiamento e das condições de armazenamento (OLIVEIRA, 2011).

Neste sentido, há a necessidade de conhecimentos sobre conservação desses grãos quando são analisadas as potencialidades brasileiras de produção agrícola e ao serem verificadas as enormes perdas em função da falta ou inadequação tecnológica da infraestrutura de unidades de secagem e armazenamento, onde muitos dos equipamentos e das estruturas de secagem, disponíveis no país, em geral não são apropriados para as condições nacionais, apresentam custos elevados, tornando-se incompatíveis com o poder aquisitivo dos pequenos e médios produtores rurais. Se há adequações no sistema de secagem, no armazenamento a situação não é muito diferente. Um pequeno percentual da capacidade armazenadora está localizado nas propriedades rurais e apresenta grandes deficiências estruturais e tecnológicas. Essa é a realidade para cultivos como milho, soja, trigo, feijão, arroz (ELIAS et al., 2010). No caso de produtos de origem extrativista, como o é a castanha-do-brasil, essa necessidade torna-se premente. Nas condições da Amazônia, de modo geral, o sistema de produção da castanha por ser predominantemente extrativista em mata nativa, não envolve investimentos tecnológicos no processo de coleta, amontoa e corte dos ouriços, quebra das castanhas na unidade produtiva e transporte imediato para armazéns adequados ou diretamente para a indústria de beneficiamento (FRANK, 1981; PAS, 2004).

De acordo com informações de produtores de comunidades extrativistas, *in locu*, localizadas nos seringais Cachoeira, em Xapuri e Porongaba, em Brasília,

ambos no estado do Acre, a cadeia produtiva da castanha-do-brasil já adota as boas práticas extrativistas (BPE), cujas principais atividades constam da amontoa dos ouriços, a quebra dos ouriços e seleção das castanhas, descartando aquelas em estado de decomposição visível, cortadas e/ou quebradas, transporte para o armazém, secagem e seleção em secador de tela em aço galvanizado e armazenamento.

Em síntese, as principais etapas do beneficiamento pós-colheita da castanha-do-brasil, desde a floresta até o pátio da agroindústria são descritos de acordo com Leite (2008).

1. Limpeza da área – é feito o corte da vegetação rasteira e cipós ao redor da castanheira que impede o acesso aos ouriços. É realizada com uso de facão e/ou foice;

2. Amontoa – consiste no recolhimento dos ouriços de forma manual à medida que caem das árvores e juntam um número mínimo de 180 a 200 em média. É feita dispendo os ouriços diretamente sobre o solo não utilizando nenhuma proteção, ou em alguns casos, utiliza-se uma camada de folhas de palmeira;

3. Quebra – dependendo da quantidade de ouriços a quebra é realizada no mesmo dia; quando não, leva uma semana ou até 15 dias para retornar no local para quebrar; o facão ou foice são os equipamentos utilizados. Corta-se a área superior (região do opérculo) do ouriço e chamada de chapéu, colocam-se as castanhas diretamente no saco retirando-se os pedaços de ouriço, os umbigos, as castanhas cortadas, podres e chochas, antes de colocarem no saco;

4. Transporte para o paiol – é realizado em sacos pelos extrativistas, ou no lombo de animal (burro, jumento, boi) com cangalha ou zorra. Dependendo do volume e da distância deste para o armazém, os produtores transportam no mesmo dia. Existe um controle e cronograma de coleta para uso do comboio de animais (Figura 3A, 3B). Nos demais estados da região amazônica o transporte de barco é muito utilizado, sendo que as castanhas permanecem expostas às intempéries naturais por vários dias a semanas, até chegarem nas zonas de comercialização, que pode ser um porto ou novo transporte até o pátio de uma agroindústria;



FIGURA 3. Controle e cronograma de coleta: (a) Anotações da Associação e (b) Comboio de animais (LEITE, 2008)

5. Armazenamento no paiol comunitário – o armazenamento é feito a granel, porém há uma organização que permite a identificação por produtor, antes da secagem e depois que são embaladas em sacos enquanto aguardam o transporte para a agroindústria; cada produtor é responsável pelo revolvimento da sua produção dentro do armazém (Figura 4C e 4D);



FIGURA 4. Sistema de armazenagem comunitária (c) separação individual e (d) secagem da castanha-do-brasil em secador de tela (LEITE, 2008)

6. Transporte para o armazém da Associação – os produtores mais próximos da sede da associação e aqueles que ficam nos locais mais distantes (um a dois dias de viagem de barco) utilizam animais de carga, que transportam em média 200kg;

7. Armazenamento no armazém da associação – na recepção da castanha, é realizado o corte (separam-se 100 unidades de castanha com casca e procede-se um corte com facão onde é contabilizado o número de castanhas deterioradas), para verificar questão de qualidade para fins de pagamento do

produto. O responsável pelo corte é um extrativista experiente e treinado, que avalia também a aparência e aspecto geral da castanha. O armazenamento é feito a granel, separando-se as castanhas mais úmidas daquelas que estão com aparência mais secas;

8. Transporte para a cooperativa central – é feito em caminhões, assim que a estrada permite acesso (a partir de abril e maio). Os produtores cujas colocações estão localizadas em pontos próximos de rios ou igarapés, cuja localização fica muito abaixo do armazém central, transportam a castanha para o armazém central de barco, uma vez que os custos são menores.

Castanhas-do-brasil podem ser processadas ou não, semisecas ou desidratadas e comercializadas com ou sem casca (ARRUS et al, 2005; PACHECO; SCUSSEL, 2009). A maioria absoluta das unidades beneficiadoras brasileiras de castanha-do-brasil procede ao descascamento manualmente uma a uma, em plantas ultrapassadas e reduzido aporte tecnológico nas etapas de tratamento térmico, descascamento, desidratação, seleção, classificação e armazenamento a vácuo. A exceção dessa realidade está nas agroindústrias construídas pelo governo do estado do Acre onde, à semelhança das plantas existentes na Bolívia, as castanhas são beneficiadas em equipamentos modernos, recebem tratamento térmico em autoclaves verticais. O descascamento é mecanizado onde as amêndoas descascadas seguem por esteiras para áreas de seleção, classificação em peneiras vibratórias, desidratação, resfriamento e embalagem a vácuo. Ainda, podem ser comercializadas com ou sem películas e o armazenamento e conservação são uma das questões mais importantes na sua comercialização (BRASIL, 2011).

Conforme a Portaria Nº 846 (08 de novembro de 1976), em seu Artigo 7º dispõe que a castanha-do-brasil descascada ou beneficiada dos Subgrupos amêndoa com película e amêndoa sem película (Brancheada) será classificada segundo seu tamanho, caracterizado na forma do disposto no artigo 5º da mesma Portaria e, simultaneamente, de acordo com a natureza a que for o produto enquadrado (inteira, ferida ou quebrada), em 8 (oito) classes: I – Miudinha (*tiny*): É o produto que contiver acima de 180 unidades/amêndoa por 453 gramas; II – Miúda (*midget*): É o produto que contiver de 160 a 180 unidades/amêndoa por 453 gramas; III – Pequena (*small*): É o produto que contiver de 140 a 159 unidades/amêndoa por 453 gramas; IV – Média (*medium*): É o produto que contiver de 115 a 139

unidades/amêndoa por 453 gramas; V – Extra Média (*extra-medium*): É o produto que contiver de 102 a 114 unidades/amêndoa por 450 gramas; VI – Grande (*large*): É o produto que contiver menos de 102 unidades/amêndoa por 453 gramas; VII – Ferida (*chipped*): É o produto que se apresente com as amêndoas lascadas e/ou mutiladas por escoriações, oriundas de agente físico; VIII – Quebrada (*broken*): É o produto que apresenta as amêndoas fragmentadas, partidas e/ou quebradas.

A maturidade e estabilidade pós-colheita são as propriedades da castanha-do-brasil menos estudadas e entendidas, além de não haver dados suficientes que definam as complexas mudanças bioquímicas que podem ocorrer nos dias, semanas e meses que se seguem desde a colheita, passando pela armazenagem na unidade familiar (conhecidas como colocações) até chegar ao armazenamento nas unidades de beneficiamento. A mesma incógnita aplica-se para a estabilidade das amêndoas após o beneficiamento e armazenagem ao longo do tempo, bem como aspectos bioquímicos relacionados às frações protéica e lipídica.

2.4 VALOR NUTRITIVO E BENEFÍCIOS À SAÚDE

Depois de processada e desidratada, a amêndoa de castanha-do-brasil pode ser consumida dessa forma ou utilizada como ingrediente em vários segmentos da indústria alimentícia (mix com outras nozes, barras de cereais, chocolate, panificação), além de fazer parte de preparações e refeições das populações tradicionais da Amazônia.

Na comercialização, a castanha-do-brasil pode ser classificada como produto pronto-a-comer (RTE – *read-to-eat*) ou como aquelas destinadas para processamento posterior (DFP – *destined for futher processing*) (Comissão do Codex Alimentarius, 2010). Amêndoas e nozes RTE são aquelas que não deveriam se submeter a qualquer processamento adicional ou tratamento antes de chegar ao consumidor final. No caso da castanha-do-brasil, RTE e DFP podem ser comercializadas com ou sem casca e ambas as formas são susceptíveis a micotoxinas.

A relação entre consumo de castanha-do-brasil e saúde humana tem sido pesquisada devido às características nutricionais que a mesma apresenta. Entre todas as amêndoas, a castanha-do-brasil é reconhecida como um dos mais

completos alimentos humanos, devido aos seus elevados conteúdos em proteínas, carboidratos, gorduras insaturadas, vitaminas e minerais essenciais como Mg, Ca, Fe, Cu, Cr, As, Se (CHUNHIENG et al., 2004; SANTOS, 2012). A composição nutricional das amêndoas de castanha-do-brasil, apresenta alto conteúdo lipídico (60-70%) e protéico (15-20%), elevado teor do aminoácido essencial metionina (que é deficiente em proteínas de outras fontes vegetais, especialmente nas leguminosas).

Metionina, que é um aminoácido essencial também é conhecida como uma fonte de grupos metil para inúmeras reações de metilação assim como metilação de ácidos nucleicos, proteínas, amins biogênicas, fosfolipídios, entre outros. Além disso, é fonte de cisteína requerida para a síntese de glutathione. O metabolismo Met (L-metionina) ocorre principalmente pela ativação do Met para AdoMet (S-adenosil-L-metionina) e mais metabolismo da AdoMet, quer pela via de transmetilação-transsulfuração ou via biossintética da poliamina. O catabolismo do grupo metilo e átomo de enxofre de Met finalmente parece ser dependente da via transmetilação-transsulfuração porque o MTA (metiladenosiltransferase) formado como o co-produto da síntese de poliamina é eficientemente reciclado para Met. Por outro lado, o destino da cadeia de quatro carbonos de Met parece depender do destino inicial da molécula de Met. Durante a transsulfuração, a cadeia de carbono é liberada como um cetobutirato, que é metabolizado a CO₂. Na via das poliaminas, o carbono do carboxil de Met se perde na formação de dAdoMet (AdoMet descaboxilado), enquanto que os outros três átomos de carbono são finalmente excretados como derivados de poliamina e produtos de degradação. O papel da via do metabolismo da transaminação Met não está firmemente estabelecida (STIPANUK, 1996; BROSNAN, 2008; THOMAS et al, 2008).

Cisteína (que pode ser formada a partir do enxofre de Met e os carbonos da serina via transsulfuração) parece ser convertido para taurina e CO₂, principalmente pela via cisteinasulfinato, e para sulfato e piruvato principalmente, pelas vias de dessulfuração em que uma forma reduzida de enxofre com um período relativamente longo de semi-vida biológica parece ser um intermediário. Com o exceção do nitrogênio de Met que é incorporada nas poliaminas, o nitrogênio de Met ou Cis é incorporado na uréia depois é liberado como amônia [nas reações catalisadas por cistationase com qualquer cistationina (a partir de Met) ou cistina (a partir de cisteína) como substrato], ou ele é transferido para um cetoácido (em Cys

ou Met transaminação). Muitas áreas do metabolismo dos aminoácidos contendo enxofre precisam de mais estudo. A magnitude da AdoMet fluxo através da via de poliamina no animal intacto, bem como detalhes sobre as reações envolvidas nesta via permanecem ser determinada. Ambas as vias e o possível papel fisiológico alternativo (AdoMet-independente) Met metabolismo, incluindo a via de transaminação, deve ser elucidado. Apesar do crescente interesse em taurina, investigação do metabolismo Cys tem sido uma área relativamente inativa durante as últimas duas décadas. Aparentes discrepâncias nos dados relatados no metabolismo Cys precisa para ser resolvido. Trabalho futuro deve considerar o papel dos tecidos extra-hepáticos em metabolismo dos aminoácidos, bem como diferenças entre as espécies nos papéis relativos de várias vias do metabolismo da metionina e cisteína (STIPANUK, 2004, BROSNAN, 2006; BIJU et al, 2008).

Ressalta-se que a concentração de metionina na dieta também influencia indiretamente a biodisponibilidade de selênio e, afinal é o *pool* corporal de metionina que determina a mobilização da selenometionina para ser utilizada como uma análoga da metionina ou para a formação de selenoproteínas (SUN et al., 1986; CUNHIENG et al., 2004). A Tabela 1 possui os principais constituintes da castanha-do-brasil.

O Selênio (Se) torna a castanha-do-brasil muito interessante, por seu conteúdo excepcionalmente alto (CHUNHIENG et al., 2004; CHUNHIENG et al., 2008; WELNA, KLIMPEL, ZYRNICKI, 2008; SANTOS, 2012), além de outros minerais importantes como Magnésio, Cálcio, Fósforo, Bário, Zinco, Ferro, Sódio, Potássio e Selênio (USDA, 2008; YANG, 2009; INC, 2010, SUN (1987). O Se participa em mecanismos antioxidante importante, considerado elemento-traço essencial que deve ser consumido em quantidades sub-miligrama na dieta. A ocorrência de deficiência grosseira conduz a uma variedade de doenças ou distúrbios, sendo que a cardiomiopatia ou doença de Keshan é a mais conhecida (VERKERK, 2010). Também é necessário para a funcionalidade de importantes enzimas dependentes de Se ou selenoproteínas, necessárias para uma ampla gama de processos metabólicos, incluindo o hormônio da tireóide, funções de regulação do sistema imunológico e reprodução. Estudos sugerem que a ingestão adequada deste mineral pode ser relacionada com redução de riscos de câncer de pulmão, intestino e próstata. Entretanto, estes estudos precisam ser aprofundados no sentido de correlacionar o Se com a redução de outros tipos de câncer. É bem reconhecido

que o selênio na dieta é importante para uma resposta imunitária saudável. Há também evidências de que Se tem um efeito protetor contra algumas formas de câncer, que pode melhorar a fertilidade masculina; diminuir a mortalidade por doença cardiovascular, e regular os mediadores inflamatórios na asma (REEVES; HOFFMANN, 2009; VERKEK, 2010).

Os mais importantes alimentos ou matérias-primas alimentícias que causam reações alérgicas são leite de vaca, ovos, trigo, amendoins, peixes e amêndoas de árvores como é o caso da castanha-do-brasil (VAN BOXTEL et al., 2008; SATHE et al., 2009). Reações alérgicas pelo consumo de castanha-do-brasil podem ser severas e uma ameaça à vida. O mais importante alergênico dessa amêndoa, *Ber* e 1, é um membro das albuminas, grupo de proteínas de armazenamento em sementes (VAN BOXTEL et al., 2008). *Ber* e 1 é sintetizado a partir de um polipeptídeo de 18 kDa, após sucessivas clivagens (modificação pós tradução) em polipeptídios menores com 12, 9 e 3kDa (MORENO et al., 2004; VAN BOXTEL et al., 2008; ALCOCER et al., 2012) e pode ser desnaturado em pH 2,0 e temperatura próxima de 83°C ou em condições de pH neutro acima de 110°C, segundo Koppelman et al. (2004), citado por Van Boxtel et al. (2008).

TABELA 1. Composição nutricional da amêndoa integral de castanha-do-brasil, resultados em g 100 g⁻¹ de amostra integral

Proteínas (g)	Lipídios (g)	Fibra total (g)	Carboidratos (g)	Valor calórico (kcal)	Fontes
14,40	65,90	2,10	11,00	666,00	Almeida (1963)
13,60	66,80	-	10,30	-	Andrade et al. (1999)
14,29	67,30	8,02	3,42	676,56	Souza; Menezes (2004)
19,93	66,70	-	-	-	Venkata Shalam; Sathe (2006)
13,60	66,80	-	10,30	-	Moodley, Kindness, Jonnalagadda (2007)
18,22	65,33	4,85	8,72	695,73	Santos (2008)
15,60	61,00	7,79	17,12	680,20	Queiroga Neto et al. (2009)

Fonte: Santos (2012)
- Não determinado

As castanhas quebradas perdem aproximadamente 40% do seu valor comercial em comparação com aquelas tipo exportação. Entretanto, podem ser utilizadas para produzir óleo por prensagem mecânica, além de inúmeros outros usos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (FREITAS e VENÂNCIO, 2011).

O resíduo da extração do óleo, conhecido como torta desengordurada tem aplicações na indústria alimentícia e, tradicionalmente é utilizada para obter o “leite de castanha”, um extrato aquoso que é utilizado em inúmeras preparações e iguarias regionais. O óleo é composto por uma mistura complexa de triglicerídeos, e os demais elementos são geralmente compostos de ácidos graxos livres, monoglicerídeos, diglicerídeos além de tocoferóis, carotenóides em esteróis pequenas concentrações. A relação entre os saturados, monoinsaturados e poli-insaturados é de 25:41:34. Isto significa que teor de gordura saturada em castanha é mais elevado do que em qualquer outra amêndoa. A castanha-do-brasil também é uma rica fonte de vitamina B1 e vitamina E, e uma boa fonte de Niacina e cálcio e ferro (RODRIGUES et al., 2005; USDA, 2008).

2.5 PROTEÍNAS VEGETAIS

O estudo de novas fontes protéicas com o objetivo de utilizar suas propriedades funcionais no processamento de alimentos pode ser justificado por razões de ordem econômica e tecnológica. Uma dessas fontes com grande potencial de utilização é o resíduo do processamento industrial de empresas alimentícias como, por exemplo, lentilha (NEVES; LOURENÇO, 1995), tremoço (LQARI et al., 2002), amaranto (ABUGOCH et al., 2003), tomate (LIADAKIS et al., 1995), entre outros.

As proteínas de origem vegetal fornecem 65% do total de proteínas ingeridas no mundo inteiro, e até 50% deste valor é representado pelos grãos dos cereais, fato este mais relevante em países em desenvolvimento, onde os cereais são a principal fonte protéica na dieta da maioria da população (SCHMIDT, 2011).

Um considerável número de matérias-primas pode ser utilizado como fonte de proteínas para a produção de alimentos, desde as sementes oleaginosas, como a soja, algodão, milho, girassol, cereais como trigo e as leguminosas, bem como as

proteínas de origem microbiana e as folhas em geral. A soja (*Glycine max*) é tida como alimento quase completo, contém aproximadamente 40% de proteínas de alta qualidade, 20% de lipídeos e 35% de carboidratos, teores consideráveis de vitaminas do complexo B e minerais como magnésio, fósforo, ferro e zinco (CARRÃO-PANIZZI, 2000; MORAES et al., 2006) citados por Vallim (2011). O grão foi, inicialmente, cultivado para extração de óleo e de componentes para ração animal, teve seus produtos proteicos (farinha, concentrados e isolados) utilizados em grande escala na última década pela indústria de alimentos. Recentemente, tem sido pesquisada como fonte de fitoquímicos, principalmente as isoflavonas. Os efeitos das proteínas e das isoflavonas da soja sobre doenças cardiovasculares, hipercolesterolêmicas, câncer, diminuição dos efeitos da menopausa têm sido avaliados e comprovado que estes compostos apresentam-se como os responsáveis pelas características benéficas da soja em humanos (ZHANG, 2003; ROSELL, et al., 2004; TORRES et al., 2005) citados por Vallim (2011). A utilização de novas fontes, de custos menores, que possam substituir ou simular alimentos protéicos tradicionais depende do conhecimento das propriedades funcionais das suas proteínas e do seu comportamento em determinado sistema alimentar.

As proteínas vegetais devem ganhar bastante espaço em alimentos, desde que apresentadas aos consumidores em formas mais atraentes com relação ao gosto, sabor, textura e outras qualidades desejadas. Para isso existe a necessidade do conhecimento de propriedades não-nutricionais que influem no comportamento durante o processamento, estocagem e preparação de ingredientes alimentares, influenciando na aceitação e no consumo do produto final (EL NASRI; EL TINAY, 2007).

A saúde de uma população tem como requisito à ingestão de alimentos que ofereçam quantidade suficiente de nutrientes qualitativamente necessários para o seu crescimento e manutenção de suas necessidades metabólicas básicas. A provisão de alimentos no mundo, principalmente proteínas, está precária e se a população continuar crescendo como previsto, 7 a 8 bilhões no século XXI, faltas localizadas serão antecipadas (FAO, 2010). Além da melhor distribuição de alimentos, solução do âmbito político-social, há necessidade de aumentar-se a quantidade de alimentos protéicos, através, principalmente, da maior e melhor utilização de fontes protéicas não convencionais ou subutilizadas.

O primeiro estudo científico descrito foi o isolamento do glúten do trigo em 1745 e as globulinas de castanha-do-brasil foram cristalizadas em 1859 (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995), no entanto estudos detalhados das proteínas de reserva já foram relatados a partir de 1924 quando T.B. Osborne desenvolveu um sistema classificatório baseado na solubilidade das proteínas durante o processo de extração, amplamente utilizado até os dias atuais. Quatro grupos foram definidos: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas os quais são solúveis em água, solução salina, álcool e solução alcalina, respectivamente (OSBORNE et al., 1914; LANDRY et al., 2000).

De acordo com a sua solubilidade (DELCOUR; HOSENEY, 2010), e com essa classificação, tem-se uma ideia da composição de aminoácidos que as sementes vegetais possuem. As albuminas são ricas em aminoácidos cisteína, glutamina e arginina (BARTOLOMÉ et al., 1997). Albuminas e globulinas, denominadas proteínas citoplasmáticas são formadas por uma série de proteínas com alta quantidade de lisina, têm funções metabólicas e estruturais e localizam-se, principalmente, no embrião e nas células de aleurona, que envolvem o endosperma. Essas frações protéicas representam de 3 a 5% e 10 a 20% respectivamente, do conteúdo de proteína total (SCHMIDT, 2011). Já as globulinas são caracterizadas pelos altos níveis de arginina, glutamina e asparagina. No entanto, elas são pobres em aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína (HIGGINS, 1994). As prolaminas são encontradas em cereais e possuem alto teor de prolina. Prolaminas são as principais proteínas de reserva dos cereais, representando cerca de 50% do conteúdo total de proteínas, com exceção para aveia e arroz que contém cerca de 10% desta fração (SHEWRY; TATHAM, 1990). Encontram-se, principalmente, no endosperma e tem função de prover nitrogênio durante a germinação e estágios primários de crescimento das plântulas. Supõe-se que as prolaminas pertencem a uma família antiga e difundida de proteínas de reserva denominada “superfamília das prolaminas”, que antecede a origem evolutiva das gramíneas (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995; SCHMIDT, 2011). As glutelinas, ricas em prolina e glutamina, são exemplos típicos a glutelina do trigo e do arroz (SHEWRY; TATHAM, 1990; SCHMIDT, 2011). As glutelinas são estruturalmente semelhantes às prolaminas, entretanto, não são solúveis em álcool uma vez que formam polímeros de alto peso molecular estabilizados por pontes dissulfeto intercadeias. Encontram-se, principalmente, no endosperma, contém cerca de 5% de lisina e representam

uma fração importante variando de 35 a 45% do conteúdo total de proteína (SHEWRY; TATHAM, 1990).

As proteínas de oleaginosas, grãos, leguminosas, peixes, microrganismos, algas, folhas e até a utilização de subprodutos da indústria da carne tem sido propostos para aumentar o suprimento de proteínas e o valor nutricional dos alimentos (FAO, 1982). A castanha-do-brasil destaca-se por ser uma das maiores fontes de proteína de origem vegetal cuja constituição é rica em aminoácidos ricos em enxofre, como metionina (18%) e cisteína (8%), além de conter todos os aminoácidos essenciais recomendados pela FAO/WHO (SRUR, 1976; SOUZA, 2003; SANTOS, 2008; QUEIROGA-NETO et al., 2009). Altenbach et al. (1987, 1992) utilizaram a 2S albumina de castanha-do-brasil que é rica em metionina (YOULE; HUANG, 1981) para elevar além de 30% o conteúdo desse aminoácido em sementes de tabaco. A caracterização de propriedades das proteínas da castanha-do-brasil tipo *broken* resultante do processo de desidratação para obtenção de amêndoas para exportação é necessária para fundamentar os estudos básicos e aplicados.

2.6 AMINOÁCIDOS

A proteína considerada de boa qualidade ou de alto valor biológico é aquela que fornece maior digestibilidade e quantidades adequadas de aminoácidos essenciais (MORALES DE LEON et al., 2005; PIRES et al., 2006). Nas proteínas são encontrados, normalmente, 20 aminoácidos, que formam sua espinha dorsal. São eles: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina (SCHIMIDT, 2011). 'Para o ser humano, são essenciais os aminoácidos isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina. A ausência ou a deficiência de um aminoácido interfere de tal forma no processo de constituição da proteína que pode levar à caracterização da dieta como aprotéica (SZARFARC et al., 1980).

A quantificação do teor protéico é um parâmetro essencial para a determinação do valor nutricional dos alimentos. A metodologia mais utilizada é a determinação indireta através do teor de nitrogênio orgânico total, utilizada há mais

de um século e que leva o nome de seu criador, o químico Johan Gustav Kjeldahl. Porém, o método Kjeldahl não é capaz de diferenciar o nitrogênio orgânico do nitrogênio protéico, fato que acabou por permitir fraude. A adição de melamina em alimentos, com a finalidade de promover o aumento no teor de nitrogênio total, é um exemplo que, devido à sua toxicidade, causou sérios problemas de saúde pública, em especial na China onde a adulteração de leite e derivados causou milhares de casos de contaminação. Métodos alternativos capazes de detectar fraude tem sido de grande demanda, e uma alternativa é a determinação dos aminoácidos contidos nas proteínas.

A análise dos aminoácidos é uma metodologia complexa e demorada, no entanto, fornece informações adicionais no que diz respeito à qualidade da proteína presente no alimento, que para ser biologicamente de boa qualidade necessita de um bom balanço dos aminoácidos essenciais (LEHNINGER, 2006). Reduções substanciais em tempo de análise, com aumento da precisão, foram observados com a introdução da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

O estudo detalhado de uma proteína exige métodos e técnicas que permitam sua purificação, separação e determinação de suas propriedades, sendo essencial uma extração pura. Os métodos atualmente disponíveis permitem a separação das proteínas utilizando propriedades que variam de uma proteína para outra, incluindo-se tamanho, carga e propriedades de ligação (LEHNINGER, 2006). A primeira etapa em qualquer procedimento de purificação é o rompimento das células para liberar suas proteínas em uma solução denominada extrato bruto. O extrato bruto deve ser submetido a tratamentos para separar as proteínas em diferentes frações baseadas em propriedades como tamanho ou carga, conhecido como fracionamento. As etapas iniciais do fracionamento incluem diferenças na solubilidade, uma função complexa do pH, temperatura, concentração salina entre outros fatores. A solubilidade de uma proteína quase sempre diminui à medida que a concentração salina é aumentada (*saltin out*), podendo precipitar seletivamente algumas destas, enquanto outras permanecerão em solução (LEHNINGER, 2006).

Segundo o mesmo autor, a solução que contém a proteína de interesse deve ser alterada antecipadamente às etapas iniciais de purificação, por exemplo,

procedimentos como a diálise, que permite a separação das proteínas dos solventes beneficiadas pelo seu tamanho maior. O extrato parcialmente purificado é colocado em um saco ou membrana semipermeável, que é suspenso em uma quantidade muito maior de solução tampão de força iônica apropriada. Essa membrana permitirá a troca do sal e tampão, não das proteínas. Resulta que, a diálise retém as proteínas grandes no interior da membrana, ao mesmo tempo permite que a concentração dos outros solutos na preparação da proteína se altere até atingir o equilíbrio com a solução do lado de fora da membrana.

Vários métodos podem ser utilizados para purificar uma proteína, desde precedentes estabelecidos ou senso comum. A escolha do método é um tanto quanto empírica e muitos protocolos devem ser testados previamente, uma vez que inúmeros destes já foram publicados e disponibilizados para diferentes proteínas (LEHNINGER, 2006).

Uma importante técnica para separar proteínas é baseada na migração das proteínas carregadas em um campo elétrico, denominada eletroforese. Os procedimentos utilizadas nesta técnica não o são para purificar proteínas em grandes quantidades, pois os métodos eletroforéticos afetam adversamente a estrutura e a função das proteínas além de existirem técnicas mais simples para esse propósito. Como método analítico, a eletroforese tem a vantagem de permitir a visualização das proteínas separadas, além de estimar rapidamente o número de diferentes proteínas em uma mistura ou grau de pureza de uma preparação proteica particular.

A eletroforese de proteínas é realizada em géis feitos de polímeros de poliacrilamida, que atua como uma peneira molecular, reduzindo a migração das proteínas em proporção aproximadamente à sua razão massa-carga. O SDS liga-se à maioria das proteínas em quantidades proporcionais ao peso molecular da proteína, na razão de uma molécula de SDS para dois resíduos de aminoácidos, contribuindo com uma carga negativa, tornando a carga da proteína insignificante e conferindo-lhe uma razão carga-massa semelhante. O SDS quando ligado altera a conformação nativa das proteínas tornando-as semelhantes. Dessa forma, contribui para separar as proteínas na base de sua massa (peso molecular), com os polipeptídeos menores migrando mais rapidamente.

Após a eletroforese, a visualização das proteínas se dá pela adição do corante azul de Comassie, que se liga às proteínas, mas não ao gel. É possível

acompanhar o progresso de um procedimento de purificação de uma proteína como diminuição do número de bandas proteicas visíveis no gel após cada nova etapa do fracionamento.

Quando se compara com as posições que migram as proteínas de peso molecular conhecidas no gel, a posição de uma proteína não identificada fornece uma ótima medida do seu peso molecular (LEHNINGER, 2006).

2.8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A técnica DTA (Análise térmica diferencial) demonstra a diferença de temperatura entre a substância e um material de referência (estável termicamente) em função da temperatura sob condições determinadas, sob a forma de curvas (DSC) pelas quais é possível medir a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência em função da temperatura, tanto em condições de aquecimento quanto de resfriamento. Consequentemente, a temperatura e energia associada aos eventos, tais como fusão, calor específico, transição vítrea, cristalização, sublimação, decomposição e transições cristal líquido, podem ser avaliadas por essas técnicas.

A análise térmica constitui um grupo de técnicas de grande interesse na caracterização de alimentos, visto que proporcionam dados relevantes ao processamento industrial de substâncias alimentícias, em um tempo relativamente curto e com certa especificidade quando associada a outras técnicas. A maioria dos alimentos sofre variações de temperatura durante sua produção, transporte, estocagem, preparação e consumo. Essas mudanças de temperatura causam alterações nas propriedades físico-químicas dos alimentos, influenciando nas propriedades do produto final, tais como sabor, aparência, textura e estabilidade (RAEMY, 2003). As reações químicas como hidrólise, oxidação ou redução, promovem mudanças físicas como evaporação, fusão, cristalização, agregação ou geleificação. A melhor compreensão da influência da temperatura nas propriedades dos alimentos permite a otimização das condições de processos e melhoramento da qualidade do produto final (SILVA et al., 2006).

Boye et al. (1996) relataram que mudanças na proteína a partir de uma conformação nativa para uma condição desnaturada aparecem, em conjunto com a

interrupção de inter e intraligações moleculares. Este processo ocorre de forma cooperativa e depende de vários fatores tais como a natureza da proteína, a concentração, atividade de água, temperatura, pH e força iônica. Essas mudanças podem afetar a sua funcionalidade e eventual utilização em sistemas alimentares.

