



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



MIKAEL KÉLVIN DE ALBUQUERQUE MENDES

**ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS E AVALIAÇÃO DOS
COMPOSTOS FENÓLICOS EM CASTANHAS *IN NATURA*, PROCESSADAS
E ULTRAPROCESSADAS**

TERESINA-PI
2018

MIKAEL KÉLVIN DE ALBUQUERQUE MENDES

**ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS E AVALIAÇÃO DOS
COMPOSTOS FENÓLICOS EM CASTANHAS *IN NATURA*, PROCESSADAS
E ULTRAPROCESSADAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Edivan Carvalho
Vieira

Co-orientador: Prof. Dr. Cícero Alves
Lopes Júnior

TERESINA-PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

M538e Mendes, Mikael Kélvyn de Albuquerque.
Estudo da solubilidade de proteínas e avaliação dos
compostos fenólicos em castanhas *in natura*,
processadas e ultraprocessadas / Mikael Kélvyn de
Albuquerque Mendes. – 2018.
104 f.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2018.

“Orientador: Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira”.

“Co-orientador: Prof. Dr. Cícero Alves Lopes Júnior”.

1. Química Analítica. 2. Castanhas. 3. Solubilidade
Proteica. 4. Compostos Fenólicos. I. Título.

CDD 543



ATA DE DEFESA DA 210 DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candidato: Mikael Kélvyn de Albuquerque Mendes

Ao decimo quinto dia do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, às nove horas. reuniu-se, no Auditório do Departamento de Química, Auditório José Roberto Oliveira Torres, da Universidade Federal do Piauí, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPI, a Comissão Julgadora composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira (orientador/presidente), Prof. Dr. Cicero Alves Lopes Junior (Co-orientador/presidente), Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega (membro externo/UFSCar), Raimundo Clécio Dantas Muniz Filho (membro externo/UEMA) e Prof. Dr. Janildo Lopes Magalhaes (suplente/UFPI), para a Defesa de Dissertação de Mestrado, sob o título: “ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS E AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM CASTANHAS IN NATURA, PROCESSADAS E ULTRAPROCESSADAS”, apresentada por Mikael Kélvyn de Albuquerque Mendes. Ao final dos trabalhos, a Comissão Julgadora reuniu-se em sessão secreta para o julgamento e atribuição de pareceres. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPI, o candidato foi considerado APROVADO. Encerrada a sessão secreta, o presidente informou ao público presente o resultado do consenso. Nada mais havendo a tratar, a reunião foi encerrada e, para constar, eu, Jose Milton Elias De Matos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química, lavrei a presente ata, que assino como os demais membros da Comissão Julgadora.

Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira
(orientador/presidente)

Prof. Dr. Cicero Alves Lopes Junior
(Co-orientador/presidente)

Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega
(membro externo/UFSCar)

Prof. Dr. Raimundo Clécio Dantas Muniz Filho
(membro externo/UEMA)

Prof. Dr. Janildo Lopes Magalhaes
(suplente/UFPI)

Edivan Carvalho Vieira
Cicero Alves Lopes Junior
Joaquim de A. Nóbrega
Raimundo Clécio Dantas Muniz Filho

Teresina, 15 de fevereiro de 2018.

Homologada pelo PPGQ
Data: 15 / 03 / 2018
Coordenação do Curso

Prof. Dr. José Milton Elias de Matos
Dep. Química - UFPI
CPF: 517.909.903-06 SIAPE: 1714193

Edivan Carvalho Vieira
Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira
Presidente

Esta dissertação é dedicada à Deus e minha família, com amor, admiração e gratidão.

Agradecimentos

- ✓ Em primeiro lugar a DEUS pelo dom da vida e pela dádiva de me proporcionar a realização desse sonho.
- ✓ Aos meus pais, Raimunda Carvalho de Albuquerque e José Roberto Carneiro Mendes pelo esforço e dedicação destinados à minha educação. Por todo amor, apoio e confiança que me deram onde foram necessários em todas as minhas decisões.
- ✓ Aos meus irmãos Milton Thélío e Michelle Sheila pelo amor, carinho e cumplicidade.
- ✓ A toda minha família, pelo incentivo e apoio dado durante toda a trajetória de minha vida.
- ✓ Ao meu orientador e segundo pai Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira, agradeço por todos os ensinamentos, confiança, respeito e amizade.
- ✓ Ao meu co-orientador Prof. Dr. Cícero Alves Lopes Júnior pela amizade, parceria e respeito. Sua contribuição foi imprescindível para realização deste trabalho, muito obrigado.
- ✓ Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Dr. Bruno Quirino Araújo e Profa Dra Mariana Helena Chaves.
- ✓ Ao Prof. Dr. Samuel Anderson Alves de Sousa pelos ensinamentos e amizade.
- ✓ Ao companheiro/irmão de laboratório e aluno de Iniciação Científica deste projeto de mestrado Christian Bremmer.
- ✓ A todos os membros que compõem o Grupo de Instrumentação Analítica e Preparo de Amostras – GRIAPA pela amizade e apoio.

- ✓ Aos meus amigos Tiago Linus, Francislene Machado, Edymilaís Sousa e Arkellau Kenned.
- ✓ Aos meus amigos de graduação Márcia Denise, Gilmar Ferreira, Dino José, Maria de Lourdes, Xavier Nobre e Andrenilton.
- ✓ Aos meus amigos da minha cidade natal “Cocal”, Jéssika Frota, Kylvia Herculano, Valdenir, Klécio, Lucas, Juscelino e Sabrina.
- ✓ A Maria Siqueira e Mara Siqueira pela amizade, apoio e companheirismo.
- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Química pela infraestrutura fornecida e às instituições de fomento CAPES e FAPEPI pela concessão da bolsa de pesquisa.
- ✓ Por fim, a todas as pessoas que não foram citadas, mas contribuíram de alguma forma para a realização e conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Aprendi que a coragem não é a ausência do medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas o que conquista esse medo”

Nelson Mandela

Publicações Oriundas no Período do Mestrado

Divulgação em reuniões científicas

- ✓ MENDES, M. K. A.; OLIVEIRA, C. B. S. ; LOPES JUNIOR, C. A. ; VIEIRA, E. C. EFEITOS DO TEMPO E DO SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CASTANHA DE CAJU (*anacardium occidentale*). In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ MENDES, M. K. A.; LOPES JUNIOR, C. A. ; CARAPELLI, R. ; VIEIRA, E. C. INFLUÊNCIA DE AGENTES OXIDANTES NA DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO EM PESTICIDAS POR HG-FAAS. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ COELHO, T. L. S. ; MENDES, M. K. A. ; SILVA, F. M. S. ; OLIVEIRA, C. B. S. ; MUNIZ FILHO, R. C. D. ; SOUSA, S. A. A. ; VIEIRA, E. C. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CARNE DE CAPRINOS EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ MENDES, M. K. A. ; OLIVEIRA, C. B. S. ; VERAS, M. D. A.; ARAUJO, B. Q; MUNIZ FILHO, R. C. D. ; CHAVES, M. H; BARBOSA, H. S; VIEIRA, E. C.; LOPES JUNIOR, C. A. EXTRAÇÃO SELETIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE CASTANHAS DE CAJU (*Anacardium Occidentale L.*) EMPREGANDO MODELAGEM DE MISTURAS In: 5º Encontro Brasileiro sobre Especificação Química –EspeQBrasil, 2017, Águas de Lindóia - SP.
- ✓ MENDES, M. K. A. ; OLIVEIRA, C. B. S. ; LOPES JUNIOR, C. A.; VIEIRA, E. C. EFEITO DO PROCESSAMENTO NA SOLUBILIDADE DE ALBUMINAS DE CASTANHA DE CAJU (*Anacardium Occidentale L.*) E CASTANHA-DO-PARÁ (*Bertholletia Excelsa*) In: 5º Encontro Brasileiro sobre Especificação Química –EspeQBrasil, 2017, Águas de Lindóia - SP.

Resumo

MENDES, M. K. A. **Estudo da solubilidade de proteínas e avaliação dos compostos fenólicos em castanhas in natura, processadas e ultraprocessadas.** 2018. 104 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do processamento na solubilidade de proteínas e no teor de compostos fenólicos em amostras de castanhas *in natura* e nos estágios, processado e ultraprocessado. Para isso, amostras de castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.), do-pará (*Bertholletia excelsa*) e de baru (*Dipteryx alata*) adquiridas junto ao comércio local de Teresina – PI foram submetidas aos ensaios de solubilidade. Para extração dos compostos fenólicos um planejamento de misturas foi realizado utilizando água, acetona, metanol, etanol e suas misturas e castanha de caju como amostra teste. Os extratos obtidos foram analisados por ESI(-)-Q-TOF MS e a partir de análise quimiométrica por análise de componente principal (PCA) e agrupamento hierárquico (HCA) foi definida a condição ótima de extração e empregada às demais amostras. Os resultados revelaram que as proteínas da castanha de caju apresentam menor solubilidade em pH 3 e as de castanha-do-pará em pH 4 próximo aos pI's das proteínas de sua composição e maior solubilidade em pH's alcalinos. As castanhas ultraprocessadas apresentaram menores teores de proteínas totais comparadas as amostras *in natura* e processadas. O modelo cúbico especial não apresentou falta de ajuste e forneceu uma variação máxima explicada de 89,2%. A condição ideal para extractabilidade de compostos fenólicos das castanhas foi alcançada empregando etanol puro extraindo preferencialmente ácido anacárdico identificado pelos picos *m/z* 341, 343 e 345. O processamento interferiu significativamente no conteúdo fenólico total, onde o estágio ultraprocessado forneceu os menores teores, porém, não interferiu na composição química das amostras. As castanhas do-pará e de baru, contiveram flavonoides como apigenina (*m/z* 269), quercetina e ácido elágico (*m/z* 301) e miricetina-3-O-raminosídea (*m/z* 463), ácidos fenólicos como ácido cafeíco (*m/z* 179) e ácido gálico (*m/z* 169) e ácidos graxos (*m/z* 255, 279, 281, 283, 297 311, 325, 339).

Palavras-Chave: castanhas; processamento; solubilidade proteica; compostos fenólicos; planejamento de misturas.

Abstract

MENDES, M. K. A. **Study of the solubility of proteins and evaluation of phenolic compounds in chestnut *in natura*, processed and ultraprocesed.** 104 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

The objective of this study was to evaluate the influence of the processing on the solubility of proteins and the content of phenolic compounds in samples of cashew nuts *in natura* and in the processed and ultra-processed stages. For this, samples of cashew nuts (*Anacardium occidentale L.*), Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) and baru (*Dipteryx alata*), purchased from the local market of Teresina-PI, were subjected to solubility tests. For the extraction of the phenolic compounds a planning of mixtures was carried out using water, acetone, methanol, ethanol and their mixtures, and cashew nuts as test sample. The obtained extracts were analyzed by ESI(-)-Q-TOF MS, and from chemometric analysis by principal component analysis (PCA) and hierarchical grouping (HCA), the optimal extraction condition was defined and used for the other samples. The results showed that cashew nut proteins have lower solubility at pH 3 and those of brown nuts at pH 4, which are near the pI's of the proteins of their composition. Both of them have higher solubility at alkaline pH's. The ultra-processed nuts presented lower total protein contents compared to *in natura* and processed samples. The special cubic model did not present a lack of adjustment and provided a maximum explained variation of 89.2%. The ideal condition for extraction of phenolic compounds from nuts was achieved by using pure ethanol extracting preferably anacardic acid identified by the peaks m/z 341, 343 and 345. The processing interfered significantly in the total phenolic content, where the ultra-processed stage provided the lowest levels, however, it did not interfere in the chemical composition of the samples. The do-para and baru nuts contained flavonoids such as apigenin (m/z 269), quercetin and ellagic acid (m/z 301) and myricetin-3-O-rhamnoside (m/z 463), phenolic acids such as caffeic acid (m/z 179) and gallic acid (m/z 169) and fatty acids (m/z 255, 279, 281, 283, 297, 311, 325, 339).

Keywords: chestnut; processing; protein solubility; phenolic compounds; mixture design.

Lista de Figuras

Figura 1 - Castanha de caju.....	6
Figura 2 - Castanha do-pará	7
Figura 3 - Castanha de baru	8
Figura 4 - Estágios de processamento dos alimentos.....	10
Figura 5 - Estrutura geral de um aminoácido	11
Figura 6 - Solubilidade proteica da castanha de caju em função do pH	18
Figura 7 - Teor de proteínas solúveis totais (mg g^{-1} de albumina) na castanha de caju em diferentes estágios de processamento	22
Figura 8 - Solubilidade proteica da castanha-do-pará em função do pH	23
Figura 9 - Teor de proteínas solúveis totais (mg g^{-1} de albumina) na castanha-do-pará em diferentes estágios de processamento	25
Figura 10 - Estrutura geral de um composto fenólico.....	29
Figura 11 - Planejamento de misturas empregado para extração de compostos fenólicos.....	36
Figura 12 - (A) Gráfico dos valores experimentais vs os valores previstos e (B) histograma de resíduos vs frequências que demonstram a capacidade de previsão e a influência de erros aleatórios do modelo cubico especial proposto para otimização do método de extração de compostos fenólicos.....	41
Figura 13 - Superfície de resposta obtida para o modelo cúbico especial onde a concentração de fenóis totais é predita em função das proporções de acetona, etanol e metanol com uma composição de água constante de 0%	41
Figura 14 - Gráfico de PC1 vs PC2 para (A) score, contendo as amostras, e (B) pesos, mostrando a influência das variáveis	47
Figura 15 - Dendrograma de HCA obtidos com os dados centrados na média	48
Figura 16 - Gráfico de PC1 vs PC2 para (A) score, contendo as amostras de castanhas, e (B) pesos, mostrando a influência das variáveis	52
Figura 17 - Dendrograma de HCA obtido para as amostras de castanhas nos diferentes níveis de processamento.	53
Figura 18 - Perfis obtidos para amostras de castanhas de caju <i>in natura</i> (CC), processadas (CCS) e ultraprocessadas (BC).	53
Figura 19 - Perfis obtidos para amostras de castanhas do-pará <i>in natura</i> (CP), processadas (CPS) e ultraprocessadas (BP).	54
Figura 20 - Perfis obtidos para amostras de castanhas de baru <i>in natura</i> (CB), processadas (CBS) e ultraprocessadas (BB).	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Concentração de aminoácidos em três tipos de castanha e seus respectivos pls	20
Tabela 2 - Concentração de fenóis (mg de AG g ⁻¹) nos diferentes ensaios propostos pelo planejamento centroide simplex.....	38
Tabela 3 - ANOVA para o modelo cúbico especial com efeitos não significativos ignorados	39
Tabela 4 - Valores de E _T (30) para solventes puros e algumas misturas binárias.....	43
Tabela 5 - Compostos identificados nos espectros dos diferentes extratos de castanha de caju adquiridos empregando ESI(-)-Q-TOF MS	46
Tabela 6 - Influência do processamento no teor de fenóis	49

Lista de Equações

Equação 1.....	40
Equação 2.....	42

Lista de Acrônimos e Abreviaturas

AG: Ácido Gálico

ANOVA: Análise de Variância, do inglês *Analysis of Variance*

OMS: Organização Mundial da Saúde

CFT: Conteúdo fenólico total

CC: Castanha de caju

CCP: Castanha de caju processada

CCU: Castanha de caju ultraprocessada

CP: Castanha-do-pará

CPP: Castanha-do-pará processada

CPU: Castanha-do-pará ultraprocessada

ESI(-)-Q-TOF MS: Espectrometria de massas por tempo de voo com ionização por eletrospray no modo negativo

PCA: Análise de Componentes Principais

HCA: Análise por Agrupamento Hierárquico

EP: Erro puro

Faj: Falta de ajuste

GL: Graus de liberdade

SQ: Soma quadrática

MQ: Média quadrática

R: Regressão

r: Resíduo

R²: Coeficiente de determinação

pH: Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO	2
CAPÍTULO 1 - ESTUDO DO EFEITO DO PROCESSAMENTO NA SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS DE CASTANHAS	4
1.1 OBJETIVO	5
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.2.1 Castanha de caju	5
1.2.2 Castanha-do-pará.....	6
1.2.3 Castanha de baru	7
1.2.4 Processamento dos alimentos.....	9
1.2.5 Proteínas	10
1.2.6 Solubilidade de proteínas	11
1.2.7 Métodos de quantificação de proteínas.....	14
1.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	15
1.3.1. Amostras	15
1.3.2. Instrumentação.....	15
1.3.3. Reagentes e soluções	16
1.3.4. Preparo das amostras	16
1.3.5. Análise das amostras	16
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
1.4.1. Solubilidade proteica da castanha de caju em função do pH	18
1.4.2 Solubilidade proteica da castanha do-pará em função do pH	23
1.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	26
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM CASTANHAS <i>IN NATURA</i> , PROCESSADAS E ULTRAPROCESSADAS.....	27
2.1. OBJETIVO	28
2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.2.1. Compostos fenólicos	28
2.2.2 Extração e quantificação dos compostos fenólicos	30
2.2.3 Planejamento experimental para otimização do método de extração de compostos fenólicos	32
2.2.4 Espectrometria de massas para identificação de compostos fenólicos	33
2.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	34
2.3.1. Amostras	34
2.3.2. Instrumentação.....	34
2.3.3 Reagentes e soluções	35
2.3.4. Preparo das amostras - secagem, moagem e armazenamento.....	35
2.3.5. Extração dos compostos fenólicos	36
2.3.6. Quantificação do conteúdo de fenólico total (CFT).....	36
2.3.7. Obtensão do perfil de fenóis de extratos por ESI(-)-Q-TOF MS	37
2.3.8. Análise estatística dos dados	37
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
2.4.1 Otimização do método de extração de compostos fenólicos empregando modelagem de mistura	38
2.4.2 Avaliação dos extratos obtidos por ESI(-)-Q-TOF MS por PCA e HCA	44
2.4.3 Efeito do processamento no CFT e na composição química das castanhas	49

2.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS.....	79
ANEXO I.....	80
ANEXO II.....	83
ANEXO III.....	86

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os padrões de alimentação estão sofrendo transformações em todo mundo, em especial nos países emergentes como o Brasil. O setor agroalimentar passa por um processo de globalização e desenvolvimento de novas tecnologias que têm favorecido a substituição de alimentos *in natura* ou minimamente processados de origem vegetal como frutas, sementes, nozes, raízes, legumes e verduras por alimentos processados e/ou ultraprocessados. O consumo excessivo destes pode acarretar o desequilíbrio no fornecimento de nutrientes e ingestão excessiva de calorias o que implica no aumento de doenças crônicas como obesidade, diabetes, hipertensão (pressão alta), doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (1). Nesse sentido, há uma preocupação por parte da sociedade sobre a origem, segurança e qualidade dos produtos consumidos, buscando, assim, maior número de informações a respeito da natureza dos mesmos (2).