Nas indústrias alimentícias são agregados processos de aquecimento e resfriamento, como por exemplo, pasteurização, esterilização, cozimento, secagem, resfriamento e congelamento, onde a análise térmica reúne técnicas apropriadas ao controle de qualidade (AMORIM et al., 2004; MAGOSHI et al., 2002; RAEMY, 2003; ROOS, 2003; SCHIRALDI; FESSAS, 2003). DSC (Diferential Scanning Calorimetry) e TG/DTG (Termogravimetria/Termogravimetria derivada) têm sido aplicadas ao estudo de isolados proteicos (FONTANARI et al., 2005; MOHAMED, 2002; ORTIZ; WAGNER, 2002), propriedades térmicas de filmes preparados a partir de isolado protéico (prolamina) de sementes de arroz, trigo e soja associado com as técnicas auxiliares (*X - ray diffraction - XRD* e *infrared - IR*) (MAGOSHI et al., 2002), e de sistemas alimentares concentrados, baixo conteúdo de água e alimentos congelados (ROOS, 2003) procurando entender as relações entre as propriedades dos alimentos e variações no parâmetro qualidade.

Em relação à castanha-do-brasil, existem recentes estudos disponíveis (SANTOS, 2012) que tratam especificamente do comportamento térmico da torta e do óleo para utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosméticos entre outras. Para a discussão dos resultados encontramos apenas um trabalho específico sobre castanha-do-brasil. No entanto, nada é encontrado para isolados protéicos.

2.9 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os antioxidantes naturais de óleos vegetais apresentam potencial efeito na prevenção de doenças crônicas, pois são capazes de proteger sistemas biológicos contra a ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, responsáveis por danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (SZYD OWSKA-CZERNIAK et al., 2008; RAMADAN; MOERSEL, 2006). A composição físico-química de óleos vegetais pode determinar a sua capacidade antioxidante total que pode estar, por sua vez, associada a atributos de qualidade dos óleos, especialmente a sua bioatividade e possivelmente a sua estabilidade oxidativa. A área da saúde, através de estudos clínicos e epidemiológicos tem demonstrado evidências de que

antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (SHAHIDI, 2004). Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos. A classe de compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem os tocoferóis, os compostos fenólicos e os taninos. Antioxidantes fenólicos são antioxidantes primários que agem como terminais para os radicais livres (SUN, 2002).

Compostos fenólicos solúveis encontram-se compartimentalizados no interior dos vacúolos celulares (BECKMAN, 2000), na forma livre ou conjugada, enquanto os fenólicos insolúveis encontram-se ligados a estruturas da parede celular, esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécnicos ou hemicelulósicos (FAULDS; WILLIAMSON, 1999). Os ácidos fenólicos livres representam a menor parte dos compostos fenólicos e são solúveis em soluções aquosas-orgânicas, como metanol, etanol ou acetona (TIAN; NAKAMURA; KAYAHARA, 2004). Os compostos fenólicos conjugados freqüentemente encontram-se sob a forma de ésteres e amidas, raramente ocorrendo como glicosídeos, incluem compostos de baixo peso molecular, solúveis em água, presentes no citosol, ou formas lipossolúveis, associadas às ceras da superfície da planta (KARAKAYA, 2004).

Nozes têm sido identificadas como sendo ricas fontes de antioxidantes (HALVORSEN et al., 2002; WU et al., 2004). Fitoquímicos, incluindo fenólicos (taninos, ácido gálico e curcumina), flavonoides (luteolina, quercetina, miricetina, kaempferol e resveratrol), isoflavonas (genisteína e daidzeína), terpenos e tocóis estão presentes em diferentes nozes (BRAVO, 1998; KRIS-ETHERTON et al., 2002). Compostos fenólicos têm atraído considerável atenção devido ao seu alto potencial em benefícios à saúde. Eles têm demonstrado ação antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, anti-inflamatória e vasodilatadora (BREINHOLT, 1999; DUTHIE et al., 2000; SHAHIDI e NACZK, 2004).

Compostos fenólicos em nozes e amêndoas estão presentes nas formas livre, esterificada ou ligada. Os ácidos fenólicos podem formar tanto ligações éter e éster, devido à sua natureza bifuncional, devido às reações que envolvem seus grupos carboxílicos e hidroxila, respectivamente, o que lhes permite formar ligações cruzadas com macromoléculas da parede celular (YU et al., 2001). Fenólicos ligados

podem ser liberados por meio de tratamento alcalino, ácido ou enzimático das amostras antes da extração (ANDREASEN et al., 2001; KRYGIER et al., 1982).

A película marrom e a casca rígida de castanha-do-brasil são subprodutos da quebra e processo de beneficiamento. No entanto, esses subprodutos podem ser fontes potenciais de antioxidantes naturais e ingredientes para alimentos funcionais. As amêndoas são fontes de nutrientes como proteínas, fibras, minerais (cálcio, ferro, potássio, zinco, cobre, magnésio, fósforo), arginina, vitaminas (niacina, tiamina), vitamina B6, vitamina E. A amêndoa fresca de castanha-do-brasil consiste de 70% de lipídios e 17 % de proteínas. Também é fonte substancial de niacina, vitamina E, vitamina B6, cálcio, ferro, potássio, zinco, cobre, arginina e flavonoides na torta, além de ser uma extraordinária fonte de selênio - 126 ppm na torta desengordurada (CHUNHIENG et al., 2004).

Embora existam um considerável número de literaturas descritivas sobre ecologia e fenologia da árvore da castanha-do-brasil e composição bioquímica das castanhas (CHUNHIENG et al., 2004; COLLINSON et al., 2000; MORI, 1992), pouco tem sido documentado sobre o conteúdo fenólico e capacidade antioxidante da amêndoa e seus subprodutos, casca e película marrom. O conteúdo de compostos fenólicos totais em castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculada foi investigada, o que poderá ajudar a compreender melhor sua capacidade como agente antioxidante.

2.10 ÓLEO DE CASTANHA-DO-BRASIL E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Nas últimas décadas, muitos esforços têm sido realizados com o intuito de preparar alimentos de alta qualidade, com baixo teor de lipídeos e sem perda significativa de suas propriedades organolépticas. No caso específico das sementes oleaginosas, a remoção de seus lipídeos ou o seu desengorduramento é realizada, basicamente por três métodos: remoção mecânica, remoção química e remoção com fluidos supercríticos.

Na atualidade é crescente a preocupação dos consumidores em reivindicar produtos ecologicamente corretos que associem qualidade e preservação do meio ambiente. Com este conceito, tecnologias que se preocupam com a qualidade de vida vêm sendo desenvolvidas com ênfase, como é o caso do processo de extração

que não utiliza solventes e ou processos que agridam a matéria-prima ou resultem em efluentes tóxicos.

A extração de óleos por uso de solventes orgânicos é um dos métodos mais comumente utilizados para extrair o óleo de sementes. Entretanto tal método apresenta um inconveniente: a necessidade de eliminação dos resíduos de solvente orgânico do óleo, além da possibilidade de ocorrer a degradação térmica dos ácidos graxos poliinsaturados contidos na semente, dependendo das condições de temperatura utilizadas na extração convencional (BOZAN; TEMELLI, 2002).

A remoção mecânica é efetuada com a utilização de prensas. Este tipo de remoção, no entanto, não extrai com eficiência o óleo das sementes, o que leva a produção de um coproduto com teor lipídico muito acima do recomendado (no máximo, até 5% de óleo residual) (MORETTO e FETT, 1998). Para minimizar este problema, duas técnicas têm sido utilizadas: a remoção mecânica tradicional associada à remoção mecânica sob alta pressão (prensagem hidráulica) ou a remoção mecânica seguida por uma remoção química. Na remoção mecânica tradicional, faz-se necessário o aquecimento prévio das amêndoas, o que pode promover a rancificação dos óleos, um processo de deterioração decorrente da exposição a altas temperaturas (MORETTO e FETT, 1998). Com a prensagem hidráulica, é possível reduzir em até 95% o teor de lipídeos na farinha. Todavia, esta técnica requer um investimento significativo em equipamentos e mão de obra especializada.

Na remoção química, a obtenção da matéria oleosa é feita por meio de solventes. O solvente utilizado é, geralmente, o hexano, com ponto de ebulição próximo a 70°C. As sementes devem ser trituradas e laminadas o máximo possível, para facilitar a penetração do solvente. O óleo que aparece no material submetido à extração apresenta-se em duas formas: 1) na forma de uma camada ao redor das partículas das sementes trituradas e laminadas, que é recuperado por processo de simples dissolução; e 2) contido em células intactas, que é removido do interior destas por difusão. Como resultado, a extração química consiste em dois processos: um deles rápido e fácil, o de dissolução, e o outro, mais demorado, dependente de difusão da mistura de óleo e solventes através da parede celular semipermeável. Assim, durante o processo de extração, a velocidade do desengorduramento da semente é no começo muito rápido, decrescendo significativamente com o decurso do processo. Além disso, este processo apresenta outras desvantagens como o

emprego de temperaturas elevadas, que devem ser próximas ao ponto de ebulição do solvente; a inflamabilidade, toxicidade e custos elevados e a possibilidade de obtenção de um coproduto com pouca aceitabilidade no mercado em função de alterações no seu sabor e odor. A vantagem é o conteúdo de óleo encontrado no coproduto após a extração com solvente: ao redor de 0,5 a 0,6% (MORETTO e FETT, 1998).

O processo de extração com fluido supercrítico vem sendo apontado como uma alternativa aos métodos de extração mecânico e químico (HARTMAN e LAGO, 1996). Fluidos supercríticos exibem propriedades físico-químicas intermediárias às de um líquido e um gás, o que aumenta sua atuação como solvente. Sua densidade relativamente alta confere bom poder de solvência, enquanto seus valores de difusividade alto e viscosidade baixo proporcionam poder de penetração apreciável na matriz do soluto. Vários estudos têm demonstrado que é vantajoso usar fluidos supercríticos, particularmente o dióxido de carbono (CO_2), para extrair óleos de sementes pelo fato do CO_2 ser atóxico, não inflamável, não corrosivo e facilmente removido dos produtos extraídos. Sua pressão crítica é moderada (73 atm), o que diminui os custos de compressão. Sua temperatura crítica é relativamente baixa (31°C), possibilitando a extração de compostos instáveis termicamente (HAWTHORNE, 1990; RIZVI et al., 1986). Lameira et al. (1997) utilizaram CO_2 supercrítico para remover lipídeos da amêndoa de castanha de caju. Nas condições experimentais utilizadas, frações de lipídeos que foram extraídas com o CO_2 supercrítico possibilitaram a produção de uma farinha com um baixo conteúdo de calorias e sem resíduos. Os autores, no entanto, não apresentam os valores quantitativos no que se refere ao teor lipídico residual.

Embora a castanha-do-brasil possua potencialidade para amplo uso agroindustrial, escassas são as literaturas que abordam métodos específicos para o seu desengorduramento utilizando CO_2 supercrítico, sendo encontrada apenas uma pesquisa nesse tema. O estudo foi conduzido para avaliar os parâmetros de extração utilizando três métodos distintos (extração com solvente hexano, prensagem hidráulica e com CO_2 supercrítico). Entre outros resultados, concluiu-se que as duas últimas formas de extração foram mais eficientes em termos de rendimento. Ficou demonstrado também que houve diferenças significativas entre as formas de extração utilizadas com relação a qualidade do óleo para acidez e índice de peróxidos e coloração. O perfil de ácidos graxos mostrou diferenças

significativas entre os métodos utilizados sendo que, na extração com CO₂ supercrítico os teores de ácidos mirístico e láurico ficaram acima da média das demais formas de extração. Quanto aos ácidos graxos essenciais, a prensagem hidráulica e a extração com CO₂ supercrítico apresentaram resultados semelhantes em sua qualidade nutricional e funcional (SANTOS, 2012).

Assim, podemos afirmar que em relação à castanha-do-brasil, existem poucos estudos disponíveis que tratam especificamente da eficiência dos métodos de extração do óleo da amêndoa para a obtenção da torta e farinha desengordurada.

2.11 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES DO ÓLEO DE CASTANHA-DO-BRASIL

Os óleos e gorduras são substâncias de origem vegetal, animal ou microbiana, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio, hexano, benzeno e álcoois (CECHI, 1999). São formados, principalmente, por triacilgliceróis, resultantes da combinação entre três moléculas de ácido graxo e uma molécula de glicerol (MORETTO; ALVES, 1986; MORETTO; FETT, 1998; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os óleos vegetais são substâncias graxas de natureza triglicerídica ou não, e estão presentes em organelas celulares de frutos ou sementes oleaginosas chamadas esferossomos. As partículas intracelulares, denominadas esferossomos, foram observadas em células de plantas por microscopia eletrônica. A afinidade de esferossomos por manchas lipofílicas e abundância relativa destas partículas no tecido de armazenamento de sementes oleaginosas indicam que estes podem conter reservas lipídicas em células vegetais (JACKS, 1967).

Os óleos e gorduras são importantes componentes da dieta, fornecendo ácidos graxos essenciais ao organismo, funcionam como precursores para inúmeros compostos biologicamente ativos, atuam no sistema de transporte de vitaminas (A, D, E e K) além de possuírem elevado valor energético (MOREIRA, 1999; AIKAWA, 2004) apud Galvão (2009).

O mercado de alimentos funcionais e nutracêuticos têm crescido rapidamente nos últimos anos e pesquisas objetivando componentes lipídicos bioativos tais como ácidos graxos poliinsaturados (especialmente os ω -3), fitosteróis,

tocoferóis e tocotrienóis têm sido muito incentivadas. São vários os alimentos atualmente estudados com o intuito de agregar princípios funcionais na alimentação dos indivíduos. Dentre os alimentos em destaque encontra-se a castanha-do-brasil, que vem sendo muito pesquisada pela sua composição e a torta obtida do desengorduramento como componente de misturas de cereais matinais.

No caso do óleo para consumo humano e terapêutico, não se faz uso de solventes orgânicos, sendo que a quantidade de óleo recuperada varia de 13 a 15% para extrações realizadas a 25°C (TRUCOM, 2006). Sabe-se hoje que os óleos vegetais com concentrações mais elevadas de ácidos graxos ω -3 são mais suscetíveis ao processo de oxidação. Portanto, foi evitada a produção industrial de óleos vegetais a partir de plantas com esta característica. A maioria dos óleos vegetais consumidos possui altas concentrações de ω -6 e ω -9 e praticamente inexistem óleos de cozinha com concentrações elevadas de ω -3, sendo única exceção o óleo de linhaça (CURI et al., 2002). A produção do óleo de castanha-do-brasil é realizada, basicamente, por prensagem a frio.

Quer em escala comercial, quer em escala artesanal, os esferossomos ou vacúolos de óleo devem ser rompidos para a sua liberação. Em frutos como dendê e oliva (azeitona), normalmente o óleo é extraído por prensagem mecânica a frio ou a quente, dependendo das características do azeite que se procure produzir ou da qualidade inicial da matéria prima. Quando obtido por prensagem a frio, não se refina, pois em detrimento do rendimento do processo de extração, o azeite será bastante apreciado pelo seu aroma e gosto do fruto original. Alguns grãos com teor de óleo superior a 30%, como amendoim e algodão, também podem e já foram prensados em escala comercial para produção de óleo.

A acidez e o índice de peróxido são descritos como parâmetros referenciais para determinar a qualidade da conservação de óleos (FERREIRA et al., 2006). O óleo bruto obtido de castanhas apresenta alto teor de ácidos graxos insaturados, principalmente oléico e linoléico, o que propicia a ocorrência de reações de degradação oxidativa (ZÁCARI, 2008).

O índice de acidez é um método determina a quantidade de ácidos graxos livres que existe na amostra. Aplica-se a todo óleo bruto e refinado, além de gorduras de animais. A acidez é frequentemente expressa em termos de % de ácidos graxos livres (AOCS, 2003), sendo que o índice de acidez é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os

ácidos graxos livres em um grama de óleo. Como os ácidos graxos são ácidos fracos, é necessário usar uma base forte como hidróxido de sódio ou de potássio para titulá-los. Pelo mesmo motivo, o ponto de equivalência estequiométrica, quando titulados com uma base forte, está no lado alcalino da neutralidade (pH 7). Por isso, a acidez causada pelos ácidos graxos livres é estimada, com hidróxido de sódio ou de potássio em solução alcoólica, usando fenolftaleína como indicador (ZÁCARI, 2008).

O índice de peróxidos é um indicador muito sensível na fase inicial da oxidação, e sua presença indica que a deterioração do sabor e odor, em função de sua instabilidade, está por acontecer. Quando sua concentração atinge certo nível, mudanças complexas ocorrem, formando compostos de baixo peso molecular, oriundos de sua degradação (REGITANO-D'ARCE, 2006). Estes compostos, aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois e hidrocarbonetos, são os responsáveis pelo sabor e odor característicos de produtos rançosos. Inevitavelmente, são decompostos mesmo a temperatura ambiente, produzindo moléculas pequenas, em especial compostos carbonílicos. Em temperatura elevada, a velocidade de formação dos peróxidos é menor que a de sua decomposição. Portanto, esta medição é limitada em razão da natureza transitória do peróxido, sua decomposição em produtos secundários pode subestimar o grau de oxidação, ou seja, baixos valores podem representar o estágio inicial ou avançada oxidação (MORETTO E FETT, 1989).

O índice de peróxidos é muito usado para indicar o grau de oxidação. O valor de peróxido é a medida do teor de oxigênio reativo expresso em termos de milequivalentes de oxigênio por 1.000g de óleo ou como milimoles de peróxido por quilo de molécula graxa (1 milimol = 2 milequivalentes) (MEHLENBACHER, 1960; AOCS, 2003). As substâncias quantificadas são geralmente peróxidos e outros produtos similares, resultantes da oxidação lipídica. Aplica-se em toda gordura ou óleo (AOCS, 2003). Conforme Cecchi (2003), o índice de peróxidos é um dos métodos mais utilizados para medir o estado de oxidação de óleos e gorduras. Segundo Malacrida (2003) nos óleos não deve ultrapassar o valor de 10meq/1000g de amostra.

2.12 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos livres e o glicerol são compostos formados a partir da quebra da ponte éster dos triglicerídeos durante a reação de hidrólise (REGITANO-D'ARCE, 2006). Estes ácidos graxos (AGs) são constituídos, geralmente, por ácidos carboxílicos que podem conter de 4 a 30 átomos de carbono na sua cadeia molecular. Os AGs que ocorrem nos triacilgliceróis de óleos e gorduras, usualmente, contêm número par de átomos de carbono, porque são formados por unidades de dois carbonos e derivados de cadeia linear (MOREIRA, 1999).

Dependendo de vários fatores, como o estado de conservação do grão do qual foi extraído, processo de extração e presença de enzimas hidrolíticas, um óleo pode apresentar maior ou menor teor de ácidos graxos livres, isto é, ácidos graxos não esterificados a glicerina (AOCS, 2003).

A composição de ácidos graxos obtida por GLC (GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY) demonstrou alto nível de instauração (75,6%) no óleo de castanha-do-brasil, devido essencialmente aos C18:1 (39,3%) e C18:2 (36,1%) como mostra a Tabela 2. Estes valores são aproximados aos encontrados por ASSUNÇÃO (1984) e CHUNIENG et al., (2008). Esses valores são mais baixos do que os reportados em óleo de oliva (83,3%), amêndoas (87,0%) e nozes (83,0%). A percentagem de ácido graxo linoléico (18,2%) é mais elevada do que em óleo de amêndoas e de oliva. A alta instauração dos ácidos graxos e a alta quantidade de ácido linoléico presentes no óleo de castanha-do-brasil a torna uma interessante fonte em termos de propriedades para uma dieta saudável.

A caracterização dos ácidos graxos (AG) se faz importante para determinar a identidade e qualidade de óleos comestíveis. A cromatografia gasosa (CG) tem sido amplamente utilizada na análise dos AG em óleos e gorduras. A determinação analítica inclui uma etapa de preparação da amostra, onde os AG por apresentarem baixa volatilidade e estabilidade térmica, requerem uma etapa adicional de derivatização, onde os grupos carboxílicos são convertidos em grupos mais voláteis como trimetilsilil-ésteres ou metil-ésteres (TAVARES et al., 2003; PESTANA, 2007).

TABELA 2. Composição de ácidos graxos (%) do óleo de castanha-do-brasil determinado por GLC em comparação com outros óleos

Ácidos Graxos	Amêndoas (%)	Nozes (%)	Oliva (%)	Castanha-do-brasil (%)	Castanha-do-brasil (%)*
C 12:0				0,2 ± 0,005	
C 14:0				0,2 ± 0,005	
C 16:0	9	9	13,9	13,0± 0,12	12
C 16:1			1,5	0,2± 0,05	
C 18:0			2,8	11,0±0,15	10,4
C 18:1	73	19	71,8	39,1±1,1	41,2
C 18:2	14	64	9,0	36,1	36,1
C 18:3	14	64	9,0	36,1±1,1	36,1
Insaturados	87,0	83,0	83,3	75,6	77,3
FFA					

FONTE: Chunhieng et al. (2008)

*Assunção et al. (1984)

2.13 MICROSCOPIA ÓPTICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A compartimentação de lipídios em plantas está geralmente associada com tecidos de sementes, onde triacilgliceróis (TAG) armazenados no interior de gotículas lipídicas (LDs – lipid droplets; ODs – oil droplets; OBs – oil bodies) atuam como um elementos fisiológicos essenciais e energia de reserva de carbono durante o crescimento pós-germinativo. No entanto, alguns não-tecidos de sementes, tais como folhas, flores e frutos, também sintetizam e armazenam TAGs. Dessa forma, ainda relativamente pouco se sabe sobre a formação ou a função de LDs, ODs ou OBs nestes tecidos (MURPHY, 1993; MURPHY, 2011).

Os esferossomos possuem uma barreira de membrana incomum, que separa os triacilgliceróis do citoplasma aquoso. Uma camada única de fosfolipídeos (ou seja, uma meia bicamada) circunda o corpo lipídico, com as extremidades hidrofílicas dos fosfolipídeos expostos ao citossol e as cadeias hidrofóbicas de hidrocarbonetos acil voltados para o interior de triacilgliceróis. O corpo lipídico é

estabilizado por proteínas específicas, principalmente oleosinas, que preenchem a superfície e impedem que os fosfolípidos de corpos lipídicos adjacentes entrem em contato e se fusionem (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Essa estrutura de membrana incomum dos corpos lipídicos é resultante do padrão de biossíntese dos triacilgliceróis. A biossíntese de triacilgliceróis nas membranas do retículo endoplasmático, acumulando-se as gorduras resultantes entre duas monocamadas da bicamada da membrana do retículo endoplasmático. A bicamada intumesce e se separa à medida que mais gorduras são adicionadas à estrutura em crescimento e, assim, um corpo lipídico maduro desprende-se do retículo endoplasmático (NAPIER et al., 1996).

Essas partículas intracelulares, chamadas de esferossomos, têm sido observadas por microscopia ótica e por microscopia eletrônica de transmissão. A afinidade dos esferossomos por manchas lipofílicas e a relativa abundância destes nos tecidos de reserva/armazenamento de sementes oleaginosas indica que os esferossomos contêm lipídeos de reserva nas células vegetais (JACKS et al., 1967).

O microscópio eletrônico de varredura é o mais versátil instrumento para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não-biológicas. A resolução do microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electron Microscope) é de 10 nanômetros, constituindo-se em uma ferramenta bastante importante em atividades de pesquisas. As aplicações do microscópio eletrônico de transmissão (MET) incluem desde estudo de organismos inteiros, tecidos e órgãos, até em certos casos, visualização *in situ* de organelas subcelulares (CASTRO, 2002).

2.14 TERMOGRAVIMETRIA/TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)

“Um grupo de técnicas, nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação, é medida, enquanto a amostra é submetida a uma programação de temperatura”, foi definida como Análise Térmica por Mackenzie (1979). Definição esta que foi aceita pela Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) em 1965. A Análise Térmica apresenta muitas vantagens: a possibilidade do uso de uma pequena quantidade de amostra para os ensaios, variedade de resultados em um único gráfico, normalmente não há necessidade de preparo químico de amostra e apresenta aplicação em diversas

áreas, tais como: alimentos, catálise, cerâmica, engenharia civil, farmacêutica, inorgânica, orgânica, petroquímica, vidros, polímeros, dentre outras. As técnicas Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/DTG), são descritas sucintamente a seguir.

Os primeiros métodos termoanalíticos a rigor, iniciaram-se quando o homem observou a ação do fogo sobre os materiais. A evolução da técnica se deu lentamente e os trabalhos iniciais resultaram de esforços isolados de alguns pesquisadores, empregando instrumentos rudimentares (CARVALHO-FILHO, 2000).

Posteriormente, a instrumentação termoanalítica atingiu um elevadíssimo grau de sofisticação em virtude dos progressos da ciência e tecnologia. Aliado a esses fatores, deve ser considerado a redescoberta das potencialidades de suas aplicações nos mais variados setores científicos e tecnológicos (IONASHIRO, 2004).

De acordo com IONASHIRO (2004), por definição, a análise térmica é o termo aplicado a um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação, é medida em função da temperatura ou tempo, enquanto a mesma é submetida a uma programação controlada de temperatura.

A termogravimetria derivada (DTG) correspondente à derivada primeira da curva TG. Os trabalhos mais comuns utilizam o modo não isotérmico, isto é, aquele no qual um programador submete a amostra a uma variação constante de temperatura enquanto se monitora a massa da amostra (IONASHIRO; GIOLITO, 1980; LUCAS, 2001). Para que haja uma comparabilidade nos resultados, é necessário descrever com detalhes as condições experimentais e o histórico da amostra. A forma adequada desta apresentação e uma sugestão de nomenclatura para a Língua Portuguesa, foram preparadas e apresentadas por Ionashiro e Giolito (1980). Estas sugestões são recomendadas pela Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria (ABRATEC) (IONASHIRO; GIOLITO, 1980).

Segundo Schnitzler et al. (2004), os métodos térmicos em análises estão sendo atualmente muito utilizados nas investigações científicas.

No início do século passado, foi apresentado um sistema capaz de medir continuamente a massa de um material enquanto este era submetido a uma programação controlada de temperatura. Este sistema foi descrito em 1915 denominado por Kôtarô Honda como termobalança, fazendo surgir a técnica termoanalítica e a termogravimetria (TG). O registro obtido é a curva

termogravimétrica ou a curva TG (Figura 5), onde T_i é a temperatura inicial, ou seja, a temperatura em que a mudança de massa alcança uma magnitude que a termobalança possa detectar e T_f , a temperatura final onde a massa alcança o seu valor máximo correspondendo a reação completa (LUCAS, 2001; CARVALHO FILHO, 2000; IONASHIRO, GIOLITO, 1982).

A termogravimetria (TG) - a técnica na qual a variação de massa de uma substância (Δm) é medida quando esta é submetida a uma programação controlada de temperatura. A termogravimetria derivada (DTG, Figura 5) é um recurso matemático, que fornece a derivada primeira da curva TG (GIOLITO; IONASHIRO, 1980; IONASHIRO; GIOLITO, 1982; WENDLANDT, 1986).

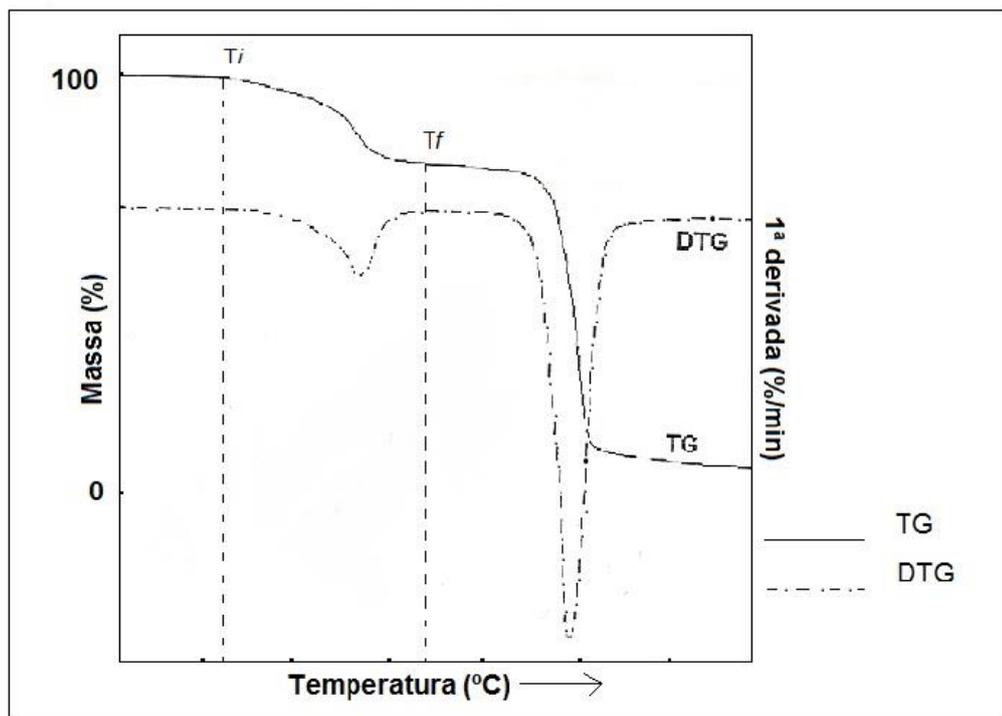


FIGURA 5. Curva de decomposição térmica de um material: (—) registro da decomposição térmica (TG); (- - -) registro da 1ª derivada da curva de decomposição térmica (DTG). Adaptado de Lucas et al (2001), pela autora.

A variação de massa que ocorre na amostra é acompanhada em função do tempo (a uma temperatura constante) ou em função da temperatura. Os resultados deste tipo de análise são curvas nas quais se observam variações de massa quando se origina produtos voláteis ou que se incorporem átomos da atmosfera gasosa,

formando um produto respectivamente mais leve ou mais pesado do que o original (LUCAS, 2001).

Essas técnicas têm sido utilizadas nas mais diversas atividades de pesquisa e ramos de aplicação, como estudos de decomposição térmica, determinação de umidade, compostos voláteis, cinética das reações, oxidação térmica, cristalização, determinação de calor específico, além do tempo de armazenamento (MONTHÉ et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Nos experimentos foram utilizadas amêndoas de castanha-do-brasil (*Bertholettia excelsa* Bonpl.) tipo *broken* e tipo *large*, oriundas da safra 2011, adquiridas junto a Cooperacre (Cooperativa Central de Comercialização Extrativista do Acre), na cidade de Rio Branco/Acre. Os lotes contendo as castanhas foram transportados via aérea até a cidade de Pelotas/RS, os quais foram levados ao Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos - LABGRÃOS, no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Universidade Federal de Pelotas, onde o experimento foi instalado. O período de armazenamento foi de outubro de 2011 a outubro de 2012, em temperatura de 16°C e as amêndoas apresentavam teor de umidade de 1,7%.

3.2 MÉTODOS

O trabalho foi dividido em dois estudos: (1) Caracterização da farinha desengordurada e isolado proteico de castanha-do-brasil e (2) Efeitos do armazenamento de amêndoas de castanha-do-brasil com película e despeliculada sobre a estabilidade e qualidade do óleo.

3.2.1. Estudo 1: CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DESENGORDURADA E ISOLADO PROTEICO DE CASTANHA-DO-BRASIL

3.2.1.1. Despeliculação das castanhas e condições de armazenamento

As castanha foram despeliculadas utilizando-se o método descrito por Sant'Anna (1985) adaptado por Felberg (2002), com modificações. Amêndoas tipo *broken* com películas (Figura 6A) foram imersas em solução de hidróxido de sódio 2%, em ebulição por 1 minuto, na proporção de 2:1 (v:m; solução de NaOH: castanha). A seguir, fez-se a drenagem da solução de soda e as amêndoas foram colocadas em água fria na proporção de 5:1 (água:castanha) por 5 minutos sob intensa agitação manual e água corrente para que ocorresse a liberação das películas. Após esta etapa as amêndoas foram imersas novamente em solução de

ácido cítrico 5% por 10 minutos para neutralizar o resíduo de hidróxido de sódio. Decorrido esse tempo, procedeu-se um teste com uma solução de fenolftaleína 1% para confirmar a ausência do resíduo de soda. Foi assumido que não havia mais resíduos de NaOH quando, ao teste de fenolftaleína as castanhas não adquiriam a coloração rósea. Por fim, as amêndoas despelculadas (Figura 6B) foram transferidas em bandejas para uma estufa com circulação de ar forçado, a 40°C durante seis horas, que após foram embaladas em embalagens aluminizadas tipo *stand pouches* com zíper, seladas a vácuo e assim comporem o experimento de armazenamento durante doze meses.

Para o experimento de armazenamento, os lotes contendo 20kg de amêndoas tipo *broken* com película e 20kg de amêndoas tipo *broken* despelculadas foram subdivididos em porções de aproximadamente 1,20kg, que foram reembalados em embalagens aluminizadas tipo *stand pouches* com zíper, seladas a vácuo e desta forma compuseram os tratamentos T1 e T2, respectivamente. As amostras foram armazenadas em temperatura de 16°C durante doze meses. Os tempos de avaliação foram 0 (testemunha), 3, 6, 9 e 12 meses, sendo 6 repetições para cada tempo.



FIGURA 6. Castanha-do-brasil tipo *broken* com película (A); castanha-do-brasil tipo *broken* despelculada (B) – Fotos: Rosana Colussi (Mai/2013)

3.2.2.1.2. Obtenção de farinha parcialmente desengordurada de amêndoas de castanha-do-brasil com película (FPD)

As embalagens contendo as amêndoas com películas e despelculadas permaneceram seladas e sob vácuo até o momento da prensagem. Abertas as

embalagens, as amêndoas foram previamente trituradas em multiprocessador. A seguir prosseguiu-se a prensagem mecânica utilizando-se prensa hidráulica (Summit, São Paulo, Brasil), com capacidade de 15kgf.cm^{-2} de pressão. Antes de iniciar a prensagem propriamente dita, tomou-se 200g de torta em um saco de tecido tipo voal, que foi depositado no porta-amostra da prensa, sobre a qual foi aplicada uma pressão máxima de 15kgf.cm^{-2} durante 15 minutos, aproximadamente. Não foi utilizado nenhum tipo de aquecimento prévio nas castanhas. A torta parcialmente desengordurada obtida foi imediatamente homogeneizada até obter aspecto de farinha e embalada em sacos tipo *stand pouches* aluminizados e mantida sob congelamento até o momento das análises.

3.2.2.1.2.1. Obtenção do isolado proteico de castanha-do-brasil (IP)

O isolado protéico de castanha-do-brasil tipo *broken* com película foi obtido baseando-se na metodologia descrita por Chunhieng et al (2004), com modificações (Figura 7). A extração da proteína total foi realizada utilizando-se 150g de farinha parcialmente desengordurada (FPD) resultante da prensagem, que foi moída em multiprocessador e peneirada (mesh 65/ 212 mm). A FPD foi homogeneizada com água destilada na proporção de 1:15 (p/v), sob agitação por 30 minutos. Para solubilização da proteína, o pH da solução foi ajustado para 10,0 com NaOH (1mol L^{-1}) sob agitação contínua com auxílio de agitador mecânico (Werke Staufen, IKA RW20 Digital, Alemanha) por 60 minutos. Depois da solubilização da proteína, a solução foi centrifugada a $7500\times g$ (Connecticut, Sorval RC-5B, EUA) a 20°C por 20 minutos para separação em duas fases. O sobrenadante foi coletado e colocado novamente em béquer de 4L a temperatura de 20°C . A seguir o pH da solução foi ajustado para pH 5,0 com HCl (1M) para a precipitação das proteínas, com homogeneização utilizando-se agitador mecânico por 30 min. Foi realizada uma segunda centrifugação nas mesmas condições descritas acima, sendo que o sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido denominou-se de isolado proteico de castanha-do-brasil (IP), que foi dialisado por 24h a 4°C , utilizando membrana de celulose com sucessivas trocas de água esterilizada. Após a diálise o material foi congelado a -85°C durante 24 horas e em seguida liofilizado por 48h. O material foi mantido a -85°C até o momento das análises.

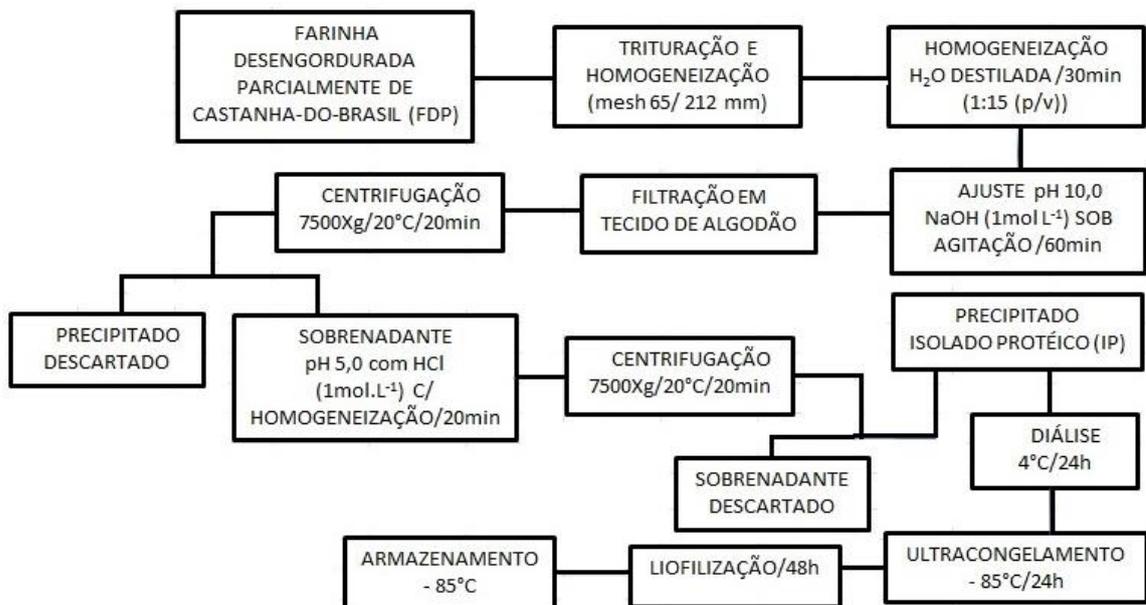


FIGURA 7. Fluxograma de obtenção do isolado protéico de castanha-do-brasil

3.2.1.2.2 Composição centesimal

Foi determinada a composição centesimal segundo os seguintes métodos:

- Umidade: segundo o método nº 920.151 da AOAC (1998), utilizando-se de secagem em estufa com circulação forçada de ar na temperatura de 105°C, até que a amostra atinja peso constante;

- Proteína bruta: segundo o método de micro Kjeldahl nº 950.48 da AOAC (1998), que se baseia na determinação da quantidade de nitrogênio total existente na amostra. O teor de proteína bruta foi calculado através da multiplicação do nitrogênio total pelo fator 5,46 (%N x 5,46);

- Lipídeos totais: de acordo com o método nº 948.22 da AOAC (1998), que consiste de extração em equipamento tipo Soxhlet usando como solvente éter de petróleo;

- Resíduo mineral fixo: o teor de cinzas foi determinado por incineração da amostra em forno mufla a 550°C, de acordo com método nº 930.05 da AOAC (1998);

- Carboidratos totais: calculados por diferença (100 g – gramas totais de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas), segundo a Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003).

3.2.1.2.3 Fracionamento das proteínas

As frações protéicas da castanha-do-brasil foram obtidas baseadas na variação do pH, como descrito por Chunieng (2004). O fracionamento foi realizado em etapas sucessivas para obter quatro frações diferentes que foram analisadas separadamente e denominadas de acordo com Osborne citado por Chunieng (2004).

Fração albuminas: a extração em água ocorreu em solução em pH 7,0. A precipitação ocorreu com o ajuste do pH para 5,0 pela adição de HCl 1 N (Figura 8).

Fração globulinas: a extração ocorreu com o resíduo da extração anterior. Uma solução de NaCl 0,5 M em pH 8,0. A precipitação ocorreu quando se ajustou para pH 5,0 adicionando-se HCl 1 N (Figura 9).

Fração prolaminas: a extração ocorreu com resíduo da extração anterior em solução de etanol 70%. A precipitação ocorreu ajustando-se para pH 5,0 com adição de HCl 1 N (Figura 10).

Fração glutelinas: a extração ocorreu com o resíduo da extração anterior. A solução de extração foi uma solução de NaOH 1 N em pH 10,0. A precipitação ocorreu ajustando-se para pH 5,0 com adição de HCL 1 N (Figura 11).

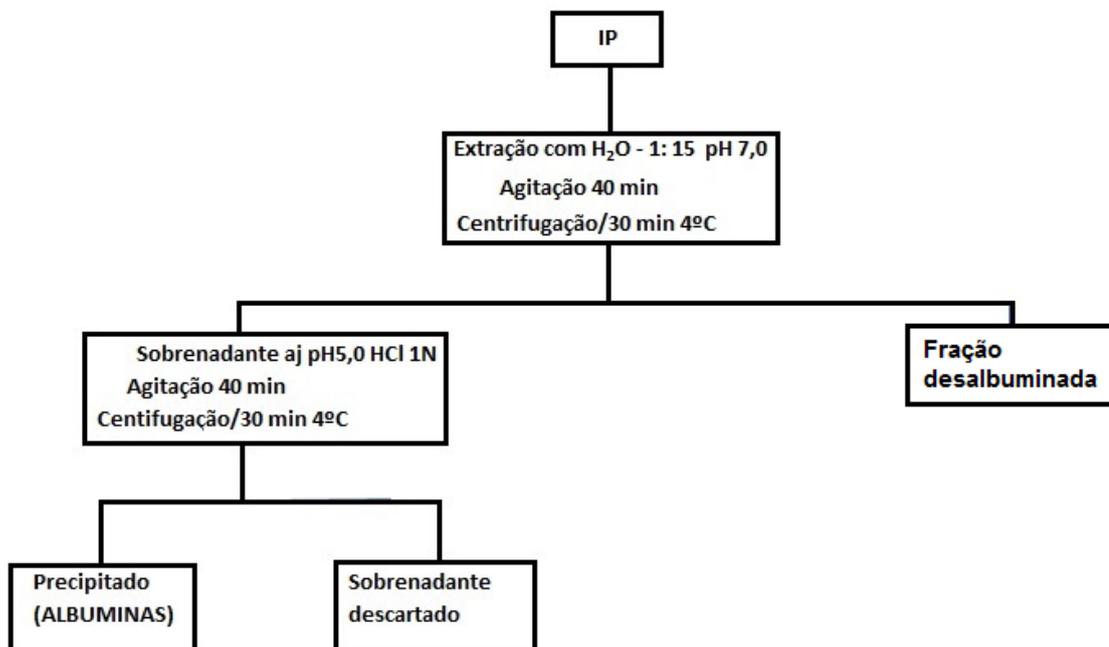


FIGURA 8. Fluxograma de fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película; parte 1- obtenção da fração albuminas

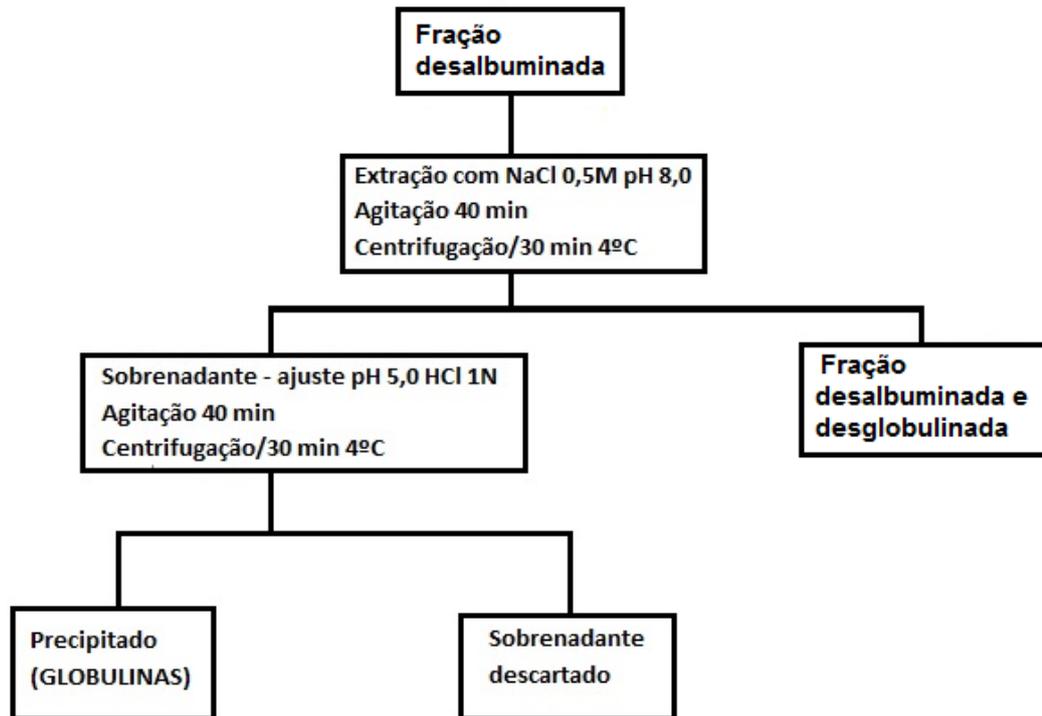


FIGURA 9. Fluxograma de fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película; parte 2 – obtenção da fração globulinas

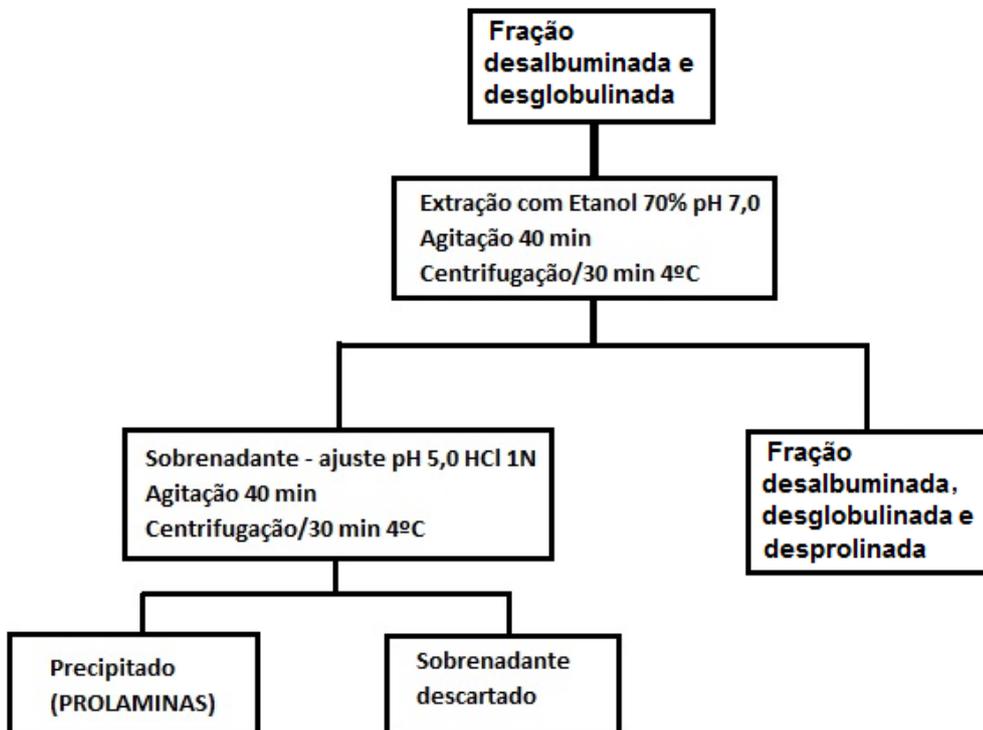


FIGURA 10. Fluxograma de fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película; parte 3 – obtenção da fração prolaminas

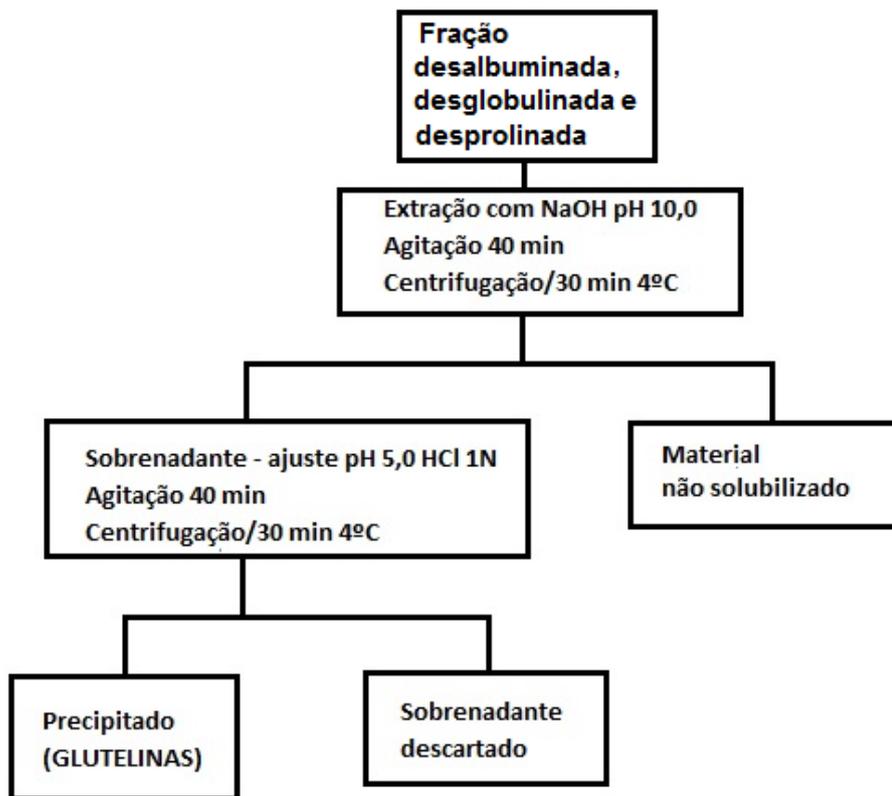


Figura 11. Fluxograma de fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película; parte 4 – obtenção da fração glutelinas

3.2.1.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

O perfil de proteínas presentes na farinha parcialmente desengordurada (FPD), isolado protéico (IP), das frações (ALB - albuminas, GLOB - globulinas, PROL – prolaminas, GLUT - glutelinas) e do material não-solubilizado (N SOLUBILIZADO) foi realizado por SDS-PAGE de acordo com método adaptado de Laemmli (1970). Para o procedimento, foi utilizado um sistema de microplacas de vidro Mini-Protean 3 System da BioRad (Oregon, Estados Unidos). O gel de resolução foi preparado com uma concentração de 15% de acrilamida e o gel de empilhamento a 4% de acrilamida, ambos com espessura de 0,75m. Dissolveram-se 3,4µg de cada um dos materiais em: 680µL (FPD, PROL), 700µL (IP, ALB, N SOLUBILIZADO), 760 µL (GLOB), 720µL (GLUT) de tampão PBS (pH 7,0) para a dissolução das proteínas. Dos materiais diluídos, foram utilizadas alíquotas de 20 µL e misturados a 680µL (FPD, PROL), 700µL (IP, ALB, N SOLUBILIZADO), 760 µL (GLOB), 720µL (GLUT) no tampão de corrida contendo 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% de SDS, 10% de glicerol, 2% β-mercaptoetanol e 0,1% de azul de bromofenol. Os tubos foram

aquecidos a 90°C por 8 minutos antes da corrida e após esse procedimento 20µL foi aplicado no gel. Em seguida, foram submetidas à eletroforese com uma voltagem inicial de 80 V que foi alterada para 100 v após a passagem das proteínas do gel de empilhamento para o gel de resolução, totalizando em 2 horas de corrida. Os pesos moleculares das proteínas foram determinados utilizando-se o padrão da NOVEX Bench Marker Ladder (10747-12) com 15 proteínas com pesos moleculares variando de 10 a 220 kDa.

3.2.1.2.4.1 Determinação do peso molecular das proteínas

O peso molecular (PM) das proteínas separadas por eletroforese foi estimado a partir do cálculo do fator de retenção (RF), o qual é baseado na relação entre a distância percorrida pela amostra e aquela percorrida pela frente de migração, como segue: $R_f = DP / DT$ (distância entre o depósito e a proteína) / DT (distância entre o depósito e a frente de migração). As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular foram depositadas paralelamente às proteínas estudadas. Um gráfico de regressão linear do log do PM das proteínas-padrão em função do seu respectivo Rf foi construído e permitiu estimar o PM das proteínas estudadas.

3.2.1.2.5 Aminoácidos

A determinação dos teores de aminoácidos na farinha desengordurada de castanha-do-brasil, no concentrado protéico, nas frações (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e no material não solubilizado do fracionamento foi realizada no laboratório privado CBO Análises Laboratoriais, Campinas, SP, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC Shimadzu, bomba LC - 20AT, Detector SPD-M20A e Injetor SIL 10AF, Kyoto, Japão). As amostras passaram por hidrólise prévia com ácido clorídrico (HCl) bidestilado 6N, seguida de derivação em pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivativos feniltiocarbamilaminoácidos (PTC-aa), em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag – 3,9x300mm), com detecção por UV a 254nm. A quantificação da amostra foi baseada na altura de cada pico de aminoácido, tendo-se usado como referência a altura do pico do padrão interno de aminoácidos com concentração conhecida, com

o padrão derivado nas mesmas condições e no mesmo tempo das amostras. Os teores de aminoácidos foram transformados para gramas por 16g de N da amostra seca. Para isso, o teor de proteína bruta (PB, g por 100g de matéria seca – MS) da amostra foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl ($N \times 6,25$), com o uso da metodologia descrita pela Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1995).

3.2.1.2.6 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As propriedades térmicas foram determinadas em calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, modelo DSC 60, Osaka, Japão). Aproximadamente 2mg de amostra foram pesados em cadinhos de alumínio (Shimadzu) e adicionados 10 μ L de tampão PBS 0,05M (pH 7,00). Os cadinhos foram hermeticamente fechados e aquecidos de 20°C até 110°C, a uma taxa de aquecimento de 5°C/minuto. Um cadinho vazio foi usado como referência. Temperatura *on-set* (T_o), pico de temperatura de desnaturação (T_p), troca de entalpia da endoderma (ΔH) representada pela área do pico foram computadas automaticamente. Os cadinhos selados contendo a farinha desengordurada, o isolado protéico, as frações e o resíduo final e o tampão foram equilibrados em temperatura de 25°C por mais de seis horas (TANG & WANG, 2010).

3.2.1.2.7 Compostos fenólicos

3.2.1.2.7.1 Obtenção do extrato

Obteve-se o extrato conforme descrito por Barreto et al. (2007) e adaptado de Kim e Jeong (2003). Para cada tempo de armazenamento, foram pesados 2 gramas das amostras de farinha parcialmente desengordurada (FPD) de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculadas e adicionados 20mL de solução metanol 80%. Deixou-se em repouso em banho com agitação a 37°C overnight. No dia seguinte, os extratos foram filtrados e adicionados 20mL de solução metanol:água (80:20) em becker sob agitação em shaker. Os extratos foram novamente filtrados por duas vezes, separadamente. Em seguida, misturou-se os três extratos obtidos (60mL aproximadamente), que foram concentrados em rotavapor à temperatura de 37°C até o volume de 25mL em balão volumétrico, onde o volume foi completado com metanol. O extrato foi colocado em freezer por uma

hora e a seguir centrifugado a 2000rpm/20 minutos e o sobrenadante coletado. A partir desse material poderão ser realizadas as reações colorimétricas para compostos fenólicos totais.

3.2.1.2.7.2. Quantificação de compostos fenólicos totais

A quantificação de teor de compostos fenólicos totais foi feita pelo método de Singleton e Rossi (1965). Para cada tempo de armazenamento e tipo de beneficiamento (com película e despeliculada), foram adicionadas alíquotas 0,02mL (20µL) e ajustados os volumes para 0,5mL (adicionando-se 0,48mL ou 480 µL de água destilada). Em seguida, adicionou-se 0,25mL (250 µL) de Folin-Ciocalteau e deixou-se repousar por 8 minutos. Transcorrido esse tempo, adicionou-se 1,25mL (1250 µL) de solução de Carbonato de Sódio 40% e agitou-se em vortex. O material foi mantido em ambiente escuro e a leitura no espectrofotômetro a 725nm foi realizada após duas contra água. Os resultados foram expressos em mgAG 100g⁻¹.

3.2.2. Estudo 2: EFEITOS DO ARMAZENAMENTO DE AMÊNDOAS DE CASTANHA-DO-BRASIL COM PELÍCULA E DESPELICULADA SOBRE A ESTABILIDADE E QUALIDADE DO ÓLEO

3.2.2.1 Método de extração de óleo

3.2.2.1.1 Obtenção de óleo de amêndoas de castanha-do-brasil

O óleo das amêndoas com películas e despeliculadas foi obtido a partir da prensagem conforme descrito no item 3.2.2.1.2, utilizando-se prensa hidráulica (SUMMIT, NEW JERSEY, USA), com capacidade de 15kgf.cm⁻² de pressão. Antes da prensagem, as castanhas de ambos tratamentos foram trituradas para facilitar a extração do óleo. Após a prensagem as tortas desengorduradas foram trituradas em multiprocessador (Arno, Mini Pratic, São Paulo, Brasil) para uniformizar a granulometria. As farinhas parcialmente desengorduradas resultantes desta etapa foram novamente acondicionadas nas embalagens tipo *stand pouches* aluminizados, que foram selados sob vácuo e armazenados sob congelamento até o momento da prensagem. O óleo obtido foi filtrado utilizando-se bomba a vácuo e em seguida

transferido para frascos de vidro âmbar e armazenados em temperatura ambiente mantida a 16°C até o momento das análises. As avaliações foram realizadas durante doze meses e o intervalo entre cada uma delas foi de três meses. O óleo obtido foi filtrado a vácuo e armazenado em frascos de vidro âmbar, identificados em cada período de análise.

3.2.2.2 Características físico-químicas e propriedades do óleo de castanha-do-brasil

3.2.2.2.1 Determinação do teor lipídico

Foi utilizado o método Soxhlet descrito pela AOCS Bc 3-49 (AOCS, 1993), expresso em porcentagem, determinado de acordo com o equipamento de extração de gordura, modelo MA 490 da marca Marconi. Esse método determina as substâncias extraídas com éter de petróleo, sob as condições do teste.

3.2.2.2.2 Índice de acidez

A determinação do índice de acidez do óleo foi realizada de acordo com o método nº 939.05 da AOAC (2000). Pesou-se 2 g de óleo em um erlenmeyer e adicionou-se 25 mL de solução de éter-álcool (2:1) previamente neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de indicador fenolftaleína e titulou-se com solução de NaOH 0,1N até atingir a coloração rósea.

3.2.2.2.3 Índice de peróxidos

O índice de peróxidos do óleo de castanha-do-brasil com películas e castanha-do-brasil despelculadas foi realizado conforme a metodologia oficial de American Oil Chemist's Society - Método AOCS Cd-8b-90 (1998), que consiste na dissolução de 5g de óleo em solução de ácido acético e clorofórmio (3:2) e adição 1mL de solução de iodeto de potássio saturada. Em seguida, procedeu-se uma leve agitação, mantendo o erlenmeyer fechado e protegido da luz durante 5 minutos. Adicionou-se 100mL de água destilada recentemente fervida e resfriada. Agitou-se vigorosamente, seguindo-se a titulação com tiosulfato de sódio 0,01N. O volume

gasto após a adição da solução de amido a 1% indicou a concentração de peróxidos em meq kg⁻¹.

3.2.2.2.4 Índice de saponificação

O índice de saponificação foi realizado conforme a metodologia AOCS Cd 3-25 (AOCS, 1998). Pesou-se 2g do óleo em um erlenmeyer e adicionou-se 20mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 4%. Em seguida, adaptou-se o erlenmeyer a um condensador de refluxo e aqueceu-se até ebulição branda, durante 30 minutos. Logo após adicionou-se 2 gotas de indicador fenolftaleína e logo depois de titulado a quente com ácido clorídrico 0,5 N até o desaparecimento da cor rosa.

3.2.2.3 Perfil de ácidos graxos

Utilizou-se o método Ce 1f-96 (1996) descrito pela AOCS (1998). Os ésteres metílicos obtidos por derivatização dos ácidos graxos do óleo de castanha-do-brasil, foram submetidos à análise cromatográfica em Cromatógrafo Gasoso - GC/FID (modelo Shimadzu 17A), equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m X 0,25mm X 0,25mm) a fim de obter o perfil cromatográfico desses óleos, por meio de comparação com os tempos de retenção dos padrões dos ésteres metílicos dos ácidos graxos. Os ésteres metílicos foram diluídos em 5mL com hexano, posteriormente foi retirada uma alíquota de 0,5mL e diluído novamente em 2mL, sendo injetados 0,5mL dos extratos hexânicos. As amostras foram injetadas nas seguintes condições cromatográficas: 100°C (0 min) – 5°C min⁻¹ – 220°C (20 min); Temperatura da coluna: 100°C; Temperatura de diluição: 200°C, Temperatura de injeção: 200°C, Split: 1:50.

3.2.2.4 Termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um TG 60 SHIMADZU. Cada amostra (amostras de óleo de castanha-do-brasil) foi retirada do dessecador e previamente pesada numa balança analítica AY 220 SHIMADZU para que se obtivesse o valor aproximado da massa a ser analisado. Todas as amostras foram pesadas e acondicionadas em micro-cadinhos de alfa-alumina pré-tarados na termobalança.

As condições de análise foram as seguintes (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998): massa de amostra: 5,0mg; atmosfera: ar sintético; vazão: 100mL min⁻¹; razão de aquecimento: 5°C min⁻¹; temperatura inicial: 30°C; temperatura final: 600°C. Para a obtenção dos valores de observação das curvas, foi utilizado o programa TA 60 (SHIMADZU).

3.2.2.5 Microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão

Amostras das amêndoas de castanha-do-brasil tipo *large*, castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculadas, fixadas em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), lavadas em água tetradestilada, desidratadas em série etílica (30; 50; 70; 90 e 95%) seguidas de duas lavagens em acetona 100% e embebidas em resina Spurr e acetona 100% (1:1). A polimerização foi feita a 60°C por 48h. As amostras foram seccionadas em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT). As secções semifinas (0,5µm) foram coradas com azul de metileno e bórax 1%. As secções ultrafinas (1000nm) foram coletadas em grades de cobre de 100 a 200 mesh e contrastadas com acetato de uranila (7%) e com citrato de chumbo (3%) durante 30 minutos cada.

As secções semifinas foram analisadas em microscópio ótico OLYMPUS modelo BX 51, em aumento de 40x. As imagens foram digitalizadas por câmara de vídeo adaptado ao microscópio, de acordo com metodologia proposta por Silveira (1989).

Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisadas em microscópio eletrônico de acordo com Silveira (1989). Foi utilizado um microscópio eletrônico ZEISS (DSM-940A), regulado à distância de trabalho de 15 mm, voltagem de aceleração de 10 kV com ampliação a partir de 3.000 X. O registro fotográfico foi feito em negativos Kodak (Plus-X pan 5-PXP120).

3.2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com três repetições em esquema bifatorial. Para o fator A foi atribuído o beneficiamento da castanha, com dois níveis, com película e despeliculada. Ao fator B foi atribuído os tempos de armazenamento, com cinco níveis (0, 3, 6, 9, 12 meses). As respostas estudadas foram: óleo (índice de acidez, índice de peróxidos, índice de

saponificação, perfil de ácidos graxos), farinha (composição centesimal, fracionamento das proteínas) e castanhas (microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão).

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância estatística, para o perfil dos ácidos graxos, compararam-se o efeito do beneficiamento da castanha (com película e despeliculada) pelo teste t ($p \leq 0,05$) e o efeito dos tempos de armazenamento por meio do intervalo de confiança. As diferenças entre os tempos foram consideradas significativas, quando não houve sobreposição entre os intervalos de confiança a 95% de probabilidade. Para as demais variáveis respostas utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância para verificar diferenças entre as médias (Sas Institute, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO 1 - CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DESENGORDURADA E ISOLADO PROTEICO DE CASTANHA-DO-BRASIL

4.1.1 Composição centesimal da castanha-do-brasil tipo *broken* com película, farinha parcialmente desengordurada de amêndoas de castanha-do-brasil (FPD) e do isolado protéico de castanha-do-brasil (IP)

Os valores médios da composição química da castanha-do-brasil tipo *broken* com película, farinha parcialmente desengordurada e do isolado protéico foram obtidos de análises em triplicata, e estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5. Composição química inicial (% b.s) das amêndoas, da farinha parcialmente desengordurada (FPD) e do isolado proteico (IP) de castanha-do-brasil tipo *broken* com películas

Amostras	Proteínas	Lipídios	Fibras	Cinzas	CHOS*
Castanha-do-brasil tipo <i>broken</i> com película	17,65±0,71c	67,35±0,23a	4,33±0,33b	3,66±0,81	6,99±0,01a
FPD	43,80±0,19b	33,80±1,20b	7,66±1,20a	9,93±1,16a	4,80±0,01b
IP	92,30±0,01a	5,75±0,01c	0,97±0,01c	nd	nd

*Carboidratos: obtidos por diferença; b.s: base seca; nd: não determinado; médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (p.0,05).