Dentre os alimentos, as nozes são largamente procuradas e consumidas em todo o mundo, devido suas propriedades organolépticas e funcionais que contribuem para a saúde humana (3). Diante disso, tem-se recomendado o consumo de alimentos *in natura* ou minimamente processados, aumentando, assim a procura por aqueles de origem vegetal, especialmente, as nozes e sementes. Sabe-se que estes apresentam um grande potencial nutricional por conter: elevado teor de fibras e compostos bioativos, tais como vitaminas, proteínas e minerais essenciais à saúde (4,5). Frente estas características, a Organização Mundial da Saúde (OMS) através da Consulta de Especialistas sobre Dieta, Nutrição e Prevenção de Doenças Crônicas, sugere a ingestão diária de 30 g de nozes e sementes para um indivíduo adulto, esta quantidade pode reduzir o risco do aparecimento de diferentes tipos de câncer e de doenças cardíacas coronarianas (6).

Conforme o guia alimentar elaborado pelo Ministério da Saúde para a população brasileira e publicado em 2014, os alimentos tais como castanhas, nozes, amendoim e outras oleaginosas sem sal e/ou açúcar foram classificados como alimentos *in natura* ou minimamente processados. Óleos derivados desses são definidos como ingredientes culinários. A adição de sal ou açúcar os identifica como alimentos processados e quando submetidos a diversas etapas de processamento com adição de outros ingredientes são classificados como alimentos ultraprocessados, por exemplo, barras de cereais. (1)

Dentre as nozes, as castanhas possuem maior abrangência de distribuição e consumo, sendo encontradas principalmente na Europa e Ásia (7). Entre as nozes verdadeiras, obtidas de frutas secas, destacam-se a castanha de caju, a castanha-do-pará, o pistache, a avelã, a macadâmia e a noz, já entre as sementes comestíveis destacam-se o amendoim, e a castanha de baru ou amêndoa de baru (8,9). O consumo de alimentos que forneçam em seus nutrientes compostos bioativos, como proteínas e compostos fenólicos, é de suma importância para a manutenção do equilíbrio metabólico no organismo humano, resultando em uma vida saudável e na diminuição do aparecimento de diversas doenças (1,10).

Dentre os compostos bioativos as proteínas são encontradas em alimentos como leite, carne, ovos, cereais, legumes e algumas oleaginosas (11). Tais macromoléculas são fundamentais em diversos processos fisiológicos no organismo humano, haja vista que inúmeras reações que ocorrem no metabolismo celular são catalisadas por elas. Atualmente, têm-se observado a busca por proteínas vegetais como ingredientes em sistemas alimentares devido possuírem propriedades funcionais e nutricionais. Dentre as propriedades funcionais a solubilidade de uma proteína destaca-se, visto que outras propriedades são fortemente dependentes dessa (12–17).

Os compostos fenólicos são caracterizados como metabólitos secundários de diversas matrizes vegetais como plantas, frutas, legumes, nozes, chás, vinhos dentre outros que são utilizados na alimentação humana (18,19). Estudos recentes indicam que esses compostos são considerados fundamentais para o bem-estar e longevidade da população (20). Eles apresentam uma série de atividades, tais como anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, antivirais e anticancerígenas, (21–23) além de atuarem na prevenção da síndrome metabólica, disfunção endotelial, hipertensão e regulação lipídica (24). Os diversos efeitos biológicos apresentados pelos polifenóis são atribuídos principalmente à facilidade que têm de perderem seus hidrogênios ionizáveis presentes em suas hidroxilas fenólicas frente a radicais (25).

❖ OBJETIVO

➤ Objetivo geral

Realizar um estudo sistemático combinado à abordagens quimiométricas para avaliar o efeito do processamento na solubilidade de proteínas e no conteúdo fenólico total de castanhas.

➤ **Objetivos específicos**

- ✓ Investigar o efeito do processamento na solubilidade de proteínas em castanhas de caju e do-pará;
- ✓ Definir uma condição ótima de extração de compostos fenólicos em castanha de caju;
- ✓ Aplicar a metodologia de extração nas demais amostras de castanhas;
- ✓ Avaliar o efeito do processamento no conteúdo fenólico total (CFT) e na composição química das amostras de castanhas de caju, do-pará e de barú.

Capítulo 1

Estudo do efeito do processamento na solubilidade de proteínas de castanhas

1.1 OBJETIVO

O objetivo do trabalho consistiu na investigação do teor de proteínas totais (solúveis) e da solubilidade de amostras de castanhas *in natura*, processadas e ultraprocessadas empregando espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta/visível.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Castanha de caju

As castanhas de caju (Figura 1) são as nozes verdadeiras mais consumidas mundialmente, devido ao seu alto potencial nutritivo (26). O caju é provindo do cajueiro (*Anacardium occidentale*), árvore que pertence à família Anacardiaceae e originário da América tropical, com altura variando entre 10 a 15 metros de tronco curto e de forma irregular (27,28).

No tocante as características físicas do fruto do cajueiro, este é composto pelo pedúnculo (pseudofruto) que é ligado a castanha (fruto real, constituído de casca e grão). O pedúnculo corresponde a parte de maior massa do caju, sendo consumida *in natura* ou na forma de suco, polpa e conserva (29). O fruto do cajueiro, popularmente conhecido como castanha de caju, é um aquênio de comprimento e largura variável, casca coriácea lisa, e mesocarpo alveolado. Na parte mais interna da castanha está localizada a amêndoa (ou grão), constituída de dois cotilédones carnosos e oleosos, que compõem a parte comestível do fruto, revestida por uma película em tons avermelhados (30). A castanha é ligeiramente curvada e envolta por uma casca de difícil remoção, que representa ca. de 5 % da castanha, e sua amêndoa (grão) pode ser consumida crua, torrada e/ou salgada, ou adicionada a outros alimentos (26,31).

A castanha de caju é considerada um produto alimentar nutritivo, devido possuir em sua constituição apresentar proteínas, carboidratos e gorduras, majoritariamente na forma de ácido oleico e ácido linoleico (26). O grão da castanha de caju é normalmente comercializado sem a casca, a fim de se evitar um sabor amargo/adstringente no produto, e atingir um preço mais elevado no mercado (32).

Figura 1 – Castanha de caju



Fonte: Autor, 2018

O pedúnculo também é nutritivo e conta com a presença de vários compostos, tais como açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, e fibras alimentares, além de possuir elevado teor de vitamina C. Dependendo dos cultivares, o pseudofruto pode ter uma coloração e brilho diferentes, podendo ir do amarelo, passando pelo laranja e vermelho. Seu formato assemelha-se ao de uma pera, tendo uma geometria pseudocilíndrica (33–35).

O Brasil é um dos principais países produtores, consumidores e exportadores desta noz, sendo a castanha de caju o principal produto da pauta de exportação do estado do Ceará. O Brasil é um dos países responsáveis por aproximadamente 92% da produção mundial comercializável. Grande parte das castanhas processadas são exportadas para a Europa, os EUA e o Japão. O cultivo de caju também é destaque na Índia, Costa do Marfim, Moçambique, Tanzânia, Quênia, Indonésia, Tailândia e Vietnã (27,28,36–38).

1.2.2 Castanha-do-pará

Outra noz bastante consumida no Brasil e em algumas partes do mundo é a castanha-do-pará (Figura 2), também denominada castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) pertencente à ordem *Ericales* e à família *Lecythidaceae*. Nativa da floresta amazônica, o cultivo e a extração dessa castanha trata-se de uma atividade bastante explorada por comunidades nativas do Brasil, Bolívia e Peru (39,40). A castanha-do-pará também possui um elevado valor nutricional, pois semelhante a castanha de caju, apresenta valores significativos de micro e macronutrientes essenciais à saúde humana (41–43).

A colheita da castanha do Brasil é frequentemente usada como exemplo de uma atividade humana sustentável. Visto que a maioria das castanhas-do-pará são extraídas diretamente da floresta, e tal extração possui um impacto ambiental relativamente pequeno, não ameaçando o equilíbrio ecológico e o meio ambiente,

podendo, assim, fornecer uma valiosa contribuição para o manejo florestal sustentável (44–47).

Figura 2 – Castanha do-pará



Fonte: Autor, 2018

A castanheira pode alcançar uma altura de 30 a 50 m e diâmetro de caule superior a 3 m em sua fase adulta, habitando normalmente locais de solo duro, de baixa fertilidade, e bem drenados. A espécie se distribui de forma irregular ao longo da bacia amazônica brasileira e estende-se por países como Peru, Colômbia, Venezuela e Equador. No Brasil, a árvore encontra-se principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia e Acre, bem como nas partes florestadas dos estados do Amapá, Roraima, Maranhão e Mato Grosso. O seu fruto possui forma cilíndrica, com cerca de 10 a 20 cm de diâmetro, envolto por uma casca dura e espessa de coloração castanho-escuro, pode atingir massa de 0,2 kg a 2 kg, comportando em seu interior uma média de 12 a 24 castanhas que envolvem os grãos, a parte comestível do fruto (47–49).

A castanha-do-brasil similar à castanha de caju, possui uma casca muito dura que envolve todo o seu grão, sendo este branco e coberto por uma estrutura marrom escura (48). A castanha apresenta em sua composição elevado teor de nutrientes tais como fibras alimentares, proteínas, várias vitaminas, compostos fenólicos, fósforo, tiamina, magnésio e selênio, sendo este último alvo de inúmeras pesquisas em relação a sua constituição na castanha-do-pará e a capacidade antioxidante da mesma (41–44,48–50).

1.2.3 Castanha de baru

A castanha de baru (*Dipteryx alata* Vog.) é proveniente do fruto do barueiro, uma árvore nativa do cerrado, pertencente à família *Faboideae Leguminosae*. O baru é fibroso, ovóide, levemente achatado e constituído por uma fina casca de coloração marrom, sendo classificado como um fruto do tipo drupa, ou seja, possui

uma polpa fibrosa de sabor adocicado e adstringente com um centro endurecido contendo uma única semente oleaginosa comestível, a castanha ou amêndoa de baru (51–53). No Brasil, a castanha de baru (Figura 3) recebe vários nomes populares, dependendo da região em que se encontra, dentre esses nomes destacam-se: cumbaru, cumaru, barujo, coco-feijão, cumarurana, emburena-brava, feijão-coco e pau-cumaru (54).

Figura 3 – Castanha de baru



Fonte: Autor, 2018

O barueiro se desenvolve predominantemente no cerrado e na floresta estacional semidecídua situadas nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo. Pode crescer de 15 a 25 metros de altura, possuindo um caule reto, e apresenta intensa frutificação em sua fase adulta nos meses de agosto e outubro. Sua única semente (amêndoa) comestível produzida pelos seus frutos é comercializada em empórios nos grandes centros, podendo ser utilizada na fabricação de doces e paçoca, ou consumida de forma crua ou torrada, sendo bastante apreciada pelas populações locais. Já a sua polpa é utilizada na fabricação de doces e geleias (53–56).

Cada árvore pode produzir de 1000 a 3000 frutos, cujo diâmetro pode ser de 3 a 7 cm, com pesos variando entre 26 a 40 g, que contém uma semente com massa média 1,17 g. Tanto a casca quanto a polpa apresentam uma cor amarronzada. A semente varia entre as cores creme e branca, e possui uma película marrom escura (57).

A produção de baru é familiar, onde os pequenos agricultores, após extrair a castanha, vendem-na para empresas, cooperativas e associações representativas de agricultores familiares, que as processam, principalmente, para elaboração de produtos alimentícios a serem comercializados. A exploração do baru é uma atividade extrativista de baixo impacto ambiental, uma vez que somente os frutos maduros que caem ao solo são utilizados (58).

Quanto á carga nutricional da castanha de baru, essa apresenta elevado teor de lipídeos, proteínas, fibras dietéticas e minerais, como potássio, fósforo, magnésio, ferro, zinco e cálcio. Essa castanha, também possui alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e compostos fenólicos, sendo esses últimos presentes em quantidades iguais ou superiores à pinheiros, macadâmias, castanhas do Brasil, castanha de caju, avelãs e amendoim. Em virtude dessas características listadas, a introdução da castanha de baru tem sido bastante indicada para compor a dieta humana (51,59–62).

1.2.4 Processamento dos alimentos

Com a revolução industrial observa-se que o padrão alimentar da sociedade brasileira e mundial vem sendo alterado no sentido da substituição de alimentos *in natura* ou minimamente processados por alimentos processados e/ou ultraprocessados, tais como refeições prontas, barra de cereais e *fast foods*. Mais recentemente, essa mudança de hábito alimentar na população pode estar atrelada principalmente, ao grande aumento da exposição midiática em propagandas de televisão e as estratégias de marketing promovidas pelos fabricantes desses produtos. Fatores, que levam a população a ingestão de açúcares de adição, gorduras trans e saturadas, sódio e a diminuição do consumo de fibras, podendo provocar um quadro de deficiência nutricional e um eventual excesso de peso bem como a doenças crônicas alusivas (63–66).

Alimentos processados são aqueles *in natura* que receberam a adição de sal e/ou óleo e/ou açúcar, enquanto os ultraprocessados são formulações industriais prontas para o consumo, feitos inteiramente ou parcialmente de substâncias extraídas, derivadas ou sintetizadas em laboratório destes alimentos (Figura 4). Estudos mostram que em média, alimentos ultraprocessados possuem maior valor energético, maior teor de açúcar livre e menor teor de fibras do que os alimentos *in natura* e processados (63,67,68).

Figura 4 - Estágios de processamento dos alimentos



Fonte: Autor, 2018

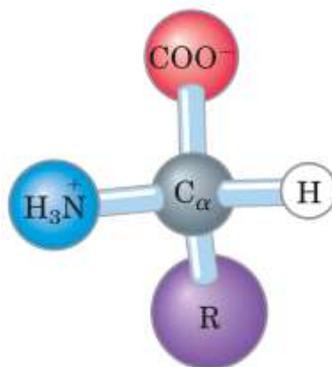
No Brasil o consumo de alimentos processados e/ou ultraprocessados é elevado, apresentando uma tendência de ascensão, visto a demanda de mercado interno, onde ocorre disputas entre os alimentos processados e os não processados e também entre as marcas. Esses alimentos possuem características singulares que favorecem o seu consumo excessivo, por exemplo: a frequente comercialização em grandes porções, a hiperpalatabilidade, a longa duração, facilidade de transporte, o que facilita e induz o hábito de comer entre refeições e fazer lanches, além de sua agressiva promoção por meio de persuasivas estratégias de publicidade. Neste cenário, a pressão das indústrias para ganhar progressivo espaço no que concerne a participação de produtos processados na alimentação brasileira é ampla (64,67,69).