Os teores de proteínas (17,65% e 43,8%) e lipídios (67,35% e 33,8%) encontrados na castanha-do-brasil tipo *broken* com película e farinha parcialmente desengordurada (FPD) estão coerentes com os resultados obtidos por Souza & Menezes (2004) e Santos et al. (2012), que obtiveram 40,23% e 38,54% para proteínas e 67,30% e 31,68%, para lipídios. Estas pequenas diferenças verificadas em relação ao trabalho realizado pelos autores podem ser atribuídas a fatores como origem e tipo de amêndoas utilizadas. Neste estudo foram utilizadas castanhas tipo *broken* com película.

Com relação ao isolado protéico (IP), foram encontrados 92,30% (proteínas), 5,75% (lipídios), 0,97% (fibras), valores aproximados aos encontrados por Gloria e Darce (2000) no isolado protéico e aos estudos realizados por Chunhieng et al.

(2004) que encontraram 92,5% (fator 6,25) e 100% (fator 6,97) de proteínas, isoladas a partir de farinha desengordurada de castanha-do-brasil por hexano. O elevado teor de lipídios de 5,75% verificado no IP é aceitável, uma vez que o processo de desengorduramento da matéria-prima utilizado foi por prensagem mecânica a frio, que não é tão eficiente quanto os processos que utilizam solventes, comparados pelos valores de gordura mantidos na FPD (33,8%) após a prensagem. Não foi encontrada na literatura a composição centesimal do isolado protéico de castanha-do-brasil, para comparação, entretanto, sabe-se que para caracterizar um isolado protéico, este deve apresentar no mínimo 90% de proteínas (Vallim, 2011). Os resultados mostram ainda que as amêndoas de castanha-do-brasil utilizadas neste estudo, além de apresentarem alto teor de lipídeos, constituem um boa fonte de proteínas, e que quando desengorduradas apresentam um aumento ou concentração bastante significativa no teor de fibras, podendo assim ser usada além de fonte de lipídeos, tanto como fonte de proteínas como de fibras.

Os valores de fibra alimentar total encontrados (4,33%) foram inferiores aos relatados por Glória e Darce (2000), Souza e Menezes (2004) e Santos et al. (2012) que encontraram 5,5%, 15,8% e 17,4%, respectivamente. A ingestão de alimentos com fibra é recomendada pela área da saúde, já que têm sido relatados numerosos estudos que relacionam o papel da fibra alimentar com a prevenção de diversas doenças como diverticulite, câncer de cólon, obesidade, problemas cardiovasculares e diabetes. As fibras insolúveis reduzem o tempo de trânsito intestinal, avolumam o bolo fecal, retardam a hidrólise do amido e a absorção da glicose. Já as fibras solúveis, retardam o esvaziamento gástrico, aumentam o tempo de trânsito intestinal e tornam a absorção da glicose mais lenta, portanto, de acordo com os teores de fibra encontrados, a castanha-do-brasil pode contribuir com fibras nas dietas (Santos, 2012).

4.1.2 Fracionamento das proteínas

Para avaliar a qualidade da proteína da castanha, esta foi fracionada e a composição percentual de cada fração protéica (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) encontrada no isolado protéico da castanha-do-brasil (IP) estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. Composição (%) de frações proteicas do isolado protéico da castanha-do-brasil

FRAÇÃO	MÉDIA ± DP (%)
Albuminas	41,34 ± 0,37
Globulinas	19,02 ± 0,67
Prolaminas	0,13 ± 0,05
Glutelinas	36,14 ± 1,57
Material não solubilizado	3,35 ± 1,19
TOTAL	99,98

As proteínas do isolado protéico foram fracionadas de acordo com sua solubilidade e apresentaram o perfil protéico indicado na Tabela 6. É possível observar que a fração protéica encontrada em maior concentração no IP das amêndoas estudadas é a das albuminas, seguido pelas glutelinas, globulinas e prolaminas. Os teores de albuminas estão de acordo com os obtidos por Chunhieng et al. (2004), que encontraram as albuminas como maior fração. Já Sun (1987) e Alcocer et al. (2012) que verificaram que as proteínas da castanha-do-brasil podem ser fracionadas em três classes majoritárias, as globulinas 7S e 11S e as albuminas 2S, sendo que neste estudos a duas frações majoritárias foram albuminas e glutelinas. Entretanto, Chunhieng et al. (2004) encontraram as globulinas sendo a segunda maior fração protéica da castanha-do-brasil, seguido de glutelinas e não encontraram a fração das prolaminas, fazendo com que os resultados encontrados neste estudo sejam diferentes dos encontrados na literatura. Nos estudos realizados por Chunhieng et al. (2004), não há relatos de caracterização da matéria-prima utilizada, o que dificulta a comparação.

Possivelmente, essas diferenças sejam decorrentes dos diferentes métodos de extração da gordura da matéria-prima (prensagem a frio ou a quente, extração por solvente, com CO₂ supercrítico) utilizados pelos autores, além das diferentes origens da matéria-prima, manejo pós-colheita e período de armazenamento que as amostras foram submetidas até o momento das análises.

4.1.3 Eletroforese SDS-PAGE

Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE) da farinha parcialmente desengordurada da castanha-do-brasil tipo *broken* com película (FPD), do isolado protéico (IP), de suas frações proteicas (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado estão apresentados na Figura 12.

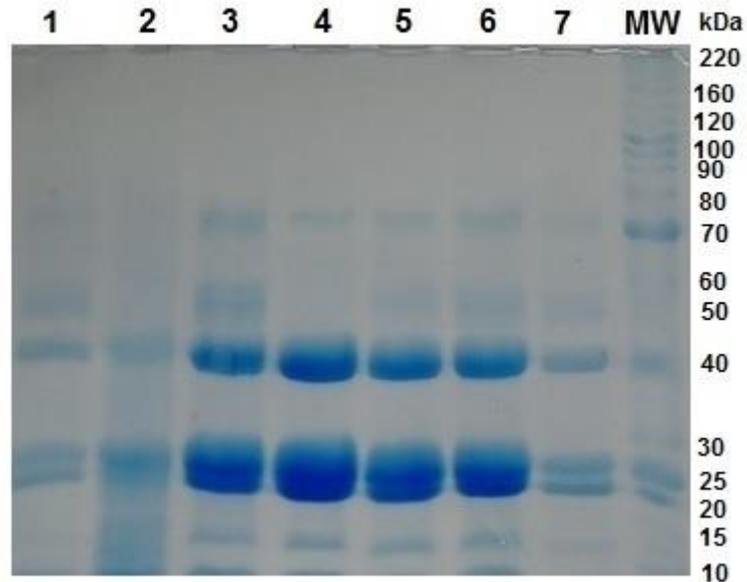


FIGURA 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS): 1 – farinha parcialmente desengordurada (FPD), 2 - isolado protéico (IP), 3 - albuminas, 4 - globulinas, 5 - prolaminas, 6 - glutelinas, 7 - material não solubilizado e MW - Marcador de peso molecular BenchMarker Protein Ladder com pesos moleculares variando de 10kDa a 220 kDa.

A separação por SDS-PAGE ilustra o perfil protéico global das amostras analisadas, as quais podem ser vistas na Figura 12, demonstrando que a castanha-do-brasil é constituída de proteínas com pesos moleculares entre 10 kDa a 52 kDa. Na FPD, observou-se a presença de seis bandas com pesos moleculares aproximados de 50,0kDa, 40,0kDa, 25,0kDa, 20,0kDa, 15,0kDa e 10,0kDa com intensidades fracas (Linha 1). No IP foram observadas cinco bandas com pesos moleculares aproximados a 40,0kDa, 25,0kDa, 20,0kDa e 10,0kDa (Linha 2), porém não foram observadas as bandas de 50,0kDa e 15,0kDa. A fração albumina apresentou bandas com peso molecular variando entre 70,0kDa e 10,0kDa totalizando oito polipeptídios (Linha 3), sendo que as bandas com pesos moleculares de 40,0kDa, 25,0kDa, 20kDa e 10,0kDa também aparecem no IP e FPD,

respectivamente. Na fração globulina foi possível visualizar seis bandas com pesos moleculares variando entre 70,0kDa e 10,0kDa (Linha 4), sendo que as bandas com pesos moleculares aproximadas a 40,0kDa, 25,0kDa, 20,0kDa e 10,0kDa também foram observadas na FPD, no IP e fração albumina e uma banda com peso molecular aproximada de 15kDa observada na fração albumina isolada. A fração prolamina apresentou sete bandas com pesos moleculares entre 52,04kDa e 9,32kDa (Linha 5), porém não se observou a banda de peso molecular de 41,78 presente no IP e fração albumina isolada. No caso das prolaminas, observou-se bandas moleculares com massas moleculares muito parecidas com as da fração albuminas, destacando-se em intensidade as bandas de 40,0kDa, 25,0kDa, 20,0kDa, 15kDa e 10,0kDa. Algumas proteínas podem pertencer à fração globulina que não foram solubilizadas no seu extrator, uma vez que este não possui um agente capaz de romper ligações fortes que mantém a proteína em uma estrutura não passível de solubilização, como por exemplo, pontes dissulfeto (SHEWRY, 2002). A fração glutelina apresentou sete bandas aparentemente com massas moleculares semelhantes as das frações albumina, globulina e prolamina, entretanto é possível observar uma banda com fraca intensidade com massa molecular próxima a 50,0kDa (Linha 6). O material não solubilizado apresentou cinco bandas com massas moleculares entre 40,0kDa e 10,0kDa (Linha 7).

As alterações nas frações proteicas, tanto quantitativas (alteração na intensidade da banda) e qualitativas (ausência e presença de bandas) podem ser explicados parcialmente o acúmulo de lisina nesses materiais, uma vez que as prolaminas são pobres em lisina (Tabela 8) e são as principais proteínas presentes nos grãos (SHEWRY et al., 1995; SHEWRY; HALFORD, 2002).

Sun et al. (1987) utilizou tampão SDS ou tampão salino para extrair as proteínas de castanha-do-brasil e obteve perfis protéicos dos extratos de castanha *in natura* e farinha desengordurada basicamente idênticos. Em seus resultados, os polipeptídeos encontrados na fração 2S albumina apresentaram pesos moleculares menores que 9 kDa. A adição de um inibidor de protease (fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF) na extração com tampões não mostrou ser eficiente para detectar alterações nos perfis protéicos. Por centrifugação em gradiente de sucrose, as proteínas foram fracionadas em três classes de tamanho, 11S, 7S e 2S na proporção de 60:10:30, respectivamente, resultados que são similares aos anteriormente encontrados por Youle e Huang (1981) apud Sun et al. (1987).

Em outro estudo, Sun et al. (1987) utilizaram em seus experimentos um agente solubilizante (resultados não demonstrados), que resultou em bandas das três classes de tamanho não sobrepostas. Em seguida, analisaram os componentes da proteína total por SDS-PAGE, e demonstraram que as proteínas do extrato consistem de polipeptídeos distintos em pesos moleculares e abundância. Os polipeptídeos maiores, abrangem próximo de 80% da proteína total, concentrados nas regiões do gel com pesos moleculares próximos a 35kDa, 24kDa e 9 kDa. Polipeptídeos menores com diversos pesos moleculares ocorreram em todo o gel. Os polipeptídeos componentes das três classes de tamanho das proteínas de castanha-do-brasil, 11S, 7S, e 2S também foram separadas por SDS-PAGE. A fração 11S consiste de quatro polipeptídeos maiores de 24kDa, dois próximos a 32kDa e alguns polipeptídeos com pesos moleculares próximos a 17kDa. A fração 7S contém, principalmente, cinco polipeptídeos: dois de 45kDa, 2 de 35kDa e um menor de 14kDa. A fração 2S consiste dois polipeptídeos de baixo peso molecular com tamanhos estimados entre 9 e 3kDa. Conforme demonstrado na Figura 13 e Tabela 7, nossos resultados são muito próximos aos relatados acima. A utilização do tampão salino permitiu uma boa separação das bandas e, por intermédio do cálculo dos fatores de retenção (R_f) de cada uma foi possível determinar seus pesos moleculares.

Nesta pesquisa, as principais bandas de proteínas estavam concentradas nas regiões do gel com pesos moleculares em torno de 40,0kDa, 25,0kDa, 20,0kDa e 10,0kDa, muito próximos aos relatados por Sun et al. (1987).

É importante ressaltar que durante as extrações não obtivemos frações protéicas exatamente puras, uma vez que o maior ou o menor grau de separação varia conforme a fonte protéica e, neste caso, as proteínas do isolado proteico de castanha-do-brasil mostram ser de difícil separação, pelo menos através do método empregado (CHUNINENG et al, 2004), o que sugere que novos métodos de separação devam ser testados e utilizados.

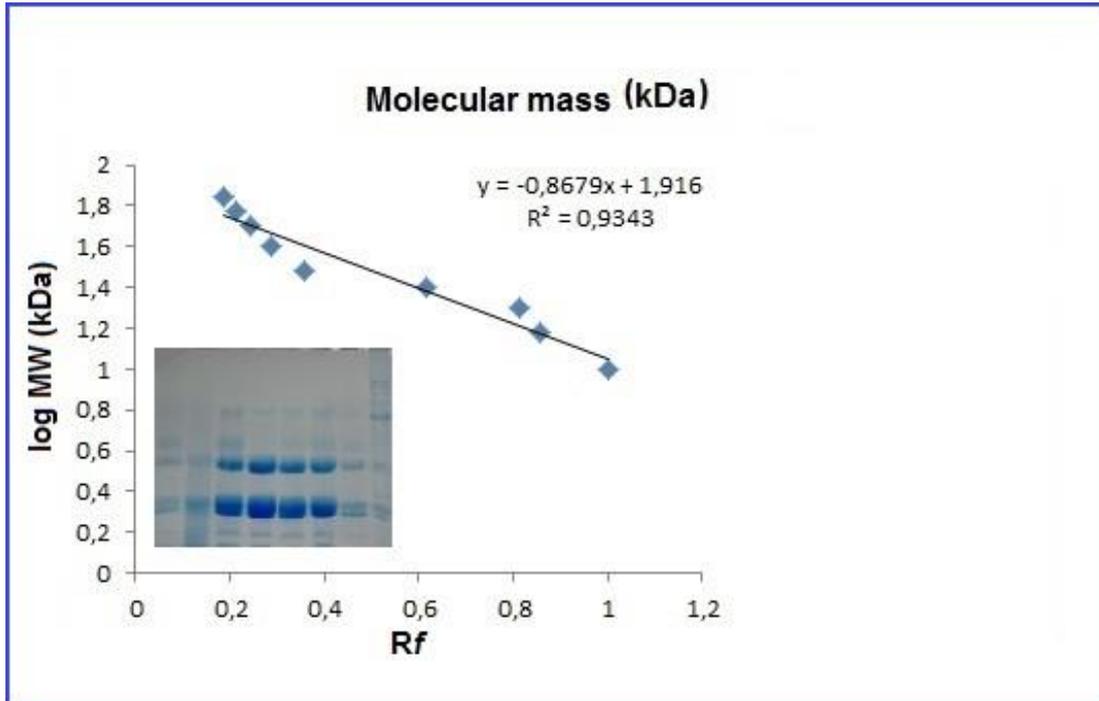


FIGURA 13. Determinação da massa molecular das proteínas desconhecidas por SDS-PAGE da FPD, IP, frações proteicas (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado

4.1.4 Aminoácidos

Para caracterizar as frações proteicas isoladas foi determinada a composição em aminoácidos das proteínas da farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil (FPD), isolado proteico (IP), frações proteicas (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado que estão demonstrados na Tabela 8, assim como da proteína de referência da FAO/WHO (1985).

TABELA 7. Composição de aminoácidos essenciais na farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil (FPD), isolado protéico (IP), frações protéicas (albuminas, globulinas, prolaminas, globulinas), material não-solubilizado e da proteína de referência da FAO/WHO

Aminoácidos ¹	FPD	IP	Albuminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas	Não Solubilizado	FAO/WHO ³	
								Crianças 2-5 anos	Adultos
Histidina ²	0,86	2,25	2,26	2,29	0,6	1,97	2,19	1,9	1,6
Treonina ²	1,02	2,88	3,03	3,12	0,86	2,45	3,03	3,4	0,9
Lisina ²	1,22	3,17	3,27	3,28	0,94	2,8	3,08	5,8	1,6
Metionina ²	2,28	3,98	3,34	2,52	0,8	1,21	2,3		1,7
Isoleucina ²	1,2	3,59	3,73	3,9	0,99	3,03	3,37	2,8	1,3
Leucina ²	2,77	7,62	7,78	8,11	2,01	6,55	7,13	6,6	1,9
Valina ²	1,97	6,07	6,38	6,71	1,64	5,81	5,85	3,5	1,3
Fenilalanina ²	1,67	5	5,25	5,38	1,44	4,53	4,77		1,9
Triptofano ²	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1,1	0,5
Tirosina	1,16	3,35	3,45	3,6	0,92	3,17	3,26		
Cisteína	0,93	1,65	1,29	1,23	0,63	0,55	1,16		
Glicina	1,71	4,59	4,7	4,87	1,26	3,82	4,32		
Ác. Glutâmico	7,38	17,97	17,66	17,27	4,52	11,72	14,32		
Alanina	1,38	3,84	4,19	4,43	1,08	3,59	3,95		
Ác. Aspártico	3,16	9,13	9,44	9,87	2,33	7,43	8,26		
Arginina	5,25	13,46	13,38	13,35	3,57	10,02	11,45		
Serina	1,68	4,34	4,42	4,45	1,24	3,60	4,22		
Taurina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Prolina	1,56	3,89	3,92	3,9	1,05	3,11	3,53		
Aa Totais	37,21	96,8	97,48	98,28	25,86	75,33	86,2		

¹ (mg de aa /100g); ² aminoácidos essenciais; ³ Fonte: SANTOS(2011); NR – não realizado; ND – não detectado

De acordo com a Tabela 7 é possível observar que a farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil possui todos os aminoácidos considerados essenciais pela FAO/WHO (1985). Dos vinte aminoácidos normalmente incorporados em proteínas, nove (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina) são considerados essenciais, pois não são sintetizados pelos humanos e animais monogástricos, portanto, necessitam ser fornecidos através de dietas alimentares. A FAO/WHO recomenda a ingestão de 5,8g/100g de proteína, para crianças entre dois e cinco anos de idade (YIN et al., 2011). Dentre os aminoácidos com padrão definido pela FAO/WHO, para crianças entre dois e cinco anos de idade e adultos, a farinha desengordurada fornece quantidades de histidina (0,86g100g⁻¹), treonina (1,02g100g⁻¹), isoleucina (1,20g100g⁻¹), leucina (2,77g100g⁻¹), lisina (1,22g100g⁻¹) e valina (1,97g100g⁻¹). Destaca-se que os aminoácidos isoleucina, leucina e valina são aminoácidos de cadeia ramificada, onde as cadeias laterais tendem a se agrupar no interior das proteínas, estabilizando a estrutura protéica por meio de interações hidrofóbicas. Em geral, são muito presentes em fontes protéicas de origem animal, onde atuam como importante fonte energética para o músculo esquelético em momentos de estresse

metabólico, promovendo a síntese protéica, evitando catabolismo e servindo de substrato para a glicogênese (LEHNINGER, 2006).

Quanto aos aminoácidos sulfurados, a Tabela 7 apresenta os aminoácidos sulfurados metionina ($2,28\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $3,98\text{g}100\text{g}^{-1}$) na FPD e IP, um aminoácido essencial com recomendação pela FAO/WHO e seu derivado, cisteína ($0,93\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $1,65\text{g}100\text{g}^{-1}$) que é um não essencial. Esses valores são adequados e foram compatíveis aos relatados por Santos (2012), que encontrou $2,67\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $0,87\text{g}100\text{g}^{-1}$, respectivamente. Nas frações purificadas, metionina e cisteína aparecem na seguinte sequência: albuminas>globulinas>glutelinas>prolaminas em quantidade. Dentre os aminoácidos essenciais a leucina e valina estão presentes em maior quantidade no IP ($7,62\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $6,07\text{g}100\text{g}^{-1}$) e na FPD ($2,77\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $1,97\text{g}100\text{g}^{-1}$). Nas frações esses aminoácidos aparecem em maior quantidade conforme a sequência: globulinas>albumina>glutelinas>prolaminas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em castanha-do-brasil ($2,70\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $0,86\text{g}100\text{g}^{-1}$) por Camargo (1968) e ($2,82\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $0,84\text{g}100\text{g}^{-1}$) por Srur (1976) citados por Souza (2004), respectivamente. O conteúdo de metionina deve ser levado em consideração, uma vez que pode ser convertido em cisteína durante seu metabolismo no ciclo de transmetilação.

Fenilalanina ($1,67\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $1,16\text{g}100\text{g}^{-1}$) e tirosina ($1,16\text{g}100\text{g}^{-1}$ e $3,35\text{g}100\text{g}^{-1}$) presentes na FPD e IP, respectivamente, possuem comportamento semelhante ao do aminoácido metionina em relação à cisteína, sendo que a fenilalanina é a precursora da tirosina (SANTOS, 2012).

É possível notar que o IP, as frações e o material não solubilizado mantêm a mesma característica da composição aminoacídica da matriz farinha parcialmente desengordurada (FPD). Tang e Huang (2011) encontraram resultados semelhantes aos relatados nesta pesquisa quando isolaram as frações albumina e globulina de sorgo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench), as quais apresentaram composição aminoacídica similar a das matrizes farinha desengordurada e isolado protéico.

No IP, os aminoácidos isoleucina, leucina e valina superam o padrão da FAO/WHO para crianças e em relação aos adultos, esta recomendação é superada para todos os aminoácidos essenciais. Verifica-se ainda que durante o isolamento das proteínas ocorreu o aumento de todos os aminoácidos, devido ao aumento da

concentração proteica dos isolados em detrimento de outros constituintes como fibras, cinzas, lipídeos do IP.

As frações albuminas e globulinas tiveram alto e similar conteúdo de aminoácidos ácidos (Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico e Arginina), o que é característico de proteínas de reserva, além de elevado conteúdo total. As albuminas apresentaram alto conteúdo de aminoácidos polares não-carregados (Glicina, Serina, Tirosina e Cisteína), considerados neste estudo como similares aos conteúdos da fração globulinas.

No presente estudo o resultado da composição de aminoácidos totais essenciais e não-essenciais na FPD, IP, frações protéicas extraídas em água, NaCl e NaOH foi considerada semelhante aos obtidos por CHUNHIENG et al. (2004), entretanto estes autores relataram não ter encontrado a fração prolaminas, extraída em etanol 70% e não realizaram a análise sobre o material não-solubilizado.

4.1.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Visando estudar e caracterizar a estabilidade térmica das proteínas da FPD, do IP e das frações, estas foram submetidas a uma varredura de calorimetria diferencial (DSC). Os valores de variação de entalpia (ΔH), temperatura inicial de desnaturação (T_0), temperatura do pico de desnaturação (T_p) e temperatura final de desnaturação (T_c) da farinha parcialmente desengordurada, do isolado protéico, das frações (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado obtidos da castanha-do-brasil tipo *broken* com película estão apresentados na Tabela 8.

A calorimetria diferencial de varredura a que foram submetidas as amostras fornecem informações para compreensão de possíveis interações na matriz em estudo, permitindo analisar as características como estabilidade e desnaturação de proteínas. Neste estudo foram obtidos termogramas da farinha desengordurada de castanha-do-brasil, isolado protéico, frações (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não-solubilizado mostrados nas Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19, respectivamente.

TABELA 8. Calorimetria diferencial de varredura da farinha parcialmente desengordurada (FPD), do isolado protéico (IP), das frações (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado do fracionamento obtidos da castanha-do-brasil tipo *broken* com película

Produto	Pico	Temperatura de desnaturação				Entalpia (J.g ⁻¹) ΔH
		To (°C) ^a	Tp (°C) ^b	Tc (°C) ^c	Tc-To(°C)	
FPD	1	95,16	97,98	100,88	5,72	0,67
	2	103,13	104,30	105,41	2,28	0,02
	3	107,73	109,43	110,64	2,91	0,14
IP	1	83,67	83,69	88,57	4,9	0,13
	2	91,86	96,73	100,73	8,87	5,16
Albuminas	1	90,52	97,82	101,41	10,89	14,25
	2	105,56	107,38	108,68	1,75	0,37
Globulinas		95,57	101,33	104,44	8,87	5,44
Prolaminas		92,63	100,41	104,49	11,86	8,01
Glutelinas		108,25	109,59	109,35	1,10	0,15*
Material não solubilizado		93,47	98,72	100,70	1,98	0,94

^a Temperatura inicial de desnaturação; ^b temperatura de desnaturação; ^c temperatura final de desnaturação; *comportamento exotérmico

O termograma da FPD apresentou três picos, 97,98°C, 104,30°C e 109,43°C, cuja representação encontra-se na Figura 14. Não foram encontrados referenciais para estas temperaturas na literatura. Segundo Sun et al. (1987), a proteína total de castanha-do-brasil pode ser fracionada em três grandes classes, globulinas 7S e 11S e albuminas 2S. O terceiro pico, não encontrado nas outras frações pode ser atribuído a presença de lipídeos (33,80%) ou interação deste com os outros componentes já que o processo utilizado não teve a eficiência desejada, e ainda por não ter ocorrido no isolado proteico.

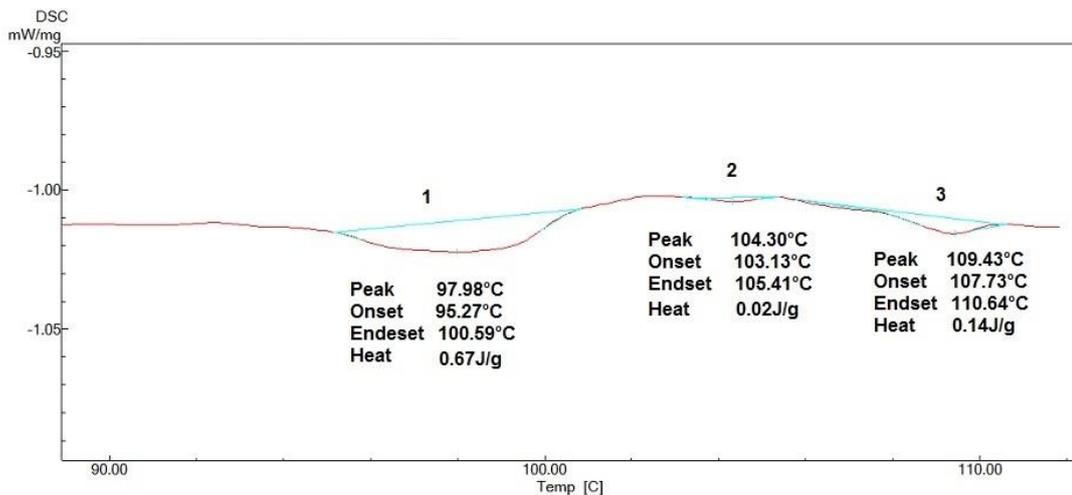


FIGURA 14. Termograma de DSC da farinha parcialmente desengordurada (FPD) de desengordurada de castanha-do-brasil

O termograma do IP apresentou dois picos, 83,69°C e 96,73°C, cuja representação encontra-se na Figura 15. A ocorrência desses dois eventos reflete a constituição diferenciada do concentrado em relação à FPD e a maior entalpia (ΔH) no segundo pico significa que nesse ponto houve maior gasto de energia para desnaturar algum constituinte naquele ponto. É provável que no processo de isolamento do produto algumas das frações de proteínas da castanha-do-brasil tenham sido desnaturadas. Estes resultados sugerem que as proteínas no isolado proteico foram muito mais desnaturadas do que nas frações albuminas e globulina. A desnaturação ácida ou alcali-induzidas pode ser uma das razões para este fenômeno, além de que a ocorrência de polifenóis em elevados conteúdos e as interações covalentes com as proteínas podem ser os responsáveis pelo baixo valor de entalpia no concentrado protéico. John e Shahidi (2010), pesquisando compostos fenólicos e antioxidantes em castanha-do-brasil, afirmam que a película marrom contém níveis significativamente elevados desses constituintes.

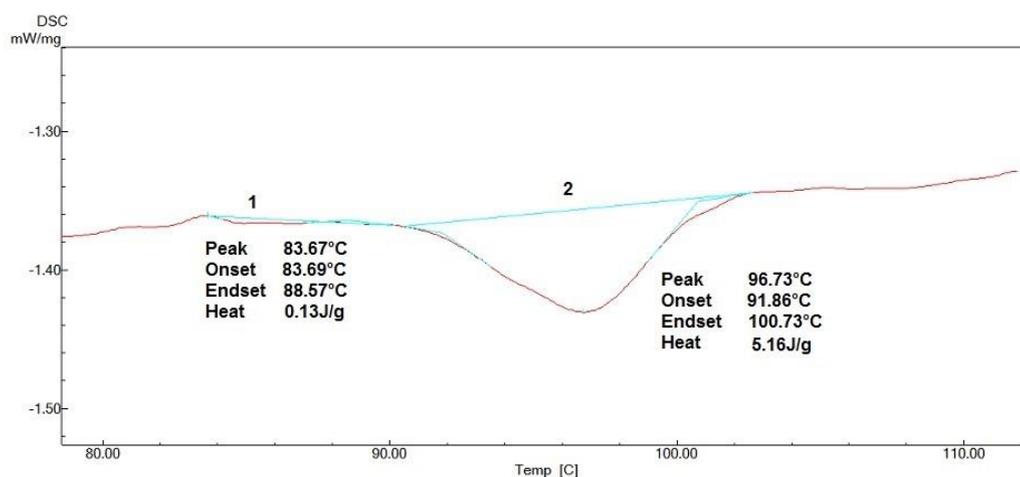


FIGURA 15. Termograma de DSC do isolado protéico de castanha-do-brasil

O termograma da fração albuminas apresentou dois picos endotérmicos, 97,82°C e 107,38°C representados na Figura 16. O pico 1 e maior deles, apresentou T_o próxima aos 90°C, a T_p aos 97°C e T_c aos 101,41°C, além de uma diferença entre a T_c e a T_o de 10,89°C e maior entalpia ($14,25\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$) entre as frações estudadas. Isso pode ser devido a quebra das pontes dissulfeto, expondo os grupos hidrofóbicos, que posteriormente formarão ligações cruzadas do tipo dissulfeto, formando redes capazes de reter a água e formar gel, o que explicam a elevada entalpia necessária para ocorrer a desnaturação. As pontes dissulfeto são formadas por resíduos de cisteína, a qual está presente em maior quantidade na fração albuminas. Esse comportamento usualmente mantém a ruptura das ligações dissulfeto, especialmente aquelas que mantêm a integridade da conformação terciária dos polipeptídeos das albuminas. O pico 2, também endotérmico apresentou T_o aos 105°C, T_p aos 107°C e T_c aos 108,68°C e entalpia de $0,37\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$. A ΔH representa a proporção de proteínas desnaturadas na amostra e é correlacionada com a estrutura das proteínas. Não foram encontradas na literatura dados para a discussão. Entretanto, conforme o trabalho realizado por Sun (1987) as albuminas da castanha-do-brasil podem ser classificadas em 2S, também conhecidas como *Ber* e 1, compreendem aproximadamente 30% da proteína total e são excepcionalmente ricas em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) segundo Antunes e Markakis, 1977 citados Alcocer et al. (2012).