1.2.5 Proteínas

Proteínas são moléculas formadas por unidades de aminoácidos. Tais unidades apresentam na sua molécula um grupo amino ($-NH_2$) e um grupo carboxila ($-COOH$) (Figura 5), que em pH fisiológico encontram-se na forma ionizada e são unidos por ligação peptídica, cujas funções quase invariavelmente dependem de interações com outras moléculas e essas interações são influenciadas de maneira fisiologicamente importante por alterações algumas vezes sutis, outras drásticas, na conformação das proteínas (70). Por essas razões, estudos de proteínas são de suma importância pois podem descrever as condições do ambiente biológico, uma

vez que estas moléculas são sensíveis a alterações que modifiquem o meio no qual estão inseridas.

Figura 5 – Estrutura geral de um aminoácido.



Fonte: NELSON; COX, 2014 (70)

As proteínas possuem papel fundamental nos processos biológicos. Praticamente todas as transformações moleculares que definem o metabolismo celular são mediadas por catálise protéica. As proteínas exercem também funções regulatórias, controlando as condições intracelulares e extracelulares e mandando informações para outros componentes da célula (71). Essas biomoléculas também fazem parte da composição de inúmeras formulações por seus efeitos funcionais e nutricionais (72).

As proteínas em especial as alimentares, são moléculas complexas e versáteis, com diversas funções. A variação na funcionalidade está associada à sua estrutura. Portanto, o conhecimento da relação estrutura-função das proteínas alimentares é importante para entender o efeito dos fatores de transformação nos aspectos físico-químicos, sensoriais e nutricionais desses ingredientes alimentares de alto valor nutritivo (72).

1.2.6 Solubilidade de proteínas

Inúmeros estudos vêm sendo realizados com diferentes tipos de proteínas visando melhorar e expandir sua utilização como ingredientes funcionais, visto que as mesmas possuem uma ampla aplicação na indústria alimentar. As propriedades funcionais das proteínas são influenciadas por vários fatores, incluindo as condições

do meio em que se encontram, a presença de íons e de outros compostos, entre outros (73,74).

Dentre as propriedades funcionais das proteínas, a solubilidade é relevante, devido à sua influência significativa sobre as outras propriedades funcionais das biomoléculas. Em geral, é necessário que as proteínas utilizadas para a funcionalidade tenham uma solubilidade elevada, de modo a proporcionarem boas propriedades de emulsão, espuma, gelificação e fusão, ou seja, uma diminuição da solubilidade de uma proteína afeta negativamente sua funcionalidade. A solubilidade das proteínas relaciona-se com a interação hidrofóbica superficial (proteína-proteína) e hidrofílica (proteína-solvente). No caso de alimentos, esse solvente é a água e, portanto, a solubilidade da proteína é classificada como uma propriedade hidrofílica (75).

A solubilidade *in vitro* de proteínas é uma propriedade importante para os estudos proteômicos, tornando-se uma questão relevante em diversas áreas da biotecnologia, incluindo a produção de proteínas farmacêuticas. Estudos estruturais e aplicações farmacêuticas frequentemente requerem amostras de proteína com alta concentração (76–78).

A solubilidade proteica é termodinamicamente a concentração da proteína no solvente, em um sistema simples ou de duas fases (solução de proteína em fases líquido-líquido ou em fases líquido-sólido no estado de equilíbrio). Matematicamente, pode-se expressar o grau de solubilidade de uma proteína como a quantidade de proteína presente na fase líquida em relação à quantidade total de proteína nas fases líquida e sólida em equilíbrio. Do ponto de vista técnico, a solubilidade da proteína também pode ser definida como um parâmetro operacional determinado pela retenção da proteína no sobrenadante após a centrifugação em solução durante um certo período de tempo e sob determinada força de centrifugação (79).

A solubilidade de proteínas é variável, podendo algumas proteínas terem insolubilidade quase que completa à valores de vários miligramas por mililitro. A força iônica, a composição iônica, o pH e a temperatura são fatores extrínsecos que influenciam na solubilidade de proteínas (80,81). Fatores intrínsecos que influenciam a solubilidade da proteína são definidos principalmente pelos aminoácidos na superfície da proteína, porém, uma compreensão detalhada de como se pode alterar as propriedades intrínsecas de uma proteína para aumentar sua solubilidade, ainda não é clara (77).

Um ponto interessante é o pI (ponto isoelétrico), ou seja, o valor de pH onde predomina a forma eletricamente neutra do aminoácido. O pI de aminoácidos que não apresentam qualquer grupo ionizável em sua cadeia lateral pode obtido através da média aritmética dos seus dois valores de pK_a . Aminoácidos que apresentam grupos ionizáveis em sua cadeia lateral tem seu pI calculado pela média aritmética dos 2 valores de pK_a mais o valor do pK_r (pK_a do grupo R ionizável) (70).

Uma proteína tem normalmente a menor solubilidade próximo ao seu ponto isoelétrico (pI), isto é, a interação proteína-proteína aumenta porque as forças eletrostáticas das moléculas estão mínimas, a carga média delas é nula e menos água interage com as moléculas da proteína. Esta é uma condição favorável para que as moléculas de proteína se aproximem, se agreguem, e formem precipitados proteicos. Para valores de pH acima ou abaixo do pI , tem-se a proteína com carga líquida negativa ou positiva, respectivamente, permitindo, assim, a interação com um maior número de moléculas de água, aumentando sua solubilidade (75,79,82).

O pH em particular afeta a natureza e a distribuição de cargas de uma proteína. Em geral, as proteínas são mais solúveis em valores de pH inferiores a 7,0, baixos (ácidos) ou elevados (alcalinos), por causa do excesso de cargas de mesmo sinal. Tal fato produz uma repulsão entre as moléculas e, conseqüentemente, contribui para a sua maior solubilidade (75).

As propriedades das cadeias laterais dos aminoácidos, principalmente o fato de algumas terem afinidade ou não pela água, são importantes para a conformação das proteínas e, portanto, para sua função e solubilidade. Os aminoácidos são classificados de acordo com a polaridade do grupo R que apresentam, e podem ser divididos em 2 grandes grupos: aminoácidos polares (grupo R hidrofílico) e aminoácidos apolares (grupo R hidrofóbico) (83).

Portanto, os aminoácidos têm pelo menos dois grupos ionizáveis, que podem existir na forma protonada ou desprotonada, dependendo do meio em que se encontram. Logo, os aminoácidos apresentam 2 regiões de tamponamento, ou seja, 2 valores de pK_a que são observados em suas curvas de titulação. Aqueles que apresentam cadeia lateral ionizável apresentam uma terceira região de tamponamento, ou seja, um terceiro pK_a . Entende-se por pK_a uma medida da tendência de um grupo doar um próton para o meio (84,85).

A carga elétrica total de uma proteína é tida como o somatório das cargas apresentadas pelos radicais dos aminoácidos que a compõem. A carga destes

radicais depende, por sua vez, do valor de seu pK_a e do pH da solução. Para cada proteína existe um determinado valor de pH no qual o número de cargas positivas equivale ao número de cargas negativas. Nesse valor de pH, a macromolécula é eletricamente neutra, como acontece com os aminoácidos. Porém, o pI de proteínas não pode ser calculado a partir dos valores de pK_a dos aminoácidos componentes, visto que a capacidade de hidratação de uma proteína está relacionada apenas em parte com a sua composição de aminoácidos, podendo esses darem apenas uma ideia do valor de pI da mesma. Isso acontece devido ao grande número de aminoácidos que compõem uma proteína, e principalmente, porque o valor de pK_a e conseqüentemente de pI desses varia conforme sua localização na estrutura da proteína e por uma série de outros fatores (70,85,86).

Logo, o ponto isoelétrico de proteínas só pode ser determinado experimentalmente, embora vários modelos teóricos já foram propostos para se prever propriedades dependentes do pH em proteínas. Tais modelos são incompletos ou apenas aproximáveis, pois alguns apenas conseguem prever certas propriedades desconsiderando fatores como os grupos ionizáveis dos aminoácidos na proteína, o efeito da interação intramolecular entre estes grupos, o enovelamento proteico, as estruturas que regem a proteína, o efeito da força iônica, a existência de estruturas atômicas e a falta de cargas nas proteínas, a constante dielétrica do solvente do meio, a influência de grupos neutros, dipolos e o efeito de solvatação e desolvatação dentre outros vários fatores (82,87).

1.2.7 Métodos de quantificação de proteínas

Dentre os métodos usados para determinar o teor de proteínas totais, os baseados em espectrofotometria UV-Vis são os mais empregados. Ao longo dos anos, têm sido propostos vários desses métodos, entretanto não existe ainda uma metodologia considerada de uso universal e unânime. Dentre estes métodos, os mais utilizados são o do biureto, o método de Lowry, o método de Bradford, do BCA ou reagente de Smith e o de absorção de proteínas no ultravioleta. No entanto, ao analisar a literatura observa-se que o ensaio de Bradford é o mais utilizado para a quantificação de proteínas totais. Esse método é o mais comum em razão da simplicidade, rapidez, sensibilidade relativa adequada sensibilidade (88–94).

O método de Bradford baseia-se na reação do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB), com resíduos de aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas em proteínas. Durante a reação, a interação entre o CBB e a proteína desloca o equilíbrio do reagente para a sua forma aniônica, tendo o complexo CBB-proteína um máximo de absorvância em 595 nm. Albumina bovina é normalmente utilizada como padrão (91,93,95).

No entanto o método de Bradford apresenta algumas limitações tais como a variação da absorvância específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade ou baixa massa molecular das mesmas, pois a proteína deve ter estrutura macromolecular, ou seja, de 8 a 9 ligações peptídicas no mínimo. A reprodutibilidade dos resultados pode ser influenciada pela pureza do reagente CBB, que varia conforme a procedência. Os lipídeos provocam turbidez na amostra. A ureia, cloretos de sódio e de potássio, e glicerol, interferem no método de Bradford, ocasionando falsos positivos ou falsos negativos. No caso de alguns polifenóis, esses reagem com as proteínas impedindo a formação do complexo CBB-proteína (93,96).

1.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

1.3.1. Amostras

As amostras de castanha de caju (*Anacardium occidentale L.*), castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) e castanha de baru (*Dipteryx alata*) em suas formas *in natura*, processadas e ultraprocessadas, utilizadas neste estudo foram adquiridas junto ao comércio local de Teresina-PI e armazenadas em frascos de polipropileno.

1.3.2. Instrumentação

Para realização das medidas de absorvância foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis FEMTO 600 Plus (FEMTO, São Paulo, Brasil). No preparo das amostras foram empregados moinho criogênico (MA775, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), liofilizador (L 101, Liobras, São Carlos, SP, Brasil), balança analítica (APX – 200, Denver, Bohemia, NY, EUA), uma centrífuga (NI 1812, NOVA, Piracicaba, SP, Brasil), e outra centrífuga microprocessada (Q222TM216, Quimis, Diadema, SP,

Brasil), uma mesa agitadora (Q225M, Quimis, Diadema, SP, Brasil), e um pHmetro (RS 232, MS TecnoPON, Piracicaba, SP, Brasil).

1.3.3. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica. Para a realização dos ensaios de solubilidade das proteínas foi feito o uso dos reagentes: hidróxido de sódio (Dinâmica, Brasil), HCl (Merck, Alemanha), Comassie Brilliant Blue G 250 Coloidal (Sigma – Aldrich, EUA), etanol (Isofar, Brasil), ácido fosfórico (Isofar, Brasil), Fosfato de amônio dibásico (Sigma – Aldrich, EuA) e padrão de albumina bovina (Sigma – Aldrich, EUA). Para o preparo do banho ácido foi usado ácido nítrico concentrado (Quemis, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida em sistema de purificação Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

1.3.4. Preparo das amostras

Após a amostragem, ca. 250 g das amostras foram pulverizadas utilizando-se pistilo e almofariz, sendo então armazenadas em béqueres e em seguida liofilizadas por 30 h, sendo previamente congeladas com nitrogênio líquido. Após a secagem, as amostras foram pulverizadas empregando moinho criogênico sob a seguinte programação: Etapa 1 - pré-congelamento @ 2 min; Etapa 2 – moagem @ 1 min, intercalados por ciclos de recongelamento e moagem @ 10 min. Então, cada amostra foi armazenada em frascos de polipropileno e mantidas em dessecador para análises posteriores.

1.3.5. Análise das amostras

A solubilidade de proteínas foi realizada de acordo com o procedimento proposto por Wang e colaboradores (2016) (97) e Yuliana e colaboradores (2014) (98), com algumas modificações. Pesou-se ca. 1,0 g de amostra em erlenmeyers de 250 mL, depois adicionou-se 100 mL de água deionizada. A mistura foi mantida sob agitação de 210 rpm por 1 h. As soluções contidas nos erlenmeyers foram transferidas para tubos falcon de 50 mL que foram centrifugados a 3500 rpm por 10

min e, então, foram filtradas. Alíquota de 10 mL da solução da amostra filtrada foi transferida para 8 tubos falcon de 50 mL. Cada tubo teve seu pH ajustado, para os valores de 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, e 12 utilizaram-se as soluções HCl 1 mol L⁻¹ e NaOH 1 mol L⁻¹. Os tubos foram novamente centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos, e uma alíquota do sobrenadante foi retirada para determinação do teor de proteínas empregando o método de Bradford. Para calibração utilizou-se soluções padrão de albumina bovina (98). A solubilidade das proteínas para cada valor de pH foi expressa em porcentagem utilizando a razão entre a massa da quantidade de proteína no sobrenadante e a massa da quantidade de proteína no extrato bruto, multiplicada por 100. As análises foram realizadas em triplacata.

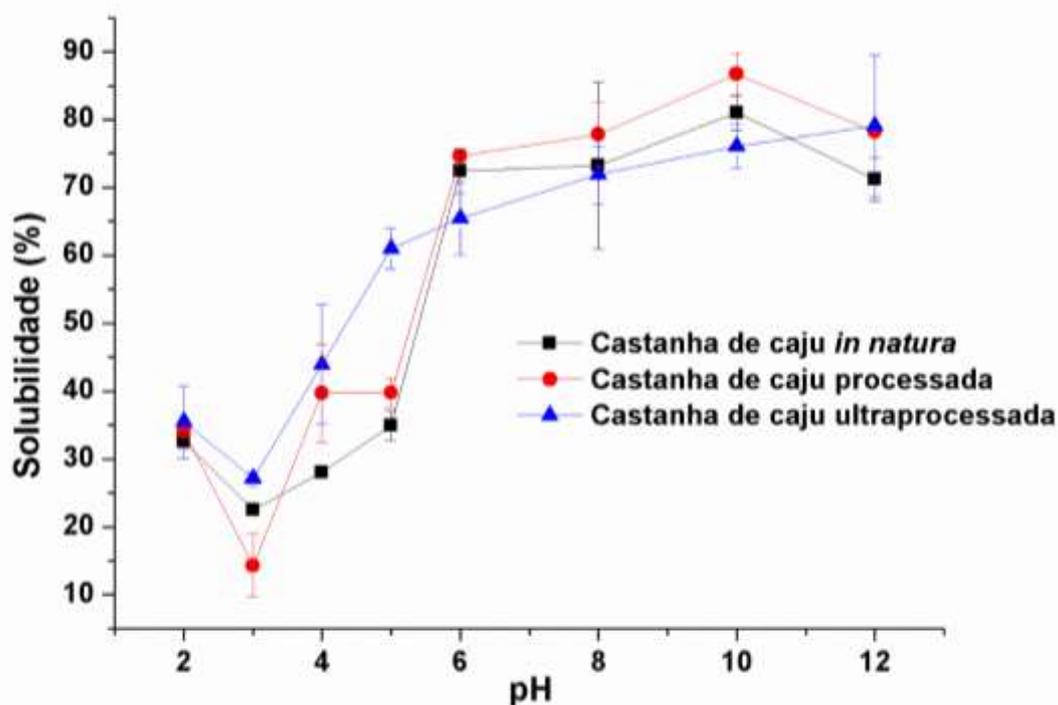
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1. Solubilidade proteica da castanha de caju em função do pH

Uma avaliação da solubilidade de proteínas é ideal para fornecer dados quantitativos de proteínas solúveis e merece uma extensa investigação, visto que esta propriedade também tem papel importante em áreas de biotecnologia, farmacologia e bioquímica (76–78).

A solubilidade das proteínas é a consequência, entre outros fatores, da interação destas com o solvente em que estão inseridas, de interações iônicas com sal presente na solução, e de forças eletrostáticas de repulsão. O pH do meio afeta a natureza e a distribuição de cargas da proteína, por isso estas apresentam alterações na solubilidade em função do pH do solvente. De modo geral, a solubilidade proteica é máxima em pH alcalino, mínima na faixa de pH 3,0 a 5,0, e algumas proteínas apresentam alta solubilidade em extremos de pH ácido (99). O efeito do pH na solubilidade das proteínas de castanha de caju *in natura*, processada e ultraprocessada pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Solubilidade proteica da castanha de caju em função do pH.