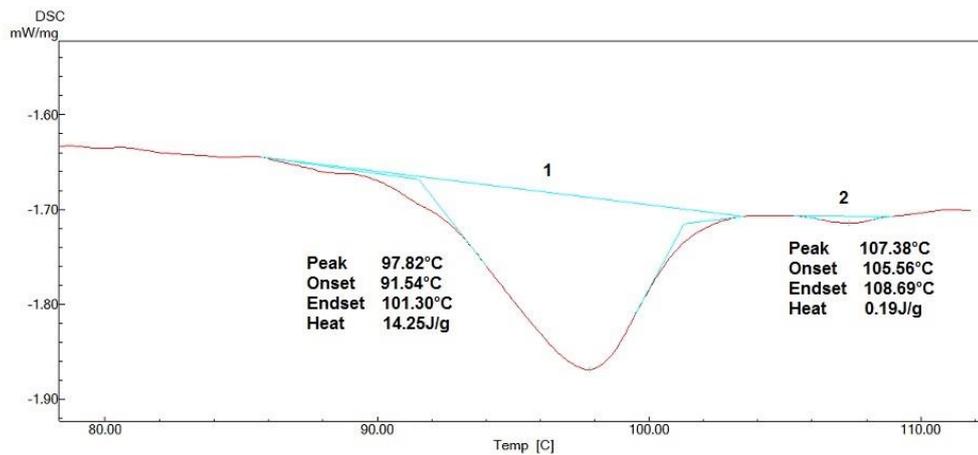


FIGURA 16. Termograma de DSC da fração albuminas de castanha-do-brasil

O termograma da fração globulinas apresentou um único pico endotérmico com T_o próxima aos 95,57°C, T_p aos 101,33°C e T_c em 104,44°C (Figura 17). A diferença $T_c - T_o$ foi de 8,87°C e a ΔH necessária para desnaturar a proteína foi 5,44J.g⁻¹ indicando que nesta fração as proteínas foram menos desnaturadas no processo de fracionamento do que na FD e no IPC. A T_p pode refletir a ruptura das pontes de hidrogênio, o que não ocorreu, mantendo as conformações terciária e quaternárias das proteínas, particularmente a estrutura terciária. A ΔH representa a porção não desnaturada da proteína na amostra e está correlacionada com a extensão da ordenada da estrutura da proteína, especialmente aquela que mantém a integridade da estrutura terciária das globulinas (MENG e MA, 2001), citados por Yin (2011), as quais possuem cisteína e, conseqüentemente, mais pontes dissulfeto.

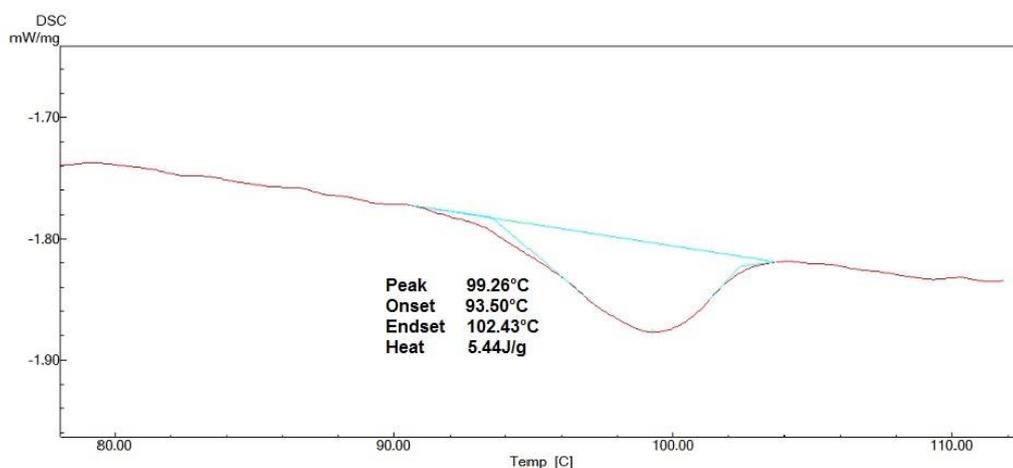


FIGURA 17. Termograma de DSC da fração globulinas de castanha-do-brasil

O termograma da fração prolaminas está apresentado na Figura 18 e apresentou um único e grande pico endodérmico, onde a T_o foi aos 92,63°C e T_p aos 100,41°C e a T_c aos 104,49°C. A fração prolaminas apresentou maior diferença entre a T_c e T_o (11,86°C) e ΔH de 8,01J.g⁻¹. As prolaminas são proteínas hidrofóbicas ricas em prolina e glutamina. O aminoácido prolina é classificado como pertencente ao grupo R alifáticos, não-polar, hidrofóbico e possui uma cadeia lateral alifática com estrutura cíclica diferente, o que lhe confere conformação rígida e reduz a flexibilidade estrutural das regiões polipeptídicas que o contém. No caso do aminoácido glutamina, que possui o grupo R não-carregado, polar, é mais solúvel em água ou mais hidrofílico que os aminoácidos não-polares, uma vez que contém grupos funcionais que formam pontes de hidrogênio com a água, que aliada com as pontes dissulfeto desempenham papel especial na estrutura das proteínas como as prolaminas (TANG E HUANG, 2010). As prolaminas constituem a terceira classe de proteínas conforme proposto por Osborne citado por Chuniheng et al. (2004) e, possivelmente foram muito mais desnaturadas no decorrer do fracionamento, resultando numa diminuição no valor de ΔH em comparação com as frações albuminas e globulinas.

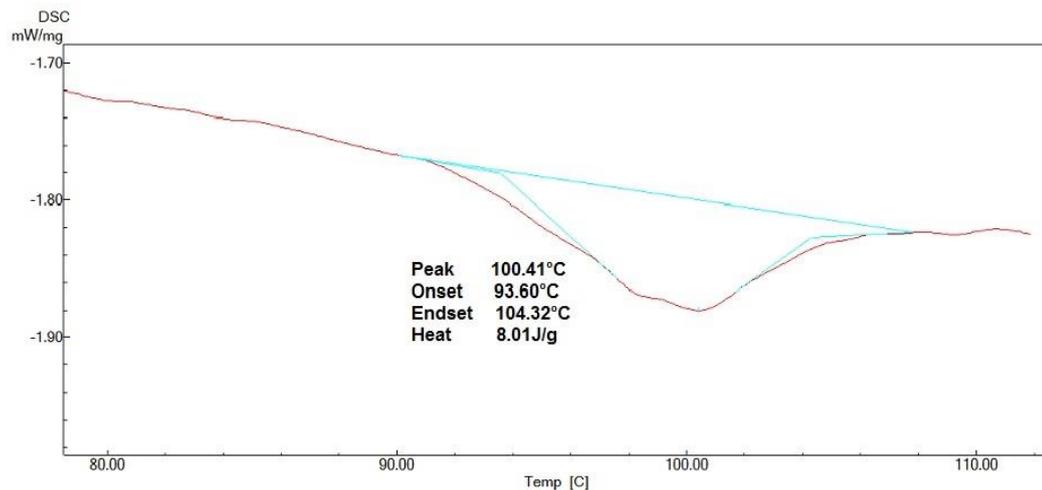


FIGURA 18. Termograma de DSC da fração prolaminas de castanha-do-brasil

O termograma da fração glutelinas apresentado na Figura 19 e, surpreendentemente, apresentou um único e pequeno pico exotérmico com T_o aos 108,25°C e T_p aos 109,59°C. Diferentemente das demais frações, a entalpia

representada por ΔH foi de $0,15\text{Jg}^{-1}$ indicando a desnaturação completa dessa fração e possivelmente, pela presença de lipídios residuais na FPD, resultantes da extração por prensagem a frio. Não foram encontradas referências para discussão desse comportamento térmico. Costa et al. (1996) isolaram e caracterizaram um polipeptídeo básico, glicosilado, de 23 kDa (G23), proveniente do *Lupinus albus*, com características de solubilidade das glutelinas, e com quantidades apreciáveis de metionina (2,0%), cisteína (5,8%) e lisina 3,5%, comparativamente às proteínas de reserva do *L. albus* caracterizadas por Duranti et al. (1997), conferindo interesse nutricional a esta fração. Conforme Tabela 3, a fração glutelinas possui esses aminoácidos em sua composição.

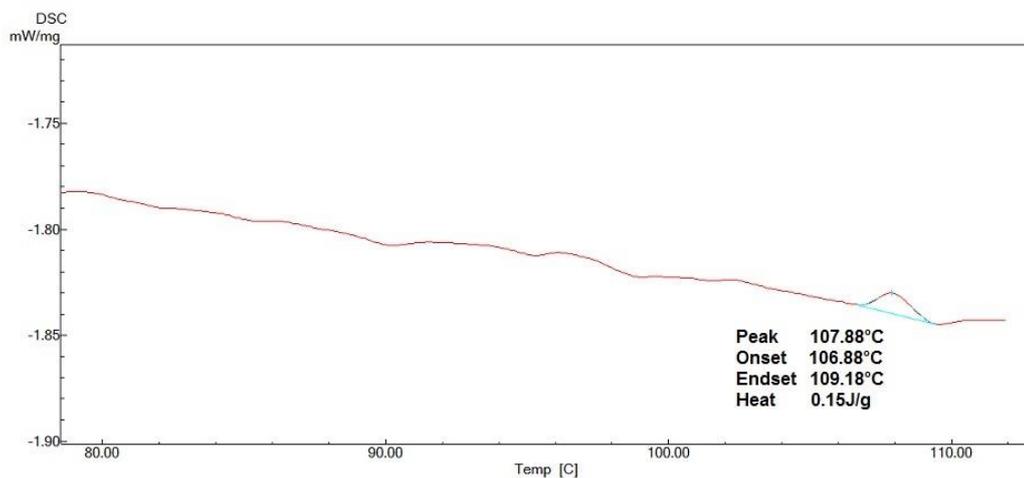


FIGURA 19. Termograma de DSC da fração glutelinas de castanha-do-brasil

O termograma do material não-solubilizado está demonstrado na Figura 20 e como é possível observar, apresentou um único pico endodérmico com T_o aos $93,47^\circ\text{C}$ e T_p em $98,72^\circ\text{C}$ e T_c aos $100,70^\circ\text{C}$. Neste caso, a entalpia foi inferior às demais frações indicando alto grau de desnaturação, o que já era aguardado pois se trata de material não solubilizado durante as etapas do fracionamento. Conforme a Tabela 10, o material não solubilizado apresenta todos os aminoácidos presentes na matriz FD, IP e respectivas frações, dificultando a interpretação dos resultados.

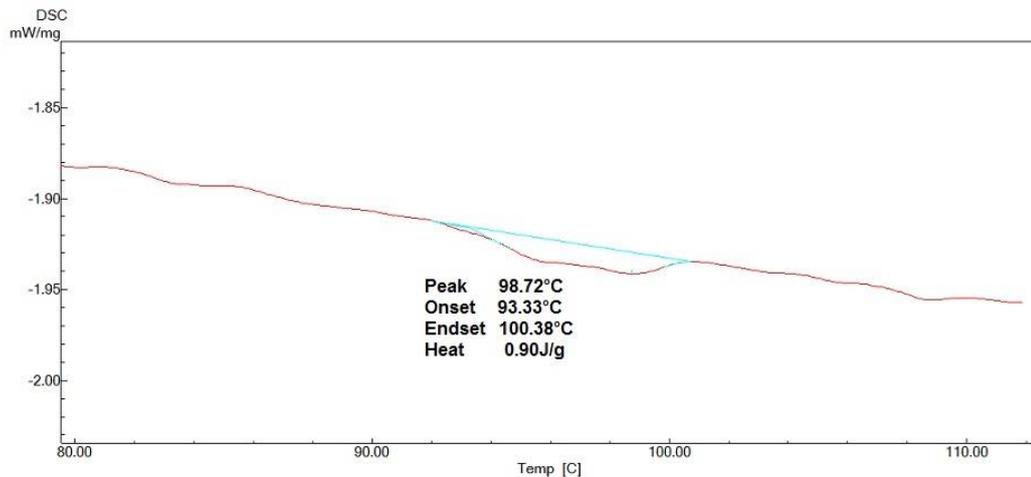


FIGURA 20. Termograma de DSC do material não solubilizado do fracionamento das proteínas de castanha-do-brasil

4.1.6 Compostos fenólicos

Na Tabela 10 podem ser observados os teores de compostos fenólicos totais determinados em FPD de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada.

TABELA 10. Compostos fenólicos totais determinados em FPD de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada

Tratamento	Tempo (mgAG/100g)	
	t inicial (0)	t final (12 meses)
T1	136,07 ± 0,67 ^a	123,62 ± 3,62 ^a
T2	113,85 ± 3,44 ^b	95,75 ± 8,44 ^b

T1 - castanha-do-brasil tipo *broken* com película; T2 - castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada; AG – Ácido Gálico; médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$)

De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que os teores de compostos fenólicos variaram com o tempo e entre os tratamentos. No início do armazenamento (t_0) o tratamento T1 apresentou 136,07mgAG/100g, aproximadamente 10% acima daquele que foi observado ao final do período de armazenamento (123,62mg/AG/100g). Já o tratamento T2 que no início do armazenamento apresentava 113,85mgAG/100g, apresentou ao final do mesmo

período um teor de 95,75mgAG/100g, ou seja, uma redução que ultrapassou os 15%. Quando se analisou a diferença entre os tratamentos, verificou-se que no início do armazenamento o tratamento T1 apresentou 16,32% a mais de compostos fenólicos em relação ao tratamento T2. Ao final do período de armazenamento os valores foram 123,63mgAG/100g e 95,75mgAG/100g para T1 e T2, respectivamente, ou seja, 22 % de diferença do T1 em relação ao T2.

Kornsteiner et al. (2006), estudaram 10 diferentes tipos de amêndoas, entre elas castanha-do-brasil importadas pela Áustria, oriundas de diversos países. O valor de fenólicos totais oscilaram entre 32mg (pinhão) e 1625mg (nozes) e os valores aumentaram na seguinte ordem: pinhões < macadâmias < amêndoas sem pele < castanha-do-brasil < castanha de caju < amêndoas com pele < avelãs < amendoim com pele < pistaches < nozes pecans, o que está em conformidade com outras pesquisas que obtiveram médias entre 0,68mgAG/100g (pinhões) e 20,16mgAG/100g (pecans) (ANDERSON et al., 2001; WU et al., 2004). Relatam estes autores que a castanha-do-brasil apresentou entre 100 a 133mgAG/100g (média 112mgAG/100g). Relataram ainda que em suas pesquisas ficou demonstrado que amêndoas com película apresentam conteúdo de fenóis totais muito mais alto do que aquelas sem películas (239:47).

John e Shahidi (2010) analisaram castanha-do-brasil, película marrom e casca. Os extratos foram obtidos com solução de acetona 70% sob condições de refluxo. Fenóis insolúveis e ligados foram subsequentemente extraídos em solução dietil éter:etil acetato (1:1, v/v) após hidrólise alcalina. Ambos, fenóis solúveis e ligados foram separadamente examinados quanto seu conteúdo de fenóis totais. Estes autores obtiveram para a película marrom 1236,06mgAG/100g, para a casca 406,83mgAG/100g e para a amêndoa 519,11mgAG/100. Quanto aos fenóis ligados, o conteúdo na película marrom, 86mgAG/100g e 19,00mgAG/100g para a casca e amêndoa. Os extratos da película marrom também exibiram atividade antioxidante mais elevada entre todos. Os fenóis livres e ligados foram identificados e quantificados, estes incluem nove ácidos fenólicos e flavonóides e seus derivados. Entretanto, alguns fenóis estavam presentes somente na forma ligada. Além disso, os fenóis foram predominantes na película marrom.

Nossos resultados foram considerados adequados, uma vez que ficaram intermediários aos obtidos por Kornsteiner et al. (2006) e John e Shahidi (2010). Está claro que a composição nutricional das nozes é altamente influenciada pelas

características genéticas, estação do ano, origem, bioma, condições ambientais, composição do solo, nível de maturidade e método de cultivo. A solubilidade dos compostos fenólicos definida pela polaridade do solvente utilizado, grau de polimerização, interação com outros constituintes da amostra e formação de complexos insolúveis. Então, fatores como composição do solvente, tempo e temperatura de extração, relação solvente:amostra, tratamento da amostra, entre outros, influenciam significativamente na eficácia de extração, resultando na maior ou menor recuperação dos compostos fenólicos (WU et al., 2004; KORNSTEINER et al, 2006; SHAHIDI, 2005).

4.2. ESTUDO 2: EFEITOS DO ARMAZENAMENTO DE AMÊNDOAS DE CASTANHA-DO-BRASIL COM PELÍCULA E DESPELICULADA SOBRE A ESTABILIDADE E QUALIDADE DO ÓLEO

4.2.1 Método de extração do óleo

Os teores de lipídios foram determinados em aparelho Soxhlet, de acordo com o método nº 30.25 da AACC (1999), utilizando-se como solvente o éter etílico, por 6 horas. Os resultados foram expressos em % de óleo, em base seca. Os resultados dos teores de lipídeos das farinhas parcialmente desengorduradas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculadas armazenadas sob vácuo durante 12 meses de armazenamento, a temperatura de 16°C estão apresentados na Figura 21, a seguir.

A extração por prensagem hidráulica a frio apresentou rendimento 45% de extração total em óleo tanto para as farinhas parcialmente desengorduradas do Tratamento 1 (castanha-do-brasil tipo *broken* com película) como para o Tratamento 2 (castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada), apesar de observarmos que o percentual de extração do tratamento 1 apresentava uma tendência de ser superior ao tratamento 2, em determinados tempos de avaliação. Observando-se a Tabela 5 é possível observar que no Tratamento 1 as amêndoas apresentavam grau de umidade relativa inferior as do Tratamento 2, com valores entre 1,68% a 2,43% (T1) e 3,36% a 7,21% (T2). Esse rendimento de extração foi considerado satisfatório, sendo que:

- as extrações foram realizadas a frio;

- a capacidade de força da prensa sobre as amostras foi de 15kgf.cm^{-2} (durante 15 minutos, aproximadamente) e as perdas decorrentes da técnica (por exemplo, perdas de material sólido e óleo que ficavam retidos no tecido voal utilizado como camisa de retenção da torta no porta-amostra);

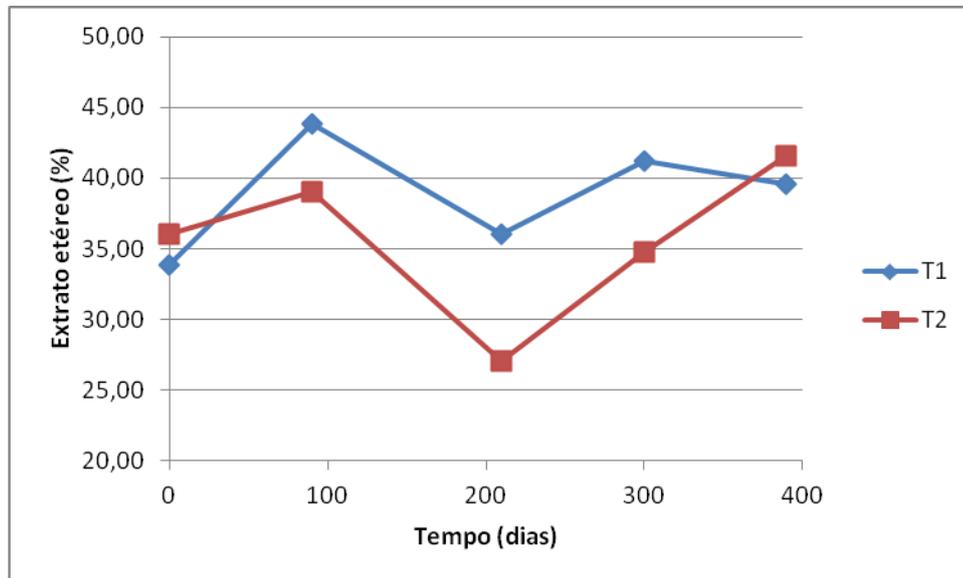


FIGURA 21. Teor de lipídeos das farinhas parcialmente desengorduradas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil despeliculada armazenadas desidratadas a 16°C durante 12 meses em embalagens aluminizadas sob vácuo. T1 – Castanha-do-brasil tipo *broken* com película; T2 – Castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada

- havia dificuldade de controlar as condições de prensagem (pressão, tempo, quantidade de amostra por vez, operador do equipamento);

- perda de óleo ao final de cada prensagem, durante a desmontagem da prensa e residual de material no porta-amostra e coletor do equipamento.

Esses resultados foram inferiores aos 52% obtidos por Santos (2011) quando realizou extrações de óleo de castanha-do-brasil tipo exportação submetida a aquecimento em estufa com circulação de ar forçado a $50^{\circ}\text{C}/24$ horas, utilizando equipamento similar. Willems et al. (2008) realizaram extrações por prensagem hidráulica em equipamento semelhante e obtiveram rendimentos de 45 a 55% para gergelim e linhaça com 4% de umidade e 70 a 75% para sementes descascadas de gergelim e pinhão-manso. Segundo os mesmos autores, o rendimento aumentou com o aumento da pressão e da temperatura, entretanto não relataram se utilizaram ou não algum tipo de aquecimento.

4.2.2 Características físico-químicas e propriedades do óleo de castanha-do-brasil

Os resultados obtidos par acidez dos óleos obtidos por prensagem hidráulica a frio estão apresentados na Tabela 11 e Figura 22. É possível observar que a interação tempo x tratamento foi significativa, ficando evidente que a acidez foi muito baixa para as amostras nos dois tratamentos até o 9º mês, e aumentou no 12º mês, principalmente para o tratamento T2 do que para o T1 indicando que a oxidação, depois que começou, foi mais intensa em T2. Para T1 e T2 a acidez ficou abaixo de 0,5 mg KOH/g até o 9º mês e depois aumentou para 3,49mg KOH/g e 13,07mg KOH/g aos doze meses, respectivamente.

TABELA 11. Índice de acidez do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada desidratadas durante doze meses de armazenamento a temperatura de 16°C

Tratamentos	Tempo (meses)				
	0	3	6	9	12
T1	0,30	0,31	0,25	0,34	3.49
T2	0,38	0,39	0,24	0,26	13,07

*médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$); T1 – castanha-do-brasil tipo *broken* com películas; T2 – Castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculadas

Os resultados encontrados para acidez foram considerados satisfatórios e aproximados aos encontrados por Rodrigues et al. (2005), que realizou pesquisas com óleo de castanha-do-brasil e macadâmia, obtidos por prensagem hidráulica com valores de acidez expressos em percentual de ácido oleico, onde a média encontrada foi de 0,24 e 0,20 (%AGL), respectivamente e por Santos (2012), que extraiu óleo de castanha-do-brasil utilizando diferentes métodos (prensagem hidráulica a quente, extração sólido-líquido, com os solventes éter de petróleo e hexano e por CO₂ supercrítico). Essa autora relata que obteve valores médios de 0,32%; 0,24%; 0,23% e 0,81%, expressos em ácido oleico, respectivamente, mostrando que houve diferença significativa entre as formas de extração utilizando prensagem hidráulica a quente e por CO₂ supercrítico, com $p \leq 0,05$ avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

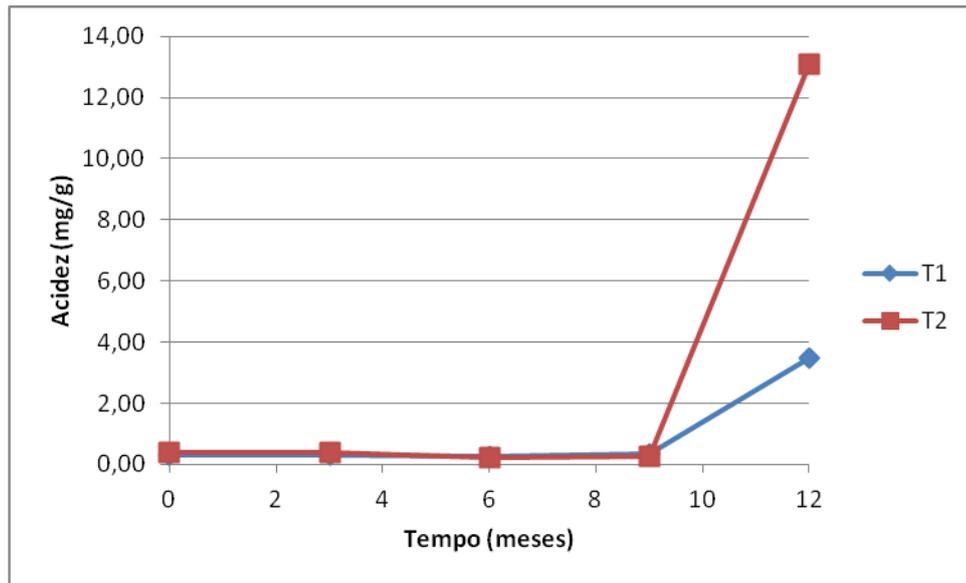


FIGURA 22. Índice de acidez de óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película (T1) e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada (T2) armazenadas desidratadas a 16°C durante 12 meses

A acidez dos óleos decorre da hidrólise dos glicerídeos, provocada por uma enzima, a lipase, que existe nas sementes de oleaginosas, mas que somente é liberada e age com o óleo durante o processo de extração ou quando a manipulação e armazenamento são inadequados, ou ainda, durante o processamento da mesma (OLIVEIRA et al., 2006; RITTNER, 1996).

No estudo conduzido por Freitas et al. (2007), os valores de acidez para o óleo de castanha-do-brasil obtido por prensagem hidráulica foram de 0,55 e 0,56 (%AGL), superiores aos encontrados neste estudo. Estes resultados apontam para a manutenção da qualidade dos óleos nas condições de extração por prensagem hidráulica analisados nesta pesquisa. Segundo Rodrigues (2005) e Santos (2012) os valores de acidez na amostra podem variar conforme as condições de armazenamento, temperatura e umidade altas, parâmetros esses muito comuns ao bioma amazônico. O índice de acidez deve ser uma das primeiras análises realizadas, uma vez que o valor encontrado pode refletir a eficiência do processo de extração do óleo. Segundo a ANVISA, para óleos extraídos a frio por prensagem e não submetidos à refinação o valor máximo é 4,0mg KOH/g de óleo.

O aumento nos índices de ácidos graxos livres verificados ao longo do armazenamento das amêndoas podem ser resultados de processos de rancidez hidrolítica que pode ou não ocorrer por ação enzimática. As lipases são as principais enzimas responsáveis pela rancidez hidrolítica, e estão presentes nos grãos

oleaginosos ou podem ser de origem microbiana e suas condições ótimas são pH 7 e 37°C. A rancidez hidrolítica pode ter ocorrido por ação de variações de temperaturas ao final do período de armazenamento, que podem ter induzido a hidrólise e produzindo ácidos graxos livres (MORETTO; FETT, 1998).

Outro parâmetro para avaliação da qualidade do óleo denomina-se índice de peróxidos. O índice de peróxidos determina, em miliequivalentes de KI por 1000g de amostra, todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio; devido à sua ação fortemente oxidante, os peróxidos orgânicos formados no início da rancificação atuam sobre o iodeto de potássio, liberando o iodo que será titulado com tiosulfato de sódio em presença de amido, como indicador (MORETTO e FETT, 1998).

Os valores para o índice de peróxidos do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada estão demonstrados na Tabela 12 e Figura 23, a seguir. Para os dois tratamentos, o índice de peróxidos foi maior nos meses 9 e 12 que nos meses 0, 3 e 6. Os valores encontrados para índice de peróxidos nos dois tratamentos nos seis meses iniciais de armazenamento foram aproximados aos encontrados por Santos (2012) que encontrou valor médio de 4,06mEqkg⁻¹ que também utilizou prensagem hidráulica. Esses resultados foram superiores nos últimos meses de armazenamento aos resultados obtidos por Queiroga-Neto (2009), que obteve 2,92mEq⁻¹ utilizando extração sólido-líquido.

TABELA 12. Índice de peróxidos do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada desidratadas durante doze meses de armazenamento a temperatura de 16°C

Tratamentos	Tempo (meses)				
	0	3	6	9	12
T1	4,93b	6,97b	13,1b	25,98a	27,28 ^a
T2	8,94b	14,55b	18,08b	37,98a	36,2 ^a

*médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si (p>0,05); T1 – castanha-do-brasil tipo *broken* com películas; T2 – castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada.

Os valores observados para ambos os óleos estão acima deste limite a partir do 6º mês para o T1 e a partir do 3º mês para o T2, indicando uma possível deterioração oxidativa. Esses resultados indicam que houveram alterações durante o período de armazenamento, durante as análises e particularidades do método utilizado para extração do óleo que podem comprometer sua estabilidade oxidativa. Entretanto, de acordo com a ANVISA estes resultados estão em conformidade para os padrões de óleos obtidos por prensagem a frio e não refinados, com valores máximos fixados em $15,00\text{mEqg}^{-1}$ e $4,00\text{mEqg}^{-1}$ para os índices de peróxidos e acidez, respectivamente (BRASIL, 2005).

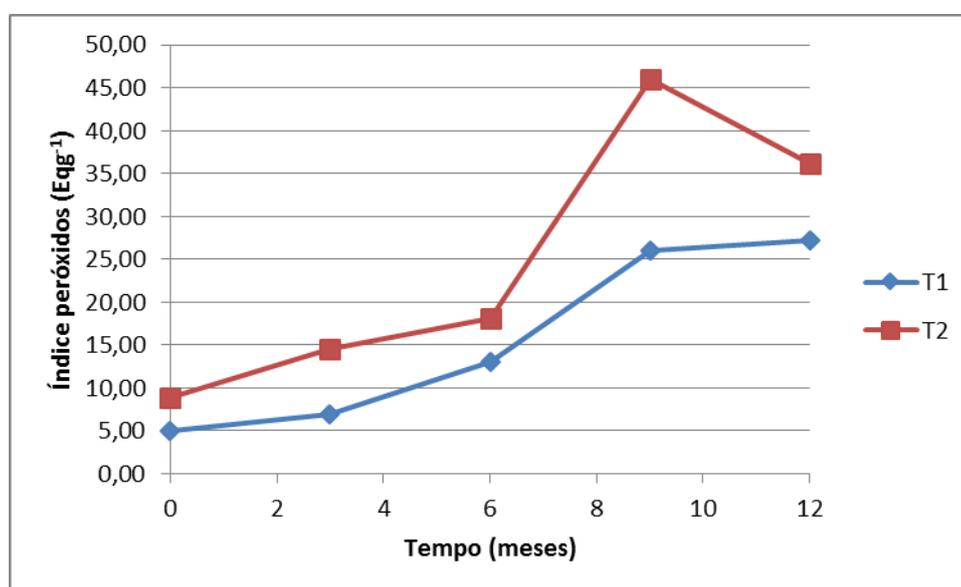


FIGURA 23. Índice de peróxidos do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película (T1) e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada (T2) armazenadas desidratadas a 16°C durante 12 meses

À temperatura ambiente o óleo bruto de castanha-do-brasil é líquido, cor amarelo-claro, com sabor e aroma agradáveis e característicos da amêndoa que o originou. Apresenta densidade de 0,917 – 0,918 a 15°C, índice de refração de 1,458 – 1,464 a 25°C, índice de iodo de 97 – 109mg iodo/100mg de óleo, ponto de fusão de 0 a -2°C e índice de saponificação de 192 – 202mg KOH/g de óleo (ZÁCARI, 2008). Em relação à estabilidade oxidativa o óleo bruto de castanha-do-brasil apresenta-se com estabilidade intermediária entre o de maracujá e o de seringueira atribuída ao seu alto teor em ácidos graxos insaturados (41,2% de oléico e 36,1% de linoléico). O melhor antioxidante sintético indicado para a conservação da estabilidade lipídica

desse óleo foi o TBHQ (ASSUNCAO et al., 1984; CHUNHIENG et al., 2008; REGITANO -D'ARCE, 1998).

Os resultados obtidos para o índice de saponificação do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada durante doze meses de armazenamento a temperatura de 16°C estão demonstrados na Tabela 13 e Figura 24, onde é possível observar que a interação tempo X tratamento foi significativa. No caso, o índice de saponificação do tratamento 2 foi maior nos meses 3 e 6, mas igual nos meses 9 e 12. Esses resultados indicam que houve algum problema durante as análises resultando em uma variação muito grande entre as repetições nos tempos t1 e t2 correspondentes aos três e seis meses.