Para a amostra de castanha de caju nos três níveis de processamento, observou-se uma solubilidade mínima no valor de pH 3, sendo de 22,5%, 14,3% e 27,1% para a castanha em sua forma *in natura*, processada e ultraprocessada, respectivamente.

A solubilidade mínima em pH 3,0 indica que a maior parte das proteínas presentes nas amostras possuem pls bastante ácidos, pH no qual a carga elétrica líquida das proteínas é nula, devido a quantidade de cargas negativas e positivas serem as mesmas. Com isso a interação proteína-proteína aumenta porque as forças eletrostáticas das moléculas estão mínimas, e menos água interage com as moléculas das proteínas, dessa forma diminuindo a solubilidade destas espécies no meio (80,82,98,100). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Yuliana e colaboradores (2014) (98), ao analisarem a solubilidade proteica da casca de castanha de caju, onde o mínimo de solubilidade foi em pH 3,0, indicando similaridade entre a natureza das proteínas presentes nas cascas e nas amêndoas da castanha de caju.

Para compreensão desse comportamento, pode-se observar na Tabela 1 os aminoácidos comumente encontrados nas proteínas presentes na castanha de caju e seus respectivos pls. Nota-se que o valores de pls encontrados neste trabalho para as proteínas da castanha de caju provavelmente diferiria daquele que seria possivelmente encontrado de forma teórica por meio de uma média aritmética dos pls dos aminoácidos constituintes.

A Tabela 1 mostra quais os aminoácidos presentes na castanha de caju, castanha do Pará e castanha de baru em mg g^{-1} de proteína e seus respectivos pls.

Ao observar a Tabela 1, pode-se notar que os valores de pl dos aminoácidos são em geral próximos ao valor pH 6, com exceção de Arginina, Histidina e Lisina, que possuem pls básicos e Aspartato e Glutamato que possuem pls ácidos. Entretanto, o valor de pl encontrado para as proteínas da castanha de caju neste trabalho foi em pH 3,0 e os valores de pl dos aminoácidos mais próximos a este são de Asp e Glu, todavia, não foram encontrados na literatura valores de composição desses aminoácidos nessa castanha.

Tabela 1 – Concentração de aminoácidos em três tipos de castanha e seus respectivos pls.

Aminoácidos	pI	Castanhas		
		Castanha de caju (mg g ⁻¹ de proteína)	Castanha do- pará (mg g ⁻¹ de proteína)	Castanha de Baru (mg g ⁻¹ de proteína)
His	7,59	26,8	30,2	23,4
Ile	6,02	41,5	31,5	37,5
Leu	5,98	80,0	82,4	77,8
Lys	9,74	45,9	37,4	48,4
Met+Cys	5,40	28,1	95,9	22,0
Phe+Tyr	5,57	72,6	71,8	77,2
Thr	5,87	32,2	26,4	44,9
Trp	5,89	13,1	10,1	20,2
Val	5,97	56,5	49,2	51,8
Asp	2,77	-	101,1	101,6
Glu	3,22	-	250,1	216,8
Ala	6,01	44,4	43,0	46,1
Arg	10,76	98,4	151,0	85,6
Gly	5,97	45,5	52,4	47,2
Pro	6,48	53,7	49,8	55,3
Ser	5,68	52,1	46,2	44,1

Fonte: FREITAS; NAVES, 2010(8); NELSON; COX, 2014(70).

No tocante ao pH de maior solubilidade nota-se uma influência mais evidente do nível de processamento da amostra sobre a característica avaliada das biomoléculas. Para a amostra ultraprocessada, o pH com maior conteúdo de proteínas na fração solúvel foi a pH 12, 79% do total. Enquanto, para a castanha de caju na forma processada e *in natura*, o máximo de solubilidade foram de 86,7% e 81% em pH 10, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, onde o perfil de solubilidade proteica teve seu máximo em pHs alcalinos. No trabalho desenvolvido por Lawal (2004) (101) a solubilidade máxima das

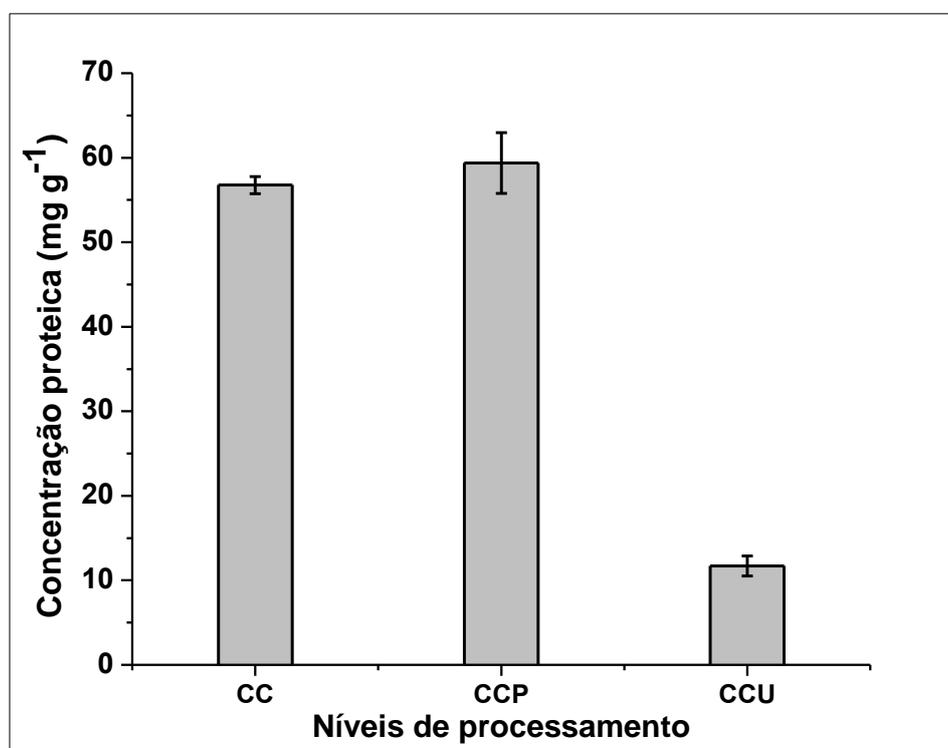
proteínas de alfaborra africana foi observada em pH 10. Cavalcanti, Bora e Carvajal (2009) (102) ao estudarem as propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da faveleira com espinhos e sem espinhos encontram uma solubilidade proteica máxima também em pH 10. Donadel e Prudencio-Ferreira (1999) (86) chegaram a resultados semelhantes ao analisarem a solubilidade proteica em função do pH para amostras de feijão comum envelhecido. Ragab, Babiker e Eltinay (2004) (16), ao investigarem o efeito do pH na solubilidade de proteínas do feijão-caupi obtiveram a maior solubilidade em pH 10. O mesmo ocorre para o trabalho desenvolvido por Silva, Azevedo e Azevedo (2015) (103), ao estudarem algumas propriedades funcionais de dois isolados proteicos das amêndoas da munguba.

Durante toda a faixa de pH as respostas variaram para cada amostra, entretanto, uma tendência geral é observada. A solubilidade das proteínas aumentou para todas as amostras com o aumento do pH, sofrendo uma ligeira redução em pH 12, para as amostras *in natura* e processada. Tal tendência decorre do fato de que as proteínas ao se afastarem de seu ponto isoelétrico adquirem carga elétrica líquida positiva ou negativa, sendo a primeira para valores de pH alcalinos e a segunda para valores de pH baixos (ácidos). Dessa forma, aumentando as repulsões eletrostáticas devido um excesso de cargas de mesmo sinal, separando as moléculas de proteínas, assim diminuindo as interações proteína-proteína e aumentando as interações proteína-solvente, e, conseqüentemente, contribuindo para uma maior solubilidade dessas. Tal perfil de solubilidade é comum para a maioria das proteínas vegetais, que possuem solubilidades mínimas entre os pHs 3 e 5 e solubilidade máxima em pH superior a 7,0 (82,98,104).

Outra explicação para a ligeira redução da solubilidade para as amostras *in natura* e processada em pH 12, bem como a pequena solubilidade em pH 2, pode ser o fato de que valores de pH elevados as vezes afetam a ionização dos grupamentos de algumas proteínas, alterando a carga líquida da mesma e conferindo a molécula uma elevada carga positiva ou negativa, que depende do valor de pH, dessa forma, ocasionando uma repulsão intramolecular eletrostática e o rompimento de algumas ligações de hidrogênio que mantêm o núcleo proteico, o que expõe o interior hidrofóbico da proteína. Ou seja, ocorre uma desnaturação da proteína com exposição de superfícies hidrofóbicas associadas, o que leva à precipitação (70,82,85).

O fato da amostra em estágio ultraprocessado ter apresentado maior solubilidade em pH inferior a 6,0 e no pH de solubilidade mínima, pode ser explicado devido a quantidade de proteína solúvel presente nesta amostra ser inferior às demais, como pode ser observado pela Figura 7. Dessa forma, a solubilidade é diretamente afetada, haja vista que uma maior quantidade de moléculas de água estará disponível para solvatar uma menor quantidade de moléculas de proteína, além de que, espera-se que peptídeos menores gerados a partir das proteínas hidrolisadas apresentem mais resíduos polares, com a possibilidade de formar ligações de hidrogênio com a água, o que aumenta a solubilidade (100).

Figura 7 – Teor de proteínas solúveis totais (mg g^{-1} de albumina) na castanha de caju em diferentes estágios de processamento.



CC= Castanha de caju *in natura*; CCP= Castanha de caju processada; CCU= Castanha de caju ultraprocessada

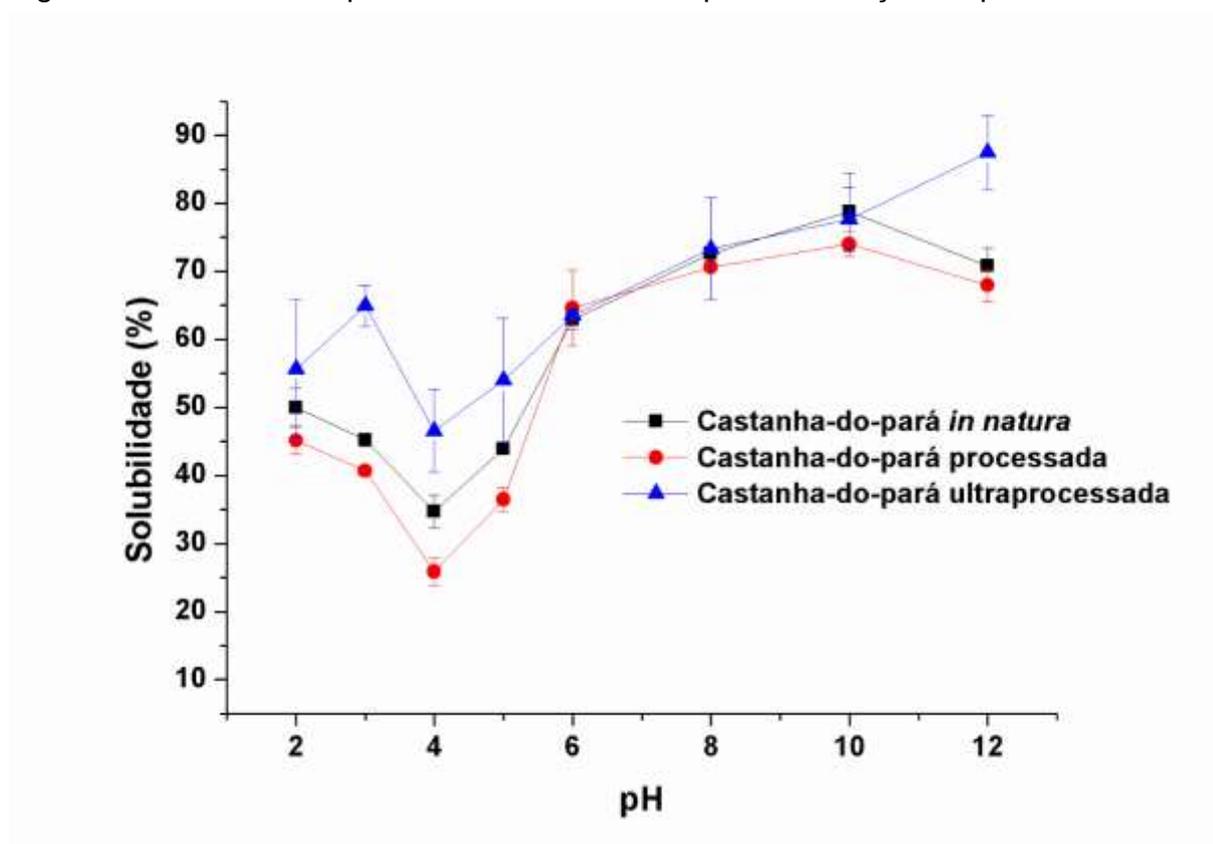
Como pode-se observar, a castanha de caju ultraprocessada apresenta 11,7 mg de equivalente de albumina por g de amostra, enquanto a amostra processada e *in natura* apresentam $59,4 \text{ mg g}^{-1}$ e $56,8 \text{ mg g}^{-1}$ respectivamente, esses resultados são relativamente distantes dos valores reportados na literatura com concentrações em média de $241,40 \text{ mg g}^{-1}$ (8,105). Isso pode ser justificado pelo fato de que em geral as proteínas majoritárias em sementes são as globulinas variando de 35-72%

(106), especificamente as castanhas de caju são constituídas 66,9% de globulinas (107).

1.4.2 Solubilidade proteica da castanha do-pará em função do pH

A Figura 8 mostra a influência do pH na solubilidade das proteínas de castanha-de-pará *in natura*, processada e ultraprocessada.

Figura 8 – Solubilidade proteica da castanha-do-pará em função do pH.



Diferentemente das amostras de castanha de caju, as de castanha-do-pará em sua totalidade tiveram um mínimo de solubilidade no valor de pH 4, sendo de 34,7%, 25,8% e 46,6% para a sua forma *in natura*, processada e ultraprocessada respectivamente. Dessa forma, pode-se afirmar que a maioria das proteínas presentes nas amostras de castanha-do-pará possuem *pI* ca. pH 4,0, resultando no maior percentual de precipitação na faixa avaliada.

Apesar de não ser possível obter o *pI* de uma proteína por meio dos *pIs* de seus aminoácidos constituintes, é possível ter uma ideia deste. Observando-se a Tabela 1, é perceptível, que em geral, existe uma concentração relativamente

elevada de aminoácidos com pls ácidos como Aspartato e Glutamato em relação aos demais aminoácidos nas proteínas da castanha-do-pará, o que contribui em parte para a solubilidade mínima no pH apresentado. Os resultados obtidos também revelam que o nível de processamento da castanha não interferiu na solubilidade mínima das proteínas em relação ao pH.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreyra e Colaboradores (2007) (74), ao analisarem a solubilidade proteica em função do pH de farinha desengordurada de amendoim. Comportamento similar foi encontrado nos trabalhos desenvolvidos por Ragab, Babiker e Eltinay (2004) (16) e Neves e colaboradores (2003) (99), ao investigarem o efeito do pH na solubilidade de proteínas do feijão-caupi. Os resultados também se assemelham aos de Cavalcanti, Bora e Carvajal (2009) (102), ao estudarem as propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da faveleira com espinhos e sem espinhos.

Quanto à solubilidade máxima, os resultados foram semelhantes aos obtidos para a castanha de caju. Sendo que as proteínas das amostras de castanha-do-pará *in natura* e processadas apresentaram *ca.* 79% e 74%, respectivamente, solúveis em pH 10, enquanto as das ultraprocessada foram 87% em pH 12.