TABELA 13. Índice de saponificação do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada desidratadas durante doze meses de armazenamento a temperatura de 16°C

Tratamentos	Tempo (meses)				
	0	3	6	9	12
T1	144,93	126,69	131,07	128,51	136,44
T2	124,13	150,52	140,93	127,96	139,14

*médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$); T1 – castanha-do-brasil tipo *broken* com películas; T2 – Castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculadas

Índice de saponificação define-se como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para saponificar os ácidos graxos, resultantes da hidrólise de um grama da amostra do óleo. É inversamente proporcional ao peso molecular médio dos ácidos graxos dos triglicerídeos presentes. Quanto menor o peso molecular do ácido graxo, tanto maior será o índice de saponificação. Em termos alimentares, quanto mais alto for o índice de saponificação melhor será o óleo para alimentação (MORETTO e FETT, 1998).

Os resultados mostraram que o óleo obtido de castanha-do-brasil com película apresentou valores inferiores aos do óleo de castanha-do-brasil despeliculada e estão abaixo dos resultados obtidos por Ferreira et al. (2006); Neto (2009) e Santos (2012). Para Ribeiro e Seravalli (2004), a reação de saponificação pode estabelecer o grau de deteriorização e a estabilidade, verificar se as

propriedades dos óleos estão de acordo com as especificações e identificar possíveis fraudes e adulterações.

De modo geral, os resultados obtidos na caracterização físico-química de óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculada deixam claro que o tipo de prensagem, as condições iniciais da castanha-do-brasil, modo de beneficiamento a que foi submetida, tipo de embalagem e temperatura de armazenamento podem influenciar diretamente seus parâmetros de qualidade.

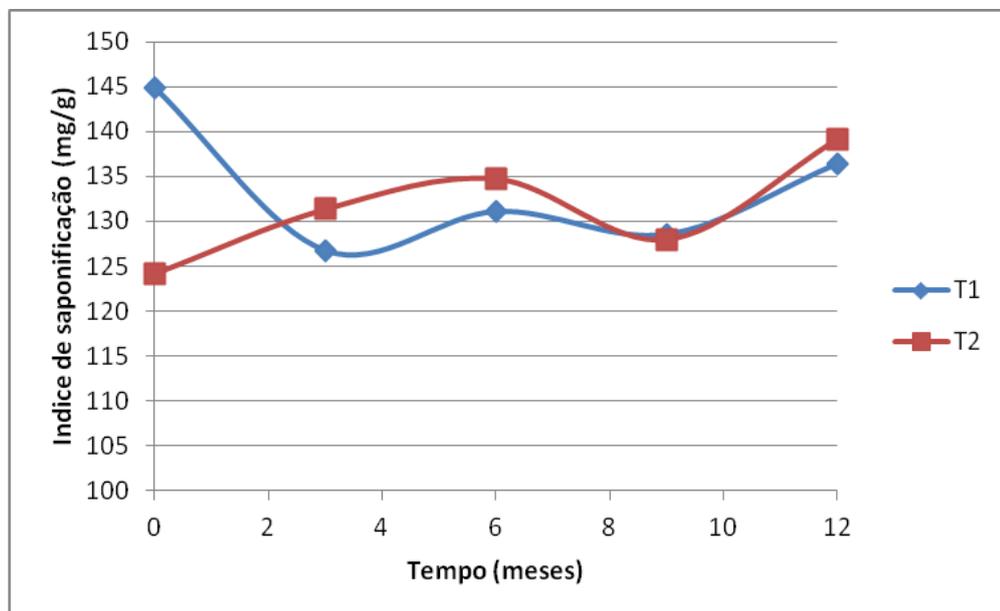


FIGURA 24. Índice de saponificação do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película (T1) e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada (T2) armazenadas a 16°C durante 12 meses.

4.2.3 Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos nos óleos obtidos de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada utilizando prensagem hidráulica a frio e armazenados durante doze meses foi caracterizada por cromatografia gasosa. Os resultados estão apresentados na Tabela 14 e Figura 25, que foram comparados com a literatura (g/100g).

Para todas as variáveis relacionadas aos ácidos graxos ocorreram interações significativas entre os fatores de tratamento (Tabelas 14; Figura 25). Nos ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) ao realizar a comparação entre o tratamento com película e despeliculada, ocorreram diferenças entre eles em todos os tempos de armazenamento (Tabela 12). Ao comparar os tempos de armazenamento, no tratamento com película, não se observou diferença entre o tempo 9 e 12 e, para o tratamento despeliculada todos os tempos diferiram (Figura 25, A - D).

TABELA 14. Ácidos graxos palmítico - C16:0, esteárico - C18:0, oléico - C18:1 e linoléico - C18:2 (%) em função dos tempos de armazenamento na castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculada

Tempo de armazenamento (meses)	Tratamentos	
	Com película	Despeliculada
Palmítico (%)		
0	12,33 *	14,09
3	11,98 *	12,97
6	13,24 *	14,72
9	14,54 *	14,39
12	14,68 *	15,04
Esteárico (%)		
0	6,67 *	7,52
3	6,38 *	6,91
6	7,12 *	9,06
9	9,15 *	9,20
12	9,38 *	9,81
Oléico (%)		
0	31,78 *	31,37
3	32,85 *	33,37
6	32,31 *	31,42
9	31,11 *	31,43
12	31,61 *	31,32
Linoléico (%)		
0	48,82 *	46,63
3	48,35 *	46,34
6	46,94 *	44,41
9	44,84 *	44,60
12	43,96 *	43,45

*significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando o tratamento (com película e despeliculada), dentro de cada tempo de armazenamento

Os valores da composição dos ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados encontrados nesta pesquisa foram considerados satisfatórios, quando comparados aos valores encontrados na literatura. Pesquisas realizadas por CHUNHIENG et al (2008) e SANTOS (2012) destacam os ácidos graxos palmítico (13% e 14,24%), esteárico (11,00 % e 6,67%), oléico (38,30 % e 36,26 %) e linoléico (36,10% e 37,53%), respectivamente. As variações entre os valores desta pesquisa para as citadas, possivelmente estão relacionadas ao tipo de amêndoas, método de extração do óleo, embalagem e tempo de armazenamento utilizados em cada uma delas. Não foram encontradas referências relacionadas ao tipo *broken* com película, tipo *broken* despeliculada e ao tempo de armazenamento.

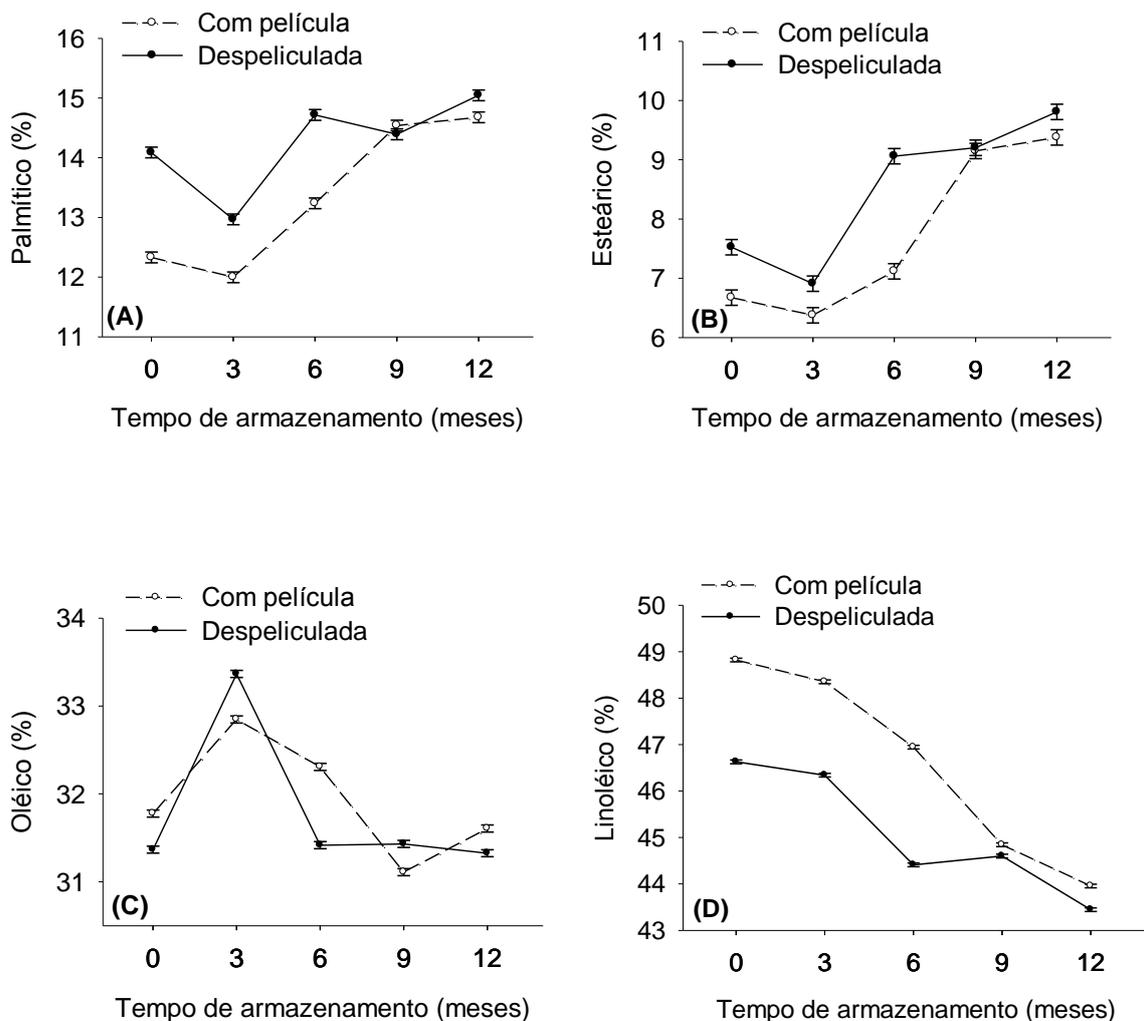


FIGURA 25 - Ácidos graxos palmítico - C16:0 (A), esteárico - C18:0 (B), oléico - C18:1 (C) e linoléico - C18:2 (D) (%) em função dos tempos de armazenamento na castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculada. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2012/13. (As barras verticais representam os intervalos de confiança; IC = 95%, $\alpha = 0,05$)

A composição de ácidos graxos obtidos por GLC demonstra um alto nível de insaturação (80,94 %) nos óleos obtidos da castanha-do-brasil tipo *broken* com películas e despeliculadas, devido essencialmente aos ácidos graxos oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) (Tabela 16). É possível observar que ao compararmos os ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados nos tratamentos castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculada, ocorreram diferenças entre todos eles. Quando se comparou os tempos de armazenamento no tratamento com película verificou-se que houve diferença significativa entre todos os tempos e, para o tratamento com castanha-do-brasil despeliculada observou-se que não houve diferença nos tempos 9 e 12 meses apenas para os ácidos graxos monoinsaturados (Figura 25, A - C).

No estudo conduzido por Ferreira et al. (2006) o óleo bruto da amêndoa da castanha-do-brasil apresentou 85% de ácidos graxos insaturados, sendo 34% representado pelo ácido graxo polinsaturado linoléico, 51% pelo ácido graxo monoinsaturado oléico e 13% representam a composição de ácidos graxos saturados. Esse resultado demonstra que o ácido graxo linoléico é o constituinte majoritário presente no óleo da amêndoa da castanha-do-brasil. Entretanto, a castanha proporciona uma ótima fonte de ácido graxo oléico.

O perfil de ácidos graxos do óleo da castanha-do-brasil compara-se aos perfis dos óleos de milho, soja e amendoim (SANTOS, 2011; CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

TABELA 16. Ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (%) em função dos tempos de armazenamento na castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculada

Tempo de armazenamento (meses)	Tratamentos	
	Com película	Despeliculada
Ácidos Graxos Saturados (%)		
0	19,06 *	21,67
3	18,43 *	19,93
6	20,41 *	23,84
9	23,74 *	23,65
12	24,11 *	24,91
Ácidos Graxos Monoinsaturados (%)		
0	32,12 *	31,71
3	33,22 *	33,73
6	32,65 *	31,75
9	31,42 *	31,75
12	31,94 *	31,64
Ácidos Graxos Poliinsaturados (%)		
0	48,82 *	46,63
3	48,35 *	46,34
6	46,94 *	44,41
9	44,84 *	44,60
12	43,96 *	43,45

*Significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando o tratamento (com película e despeliculada), dentro de cada tempo de armazenamento

4.2.4 Termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG)

Define-se a análise térmica como sendo um grupo de técnicas analíticas na qual uma propriedade física de uma substância ou seus produtos de reação é

medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto tal substância é submetida a um programa controlado de temperatura (WENDLANDT, 1986). Já a análise termogravimétrica diz respeito ao processo contínuo que envolve a medida da variação de massa de uma amostra em função da temperatura, ou do tempo a uma temperatura constante (LUCAS, 2001).

Sendo assim TG/DTG fornecem informações sobre variações de massa em função do tempo e/ou temperatura sob determinadas condições atmosféricas. Essas curvas fornecem dados sobre composição e estabilidade térmica, produtos intermediários e resíduos formados (MACHADO e MATOS, 2004; DE DEUS, 2008). A DTG é a derivada primeira da curva TG. Nesta, os degraus correspondentes às variações de massa da curva TG são substituídos por picos que determinam áreas proporcionais às variações de massa, tornando as informações mais acessíveis e com melhor resolução (LUCAS, 2001).

Foram analisadas amostras de óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despeliculadas, armazenadas durante doze meses, sob vácuo e temperatura aproximada de 16°C. As curvas TG e DTG foram obtidas utilizando um equipamento de análise térmica TGA 60 (Shimadzu) capaz de operar nos modos TG e DTG. Os resultados estão demonstrados na Tabela 14 e nas Figuras 26 a 29.

Na Tabela 17, são identificados os principais pontos de temperatura: “onset” ou temperatura inicial, definida como a menor temperatura em que pode ser detectada o início da variação da massa do óleo e “endset”, que é a menor temperatura que indica que o processo responsável pela variação de massa foi concluído. É mostrado também na mesma tabela, a temperatura média onde foi registrada a perda de 50% da massa da amostra (midpoint), a temperatura do pico (peak) e a percentagem de perda de massa ao final da programação (%weight loss) que neste estudo foi de 30°C até 600°C, com uma taxa de aquecimento de 5°C.min. Sendo assim, é possível observar que no início do armazenamento as temperaturas *onset* foram menores que aquelas apresentadas ao final do período de armazenamento de doze meses, tanto para o tratamento T1 (castanha-do-brasil tipo *broken* com película) como para o T2 (castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada).

TABELA 17. Dados termogravimétricos do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com películas (T1) e despeliculadas (T2), obtido por prensagem hidráulica, armazenado durante doze meses a 16°C

Amostra	T°C				% Weight loss
	Onset	Midpoint	Endset	Peak	
T1t1R1	379,76	405,28	429,91	409,41	99,59
T1t2R1	399,11	418,63	439,59	418,34	99,18
T1t3R1	393,63	412,87	434,28	413,88	99,79
T1t4R1	395,14	419,25	443,00	425,71	99,14
T1t5R1	396,17	419,58	444,01	425,71	99,12
T2t1R1	396,17	419,58	444,01	420,00	100,00
T2t2R1	397,99	419,31	438,50	418,87	100,00
T2t3R1	392,73	414,62	436,91	419,06	100,37
T2t4R1	397,19	419,17	443,47	424,80	99,13
T2t5R1	398,24	419,71	444,53	425,94	98,39

T1 e T2- tratamentos; t1- t5 - tempos de armazenamento (0, 3, 6, 9, 12 meses); R1 – média da repetição 1.

Na Figura 26 observa-se que as curvas TG do óleo de castanha-do-brasil com película (T1), extraído por prensagem a frio apresenta um único evento. Atribui-se esse comportamento de único evento no tratamento T1t1 à presença de maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados no tempo zero (Tabela 16 e Figura 25), os quais são muito suscetíveis a oxidação e quando presentes reduzem a estabilidade do óleo como um todo. No caso do óleo oriundo de castanha-do-brasil despeliculada, a qual passa por etapa de aquecimento, observou-se a redução dos ácidos graxos poliinsaturados já no início do armazenamento. As curvas TG das amostras de óleo analisadas apresentaram um evento pouco significativo próximo de 100°C, geralmente relacionado à perda de água e a partir de 379,76°C no caso da amostra T1t1, representativa do tempo inicial do período de armazenamento. Em seguida, houve uma significativa perda de massa próxima à temperatura de 429,91°C, igual a 99,59% (Tabela 14). Esse comportamento foi semelhante para todas as amostras durante os doze meses de armazenamento, sendo que todos ocorreram até a temperatura final de 444,01°C e revelaram perdas de massa entre 99,12 a 99,79%.

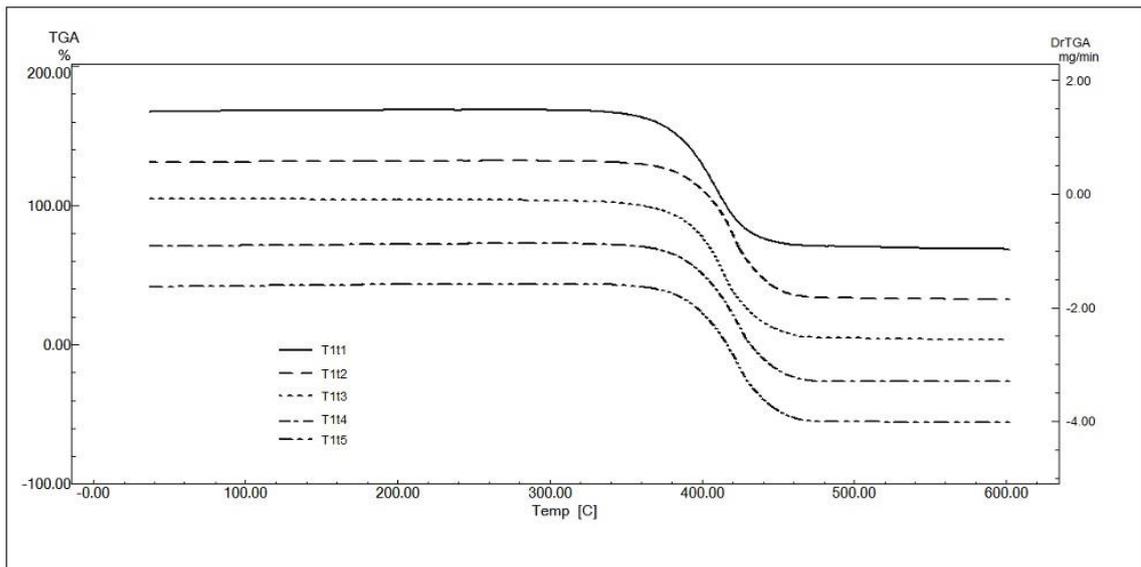


FIGURA 26. Curvas/Termogramas TG do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com películas (T1), obtido por prensagem hidráulica a frio armazenadas durante doze meses a 16°C; t1 – tempo 0; t2 – 3 meses; t3 – 6 meses; t4 – 9 meses; t5 – 12 meses

Apesar de o modo mais comum de expressar os resultados de TG ser em termos de % de perda de massa, é possível encontrar gráficos na literatura cuja abscissa é expressa em termos de massa. Neste caso, a DTG é a derivada primeira da curva TG. Nesta, as sobreposições ou os degraus correspondentes às variações de massa da curva TG são substituídos por picos que determinam áreas proporcionais às variações de massa, tornando as informações mais acessíveis e com melhor resolução. Quando observadas as curvas derivadas DTG (Figura 27), confirma-se que esse comportamento em evento único predomina partir de 409,41°C para a amostra no início do armazenamento (T1t1), 418,34°C para T1t2 (3 meses), 413,88°C para T1t3 (6 meses), 425,71°C para os tempos finais T1t4 (9 meses) e T1t5 (12 meses).

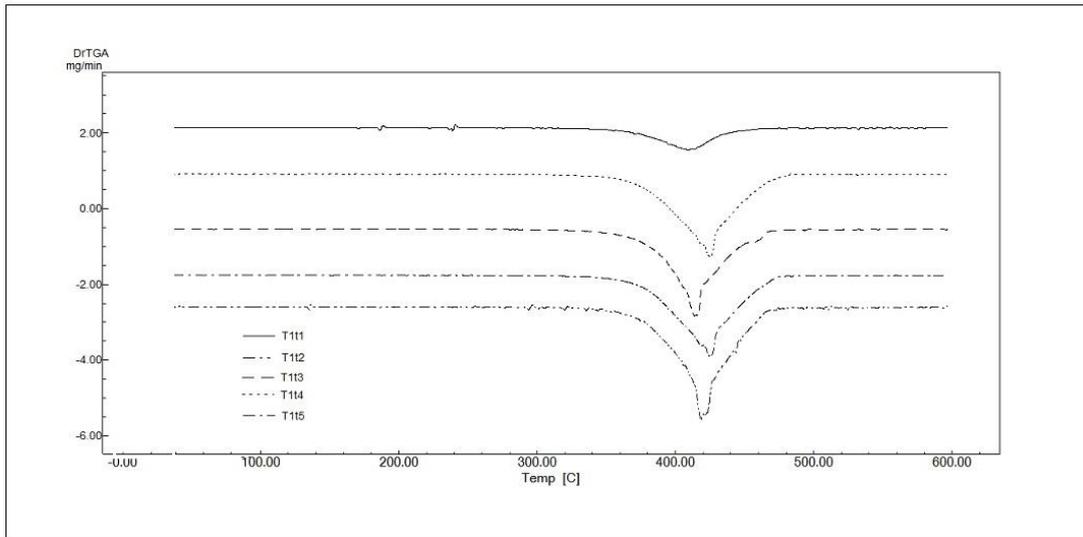


FIGURA 27. Curvas/Termogramas DTG do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* com películas (T1), obtido por prensagem hidráulica a frio, armazenadas durante doze meses a 16°C; t1 – tempo 0; t2 – 3 meses; t3 – 6 meses; t4 – 9 meses; t5 – 12 meses

A Figura 28 mostra as curvas TG do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculadas (T2), obtido por prensagem hidráulica a frio. É possível observar que as curvas apresentaram comportamento semelhante, com um único evento significativo de perda de massa ocorrendo a 396,17°C no início do armazenamento (T2t1), 397,99°C para T2t2 (3 meses), 392,73°C para o T2t3 (6 meses), 397,19°C para T2t4 (9 meses) e 398 24°C para o final dos doze meses de armazenamento (T2t5).

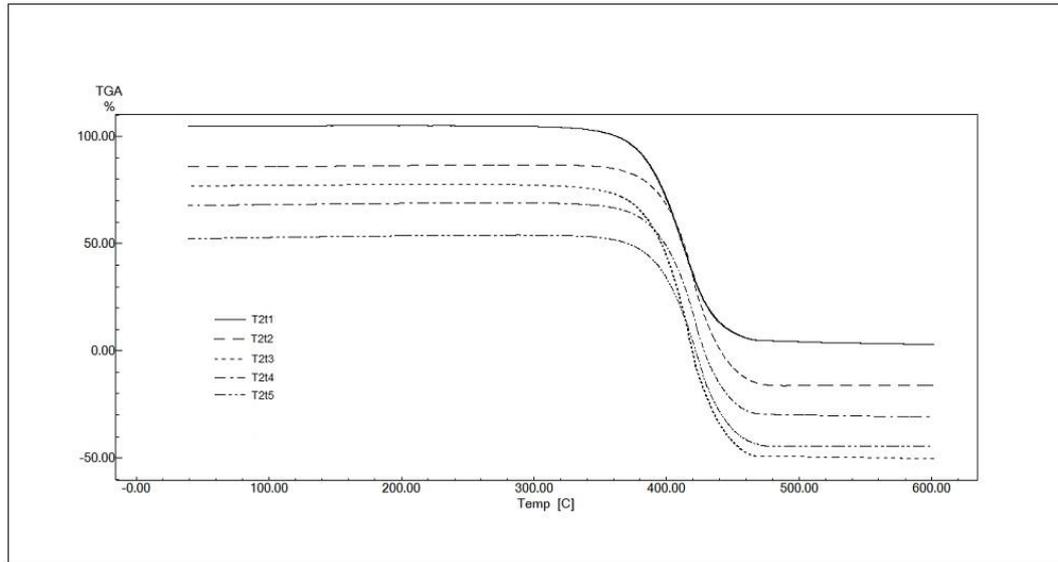


FIGURA 28. Curvas TG do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* despelculada (T2), obtido por prensagem hidráulica a frio, armazenadas durante doze meses a 16°C; t1 – tempo 0; t2 – 3 meses; t3 – 6 meses; t4 – 9 meses; t5 – 12 meses

A Figura 29 demonstra as curvas DTG do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* despelculada (T2), obtido por prensagem hidráulica a frio. Observa-se que a ocorrência de um único pico de decomposição de massa ocorreu em todas as amostras, entre 418,87°C (T2t2) a 425,94°C (T2t5) e perda de massa de 98,39 (T2t5) a 100,37 (T2t3).

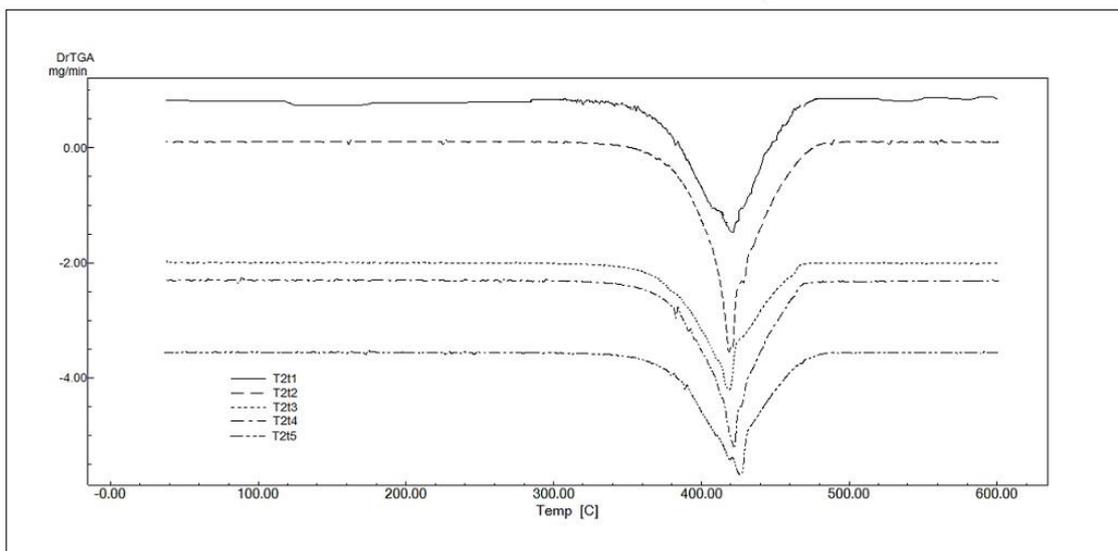


FIGURA 29. Curvas DTG do óleo de castanha-do-brasil tipo *broken* despelculada (T2), obtido por prensagem hidráulica a frio, armazenadas durante doze meses a 16°C; t1 – tempo 0; t2 – 3 meses; t3 – 6 meses; t4 – 9 meses; t5 – 12 meses.

4.2.5 Microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão

4.2.5.1 Microscopia ótica

Vários mecanismos de proteção atuam na manutenção da qualidade fisiológica de grãos, sementes e de amêndoas durante as etapas de secagem e armazenamento. Esses mecanismos têm a função de manter a integridade das membranas celulares, fundamental para o perfeito funcionamento do metabolismo celular. O estudo das estruturas permite a visualização dos danos causados pelas operações de agroindustrialização na ausência de mecanismos de proteção além da observação do início da efetividade destes mecanismos. Membranas das organelas celulares, o citoesqueleto e o núcleo esquelético são essenciais para o perfeito funcionamento da célula e danos a essas estruturas durante a secagem, desidratação e armazenamento podem levar à perda de qualidade (BERJAK e PAMMANTER, 2000).

Por não haver disponibilidade de referências para discussão dos resultados, nós decidimos analisar castanha-do-brasil tipo *large*, que é considerada a de maior valor comercial para exportação, simultaneamente às utilizadas neste estudo para fins de comparação das estruturas e conteúdos celulares com as do tipo *broken*, utilizadas neste estudo, de menor valor agregado e consumo estritamente nacional. Os estudos de estruturas celulares nos ajudam entender os mecanismos de envelhecimento e degradação de amêndoas armazenadas.

O corte transversal da amêndoa de castanha-do-brasil tipo *large* evidencia a presença da película (Figura 30). Segundo Castro, Camargo e Gavilanes (2000) essa película constitui-se de tecido lignificado, cujas células mortas não apresentam distinção visível entre si e é pouco aderente ao tecido interno adjacente. Segundo Corner (1976) é provável que esse tecido faça parte dos tegumentos da semente, pois em Lecythidaceae ocorre a presença de óvulos e sementes bitegmentadas. Para confirmação seria necessário um estudo anatômico de ontogênese da germinação desde a fecundação até a maturação da semente.

O tecido interno adjacente compõe-se de uma camada epidérmica, predominantemente bisseriada, com células de forma tabular e paredes celulares espessas (1b). Este tecido é o endosperma, que pode ter de duas a três camadas de células, com função de proteção, apresentando células diferenciadas, sem

capacidade de multiplicação, pois se rompe durante o processo de germinação, nos locais de prostrusão de raiz e parte aérea (CORNER,1976; CAMARGO, 2001).

A próxima camada interna constitui-se de tecido epidérmico contendo uma camada de células globosas, arredondadas, tamanhos pouco uniformes e paredes finas, que pode representar a primeira camada distinta, unisseriada, com células circulares, menores e formatos mais uniformes (1c). Possivelmente, trata-se de tecido parenquimático que compõe a maior parte da amêndoa da castanha-do-brasil. Os parênquimas apresentam células pouco especializadas, com potencial para retomada de atividade meristemática, podendo apresentar diversas atividades funcionais, bem como armazenar material de reserva (VAUGHAN, 1970; CUTTER, 1986; CASTRO, 2000).

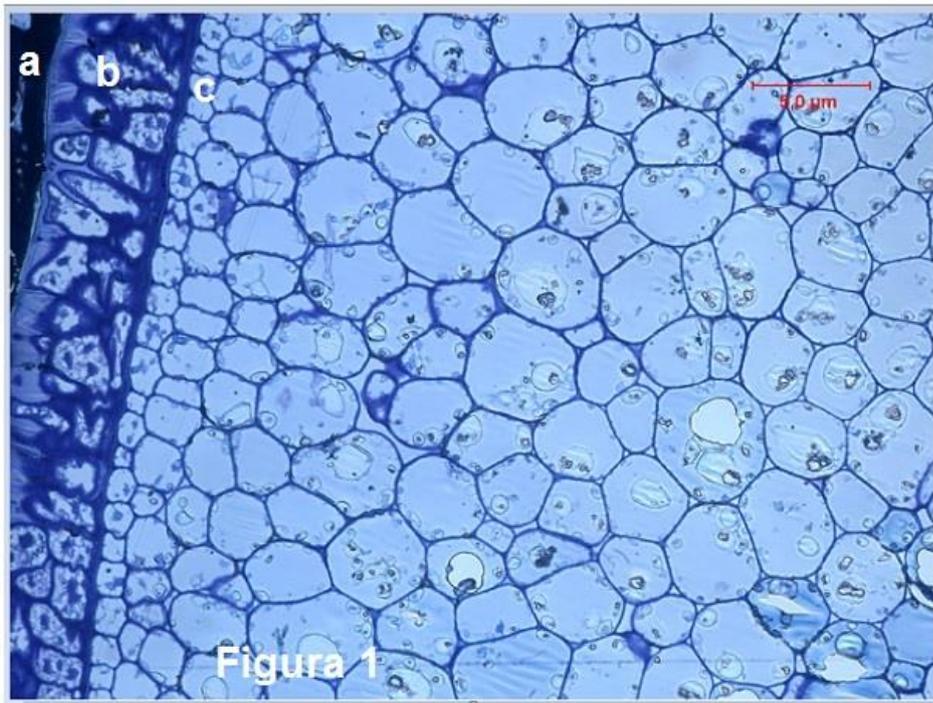


FIGURA 30. Corte transversal de amêndoa de castanha-do-brasil tipo *large* (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) evidenciando os tecidos distintos: 1a - Película marrom que envolve a amêndoa; 1b - Camada epidérmica; 1c - Primeira camada de células do tecido parenquimático. Aumento de 400x, barra 5μm, Embrapa Clima Temperado, 2013

Na Figura 31 (A e B) são apresentados os cortes transversais de endospermas de amêndoas de castanha-do-brasil *broken* com película, armazenadas em sacos de polietileno aluminizados, sob vácuo e mantidas sob temperatura ambiente (16°C) no período de outubro de 2011(t0) a outubro de 2012 (t4), respectivamente. O teor de umidade para o tratamento T1 (castanha-do-brasil

tipo *broken* com película) no início do armazenamento (t0) e no final (t4) foi de 1,7 e 2,4%, respectivamente.