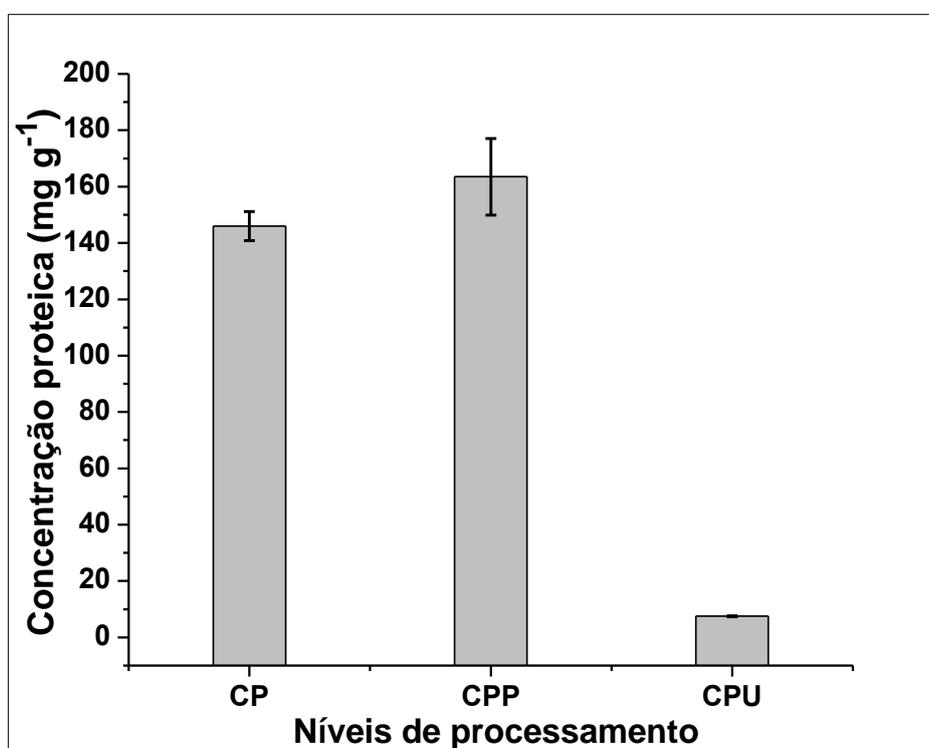
Comparando a solubilidade das proteínas das castanhas de caju e -do-pará nos diferentes níveis de processamento observa-se que para $pH > 5,0$ ocorre um aumento considerável da característica avaliada como se observa nas Figuras 2 e 4. Outra semelhança que pode ser identificada é a solubilidade superior das proteínas das castanhas nas amostras ultraprocessadas em pH inferior a 6,0 em relação a suas formas *in natura* e processada. Outro ponto que deve ser considerado é o comportamento no pH de solubilidade mínima para as duas castanhas, aquelas no estágio ultraprocessado apresentaram solubilidade maior, seguido das *in natura* e processadas.

Assim como as castanhas de caju, as castanhas-do-pará apresentaram na faixa de valores de pH investigada solubilidades que variaram para cada amostra, porém em uma mesma tendência. As solubilidades das proteínas em pH's alcalinos foram superiores àquelas em meio ácido. As proteínas das amostras ultraprocessadas tendem aumentar a solubilidade em pH 12 enquanto as das amostras *in natura* e processada sofrem uma redução, devido a possível desnaturação que ocorre em algumas proteínas neste valor de pH. Provavelmente,

no nível de processamento mais elevado não deve apresentar proteínas menos solúveis em pH 12.

Quanto a carga proteica total solúvel, a castanha-do-pará mostrou-se mais rica em suas formas *in natura* e processada que a castanha de caju, apresentando 146,0 mg g⁻¹, 163,5 mg g⁻¹ e 7,5 mg g⁻¹ na amostra natural, processada e ultraprocessada, respectivamente. Diferentemente das castanhas de caju as do-pará apresentaram concentrações próximas aos valores reportados na literatura de 141,1 mg g⁻¹ (8). Os valores podem ser visualizados na Figura 9.

Figura 9 - Teor de proteínas solúveis totais (mg g⁻¹ de albumina) na castanha-do-pará em diferentes estágios de processamento.



CP= Castanha-do-pará *in natura*; CPP= Castanha-do-pará processada; CPU= Castanha-do-pará ultraprocessada

Apenas no estágio ultraprocessado a castanha-do-pará apresentou menor quantidade de proteína solúvel total que a castanha de caju, sendo de 7,5 mg de equivalente de albumina por grama de amostra para a primeira e 11,7 mg g⁻¹ para a última.

1.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Quanto a concentração de proteínas, o processamento do alimento interferiu significativamente nessa propriedade nutricional. A castanha de caju no estágio ultraprocessado apresentam teor de proteína ca. 5 vezes menor ao da *in natura*, enquanto que a do-pará foi 20 vezes inferior. Sobre a solubilidade proteica, as amostras de castanhas apresentaram menores valores em pH's ácidos na faixa de 3 a 5 devido estes estarem próximos ao pls das proteínas de sua composição. A solubilidade proteica aumenta para valores de pH > 5,0, sendo máxima em meio alcalino de pH entre 10 e 12. No próximo capítulo será investigado o Conteúdo Fenólico Total (CFT) nas amostras de castanhas nos diferentes níveis de processamento para avaliar a influência deste nos teores de compostos fenólicos e na composição química das amostras em estudo.

Capítulo 2

Avaliação dos compostos fenólicos em castanhas *in natura*, processadas e ultraprocessadas

2.1. OBJETIVO

O objetivo do estudo apresentado neste capítulo consistiu na otimização da condição ótima de extração de compostos fenólicos da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) avaliando diferentes solventes extratores (acetona, água, etanol e metanol) e suas combinações por meio do planejamento centroide simplex e metodologia de superfície resposta. Além disso, a análise por ESI(-)-Q/TOFMS aliada às Análises de Componentes Principais (PCA) e por Agrupamento Hierárquico (HCA) foram realizadas para avaliar a influência da variedade de compostos fenólicos da castanha de caju sobre os procedimentos de extração bem como verificou-se o efeito do processamento no conteúdo de fenóis totais (CFT) e na composição química das amostras de castanha.

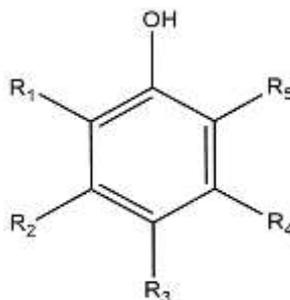
2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas em toda a natureza, do qual mais de 8000 mil deles já foram descobertos em plantas. Essas substâncias são classificadas como metabólitos secundários dos vegetais, apresentam função de defesa, atuando como antipatogênicos e agem no crescimento e reprodução das plantas. Em nível celular, influenciam o metabolismo de lipídios e o mecanismo bioquímico da respiração, inibindo o transporte de glicose e a síntese de celulose. Os compostos fenólicos são empregados pela indústria alimentícia para conferir cor, adstringência e aroma aos alimentos (18,108–111).

Os compostos fenólicos (Figura 10) são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Dispõem de estrutura variável e com isso desenvolvem atividades multifuncionais. Os fenóis abrangem desde moléculas simples até moléculas com elevado grau de polimerização, podendo estar presentes nos vegetais de forma livre ou associados a açúcares e proteínas. A diversidade desses compostos deve-se a grande variedade de combinações que ocorrem na natureza e os compostos resultantes são denominados polifenóis (112,113).

Figura 10 – Estrutura geral de um composto fenólico.



Fonte: Autor,2018

Dentre os compostos considerados fenóis estão os ácidos fenólicos derivados de ácido benzoico e cinâmico, cumarinas, flavonoides, estilbenos, antocianidinas, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas entre outros (114). Os fenóis e polifenóis podem ocorrer sob diferentes formas em locais distintos da planta, sendo essas comestíveis ou não. Esses compostos apresentam significativa estabilidade, resistindo ao processamento industrial, sendo encontrados em alimentos processados. Por exemplo, no trabalho desenvolvido por Aires et al. (2016), os autores quantificaram ácido elágico, ácido gálico, catequina e epicatequina em castanha portuguesa. A reatividade é outra característica destas substâncias, que permitem formar ligações covalentes e complexos com outros metabólitos da planta (115).

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos importantes encontrados na natureza, eles podem ser classificados em diferentes grupos, como: catequinas, antocianidinas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavan-3-ols e flavonóis, de acordo com suas diferenças estruturais (116,117). Esses compostos apresentam massa molecular variada, entre 200 a 3000 Da, mas em sua maioria apresentam baixa massa molecular e são constituídos por 15 átomos de carbono, dispostos num arranjo C6-C3-C6. É característico dos flavonoides apresentar em suas estruturas 2 anéis aromáticos ligados por uma ponte de 3 carbonos, geralmente na forma de um anel heterocíclico. As variações nos padrões de substituição do anel heterocíclico resultam nas principais classes de flavonoides. Enquanto as substituições nos 2 outros anéis resultam em compostos diferentes dentro de cada classe de flavonoides (118).

Observando a literatura, nota-se um aumento de trabalhos focados no estudo de compostos fenólicos, devido ao seu crescente valor comercial para as indústrias

de cosméticos e fármacos bem como o efeito benéfico causado por esses na nutrição humana (115). A característica antioxidante dos compostos fenólicos foi a motivação para realização de inúmeras pesquisas focadas em avaliar a influência desses compostos na prevenção de doenças, como alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, acidentes vasculares cerebrais e demais doenças relacionadas ao envelhecimento. Atualmente, os estudos estão dirigidos para os efeitos benéficos destes compostos na alimentação humana (119).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é explicada principalmente pelas suas propriedades redutoras e estrutura química. Essas propriedades exercem um papel significativo na neutralização ou no sequestro de radicais livres, bem como na quelação de metais de transição, agindo tanto no processo de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários que são formados pela ação dos antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura desses compostos (114,120–122).

Portanto, vários destes compostos estão sendo associados a diferentes atividades biológicas, tais como antimutagênicas, anticarcinogênicas, antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, com efeitos neuro e cardioprotetores, além de promoverem a inibição da agregação plaquetária e funções imunológicas, participam na proteção direta do DNA e na promoção da apoptose entre outras atividades (123–125).

2.2.2 Extração e quantificação dos compostos fenólicos

A extração consiste na etapa prévia a análise dos compostos fenólicos, de maneira que as estratégias utilizadas nesta fase experimental refletirão diretamente no resultado a ser obtido. Esta etapa é fundamental no isolamento, identificação e posterior utilização desses compostos, apesar de ainda não existir um método de extração unívoco e padrão. A extração com uso de solventes e com fluido supercrítico são os procedimentos mais utilizados para o isolamento dessas substâncias (118).

O procedimento de extração de compostos fenólicos em vegetais é influenciado pela natureza química de suas matrizes, o método de extração, o tempo de extração, distribuição de partículas da amostra, condições de armazenamento e pelos solventes e proporções (solvente/amostra) utilizadas para esse processo. A

natureza química dos compostos fenólicos presentes nas plantas varia de substâncias simples à altamente polimerizadas, incluindo proporções variáveis de diversos fenóis e polifenóis. Em virtude disso, os extratos fenólicos são sempre uma combinação de diferentes classes de fenóis solúveis no solvente utilizado na extração (126).

Logo, a solubilidade de compostos fenólicos depende de alguns fatores: tipo e polaridade do solvente, grau de polimerização e interação dos compostos fenólicos com outros componentes da matriz vegetal. Essa característica dificulta a padronização de um protocolo de extração (126,127).

Vários métodos de extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes são reportados na literatura, nas quais utilizam-se vários solventes com polaridades diferentes, tais como metanol, etanol, acetona, acetato de etila e água e, em menor extensão, propanol e dimetilformamida. A combinação em diferentes proporções destes solventes também é frequentemente utilizada para a extração de fenóis (126,128).

Os métodos espectrofotométricos ou cromatográficos são os mais utilizados para a quantificação de compostos fenólicos em amostras vegetais. O amplo emprego de métodos espectrofotométricos deve-se ao fato de serem simples, rápidos, de alta repetitividade e reprodutibilidade, baixo custo e confiáveis (129,130).

Vale ressaltar que os ensaios espectrofotométricos apenas fornecem uma estimativa do conteúdo fenólico total. Para investigar compostos fenólicos individuais presentes no extrato faz-se necessário a realização de experimento empregando sistemas cromatográficos convencionais ou acoplados ao espectrômetro de massas (129).

A maioria dos trabalhos reportados na literatura empregam o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu para a quantificação do teor total de fenóis e polifenóis nos diferentes tipos de amostras. Uma vantagem deste método refere-se ao fato de apresentar resposta equivalente a diferentes substâncias fenólicas presentes nos diversos materiais biológicos com significativa reprodutibilidade (130–132).

O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução química dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu pelos fenóis existentes na amostra. O molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação +6, na presença de certos agentes redutores,

como os compostos fenólicos, formam-se os complexos chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre +5 e +6. Esses apresentam coloração azul e absorvem radiação em 765 nm. Nesse método emprega-se padrão de ácido gálico para calibração, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (EAG) (114,126,129,133).

2.2.3 Planejamento de misturas para otimização do método de extração de compostos fenólicos

Com o avanço e desenvolvimento de métodos instrumentais analíticos, incluindo automação na geração e aquisição de dados, uma grande quantidade de valores numéricos e informações têm sido obtidos. Nesse sentido, a aplicação da Quimiometria facilita a interpretação de forma mais rápida e eficaz da crescente gama de dados originados por um sistema (134). Os planejamentos experimentais são utilizados para maximizar ou minimizar algum tipo de resposta que é obtida por uma série de experimentos (135).

Geralmente, a otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez, ou seja, de forma univariada. No entanto, essa abordagem apresenta algumas limitações, tais como maior tempo de análise e negligência dos efeitos das interações entre as variáveis na resposta observada. Nesse sentido, essa abordagem resulta em uma otimização ineficiente, não remetendo a condição ótima verdadeira, cuja obtenção é alcançada por meio do emprego de técnicas multivariadas (136).

Dentre os planejamentos experimentais que utilizam sistemas multivariados, a modelagem de misturas é uma técnica bastante utilizada, aplicável quando se utiliza um sistema que consiste em uma mistura, ou seja, quando as variáveis são dependentes entre si (137).

Dois tipos de variáveis podem influenciar a resposta de um sistema químico: as de processo e as de mistura. Os planejamentos experimentais para o estudo de misturas apresentam uma importante diferença em relação aos planejamentos fatoriais. Modificações nos níveis das variáveis de processo são capazes de afetar o resultado experimental por meio de seus efeitos principais (efeitos individuais) e de interação com outras variáveis de processo. Porém, seus níveis podem ser variados

de forma independente uns dos outros durante o modelamento, sendo normalmente o que acontece nos planejamentos fatoriais (138).

Por exemplo, ao modificar-se os valores dos níveis dos fatores que envolvem um planejamento fatorial, espera-se que não só o rendimento seja modificado, mas também as propriedades do produto final. Entretanto, quando o sistema se trata de uma mistura, ao modificar-se os níveis dos fatores, espera-se que apenas o rendimento se altere, mas que o produto final não seja modificado. Isso acontece porque as propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções dos níveis de seus fatores, e não por valores absolutos destes (137).

Não há limitações quanto ao estado físico dos componentes, podendo estes serem sólidos, líquidos ou gasosos, desde que as propriedades do sistema químico sejam definidas pela proporção entre eles na mistura. Dessa forma, a quantidade de cada componente do sistema deve ser investigada como uma variável (variável de mistura), que não é independente das demais, pois o somatório das proporções de seus componentes deve ser a unidade (138).

Nesse sentido, a modelagem de misturas consiste em ajustar um modelo matemático polinomial a uma superfície de resposta obtida segundo um planejamento experimental específico, denominado como planejamento estatístico de misturas. O planejamento estatístico de misturas empregado depende da complexidade do modelo matemático do qual se quer ajustar e do número de componentes da mistura. Esse planejamento acarreta a execução de um número definido de experimentos, que servem para ajustar o modelo matemático selecionado e que permite determinar os parâmetros com um menor número de erros (137,138).

2.2.4 Espectrometria de massas para identificação de compostos fenólicos

A identificação de compostos fenólicos é muitas vezes uma tarefa difícil devido à grande variedade de estruturas que essas substâncias possuem. Nesse sentido, a ionização por eletrospray (ESI), em específico, vem sendo bastante utilizada, visto que essa técnica de ionização suave gera moléculas protonadas ou desprotonadas. A obtenção das massas exatas desses compostos é bastante importante para determinar fórmulas químicas das quais facilitam a identificação dos mesmos. Nesse aspecto, o analisador de massas por tempo de voo acoplado ao

quadropolo (Q-TOF MS) combina alta sensibilidade e resolução possibilitando a caracterização estrutural dos compostos (139).

A interface ESI apresenta elevada versatilidade, sendo observado seu acoplamento a diversos analisadores de massas, por exemplo, ESI-TOF. Instrumento com essa configuração apresenta a fonte de ESI ortogonal ao TOF. Tal fato deve-se a características dos componentes, sendo o TOF, um analisador de massas pulsado e ESI uma fonte contínua de íons. Para facilitar esse acoplamento foi desenvolvida uma configuração instrumental, tendo um analisador de massas quadropolo posterior a fonte, sendo o ESI-Q-TOF. O quadropolo atua como um filtro de íons de 100 a 3000 m/z , sendo a separação dos íons realizada pelo TOF cuja resolução pode alcançar até 100.000 (separando a m/z em intervalos de 0,001) (140).

Um analisador TOF possui a capacidade e a vantagem de produzir medidas de massa exatas, podendo confirmar ou excluir potenciais fórmulas moleculares. Além do mais, pode fornecer abundâncias isotópicas e a composição elementar de íons fragmentos, os quais são de grande relevância para o estudo de interferências estruturais por compostos desconhecidos (141).

Diversos trabalhos utilizam a técnica de ESI-Q-TOF-MS/MS aliada a outras técnicas analíticas para a separação e identificação de compostos fenólicos nas mais diversas matrizes (142–146).