É possível observar nas Figuras 31A (T1t0 – tempo inicial de armazenamento) e 31B (T1t4 – tempo final de armazenamento) a presença da película marrom (a), camada epidérmica (b) e primeira camada de células do tecido parenquimático preservada (c). Entretanto, percebe-se que as células do tecido de castanha-do-brasil *broken* com película armazenada durante 12 meses (Figura 31B2) apresentam tamanho reduzido, maior espessamento das paredes celulares, menos espaços intercelulares quando comparada àquelas do início do armazenamento (t0). O espessamento das paredes celulares é mais acentuado nas amêndoas armazenadas durante 12 meses, onde se observa que houve uma elevação do grau de umidade (2,4%,) conforme Figura 31. As castanhas frescas, antes do beneficiamento apresentam a película completamente aderida à camada epidérmica. Ao final de doze meses de armazenamento a camada epidérmica encontra-se mais lignificada, como se houvesse uma tentativa de autoproteção para evitar a degradação. É possível observar que as células ao fim do armazenamento apresentam-se mais irregulares, o que permitiu maior degradação do conteúdo lipídico.

Em estudo realizado com soja (*Glycine max*, (L.) Merrill) Oliveira (2011) observou que no início do armazenamento havia maior presença de espaços intercelulares e maior integridade e organização do conteúdo celular do que em grãos armazenados durante 12 meses em sistemas não hermético, hermético com e sem atmosferas modificadas com adições de dióxido de carbono (CO₂) e nitrogênio (N₂). O processo de lignificação da parede celular pode estar relacionado com a menor solubilidade protéica dos grãos submetidos a este sistema de armazenamento. Uma das manifestações da deterioração dos grãos durante o armazenamento é a desestruturação do sistema de membranas, como consequência do ataque aos seus constituintes químicos pelos radicais livres (JOSÉ et al., 2010).

Segundo Taiz e Zaiger (2004), a maioria das células vegetais é interconectada por plasmodesmas que formam um *continuum* citoplasmático e estes são responsáveis por transporte de solutos. Pammenter & Berjak (1999) relataram que o dano mecânico associado com a redução do volume celular durante o processo de secagem é o mais importante dano em tecidos muito hidratados.

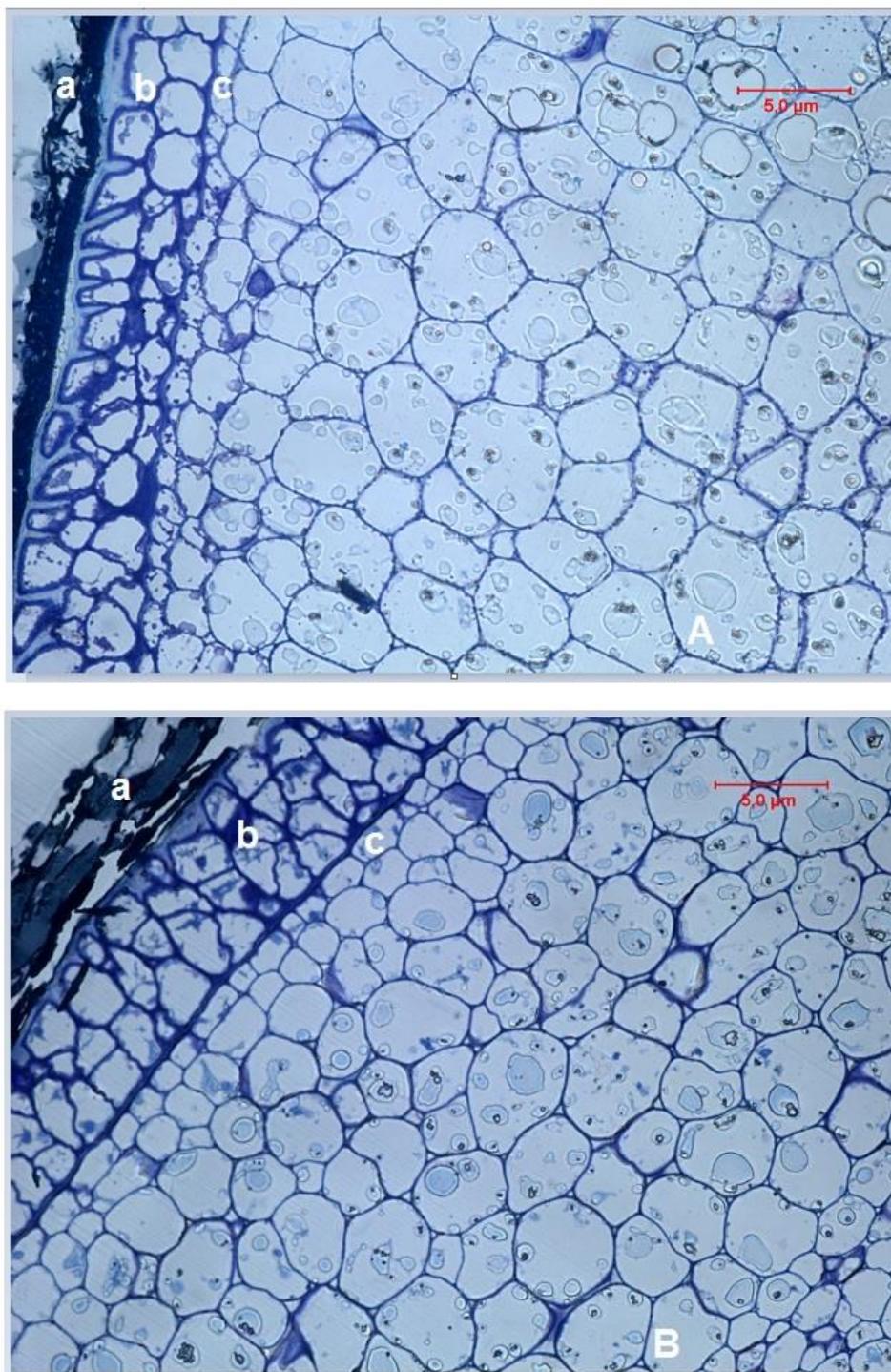


FIGURA 31. Cortes transversais de amêndoas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película evidenciando a preservação dos tecidos distintos. A – T1t0; B – T1t4; a – Película marrom que envolve a amêndoa; b – Camada epidérmica e c – Primeira camada de células do tecido parenquimático. Aumento de 400x, barra 5µm, Embrapa Clima Temperado, 2013

Durante o beneficiamento para obtenção de amêndoas desidratadas, as castanhas passam por diferentes operações, sendo a desidratação uma das etapas finais que antecedem o armazenamento, após a embalagem em sacos de polietileno

aluminizado sob vácuo. Apesar das amêndoas tipo *broken* serem classificadas como matéria-prima de baixo valor, estas mantêm as mesmas estruturas das amêndoas tipo *large* que possuem elevado valor comercial e, portanto, apresentam grande potencialidade para utilização como matéria-prima nas diversas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

As amêndoas de castanha-do-brasil tipo *broken* despelucada apresentavam, no início do armazenamento (T2t0) grau médio de umidade de 3,4% que manteve-se em elevação nos tempos subsequentes (t1, t2) (Figura 32). No tempo final (t3 = nove meses) apresentou uma pequena redução, mas manteve-se mais elevada (T2t4 = 7,4%). Esses valores foram muito acima das médias observadas para as amêndoas do T1 (castanha-do-brasil tipo *broken* com película) mantidas nas mesmas condições.

Na Figura 33 são apresentados os cortes transversais de endospermas de amêndoas de castanha-do-brasil *broken* despelucadas, armazenadas em sacos de polietileno aluminizados sob vácuo e mantidas sob temperatura ambiente (16°C) no período de outubro de 2011(t0) a outubro de 2012 (t4), respectivamente. O grau de umidade das amêndoas do tratamento T2 (castanha-do-brasil tipo *broken* despelucada) no início do armazenamento (T2t0) e no final (T2t4) foi de 3,4 e 7,2%, respectivamente. A Figura 32 (A e B) evidencia a ausência das camadas de película e de células da camada epidérmica. Observa-se também o acúmulo de substâncias (seta) nos espaços intercelulares, tanto no início quanto ao final do armazenamento (seta).

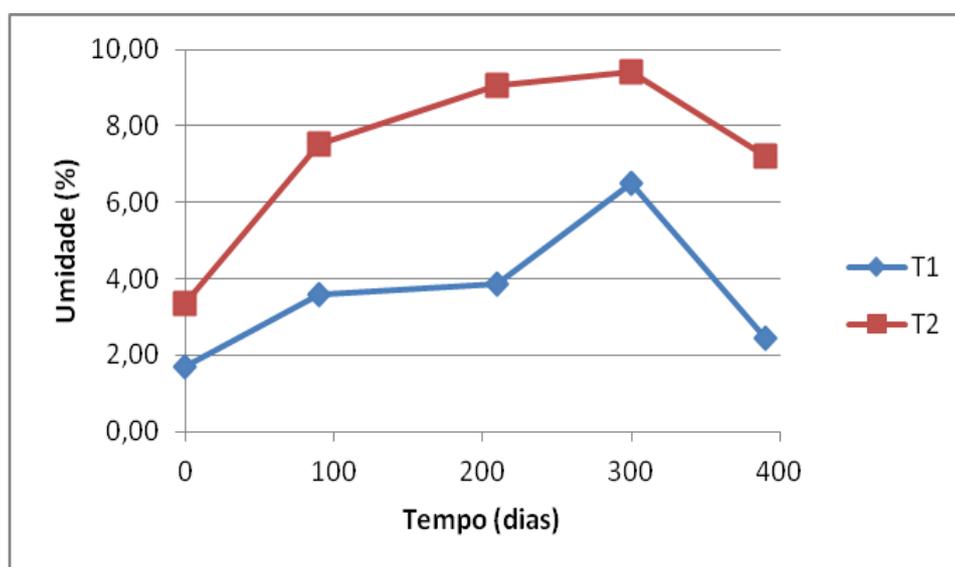


FIGURA 32. Grau de umidade das castanha-do-brasil tipo *broken* com películas (T1) e despelucada (T2) obtido por prensagem hidráulica a frio, armazenadas durante doze meses a 16°C

O tipo e as condições de embalagem utilizadas para armazenar amêndoas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película e despelculadas durante este estudo permitiram preservar suas características de qualidade com reflexo direto sobre a qualidade físico-química do óleo extraído, até os nove meses (Figuras 21 e 22), onde, a partir desse ponto observou-se uma ligeira elevação do grau de umidade, dos índices de acidez e peróxidos até o final dos doze meses, para os dois tratamentos. O aumento dos espaços intercelulares observados nas amendoas mais velhas, também demonstra degradação de reservas celulares.

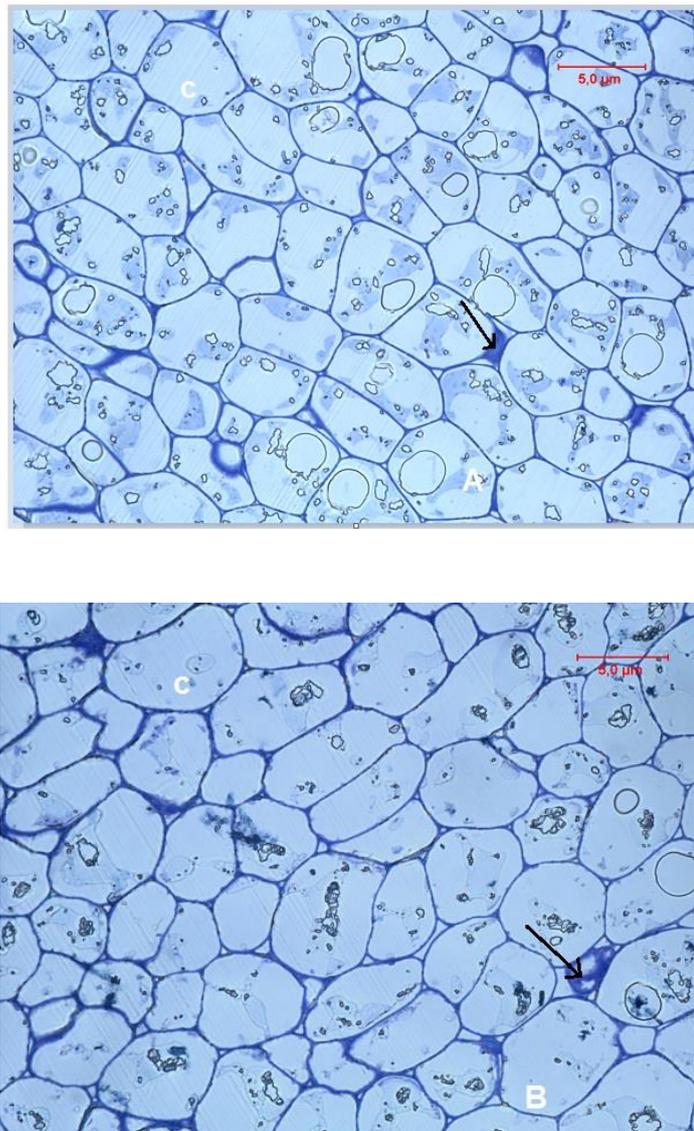


FIGURA 33. Cortes transversais de amêndoas de castanha-do-brasil tipo *broken* despelculadas evidenciando a ausência de tecidos distintos. A – T2t0; B - T2t4; C – Primeira camada de células do tecido parenquimático. Aumento de 400x, barra 5µm, Embrapa Clima Temperado, 2013

4.2.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As micrografias obtidas por MET de corte ultrafinos de amêndoas de castanha-do-brasil tipo *large*, castanha-do-brasil tipo *broken* com película e castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada são mostradas nas Figuras 33, 34, 35 e 36. Nas Figuras 34 e 34B é possível observar que a parede celular (W) nas duas imagens apresenta contornos bem definidos, assim como os corpos lipídicos (OD) que estão delimitados em organelas chamadas algumas vezes de oleossomos, esferossomos, gotas lipídicas ou corpos lipídicos. O papel dos corpos lipídicos é bem aceito como sendo um compartimento sub-celular onde as reservas lipídicas são depositadas e armazenadas. Essas reservas, na forma de triacilgliceróis compõem a maior parte dos esferossomos (NAPIER et al., 1996).

A compartimentação de lipídios está associada com tecidos de sementes, onde triacilgliceróis (TAG) armazenados dentro gotículas lipídicas (LDS, OD, OB) podem servir como um elemento fisiológico essencial e de energia de reserva de carbono durante crescimento pós-germinativo (CHAPMAN et al., 2011). Os TAG são então divididos e metabolizados em energia consumida em eventos como a germinação. Em geral, esses corpos lipídicos podem facilitar a quebra dos lipídios de armazenamento devido à sua área de superfície elevada em relação ao volume, ou seja, uma maior área de TAG disponível para quebra e assim, permitir que o catabolismo seja eficiente.

Em geral, os corpos lipídicos em sementes de uma vasta gama de espécies de plantas diferentes parecem ser de um tamanho similar, geralmente variando entre 0,2 μ m e 21 μ m de diâmetro, embora essas estimativas sejam baseadas em microscopia eletrônica de cortes ultrafinos de tecido da semente, onde os corpos lipídicos estão geralmente muito compactados na célula *in vivo*. Entretanto, o seu tamanho pode aumentar ao longo do desenvolvimento e maturação da semente, assim como o número destes, até que eles estejam ocupando todo o citoplasma da célula nos tecidos de armazenamento (NAPIER et al., 1996; CHAPMAN et al., 2011; LOTT e BUTTROSE, 1977).

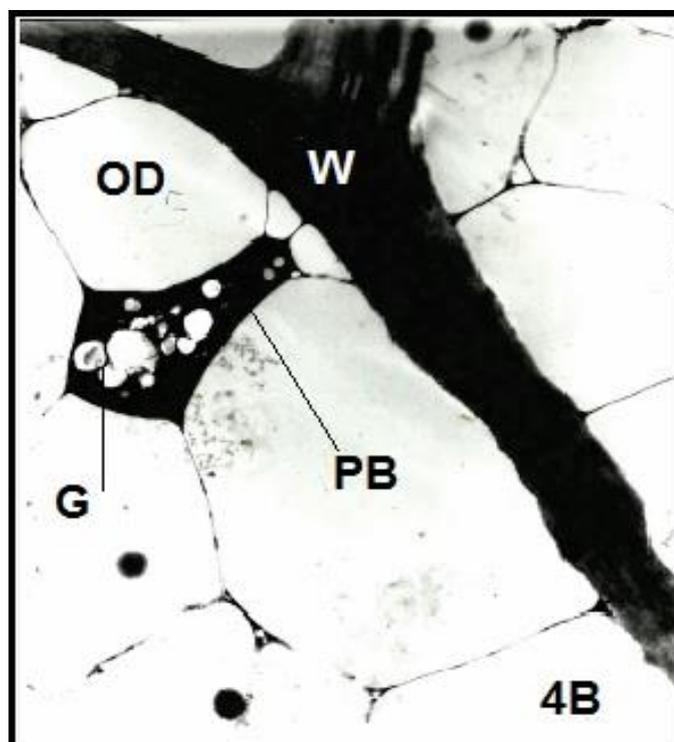
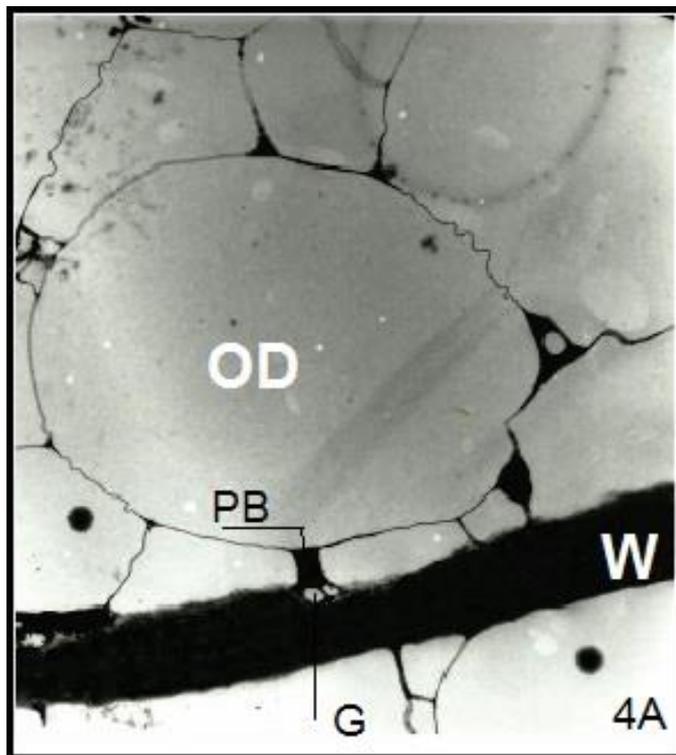


FIGURA 34. Micrografias de células do endosperma de castanha-do-brasil desidratada tipo *large*, com 1,7% de umidade, visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão. W – parede celular; OD – corpos lipídicos; PB – corpos protéicos; G - globóides. - Aumento de 17000x; 4B – Aumento de 7000x; Embrapa Clima Temperado, 2013

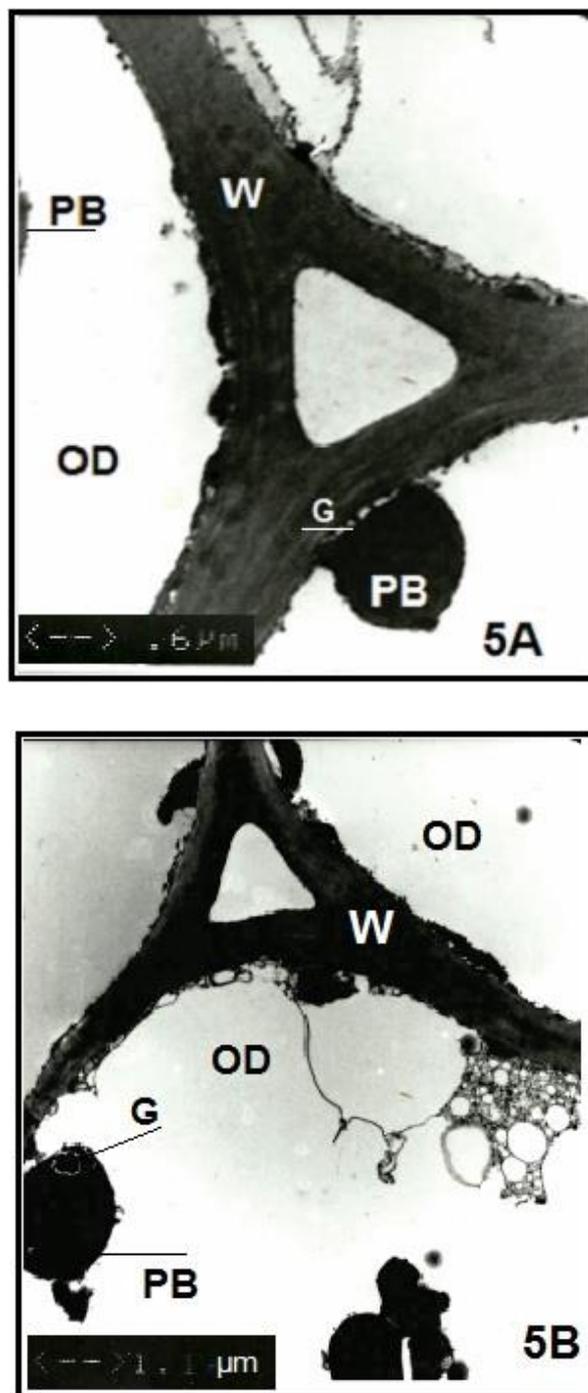


FIGURA 35. Micrografias de células do endosperma de castanha-do-brasil tipo *broken* com película, visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão. 5A - castanha-do-brasil tipo *broken* com película no início do armazenamento; 5B - castanha-do-brasil tipo *broken* com película no final do armazenamento. W – parede celular; OD – corpos lipídicos; PB – corpos protéicos; G - globóides. 5A - Aumento de 12000x; 5B - Aumento de 17000x; Embrapa Clima Temperado, 2013.

Corpos protéicos (PB) são organelas delimitadas por uma membrana única e estão relacionados ao armazenamento de proteínas em sementes de plantas. Eles possuem uma matriz homogênea em que cristalóides e/ou globóides podem ser incorporados. Além de proteínas de armazenamento acumulados várias enzimas hidrolíticas, fosfatos (proteases), lectinas e íons inorgânicos, principalmente fitina (K^+ , Mg^+ , Ca^{+1}) também estão presentes. Os corpos protéicos (PB) nas Figuras 34A e 34B, consistem na matriz protéica contendo áreas globóides e cristalóides (G). É possível observar a presença de globóides ou cristais encontrados no interior da matriz protéica (ou cristalóides), com aspecto electron-opaco semelhantes aos encontrados por Lott e Buttrose (1977) quando analisou, entre outras matrizes, amêndoas de castanha-do-brasil. Segundo estes autores, os globóides identificados são compostos de cristais e possuem, frequentemente, bário além de fósforo, potássio, cálcio e magnésio.

Na Figura 35, podemos observar as estruturas celulares nos tecidos de amêndoas de castanha-do-brasil tipo *broken* com película no início do armazenamento (figura 35A) e após doze meses de armazenadas (Figura 35B). É possível notar as alterações ocorreram nas estruturas no decorrer do armazenamento, principalmente nos corpos lipídicos quando comparados às da castanha-do-brasil tipo *large*, que se apresentavam bem delimitados e com paredes celulares bem definidas e intactas. Na Figura 35A, correspondente ao início do armazenamento, os corpos lipídicos (OD) encontravam-se pouco definidos em forma e tamanho, uma vez que a meia bicamada que os delimitava praticamente desapareceu nos campos visualizados. Já nas amêndoas submetidas a 12 meses de armazenamento estes corpos encontram-se aglomerados e pouco delimitados (Figura 35B), tamanhos reduzidos e muito próximos à parede celular, juntamente com outros elementos como corpos protéicos (PB), globóides (G). As paredes celulares apresentam-se, mais delgada e visivelmente degradada no início e no final do armazenamento, respectivamente.

A Figura 36 apresenta as estruturas observadas nas células do tecido parenquimático das amêndoas despeliculadas no início do armazenamento (36A) e ao final do armazenamento (36B).

São visíveis a completa ausência de fragmentos de película e a desorganização dos conteúdos já no início do armazenamento. É possível observar que não se verifica a presença da meia bicamada que circunda os corpos lipídicos, os quais parecem estar livres no citosol. Tanto no início como ao final do armazenamento as paredes celulares (W) apresentam contornos irregulares, corpos

protéicos (OD), globóides e cristalóides (G) com forma pouco regulares e próximos das paredes celulares. Note-se que na Figura 36A a parede celular apresenta uma ruptura (seta), indicando uma possível perda de conteúdo para o meio extracelular.

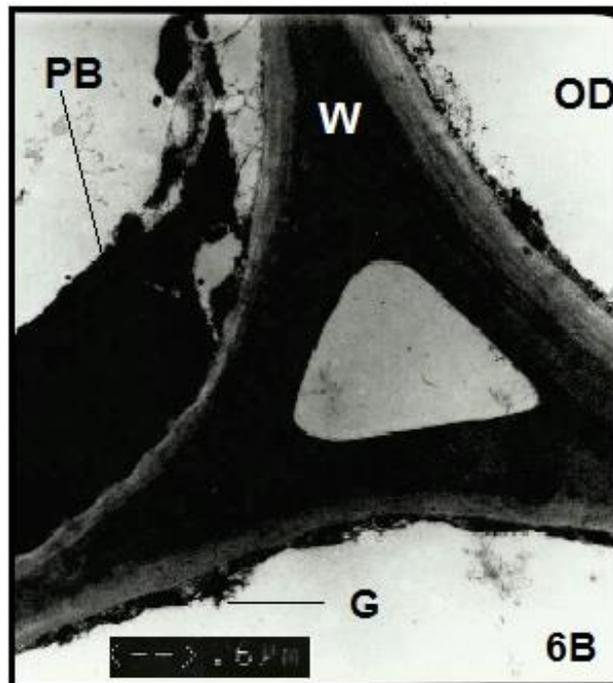
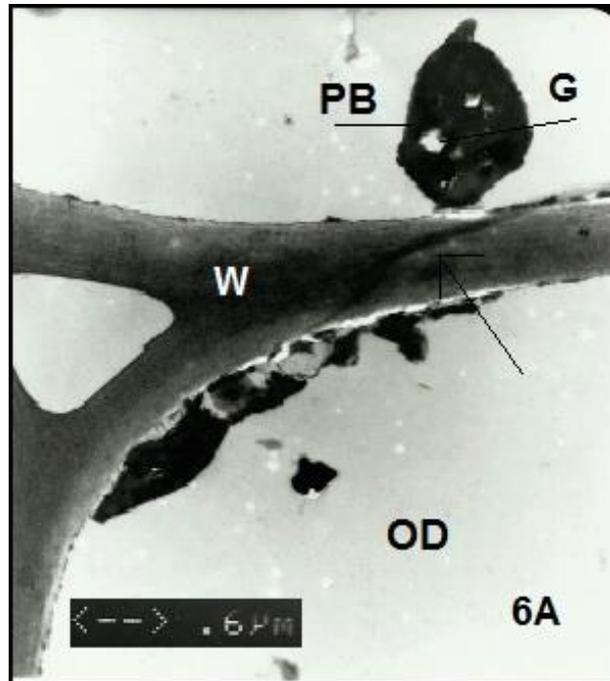


FIGURA 36. Micrografias de células do endosperma de castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculadas, visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão. 6A - castanha-do-brasil tipo *broken* despeliculada no início do armazenamento; 6B - castanha-do-brasil tipo *broken* com despeliculada no final do armazenamento. W - parede celular; OD - corpos lipídicos; PB - corpos protéicos; G - globóides; Aumento de 12000x; F2 - Aumento de 12000x; Embrapa Clima Temperado, 2013

No caso da castanha-do-brasil, existem raros estudos sobre microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. Na verdade, foram encontrados apenas dois trabalhos que versam diretamente sobre estruturas celulares desta importante matéria-prima, mas no âmbito de estudos botânicos.

5 CONCLUSÕES

5.1 ESTUDO 1

A caracterização protéica da castanha-do-brasil qualifica esta matéria-prima como uma fonte potencial de proteína de boa qualidade, com potencial uso sob a forma de ingrediente funcional de alimentos.

A separação por SDS-PAGE ilustra o perfil proteico global da FPD, IP, frações (albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas) e material não solubilizado, indicando a sua complexidade. A separação utilizando condições redutoras confirma que a fração albumina é o maior componente do IP, seguida pelas frações glutelina, globulina e prolamina e que frações apresentam perfil eletroforético semelhante ao da matriz FPD.

As proteínas de castanha-do-brasil, incluindo o isolado proteico, as frações albumina, globulina, prolamina, glutelina exibem composições de aminoácidos balanceadas, que podem suprir as necessidades diárias requeridas para crianças e adultos. Estudos como este qualificam as proteínas de castanha-do-brasil como potenciais ingredientes para elaboração de alimentos nutritivos.

Análises de DSC demonstram que FPD, IP, frações (albuminas, globulinas, prolaminas) e material não solubilizado possuem comportamento térmico semelhante, com exceção da fração glutelina que apresentou pico exotérmico.

O valor de ΔH requerido para a desnaturação é maior na fração albuminas, possivelmente pela presença de aminoácidos sulfurados como a cisteína, que promovem a formação de pontes dissulfeto, tornando as proteínas mais resistentes termicamente.

Castanhas-do-brasil tipo *broken* com películas apresentaram conteúdo de compostos fenólicos superior ao das castanhas-do-brasil tipo *broken* despeliculadas, o que pode ter contribuído para a maior estabilidade do óleo obtido a partir da prensagem das castanhas com película durante o armazenamento. A manutenção da película marrom pode fornecer importante quantidade de antioxidantes fenólicos que inibem o estresse oxidativo do organismo.

5.2 ESTUDO 2

O óleo de castanhas-do-brasil tipo *broken* armazenadas por 12 meses com películas e despelculadas nas condições do estudo mantém os índices de acidez, peróxidos e saponificação dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA, de acordo com a Resolução nº 482 de 23/10/1999.

A despelculagem das amêndoas afeta a composição de ácidos graxos e a estabilidade térmica dos lipídeos.

O armazenamento de castanhas-dos-brasil tipo *broken* com película por até 12 meses, garante a conservabilidade lipídica e proteica das amêndoas.

Conforme as análises de microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão, a manutenção da película marrom que envolve a castanha-do-brasil, notadamente as do tipo *broken* utilizadas nesta pesquisa, pode contribuir para maior organização do conteúdo celular, possibilitando uma maior proteção das características físico-químicas, bioquímicas e estabilidade da lipídica.

6 REFERÊNCIAS

ABUGOCH, E.L.; MARTINEZ, E.N.; AÑÓN, M.C. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Glutelin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, La Plata, Argentina, v.51, p.4060-4065, 2003.

AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochimica Acta**, Toledo, Ohio, USA, v.319, p.17-25, 1998.

AIKAWA, J. **Efeitos da suplementação com óleo de peixes sobre a caquexia, o crescimento tumoral e o sistema imunitário em ratos F2**. 2004. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

ALCOCER, M.J.C.; RUNQVIST, L.; LARSSON, G. Ber e 1 protein: the versatile major allergen from Brazil nut seeds. **Biotechnology Letters**, Nottingham, Loughborough, UK, v.34, p.597-610, 2012.

ALTENBACH, S.B.; PEARSON, K.W.; LEUNG F.W.; SUN, S.S.M. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a Brazil nut protein exceptionally rich in methionine. **Plant Molecular Biology**, California, USA, v.8, p.239-250, 1987.

ALTENBACH, S.B.; KUO, C.C.; STARACI, L.C.; PEARSON, K.W.; WAINWRIGHT, C.; GEORGESCU, A.; TOWNSEND, J. Accumulation of a Brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. **Plant Mol. Biol.**, California, USA, v.18, p.235-245, 1992.