2.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.3.1. Amostras

As amostras de castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.), castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) e castanha de baru (*Dipteryx alata*) em suas formas *in natura*, processadas e ultraprocessadas, foram adquiridas no comércio local de Teresina-PI e armazenadas em frascos de polipropileno mantidas em dessecador.

2.3.2. Instrumentação

Para preparo da amostra, empregou-se um liofilizador (L 101, Liobras, São Carlos, SP, Brasil) para a secagem. A moagem das amostras foi realizada em

moinho criogênico (MA775, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Os procedimentos envolvendo agitação e centrifugação foram realizados em uma mesa agitadora (Q225M, Quimis, Diadema, SP, Brasil) e em uma centrífuga microprocessada (Q222TM216, Quimis, Diadema, SP, Brasil), respectivamente. Todas as pesagens foram feitas usando balança analítica (APX – 200, Denver, Bohemia, NY, EUA). Para realização das medidas de absorvância do método de Folin-Ciocalteu foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis Lambda 25 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Os espectros de massas foram adquiridos em espectrômetro de massas com analisador quadrupolo e por tempo de voo (MicrOTOF-Q II, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

2.3.3 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica adequada. Todas as soluções foram preparadas com água desionizada ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtida de um sistema Milli-Q Direct (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). A limpeza dos materiais foi realizada com solução 10% (v:v) de HNO_3 por 24 h, em seguida foram lavados com água deionizada e secos sob temperatura ambiente. Para os ensaios de otimização das condições de extração de polifenóis empregaram-se os solventes: acetona (Isofar, Brasil), etanol (J. T. Baker, Brasil) e metanol (Sigma – Aldrich, EUA). Para a determinação do teor total de fenóis foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma – Aldrich, EUA), ácido gálico (Sigma – Aldrich, EUA), e carbonato de sódio (Sigma – Aldrich, EUA).

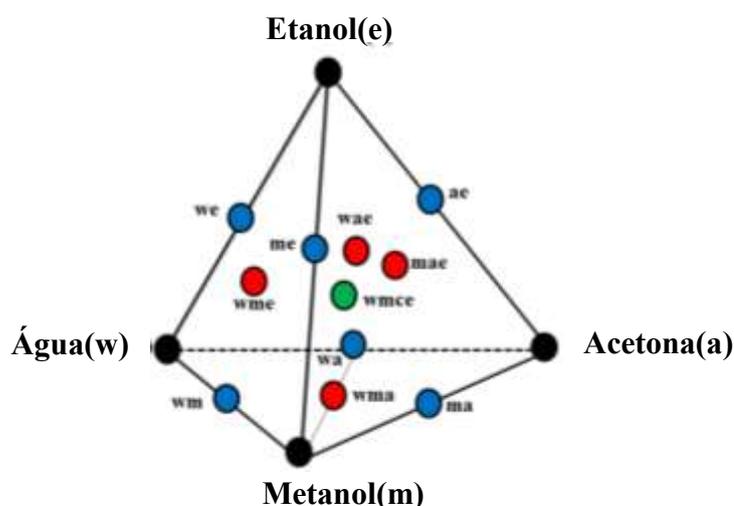
2.3.4. Preparo das amostras - secagem, moagem e armazenamento

Após a amostragem, ca. 250 g foram maceradas utilizando pistilo e almofariz e, depois, submetidas a liofilização durante 30 h. Em seguida, foi feita a moagem das amostras em moinho criogênico conforme o seguinte programa: Etapa 1 - pré-congelamento @ 2 min; Etapa 2 – moagem @ 1 min, intercalados por ciclos de recongelamento e moagem @ 10 min. Por fim, cada amostra foi armazenada em frascos de polipropileno hermeticamente fechados, mantidas em dessecador para análises posteriores.

2.3.5. Extração dos compostos fenólicos

Buscando obter a melhor condição de extração dos compostos fenólicos das amostras de castanha de caju, foram feitos ensaios com misturas de soluções extratoras contendo acetona, água, etanol e/ou metanol (Figura 11). A extração dos compostos fenólicos foi realizada segundo Contine *et al.* (2008) (147) e Pereira e Tavano (2014) (148), com algumas modificações. Realizou-se a adição de 10 mL de solução extratora a 1,0 g de amostra pulverizada e seca. Em seguida, a mistura foi submetida a agitação de 210 rpm por 2 h e centrifugada a 3500 rpm durante 15 min. Logo após, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em frasco âmbar a temperatura de 5 °C. A Figura 6 apresenta o planejamento experimental empregado visando a obtenção da melhor solução de extração. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

Figura 11 - Planejamento de misturas empregado para extração de compostos fenólicos.



Fonte: Autor, 2018

2.3.6. Quantificação do conteúdo de fenólico total (CFT)

O teor de fenóis totais foi determinado baseado no método proposto por Monção e colaboradores (2015) (133). Foi transferida uma alíquota de 1,0 mL dos extratos para tubos falcon de 15 mL, onde se adicionou 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 5 mL de água deionizada. Posteriormente, os frascos foram agitados por 1 min e adicionado 2 mL de uma solução de Na₂CO₃ 15% (m:v), agitando-se por 30

s. Então, o volume de cada tubo foi completado a 10 mL com água deionizada e incubados sob proteção da luz à temperatura ambiente por 2 h. As medidas de absorvância de cada amostra foram realizadas em triplicada em $\lambda=750$ nm. A concentração total de fenóis nas amostras foi expressa em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de material vegetal (mg de AG g⁻¹).

2.3.7. Obtenção do perfil de fenóis de extratos por ESI(-)-Q-TOF MS

Para avaliação dos extratos obtidos nos ensaios propostos pelo planejamento e para as amostras de castanhas nos diferentes estágios de processamento utilizou-se ESI(-)-Q-TOF MS. Para tanto, a solução dos extratos de 100 mg L⁻¹ foi injetada por meio de infusão direta a 180 μ L h⁻¹. Os espectros de massas foram registrados no modo negativo com ionização por *electrospray*, ESI(-), na faixa de m/z 100 a 1000 Da, operando com voltagem do capilar a 3500 V, pressão do gás de nebulização a 2,0 bar, fluxo do gás de secagem de 6,0 L min⁻¹ e temperatura de secagem de 190 °C. A calibração externa foi realizada com solução de *cluster* de formiato de sódio [M⁺(NaCHO₂)_n]⁻, correspondente à uma série de moléculas protonadas [M-H]⁺ com adição de 68 Da. Os espectros de massas foram processados em *software* Compass Data Analysis (versão 4.1, Bruker Daltonics).

2.3.8. Análise estatística dos dados

O software STATISTICA 8.0 foi empregado para a modelagem do planejamento centroide simplex e obtenção dos gráficos de superfície resposta do experimento proposto.

Os fingerprints dos espectros de massas dos extratos do planejamento foram analisados empregando métodos de reconhecimento de padrão não supervisionados, PCA (análise por componentes principais) e HCA (análise hierárquica de agrupamentos). Para tanto, os espectros de massas foram organizados em uma matriz de dados, centrados na média e analisados com o MATLAB.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Otimização do método de extração de compostos fenólicos empregando modelagem de mistura

Diante da complexidade e da diversidade estrutural dos compostos fenólicos, um procedimento ótimo de extração deve ser abrangente e livre de interferentes (149). Logo, faz-se necessário avaliar diferentes solventes orgânicos e suas possíveis combinações mais utilizadas na literatura (108,115,118,123,126,131,147,148,150,151) por meio de uma abordagem multivariada baseada na modelagem de misturas. A Tabela 2 apresenta os resultados nos diferentes ensaios realizados com os solventes e suas misturas propostas pelo planejamento centroide simplex (Figura 6).

Tabela 2 – Concentração de fenóis (mg de AG g⁻¹) nos diferentes ensaios propostos pelo planejamento centroide simplex.

Ensaio	w	a	m	e	Concentração de fenóis (mg g⁻¹)
S1	1	0	0	0	2,23 ± 0,05
S2	0	1	0	0	1,86 ± 0,23
S3	0	0	1	0	1,53 ± 0,15
S4	0	0	0	1	5,93 ± 2,02
S5	1/2	1/2	0	0	2,09 ± 0,4
S6	1/2	0	1/2	0	1,66 ± 0,25
S7	1/2	0	0	1/2	1,77 ± 0,16
S8	0	1/2	1/2	0	4,13 ± 1,71
S9	0	1/2	0	1/2	2,98 ± 0,23
S10	0	0	1/2	1/2	2,61 ± 0,64
S11	1/3	1/3	1/3	0	1,51 ± 0,21
S12	1/3	1/3	0	1/3	1,59 ± 0,16
S13	1/3	0	1/3	1/3	1,48 ± 0,021
S14	0	1/3	1/3	1/3	5,92 ± 0,18
S15 (C)	¼	1/4	¼	1/4	1,63 ± 0,14

w = água; a = acetona; m = metanol; e = etanol

Comparando as médias das concentrações de fenóis extraídos pelos solventes puros e misturas, em geral, pode-se notar que a eficiência de extração aumentou numericamente na seguinte ordem: mistura quaternária de solventes ($1,63 \pm 0,14$), mistura binária de solventes ($2,54 \pm 0,93$), mistura terciária de solventes ($2,62 \pm 2,20$) e solventes puros ($2,89 \pm 2,05$), muito embora, estatisticamente, conforme o teste t, nenhuma diferença significativa entre os grupos tenha sido encontrada ao nível de confiança de 95%.

Para a descrição dos dados obtidos foram avaliados o modelo linear, quadrático e cúbico especial. Dentre estes, o cúbico especial foi escolhido. Pois de acordo com a ANOVA observa-se que o modelo não apresentou falta de ajuste, já que o F_{cal} de 1,59 foi menor que o F_{tab} de 2,71. O coeficiente de determinação múltipla R^2 , que avalia a capacidade de predição do modelo (152), descreve ca. 81,3% da variância dos dados e o modelo apresenta uma máxima variação explicada de 89,2%. A análise dos resíduos do modelo demonstrou que os mesmos seguem uma distribuição normal (Figura 12), indicando que as variações nas medidas realizadas resultam de erros aleatórios decorrentes de fatores inerentes ao procedimento experimental. Estes erros normalmente tendem a se anular, promovendo uma sensível influência sobre o valor médio (153). A Tabela 3 apresenta os parâmetros da ANOVA para avaliar a qualidade do modelo cubico proposto para descrever os dados experimentais obtidos.

Tabela 3 – ANOVA para o modelo cúbico especial com efeitos não significativos ignorados.

Fonte de variação	Graus de Liberdade(GL)	Soma Quadrática (SQ)	Média Quadrática (MQ)	F	p-value
Modelo	7	59,61	8,52	13,67	0,000001
Resíduo	22	13,71	0,62		
Falta de ajuste	7	5,77	0,82	1,59	0,222181
Erro puro	15	7,93	0,53		
Ajuste total	29	73,34	2,53		

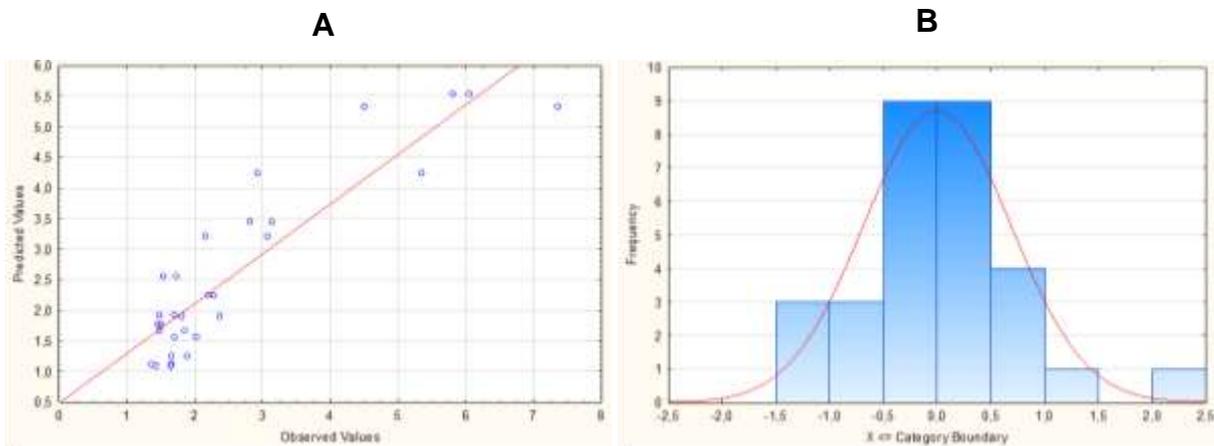
O modelo cúbico especial que não apresentou falta de ajuste significativa a 95% de confiança é representado pela Equação 1.

$$\text{CFT} = 2,25w + 1,57a + 1,10m + 5,34e - 10,13we + 11,65am - 49,01wam + 42,44ame \quad (1)$$

$(\pm 0,47) \quad (\pm 0,46) \quad (\pm 0,46) \quad (\pm 0,47) \quad (\pm 2,37) \quad (\pm 2,59) \quad (\pm 15,88) \quad (\pm 15,88)$

A Equação 1 apresenta apenas os termos significativos. Todos os coeficientes dos termos lineares são positivos, sendo que o maior deles corresponde ao etanol corroborando com o teor de fenol encontrado nos extratos (Tabela 2). O valor negativo para o coeficiente do termo quadrático mostra que a interação água:etanol é antagônico, ou seja, a resposta obtida com os dois componentes combinados será sempre menor do que a soma de suas respostas individuais devidamente ponderadas pelas respectivas proporções. Em contrapartida, o efeito binário entre acetona:metanol é sinérgico, ou seja, a resposta obtida com os dois componentes misturados será sempre maior do que a soma individual de suas respostas. A mistura ternária acetona:etanol:metanol é sinérgica e importante para obtenção de um elevado teor de fenóis totais nos extratos (Tabela 2). Por sua vez, a interação entre água:acetona:metanol é antagônica, produzindo um efeito negativo na extração dos compostos fenólicos resultando na obtenção dos menores teores (137).

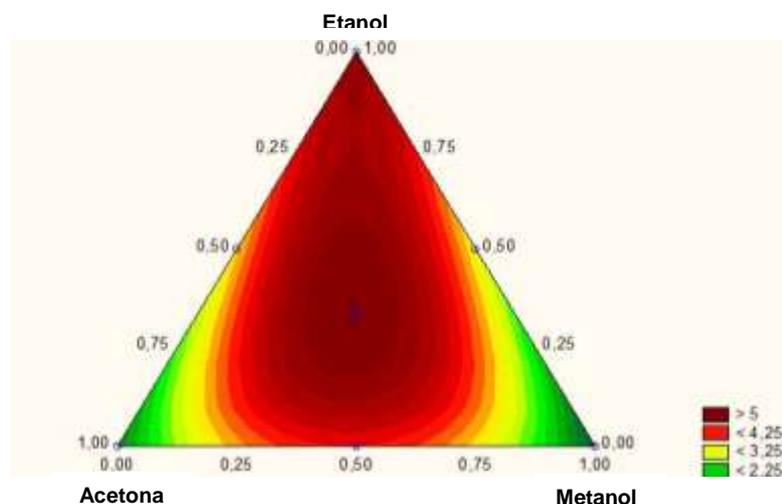
Figura 12 – (A) Gráfico dos valores experimentais vs os valores previstos e (B) histograma de resíduos vs frequências que demonstram a capacidade de previsão e a influência de erros aleatórios do modelo cúbico especial proposto para otimização do método de extração de compostos fenólicos.



Fonte: Autor,2018

Após avaliação da significância dos efeitos e performance do modelo usando ANOVA, obteve-se a superfície de resposta apresentada na Figura 13 que mostra a concentração de fenóis totais em função da composição da mistura de solventes extratores.

Figura 13 - Superfície de resposta obtida para o modelo cúbico especial onde a concentração de fenóis totais é predita em função das proporções de acetona, etanol e metanol com uma composição de água constante de 0%.



Observando a Figura 8, a região central da superfície de resposta apresenta as condições mais favoráveis para extração de compostos fenólicos, sendo os maiores teores obtidos para mistura ternária de acetona, etanol e metanol, e etanol puro, indicando a possibilidade de duas condições ótimas para a extração de fenóis. À medida que se distancia da região central ocorre uma redução de eficiência de extração. Nas arestas que correspondem a acetona e metanol puro, tem-se os menores teores de fenóis totais. A mistura binária de acetona:metanol apresenta alto teor de fenóis devido ao efeito sinérgico demonstrado pela Equação 1.

Os compostos fenólicos, em geral, possuem polaridade elevada, que pode variar dependendo da estrutura do fenol. Esses compostos abrangem desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, apresentando-se na forma livre ou associada a açúcares e/ou proteínas. Portanto, os extratos fenólicos são sempre uma combinação de diferentes classes de fenóis solúveis no solvente utilizado na extração (108,112,113,126).