ALVARES, V.S.; CASTRO, I.M.; COSTA, D.A.; LIMA, A.C.; MADRUGA, A.L.S. Qualidade da castanha-do-brasil no comércio de Rio Branco, Acre. **Acta Amazônica**, v.42, n.2, p.269-274, 2012.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (AACC). **Approved methods of the AACC**. 8th.ed., Saint Paul, USA, 1983.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTRY (AACC). 17thed., Washington, DC, USA, v.2, 1995.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (AACC). **Approved methods**. 10thed., Saint Paul, USA, 1999.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official and tentative methods**. 3thed., Champaign, Illinois, USA, 2003.

AMORIM, J.A.; ELIZIÁRIO, S.A.; GOUVEIA, D.S.; SIMÕES, A.S.M.; SANTOS, J.C.O.; CONCEIÇÃO, M.M.; SOUZA, A.G.; TRINDADE, M.F.S. Thermal analysis of de rice and by-products. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Campina Grande, PB, v.75, n.2, p.393-399, 2004.

ANDERSON, K.J.; TEUBER, S.S.; GOBEILLE, A.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A.L.; STEINBERG, F.M. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. **Journal of Nutrition**, San Diego, USA, v.131, n.11, p.2837–2842, 2001.

ANDREASEN, M.F.; LANDBO, A.K.; CHRISTENSEN, L.P.; HANSEN, A.; MEYER, A.S. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoprotein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Rolighedsvej, Denmark, v.49, p.4090-4096, 2001.

ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A.; ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of Food Protection**, Winnipeg, Manitoba, Canada, v.68, p.1060-1065, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official AOAC**, 16th ed., Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of Analysis of the Association of AOAC International**. 17th ed. Gaithersburg, Maryland, USA. 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOCS). **Official methods and recommended practices of AOCS**. Champaign, Illinois, USA. 1991.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOCS). **Official and tentative methods of the American Oil Chemist's Society** (3rd ed.). Chicago, USA: American Oil Chemists' Society Press, 1998.

ASSUNÇÃO, F.P.; BENTES, M.H.S.; SERRYA, H.A comparison of stability oil from Brazil nut, from rubber and passion fruit seeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, Illinois, USA, v.61, n.6, p.1031-1036, 1984.

BARRADAS, M.M. **Estrutura do fruto e da semente do piqui – *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae)**. 1971. 129f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

BARRADAS, M.M. Morfologia do fruto e da semente de piqui (*Caryocar brasiliense*), em várias fases de desenvolvimento. **Revista de Biologia**, Lisboa, Portugal, v.9, n.1-4, p.69-93, 1973.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999. 443p.

BARTOLOMÉ, B.; MENDEZ, J.D.; ARMENTIA, A.; VALLVERD, A., PALACIOS, R. Allergens from Brazil nut: immunochemical characterization. **Allergol Immunopathology**, Bilbao, Spain, v.25, p.35-44, 1997.

BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants?

Physiological and Molecular Plant Pathology. Kingston, USA, v.57, n.3, p.101-110, 2000.

BELTRATI, C.M. **Morfologia e anatomia de sementes.** Rio Claro: UNESP, 1994. 108p.

BERNAL, C.; COUTO, A.B.; BREVIGLIERI, S.T.; CAVALHEIRO, E.T.G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova** [online], v.25, n.5 [cited 2013-05-04], p.849-855, 2002.

BOYE, J.L.; MA, C.Y.; HARWALKAR, V.R. In: S. DAMODARAN, A. PARAF (Eds.), **Food Proteins and Their Applications**, Marcel Dekker, Basel, NY, 1996, p.25.

BOZAN, B.; TEMELLI, F. Supercritical CO₂ extraction of flaxseed. **Journal American Oil Chemistry Society**, Alberta, Canada, v.79, p.231-235, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360. Regulamento sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, dezembro de 2003.

BRASIL. Resolução RDC/ANVISA/MS nº 270, de 22 setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial União**. Brasília, 23 set. 2005, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas específicas de castanha-do-brasil – safra 2011.** Comunicado CONAB/MOC Nº 001, de 07/01/2011.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, USA, v.56, p.317-333, 1998.

BREINHOLT, V. Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids. In: KUMPULAINEN, J.; SALONEN, J.E. (Eds.). **Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999, p.93-105.

BROWN, K.M.; ARTHUR, J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutrition**, Aberdeen, Scotland, v.4, n.2B, p.593-599, 2001.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. **Pediatric Research**, Cleveland, USA, v. 64, n4, p.381-386, 2008.

CAMARGO, I.P.; CASTRO, E.M.; GAVILANES, M.L. Aspectos da anatomia e morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-Brasil. **Revista CERNE**, Lavras, MG, v.6, n.2, p.11-18, 2000.

CARDARELLI, H.R.; OLIVEIRA, A.J. Conservação do leite de castanha-do-pará. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, SP, v.57, n.4, p.617-622, 2000.

CARVALHO-FILHO, M.A.S. **Preparação e estudo termoanalítico dos cinamatos de terras raras, exceto (escândio), no estado sólido**. 2000, 145f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

CASTRO, L.A.S. **Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. 37p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 93).

CAVALHEIRO, E.T.G.; IONASHIRO, M.; BREVEGLIERI, S.T.; MARINO, G.; CHIERICE, G.O. Influence of experimental factors on results of thermogravimetric analysis. **Química Nova**, São Carlos, SP, v.18, n.3, p.305-308, 1995.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1999, 212p.

CHAPMAN, KD. Et al. Biogenesis and functions of lipids droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. Guelph. **Journal Lipids Research**, Ontario, Canada, v.53, n.2, p.215-26, 2012.

CHUNHIENG, T.; GOLI, T.; PIOMBO, G.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Recent analysis of the composition of Brazil nut: *Bertholletia excelsa*. **Bois et Forêts Des Tropiques**, Montpellier, France, v.280, p.91-98, 2004.

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil biological active compounds. **Corps Gras**, Castries, France, 2004.

CHUNHIENG, T.; PETRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.A., GOLI, T.; MONTET, D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Canada, v.52, n.13, 2004.

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed study of Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) oil microcompounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal Brazil Chemistry Society**, Canada, v.19, n.7, p.1374-1380, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex **Standards for named vegetable oils, CODEX Stan 210, 1999**. Roma: FAO/WHO, 2005. (Revisão 2005).

COLLINSON, C.; BURNETT, D.; AGREDA, V. (2000). **Economic viability of Brazil nut trading in Peru**. Disponível em: <http://www.nri.org/projects/NRET/brazilnuts.pdf>. Acessado em: 29.04.2013.

CORNEJO, F. **História natural de la castaña (*Bertholletia excelsa* Humb & Bonpl.) y propuestas para su manejo**. Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazónica (ACCA). Madre de Dios, Perú. 52p. 2004.

CORNER, E.J.H. **The seeds of dycotyledons**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976, v.1, 552p.

COSTA, M.G.; SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; ANDRADE, S.A.C. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importadas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, 2008.

CURI, R. et al. **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. 1.ed., Barueri-SP: Manole, 2002, 580p.

DELCOUR, J.A.; HOSENEY, R.C. **Principles of cereal science and technology**, 3rd Ed., AACC International Inc., St. Paul, Minnesota, USA, 2010.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, Milão, Itália, v.53, p.31-45, 1997.

DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, J.A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, Campinas, v.13, p.79-106, 2000.

ELIAS, M.C.; SCHIAVON, R.A.; OLIVEIRA, M. Aspectos científicos e operacionais na industrialização de arroz. In: ELIAS, M.C. **Qualidade de arroz na colheita: ciência, tecnologia e normas**. Pelotas: Ed. Santa Cruz, 2010. 543p.

EL NASRI, N.A.; EL TINAY, A.H. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. **Food Chemistry**, Shambat, Sudan, v.103, p.582-589, 2007.

ENRIQUEZ, G.; SILVA, M.A.; CABRAL, E. **Biodiversidade da Amazônia: usos e potencialidades dos mais importantes produtos naturais do Pará**. Belém: NUMA/UFGPA, 2003.

FAULDS, C.B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Norwich, UK, v.79, n.3, p.395, 1999.

FERBERG, I. et al. Efeito das condições de extração no rendimento e qualidade do leite de castanha-do-brasil despelculada. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Rio de Janeiro, RJ, v.20, n.1, p.75-78, 2002.

FERNANDES, D.C.; FREITAS, J.B.; CZEDER, L.P.; NAVES, M.M.V. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna. **Journal of the Science of Food Agriculture**, Oxford, England, v.90, n.10, p.1650-1655, 2010.

FERREIRA, E.S.; SILVEIRA, C.S.; LUCIEN, V.G.; AMARAL, A.S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.17, n.2, p.203-208, 2006.

FONTANARI, G.G.; BATISTUTI, J.P.; BANNACH, G.; PASTRE, I.A.; IONASHIRO, E.Y.; FERTONANI, F.L. Thermal study and physico-chemical characterization of some functional properties of guava seeds protein isolate (*Psidium guajava*). **Journal Thermal Analytical Calorimetry**, Araraquara, SP, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **El número de personas que pasan hambre está aumentando.** Disponível em: <http://www.fao.org/hunger/hungerhome/es/>. Acesso em: 10 de março de 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Enriquecimiento de los alimentos.** Desnutrición proteico-calórica. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Nutrición, Organización Mundial de la Salud, Série de Informes Técnicos, Organización Mundial de la Salud, Ginebra. 1971.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Major food and Agricultural commodities and producers**, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Disponível em: http://www.healthknot.com/essential_amino_acids.html. Acesso em: 29/11/2012.

FRANK, H.K.; BETANCOURT, L. A castanha-do-pará I: Origem, produção e características físicas e químicas. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.15, n.4, p.351-365, 1981.

FREITAS, L.S.; OLIVEIRA, J.W.; DARIVA, C.; JACQUES, R.A.; CARAMÃO, E.B. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Porto Alegre, RS, v.56, p.2558-2564, 2008.

FREITAS, S.P.; FREITAS-SILVA, O.; MIRANDA, I.C.; COELHO, M.A. Extração e fracionamento simultâneo do óleo de castanha-do-brasil com etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p.14-17, 2007.

FREITAS-SILVA, O.; SOUZA, M.L.M.; VENANCIO, A. Tracing fungi secondary metabolites in Brazil nuts using LC-MS/MS. **Drug Metabolism Letters**, Braga, Portugal, v.5, n.3, p.150-155, 2011.

GALVÃO, E.L. **Extração supercrítica do óleo de linhaça: construção do extrator, estudo de parâmetros de processo, avaliação química e antioxidante do produto.** 2009, 142f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

GLÓRIA, M.M.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha-do-pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.20, n.2, 2000.

GUEDES, A.M.M. **Estudo da extração de óleo da polpa de tucumã por CO₂ supercrítico.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, Belém.

HAGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. **Journal of The Association of Official Analytical Chemists**, Moscow, URSS, v.72, n.6, p.912-916, 1989.

HALVORSEN, B.L.; HOLTE, K.; MYHRSTAD, M.C. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **The Journal of Nutrition**, Minneapolis, USA, v.132, p.461-471, 2002.

HARTMAN, L.; ESTEVES, W. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. In: FUNDAÇÃO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA. **Tecnologia agroindustrial**. São Paulo, SP, 1982, p.1-10.

HARTMAN, L.; LAGO, R. **Análise de óleos e gorduras**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CTAA, 1996.

HAWTHORNE, S.B. Analytical-scale supercritical fluid extraction. **Analytical Chemistry**, Uppsala, Sweden, v.62, n.11, p.633-642, 1990.

HIGGINS, T.S.V. Synthesis and regulation of major protein in seeds. **Annual Review Plant Physiology**, Canberra, Australia, v.35, p.191-121, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: O Instituto, 1985.

INTERNATIONAL NUT COUNCIL (INC). **Brazil Nut Retrieved on 30th November 2010**. Disponível em: <<http://www.nutfruit.org/brazilnuts>>. Acesso em: 20.12.2012.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, São Paulo, SP, n.26, v.121, p.17-24, 1980.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. **Princípios básicos da termogravimetria e análise térmica diferencial/calorimetria exploratória diferencial**. São Paulo: Giz Editorial, 2004. 82p.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v.26, p.54-75, out./nov. 1980. Disponível em: <www.abratec.com.br>. Acesso em: 25 de janeiro de 2013.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v.26, p.54-75, out./nov. 1980. Disponível em: <www.abratec.com.br>. Acesso em: 25 de janeiro de 2013.

IRVING, D.W.; PEAKE, J.L.; BREDA, V.A. Nutrient distribution in five perennial grain species exhibited by light and electron microscopy. **Cereal Chemistry**, Albany, CA, USA, v.68, n.4, p.376-382, 1991.

JACKS, T.J.; YATSU, L.Y.; ALTSCHUL, A.M. Isolation and characterization of peanut spherosomes. **Plant Physiology**, New Orleans, Louisiana, USA, v.42, p.585-597, 1967.

JOHN, J.A., SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, Newfoundland, Canada, v.2, p.196-209, 2010.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**/ Aylton B. Joly; ilustrações de Irina Gemtchujnikov. 5.ed., São Paulo: Ed. Nacional, 1979.

JOSÉ, S.C.B.R.; SALOMÃO, A.N.; COSTA, T.S.A.; SILVA, J.T.T.T.; CURI, C.C.S. Armazenamento de sementes de girassol em temperaturas subzero: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v.32, n.4, p.029-038, 2010.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Izmir, Turkey, v.44, n.6, p.453-464, 2004.

KIM, D.O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, Geneva, NY, USA, v.81, p.321-326, 2003.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K.H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, Barking, v.98, n.2, p.381-387, 2006.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, Pennsylvania, USA, v.113, 71S–88S. 2002.

KRISHNAN, H.B; OKITA, T.W. Structural relationship among the rice glutelina polypeptides. **Plant Physiology**, Beltsville, USA, v.81, p.748-753, 1986.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 2. Composition of phenolic acids in rapeseed flour and hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Beltsville, USA, v.30, p.334-336, 1982.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAMEIRA, C.P.; COELHO, G.L.V.; MOTHE, C.G. Extração de lipídeos da amêndoa de castanha de caju com CO₂ supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.17, n.4, p.405-407, 1997.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating alpha-amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.77, n.5, p.620-626, 2000.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.L.; GOX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed., São Paulo: Sarvier, 2006.

LEITE, F.M.N. **Fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil sob as condições da floresta e de armazenagem comunitária no Acre**. 2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

LIADAKIS, G.N.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C.D. Protein isolation from tomato seed meal, extraction optimization. **Journal of Food Science**, Beltsville, USA, v.60, n.3, p.477-482, 1995.

LOTT, J.N.A.; BUTTROSE, M.S. Globoids in protein bodies of legumes seed cotyledons. **Australian Journal Plant Physiology**, Gatersleben, German, v.5, p.89-111, 1977.

LQARI, H.; VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; MILLÁN, F. *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. **Food Chemistry**, Sevilla, Spain, v.76, p.349-356, 2002.

LUCAS, E.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros – Determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: e-papers, 2001. 366p.

MACKENZIE, R.C. Nomenclature in thermal-analysis. **Thermochemica Acta**, New York, USA, v.28, n.1, p.1-6, 1979.

MAGOSHI, J.; BECKER, M.A.; HAN, Z.; NAKAMURA, S. Thermal properties of seed proteins. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Tsukuba, Japan, v.70, p.833-839, 2002.

MALACRIDA, C.R. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê – óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. **Brazil Journal Food Technology**, São Paulo, SP, v.6, n.2, p.245-249, 2003.

MAUSETH, J. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1988. 560p.

MEHLENBACHER, V.C. The analysis of fats and oils. Champaign: Garrard Press, 1960, apud ZÁCARI, C.Z. **Estabilidade oxidativa de óleo extra virgem de castanha do Pará com ervas aromáticas antioxidantes**. 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MOHAMED, A.A. Effect of corn oil and amylose on the thermal properties of native soy protein and commercial soy protein isolate. **Food Chemistry**, Peoria, Illinois, USA, n.78, p.291-303, 2002.

MORALES DE LEON, J.; BOURGES, H.; CAMACHO, M.E. Amino acid composition of some Mexican foods. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, Venezuela, v.55, p.172-186, 2005.

MOREIRA, A.V.B. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.). I - Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação**. 1999. 120f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

MORENO, F.J.; JENKINS, J.A.; MELLON, F.A.; RIGBY, N.M.; ROBERTSON, J.A.; WELINER, N. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholettia excelsa*). **Biochimica et Biophysica Acta**, Norwich, UK, v.1698, n.2, p.175-186. 2004.

MORETTO, E.; ALVES, R.F. **Óleos e gorduras vegetais: processamento e análises**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1986, 179p.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na Indústria de alimentos**. São Paulo: Editora e Livraria Varela, 1998. 150p.

MORI, A.S. The Brazil nut industry – past, present and future. In: PLOTKIN M.; FAMORALE L. (eds.). **Sustainable harvest and marketing of rain forest products**. Washington: Island Press, 1992, p.241-251.

MORI, S.A.; PRANCE, G.T. **Lecythidaceae – Parte III**. Flora Neotropica. New York: The New York Botanical Garden, 1990.

MORITZ, A. **Estudos biológicos da floração da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.; Lecythidaceae)**. EMBRAPA/CPATU (Documentos 28:1-82). 1984.

MOTHÉ, C.G.; ARAÚJO, C.R.; OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Cleveland, USA, v.67, p.305-312, 2002.

MURPHY, D.J. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. **Prog. Lipid Res.**, Guelph, Ontario, Canada, v.32, n.3, p.247-280, 1993.

MURPHY D.J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from *archaea* to mammals. *Protoplasma*. **Epub ahead of print**. Cardiff, UK, October 15, 2011.

NAOZUKA, J; OLIVEIRA, PV. Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, SP, v.18, n.8, 2007.

NAPIER, J.A.; STOBART, A.K.; SHEWRY, P.R. The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. **Plant Mol. Biol.**, Cell Biology Department, University of Bristol, Long Ashton, UK, v.31, n.5, p.945-56, 1996.

NEVES, V.A.; LOURENCO, E.J. Isolation and In vitro hydrolysis of globulin G-1 from Lentils (*Lens culinaris medik*). **J. Food Biochem.**, São Paulo, SP, v.19, p.309-320, 1995.

OLIVEIRA, A.D.; SILVA, C.C.; LIMA, L.N.; SILVA, J.D.S.; SANTOS, J.C.O.; VIEIRA, F.F.; CONCEIÇÃO, M.M.; SOUZA, A.G. Estudo da estabilidade térmica e oxidativa do óleo e do biodiesel derivados do óleo de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA, 5. **Anais...** Poços de Caldas, 2006.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Revisão: análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, São Paulo, SP, v.34, n.7, p.1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, M. **Efeitos da umidade, do tempo e de sistemas de armazenamento sobre parâmetros de qualidade e propriedades tecnológicas dos grãos e do óleo de soja**. 2011. 131f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

ORTIZ, S.E.M.; WAGNER, J.R. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. **Food Res. Int.**, La Plata, Argentina, v.35, p.511-518, 2002.

OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B.; FERRY, E.L.; WAKEMAN, A.J. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.18, n.1, p.1-16, 1914.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**, 2nd ed. London: Longman-Green, 1924.

PACHECO, A.M.; SCUSSEL, V.M. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* h.b.k.) e qualidade de produtos derivados**. 2007. 144f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, n.1, p.13-37, 1999.

PECHNIK, E.; BORGES, P.; SIQUEIRA, R. Estudo sobre a castanha-do-pará. **Arquivos Brasileiros de Nutrição**, Rio de Janeiro, v.7, n.1, p.7-41, 1950, apud ZÁCARI, C. Z. **Estabilidade oxidativa de óleo extra virgem de castanha do Pará com ervas aromáticas antioxidantes**. 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

PESTANA, V.R. **Avaliação da qualidade do óleo de arroz e do conteúdo de tocoferóis e orizanois durante o processo de refino**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, São Paulo, SP, v.26, p.179-187, 2006.

PRANCE, G.T.; MORI, S.A. Observations on the fruits and seeds of neotropical Lecythidaceae. **Brittonia**, New York, v.30, p.21-33, 1978.

PROGRAMA DE ALIMENTOS SEGUROS (PAS). **Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Brasília, 2004, 62p.

PROGRAMA ESTADUAL DE ZONEAMENTO ECOLÓGICO-ECONÔMICO DO ACRE. **Zoneamento ecológico-econômico do Acre: fase II: documento síntese: escala 1 : 250.000**. Rio Branco, AC: Secretaria de Estado de Planejamento e Desenvolvimento Econômico Sustentável, 2006. 354 p.

QUEIROGA-NETO, V.; BAKKE, O.A.; RAMOS, C.M.P.; BORA, P.S.; LETELIER, J.C.; CONCEIÇÃO, M.M. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil:

characterization and thermal stability. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**, João Pessoa, PB, v.3, n.2, 2009.

RAEMY, A. Behavior of foods studied by thermal analysis: Introduction. **J. Therm. Anal. Cal.**, Lausanne, Switzerland, v.71, p.273-278, 2003.

RAMADAN, M.F.; MOERSEL, J.T. Screening of the antiradical action of vegetable oils. **J. Food Compost. Anal.**, Berlin, Germany, v.19, p.838-842, 2006.

RAVEN, P H. **Biology of plants**. New York: Worth Publisheer, 1996, 728p.

REEVES, M.A.; HOFFMANN, P.R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Honolulu, Hawaii, USA, v.66, p.2457-2478, 2009.

REGITANO-d'ARCE, M.A.B. **Castanha-do-pará: óleo e subprodutos sob a ótica da lipidologia**. 1998. 64f. (Tese Livre Docencia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de Sao Paulo, Piracicaba, SP.

REGITANO-d'ARCE. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M; REGITANO-d' ARCE, M.A.B; SPOTTO, M.H.F. (Ed.) **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006, p.243-270.

RIBEIRO, M.A.A.; SOLER, R.M.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B.; LIMA, V.A. Shelled Brazil nuts canned under different atmospheres. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.15, n.2, p.105-107, 1995.

RITTNER, H. **Óleo de mamona e derivados**. São Paulo: H. Rittner, 1996. 559p.

RIZVI, S.S.H.; BENADO, A.L.; ZOLLWEG, J.A.; DANIELS, J.A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, Beltsville, USA, v.40, n.6, p.55-65, 1986.

ROCHA, D.B; DELGADO, P.; AUGUSTO, E. **Ácido oléico**. Disponível em: <http://www.aboissa.com.br/homecare/tacidooleico.htm>. Acesso em: 26 de junho de 2007.

ROCHA, L.L.L.; GONÇALVES, J. DE A.; JORDÃO, R.G.; DOMINGOS, A.K.; ANTONIOSSI-FILHO, N.R.; ARANDA, D.A.G. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos de mamona (*Ricinus communis* L.) e soja (*Glycine max*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CATÁLISE, 14. **Anais...** Porto de Galinhas, PE, 2007.

RODRIGUES, J.E.; ARAÚJO, M.E.; AZEVEDO, F.F.M.; MACHADO, N.T. Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, Belém, PA, v.34, p.223-229, 2005.

ROOS, Y.H. Thermal analysis, state transitions and food quality. **J. Therm. Anal. Cal.**, Cork, Ireland, v.71, p.197-203, 2003.

SALOMÃO, R.P.; ROSA, N.A.; NEPSTAD, D.C.; BAKK, A. Estrutura populacional e breve caracterização ecológica-econômica de 108 espécies arbóreas da Floresta Amazônica Brasileira – I. **Interciencia**. Brasil, v.20, n.1, p.20-29, 1995.

SANTOS, J.C.; VEIGA, S.A.; SÁ, C.P.; WADT, L.H.O.; NASCIMENTO, G.C.; SILVA, M.R. **Estimativa de custo de coleta e rentabilidade para sistema extrativo de castanha-do-brasil no Acre, safra 2001/2002**. Rio Branco: Embrapa Acre (Comunicado Técnico), 2002.

SANTOS, M.A.T. Effects of boiling on contents of antinutritional factors in leaves of broccoli, cauliflower and cabbage. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, MG, v.30, n.2, p.294-301, 2006.

SANTOS, O.V.; LOPES, A.S.; AZEVEDO, G.O.; SANTOS, A.C. Processing of Brazil-nut flour: characterization, thermal and morphological analysis. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.30, Supl. 1, p.264-269, 2010.

SANTOS, O.V. **Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos**. 2012. 214f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**, version 9.1. Cary: SAS Institute, 2002.

SCHMIDT, D. **Caracterização de proteínas de reserva, perfil de aminoácidos e enzimas envolvidas no metabolismo de lisina em cevada (*Hordeum vulgare* L.) geneticamente modificada**. 2011. 153f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

SCHNITZLER, E.; LAZZAROTT, M.; CARVALHO-FILHO, M.A.S.; IONASHIRO, M. Thermoanalytical study of the complexes of dimethylaminocinnamylidenpyruvate with manganese(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II), zinc(II) and lead(II), in the solid state. **Ecletica Química**, São Paulo, SP, 2004.

SCHRIRALDI, A.; FESSAS, D. Classical and knudsen thermogravimetry to check states and displacements of water in food systems. **J. Therm. Anal. Cal.**, Milan, Italy v.71, p.225-235, 2003.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton, FL: CRC Press. 2004.

SHARMA, G.M.; ROUX, K.H.; SATHE, S.K. A sensitive and robust competitive enzyme-linked immunosorbent assay for Brazil nut (*Bertholletia excelsea* L.). Tallahassee, USA, v.28;57, n.2, p.769-776.2009.

SHEWRY, P.R.; TATHAM, A.S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **J. Bioch.**, Harpenden, UK, v.267, p.1-12, 1990.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins - structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, n.7, p.945-956, 1995.

SHEWRY, P.R.; HALFORD, N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **J. Exp. Bot.**, Bristol, UK, v.53, n.370, p.947-958, 2002.

SILVA, M.A.P.; MEDEIROS-FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, CE, v.37, n.3, p.320-325, 2006.

SILVEIRA, M. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. USP, São Paulo, p.71-79, v.1, 1989.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

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

SRUR, A.U.O.S. **Processamento da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.)**. Campinas, 1976. 59p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

STIPANUK, M. H. Metabolismo f sulfur-containing amino acids. **Annual Review Nutrition**, Ithaca, New York, USA, v.6, p.179-209, 1996.

SUN, S.S.M.; LEUNG, F.W.; TOMIC, J.C. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) proteins: fractionation, composition, and identification of sulfur-rich protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Berkeley, CA, USA, v.35, p.232-235, 1987.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J. Agric. Food Chem.**, Ithaca, New York, USA, v.50, p.7449-7454, 2002.

SZARFARC, S.C.; MARTINS, I.S.; MAZZILLI, R.N.; CAVALCANTI, M.L.F.; GANDRA, Y.R. Qualidade protéica de dietas avaliadas segundo os padrões FAO, 1968 e FAO, 1973. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, SP, v.14, p.151-160, 1980.

SZYD OWSKA-CZERNIAK, A.; KARLOVITS, G.; DIANOCZKI, C.; RECSEG, K.; SZB YK, E. Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed and olive oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Torun, Poland, v.85, p.141-49, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Califórnia: Cummings, 2004. 565p.

TANG, C.; HUANG, X. Physicochemical and structural characterization of globulin and albumin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. **Food Chemistry**, Guangzhou, China, v.121, p.119-126, 2010.

TATEO, F. La composizione acidica della materia gasta estratte daí semi di *Bertholletia excelsa*. **Ind. Alim.**, Pinerolo, v.10, n.2 p.68-70, 1971.

TAVARES, M.F.M.; OLIVEIRA, M.A.L.; LAGO, C.L.; SILVA, J.A.F. Analysis of fatty acids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Química Nova**, São Paulo, SP, v.26, n.6, p.821-824, 2003.

THOMAS, B.; GRUCA, L.L.; BENNETT, C.; PARIMI, P.S.; HANSON, R.W.; KALHAN, S.C. Metabolism of methionine in the newborn infant: response to the parenteral and enteral administration of nutrients. **Pediatric Research**, Cleveland, Ohio, USA, v.64, n.4, p.381-386, 2008.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice and germinated brown rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Nagano, Japan, v.52, n.5, p.4808-4813, 2004.

TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde, 2006. 151p.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Food Group:12 Nut and Seed Products (Publication. Retrieved 15th November, 2010, from USDA.

VALLIM, A.P.S.W. **Efeitos do tratamento hidrotérmico na formação de isoflavonas agliconadas e nas propriedades funcionais de isolado protéico de soja**. 2011. 135f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

VAN BOXTEL, E.L.; KOPELMAN, S.J.; VAN DEN BROEK, L.A.M.; GRUPPEN, H. Heat denaturation of Brazil nut allergen Ber e 1 in relation to food processing. **Food Chemistry**, Wageningen, The Netherlands, v.110, p.904-908, 2008.

VAUGHAN, J.C. **The structure and utilization of oil seeds**. London: Chapman & Hall, 1970. 279p.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Tallahassee, Florida, USA, v.54, n. 3, p.4705-4714, 2006.

VERKERK, R.H.J. The paradox of overlapping micronutrient risks and benefits obligates risk/benefit analysis. **Toxicology**, Dorking , UK, v.278, p.27-38, 2010.

VOEDT, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. USA: John Wiley & Sons, 1995. 1361p.

VONDERHEIDE, A.P.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S.S.; B'HYMER, C.; MONTES-BAYÓN, M.; PONCE DE LEÓN, C.; CARUSO, J.A. Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Cincinnati, Ohio, USA, v.50, p.5722-5728, 2002.

WADT, L.H.O.; KAINER, K.A.; NUNES, G.M.; LEITE, F.M.N. **Manejo da castanheira (*Bertholletia excelsa*) para a produção de castanha-do-brasil**. Rio Branco: Secretaria de Extrativismo e Produção Familiar. 42p il. Seprof documento técnico, n.3, 2005.

WADT, L.H.O.; KAINER, K.A. Domestication and breeding of the Brazil nut tree. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.; CLEMENT, C.R.; NODA, H. (Eds.) **Domestication and breeding** - Amazonian species. Viçosa: UFV, 2012, p.297-317.

WEBER, E.; NEUMANN, D. Protein bodies, storage organelles in plant seeds. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, Gatersleben, Germany, v.175, 1980, p.279-306 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015379680800709>).

WELNA, M.; KLIMPEL, M.; ZYRNICKI, W. Investigation of major and trace elements and their distributions between lipid and non-lipid fractions in Brazil nuts by inductively coupled plasma atomic optical spectrometry. **Food Chemistry**, Wroclaw, Poland, v.111, p.1012-1015, 2008.

WENDLANT, W.W. **Thermal analysis**. New York: John Wiley, 1985. 814p.

WHITE, J.A.; HART, R.J.; FRY, J.C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, Surrey, UK, v.8, n.4, p.170-177, 1986.

WILLEMS, P.; KUIPERS, N.J.M.; DE HAAN, A.B. Hydraulic pressing of oilseeds: experimental determination and modeling of yield and pressing rates. **Journal of Food Engineering**, Enschede, The Netherlands, v.89, p.8.16, 2008.

WOODROOF, J.G. **Tree nuts**: production, processing, products. 2nd ed. Westport: AVI Publishing, 1982. 731p.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Beltsville, Maryland, USA, v.52, p.4026-4037, 2004.

YIN, S.W.; CHEN, J.C.; SUN, S.D.; TANG, C.H.; YANG, X.Q.; WEN, Q.B.; QI, J.R. Physicochemical and structural characterization of protein isolate, globulin and albumin from soapnut seeds (*Sapindus mukorossi* Gaertn.). **Food Chemistry**, Guangzhou, China, v.128, p.420-426, 2011.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. **LWT Food Science and Technology**, Plano, TX, USA, v.42, p.1573-1580, 2009.

YOULE, R.J.; HUANG, A.H.C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. **Am. J. Bot.**, South Carolina, USA, v.68, p.44-48, 1981.

YU, J.; VASANTHAN, T.; TAMELLI, F. Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Alberta, Canada, v.49, p.4352-4360, 2001.

ZÁCARI, C.Z. **Estabilidade oxidativa de óleo extra virgem de castanha do Pará com ervas aromáticas antioxidantes**. Piracicaba, 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

ZHAO, W.M.; GATEHOUSE, J.A.; BOULTER, D. The purification and partial amino acid sequence of a polypeptide from the glutelin fraction of rice grains; homology to pea legumin. **FEBS Lett**, Mississippi, USA, v.162, p.96-102, 1983.