Em relação a polaridade dos solventes, é conhecida apenas de forma teórica. No entanto, existe uma estimativa empírica que é a escala de polaridade ET (transição eletrônica) que é composta pelas interações entre o soluto e o solvente e solvente-solvente presente em misturas para avaliar as propriedades físico-químicas como: momento de dipolo (μ), constante dielétrica (ϵ), viscosidade absoluta (η) e índice de refração (n) (154). No entanto, o solvatocromismo em misturas binárias é mais complexo porque envolve as interações entre os componentes da mistura e individualmente (155). Na literatura foram encontrados valores de $E_T(30)$ disponíveis na Tabela 4 (156–158).

$$ET (\text{Kcal mol}^{-1}) = \frac{28591,5}{\lambda_{\text{max}}} \quad (2)$$

Ao observar a Tabela 4, pode-se notar que como esperado teoricamente a ordem crescente de polaridade dos solventes consiste em acetona < etanol < metanol < água. Em relação aos teores de fenóis encontrados nos extratos, observa-se que o etanol foi capaz de extrair o maior teor desses compostos, sendo atribuído a sua polaridade intermediária. Enquanto que para solventes de maior polaridade, por exemplo, a água apresentou teor inferior. As misturas binárias com valores de

$E_T(30)$ encontrados na literatura foram para aquelas contendo água (156,157), que neste trabalho apresentaram os menores valores de resposta (Tabela 2).

Tabela 4 - Valores de $E_T(30)$ para solventes puros e algumas misturas binárias

Solvente/ Mistura	Valores de $E_T(30)$
Água	63,1
Acetona	42,2
Etanol	51,9
Metanol	55,4
Água-Acetona	57,0
Água-Etanol	57,4
Água-Metanol	57,7

Dessa forma, percebe-se que a solubilidade dos compostos fenólicos está relacionada à polaridade do solvente (126,127,159). O elevado teor de compostos fenólicos encontrado no extrato obtido empregando a mistura ternária dos solventes orgânicos acetona, etanol e metanol na mesma proporção pode ser atribuído a polaridade resultante ser similar a do etanol puro, proporcionando, assim, a mistura elevada extratibilidade (108,118,126). Em contrapartida, todas as misturas contendo água apresentaram menor rendimento de extração, devido a polaridade resultante ser elevada.

Embora com o teor inferior ao observado pela mistura ternária de acetona, etanol e metanol, as misturas binárias acetona:metanol; acetona:etanol e metanol:etanol apresentaram relevantes CFT. A combinação binária na mesma proporção de solventes possibilita, significativa interação entre os diferentes compostos fenólicos da castanha de caju, ocorrendo uma maior solubilização e, posterior, extração.

O maior conteúdo de fenóis totais encontrado nos extratos com etanol foi surpreendente, pois a literatura reporta maior eficiência de extração de compostos fenólicos em aplicações combinada com água (118,131,148,160). Chiang e colaboradores (2017) (161), atribuem essa relevante extratibilidade a facilidade de permeação do etanol puro nas células dos tecidos vegetais, favorecendo a

solubilização em maior nível de compostos fenólicos pela relação líquido-sólido, e, conseqüentemente, elevando o rendimento na extração. Entretanto, esse mecanismo não se observa nos demais solventes puros avaliados neste estudo, visto que estes não apresentaram extratos com teores de fenóis tão significativos. Neste sentido, a extração empregando etanol puro foi a condição ótima revelada neste estudo para compostos fenólicos. Embora o teste t, a 95% de confiança, indique que os resultados obtidos sejam estatisticamente iguais aos da extração realizada com a mistura ternária de acetona, etanol e metanol.

Apesar de apresentar sua robustez, o método de Folin-Ciocalteu não remete a natureza dos compostos extraídos, ou seja, não é específico para compostos fenólicos, visto que outras moléculas antioxidantes não fenólicas podem reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu. Portanto, esse método depende da oxidação seletiva de substâncias que possuem propriedades redutoras semelhantes, e que, quando presentes na amostra, contribuem para o conteúdo fenólico total aparente. Substâncias oxidáveis similares aos fenóis que podem ser interferentes: açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, ácidos orgânicos, proteínas, ferro (II), além de outros enedióis (131,132). Diante disto, buscou-se a caracterização estrutural dos compostos obtidos nos 15 ensaios por ESI(-)-Q-TOF MS para revelar a identidade dos compostos fenólicos bem como a presença de possíveis interferentes, e, assim, estabelecer a solução extratora ótima.

2.4.2 Avaliação dos extratos obtidos por ESI(-)-Q-TOF MS por PCA e HCA

Sabe-se que a castanha de caju possui ca. 70% de ácidos anacárdicos, sendo ácidos 6-alkilsalicílicos de cadeia carbônica de diferente extensão e números de insaturação, 18% de cardol, 5% de cardanol, dentre outras classes de fenóis e substâncias de menor polaridade (162). Desta forma, nas análises por ESI(-)-Q-TOF MS dos extratos obtidos nos 15 ensaios foram identificados nos diferentes espectros de massas (material suplementar): ácidos anacárdicos, cardóis e cardanóis, além de ácidos graxos e açúcares (Tabela 3). Os sinais atribuídos aos ácidos graxos foram mais intensos nos espectros dos extratos obtidos na presença de acetona, visto que esse solvente extrai comumente esses compostos (163), enquanto o etanol apresentou sinais mais intensos para os íons m/z 341, 343 e 345, referente aos ácidos anacárdicos tri, di e mono insaturados, respectivamente (164).

Tais compostos são substâncias predominantemente hidrofóbicas e relativamente apolares com baixa solubilidade relativa em água, porém de solubilidade ca. 10 mg/mL em solventes orgânicos, por exemplo, etanol (162). O etanol puro por ser relativamente menos polar que a água e o metanol, e por apresentar, também, capacidade de realizar ligações de hidrogênio, torna-se mais susceptível a interagir com compostos anfipáticos, aumentando sua eficiência de extração, visto que pode interagir por interações polares e apolares como ligação de hidrogênio e forças de dispersão de London, respectivamente (165,166).

Vale destacar a ausência de picos correspondentes a açúcares e ácidos graxos nos espectros de massas do extrato obtido com etanol anidro. Neste sentido, os resultados deste estudo são opostos aos do trabalho desenvolvido por Baümler, Carrín e Carelli (2017) (167). Os autores afirmam que o etanol puro apresenta baixa seletividade, extraíndo triglicerídeos, fosfatídeos, pigmentos e açúcares solúveis durante o processo de extração.

Tabela 5 – Compostos identificados nos espectros dos diferentes extratos de castanha de caju adquiridos empregando ESI(-)-Q-TOF MS.

Compostos	m/z experimental	Fórmula molecular	(m/z) Calculada	Erro (mDa)
Hexose polimérica	683,2349	C ₄₉ H ₃₂ O ₄	683,2222	41,1
Ácidos graxos				
(C16:0)	255,2297	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255,2323	-2,63
(C18:2)	279,1665	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279,2323	-65,83
(C18:1)	281,2496	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	281,2480	1,62
(C18:0)	283,2549	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283,2636	-8,73
(C19:0)	297,2204	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	297,2793	-58,88
(C20:0)	311,1680	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	311,2949	-126,93
(C21:0)	325,1834	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	325,3106	-127,18
(C22:0)	339,1990	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	339,3262	-127,23
Ácido anarcádico (C15:0)		C ₂₂ H ₃₆ O ₃	347,2585	-1,955
Ácido anarcádico (C15:1)	345,2520	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	345,2429	-9,105
Ácido anarcádico (C15:2)	343,2335	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	343,2272	-6,255
Ácido anarcádico (C15:3)	341,2207	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	341,2116	-9,105
Ácido anarcádico (C16:0)	361,2382	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	361,2742	-35,995
Ácido anarcádico (C16:1)	359,2265	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	359,2585	-32,045
Ácido anarcádico (C16:2)	357,2077	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	357,2429	-35,195
Ácido anarcádico (C16:3)	355,2024	C ₂₄ H ₃₄ O ₃	355,2272	-24,845
Ácido anarcádico (C17:0)	375,2804	C ₂₁ H ₃₆ O	375,2898	-9,445
Ácido anarcádico (C17:1)	373,2741	C ₂₁ H ₃₄ O	373,2742	-0,095
Ácido anarcádico (C17:2)	371,2575	C ₂₁ H ₃₂ O	371,2585	-1,045
Ácido anarcádico (C17:3)	369,2428	C ₂₁ H ₃₀ O	369,2429	-0,095
Cardanol(C:15:0)	303,2621	C ₂₃ H ₃₈ O ₃	303,2687	-6,615
Cardanol(C:15:1)	301,2527	C ₂₃ H ₃₆ O ₃	301,2531	-0,365
Cardanol(C:15:2)	299,2380	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	299,2374	0,585
Cardanol(C:15:3)	297,2228	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	297,2218	1,035
Cardol (C:15:0)	319,2286	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	319,2636	-35,03
Cardol (C:15:1)	317,2215	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	317,2480	-26,48
Cardol (C:15:2)	315,2325	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	315,2324	0,11
Cardol (C:15:3)	313,2179	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	313,2167	1,22

$$\text{Erro}=(m_{\text{exp}} - m_{\text{calc}})*1000$$

Em comparação ao extrato com etanol anidro, observa-se na mistura ternária de metanol, etanol e acetona também um intenso sinal m/z 341 bem como outros de intensidade relativa para compostos interferentes, por exemplo, açúcares m/z 683 e 503 (168). Os açúcares participam da biossíntese fenólica, uma vez que as enzimas glicosiltransferases (GT) catalisam a transferência de uma parcela de açúcares, como glicose, galactose e arabinose de nucleotídeos para compostos fenólicos, causando alterações em suas propriedades químicas, como maior solubilidade em água e maior estabilidade (168). Diversas moléculas fenólicas podem ser glicosiladas por GTs que possuem em seus substratos ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides com ésteres de ácidos cinâmicos como produtos principais. Monohexósidos de miricetina como 3-O-galactosido e 3-O-glucosido e quercetina 3-O-galactosido são os principais flavonóis presentes na pele e polpa da castanha de caju (168,169).

As Figuras 14 e 15 mostram os gráficos de componentes principais de escores e pesos e o dendrograma de HCA, respectivamente, obtido após processamento dos espectros de cada ensaio.

Figura 14 – Gráfico de PC1 vs PC2 para (A) escore, contendo as amostras, e (B) pesos, mostrando a influência das variáveis.

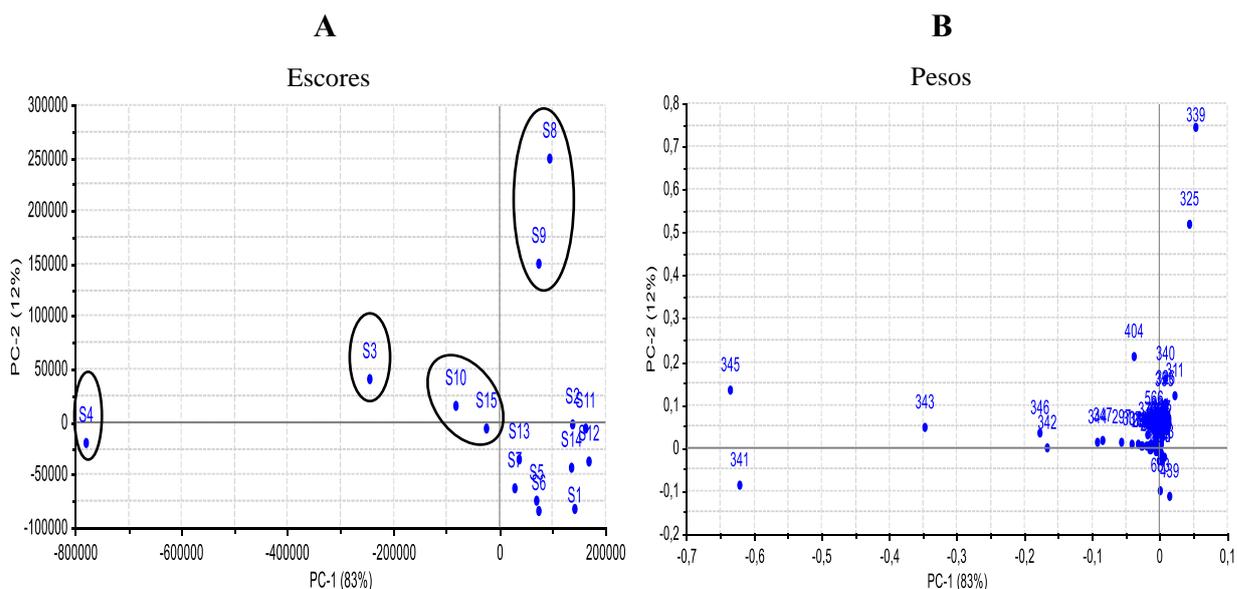
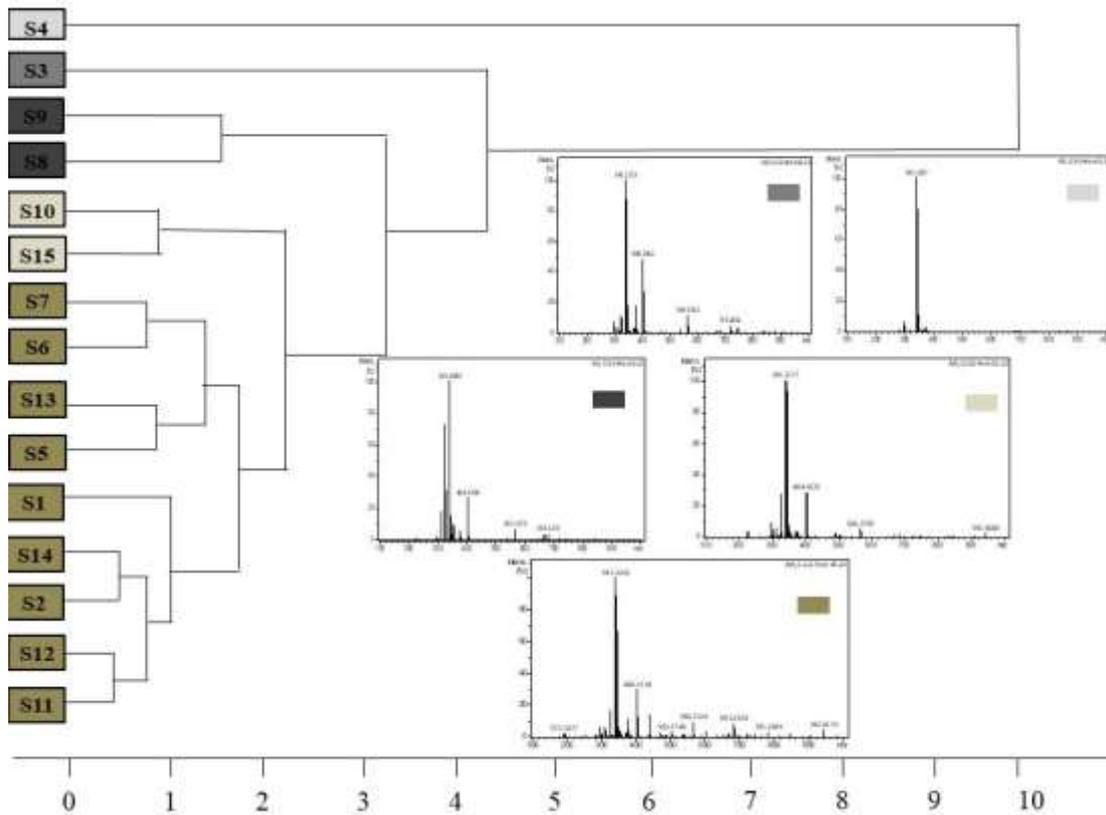


Figura 15 – Dendrograma de HCA obtidos com os dados centrados na média.



Duas componentes principais, PC1 e PC2, representam a nova dimensionalidade para os dados dos 15 extratos obtidos. Essas descrevem ca. 95% da variância, sendo PC1 (83%) e PC2 (12%) (Figura 9. A). Observando-se a Figura 9, o extrato do ensaio com etanol puro (S4) mostra-se bastante dissimilar em relação aos demais devido a elevada intensidade dos sinais m/z 341 e 345. S8 e S9 mostram-se similares e apresentam escores positivos em PC2 devido ao elevado sinal para m/z 325 e 339 dos ácidos graxo. Embora o extrato da mistura ternária de acetona:metanol:etanol (S14) tenha apresentado elevada resposta, sua composição é similar a maioria dos extratos, estando nos escores positivos em PC1 devido apresentar sinal intenso para os íons m/z 325 e 339 dos ácidos graxos, que possuem pesos positivos para tal componente. Também pode ser observado pela análise de PCA, a similaridade entre os ensaios S3, S10 e S15, correlacionada aos sinais m/z de 343, 342 e 346 detectados nos espectros dos extratos. Então, a classificação realizada com a aplicação de PCA com os espectros de massas dos

diferentes extratos permite inferir que o etanol puro (S4) consiste na condição de maior seletividade e eficiência para a extração de compostos fenólicos.

Todas as similaridades identificadas entre os ensaios no subespaço gerado pela PCA também foram visualizadas pela HCA. A variação da composição química das amostras é evidenciada pela separação de grupos no HCA (Figura 15), com grau de similaridade de 80% (distância Euclidiana = 2) é possível perceber a formação de 5 grupos relativos aos diferentes perfis de ESI(-)-Q-TOF MS. O primeiro é formado pelo ensaio S4; o segundo por S3; o terceiro por S8 e S9; o quarto por S10 e S15 e o quinto pelas demais amostras S1, S2, S5, S6, S7, S11, S12, S13 e S14.

Portanto, os resultados deste estudo mostram que o etanol puro é a condição ótima, possibilitando a extração preferencial de compostos fenólicos na castanha de caju, além de ser considerado um biosolvente reutilizável e de baixo custo (170). Sendo assim, este resultado obtido está relacionado a polaridade intermediária do etanol que possibilita extensa interação com diferentes fenóis ocorrendo a solvatação dos compostos.

2.4.3 Efeito do processamento no CFT e na composição química das castanhas

Definida a condição ótima para extração de compostos fenólicos em castanhas de caju, aplicou-se etanol puro para extração destes constituintes para as demais amostras. John e Shahidi (2010) (48), avaliaram o solvente (acetona, metanol e etanol) mais adequado para extração de compostos fenólicos em castanhas do Pará e concluíram que acetona apresentou a maior recuperação da ordem de 15,60 enquanto que etanol e metanol apresentaram, respectivamente, 14,56 e 12,44 (48). Dessa forma, pode-se afirmar que etanol apresentou boa recuperação sendo adequado para extração destes compostos. Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Influência do processamento no teor de fenóis.

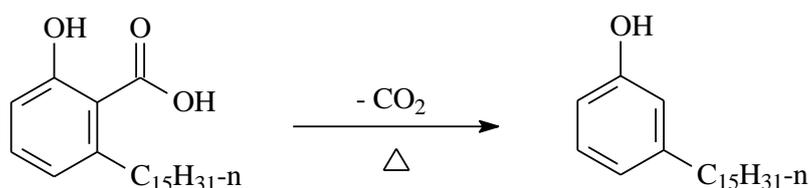
Amostras	<i>In natura</i> (mg de AG g ⁻¹)	Processada (mg de AG g ⁻¹)	Ultraprocessada (mg de AG g ⁻¹)
Castanha de caju	9,95 ± 0,75	9,56 ± 0,21	8,00 ± 0,21

Castanha-do-pará	11,23 ± 0,80	10,14 ± 0,07	2,33 ± 0,17
Castanha de Baru	9,82 ± 0,03	7,50 ± 0,08	2,80 ± 0,25

A partir da Tabela 6 pode-se concluir que o processamento interferiu significativamente no conteúdo fenólico total. Para todas as amostras de castanhas o estágio ultraprocessado foi o que apresentou menores teores de fenóis, seguido pelo processado e *in natura*. Um teste Tukey, a 95% de confiança, mostrou que as amostras *in natura* apresentaram teores de fenóis significativamente iguais, enquanto para as processadas a castanha-do-pará foi significativamente diferente da castanha de baru sendo levemente superior e quanto as ultraprocessadas a castanha de caju difere das demais sendo 3,43 e 2,85 vezes superior à castanha do Pará e de baru, respectivamente. Os resultados mostraram que as castanhas são fontes ricas em compostos fenólicos.

Em relação a composição química das amostras verificou-se que o efeito do processamento não foi suficiente para alterar a natureza química de seus componentes. A exemplo disso, o ácido anacárdico sob aquecimento pode sofrer decomposição térmica produzindo cardanol que são seus derivados descarboxilados (171). Pode-se analisar este fato para as amostras de barras de cereais que em geral são produzidas sob aquecimento brando (172–174), no entanto, o perfil para barra de caju (BC) não foi alterado como pode-se observar na Figura 18. As amostras de castanhas de caju apresentaram picos característicos de ácido anacárdico (m/z 341, 343, 345 e 347)(175), sendo que no seu estágio ultraprocessado apresentou também picos característicos de ácido graxos representados pelos picos (m/z 325 e 339).

Reação 1: Descarboxilação do ácido anacárdico



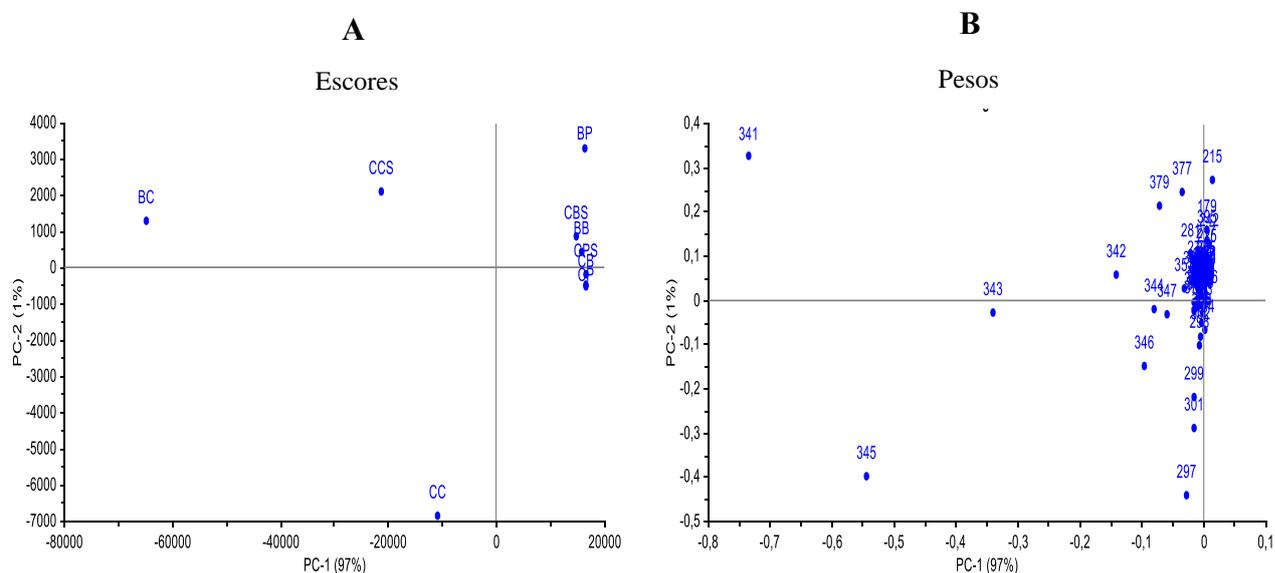
Para as castanhas do-pará a natureza dos compostos fenólicos foi mais variada comparada as amostras de caju, onde identificaram-se ácidos fenólicos simples, flavonoides, além de ácidos graxo. O processamento influenciou na

composição química dessas, onde a ultraprocessada revelou-se mais diversificada que a processada, possivelmente por essa amostra conter diversos ingredientes como mel, flocos de milho e de arroz, uva passa, dentre outros. As amostras revelaram picos característicos de ácido cafeico (m/z 179), derivado de ácido cafeico (m/z 247), apigenina (m/z 269), quercetina e ácido elágico (m/z 301), miricetina-3-O-raminosídea (m/z 463), além de ácidos graxos (m/z 311, 325, 339 e 353) (48,176,177).

As castanhas de baru apresentaram em sua composição química ácido elágico (m/z 301), ácido cafeico (m/z 179), galato de etila (m/z 197) ácido gálico (m/z 169) corroborando com os resultados encontrados por Lemos e colaboradores (2012) (60). Além disso, estas castanhas são constituídas de picos característicos de ácidos graxos (m/z 255, 279, 281, 283, 297 311, 325, 339) e isso pode estar relacionado ao elevado teores de lipídeos contidos nas castanhas e barras de cereais da ordem de 40,98 g/100g e 10,77 g/100g respectivamente, além do que Tekamoto e colaboradores relataram a quantificação desses ácidos graxos nas castanhas de baru (55).

Duas componentes principais PC1 e PC2 caracterizaram a composição fenólica dos extratos obtidos para as castanhas *in natura* (CC, CP, CB), processadas (CCS, CPS, CBS) e ultraprocessadas (BC, BP e BB). Estas descrevem ca. 98% da variância, sendo PC1 (97%) e PC2 (1%) (Figura 16). Observando a Figura 16 pode-se notar que a castanha de caju mostrou-se bastante dissimilar das demais amostras apresentando em sua composição química majoritariamente ácido anacárdico representado principalmente pelos íons m/z 341, 343 e 345 (Figura 18). As castanhas do-pará e de baru apresentaram composição química similar como pode ser confirmado nos espectros de massas dispostos nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Em relação ao processamento verificou-se que as amostras ultraprocessadas (BC e BP) de castanhas de caju e do-pará revelaram-se dissimilares das suas formas *in natura* e processadas. A castanha de baru isso não foi observado, possivelmente por sua forma *in natura* conter elevado teor de castanhas de baru (10% - Anexo III).

Figura 16 – Gráfico de PC1 vs PC2 para (A) escore, contendo as amostras de castanhas, e (B) pesos, mostrando a influência das variáveis.



As similaridades identificadas entre as castanhas nos diferentes níveis de processamento no subespaço gerado pela PCA também foram observadas na HCA. A variação da composição química das amostras é evidenciada pela separação de grupos no HCA (Figura 17), com grau de similaridade de 70% (distância Euclidiana = 3) é possível perceber a formação de 3 grupos relativos aos diferentes perfis obtidos por ESI(-)-Q-TOF MS. O primeiro identificado pela amostra BC; o segundo por CC e CCS e o terceiro por CP, CPS, CP, CB, CBS e BB.

Figura 17 – Dendrograma de HCA obtido para as amostras de castanhas nos diferentes níveis de processamento.

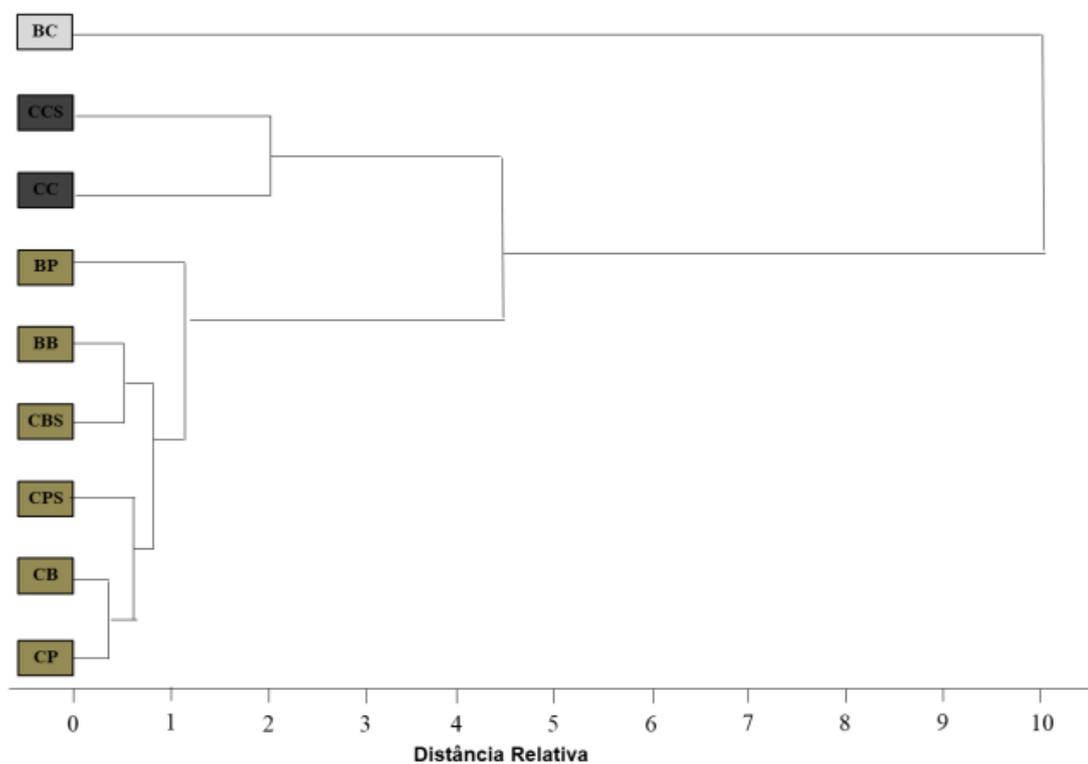


Figura 18 – Perfis obtidos para amostras de castanhas de caju *in natura* (CC), processadas (CCS) e ultraprocessadas (BC).

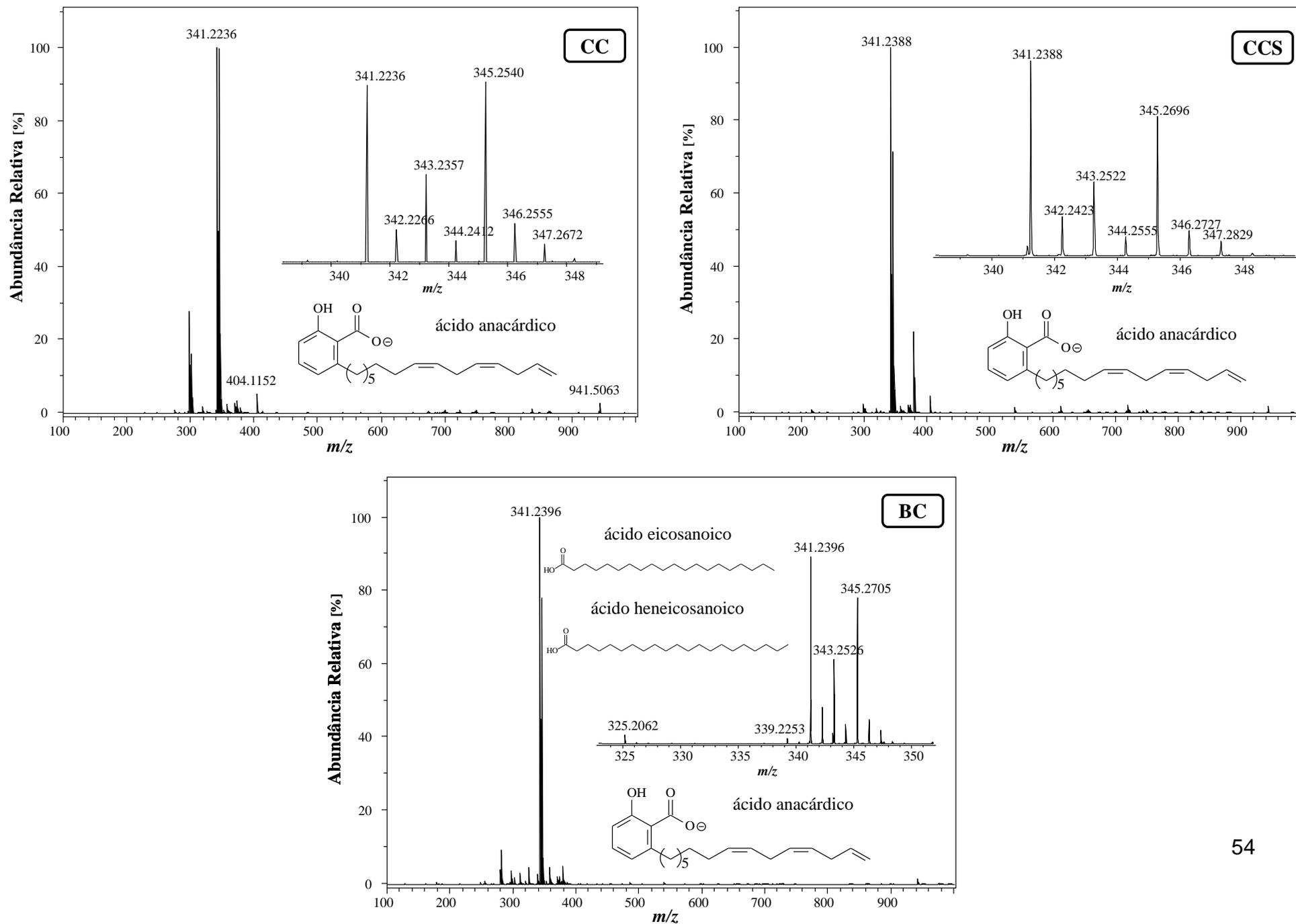


Figura 19 – Perfis obtidos para amostras de castanhas do-pará *in natura* (CP), processadas (CPS) e ultraprocessadas (BP).

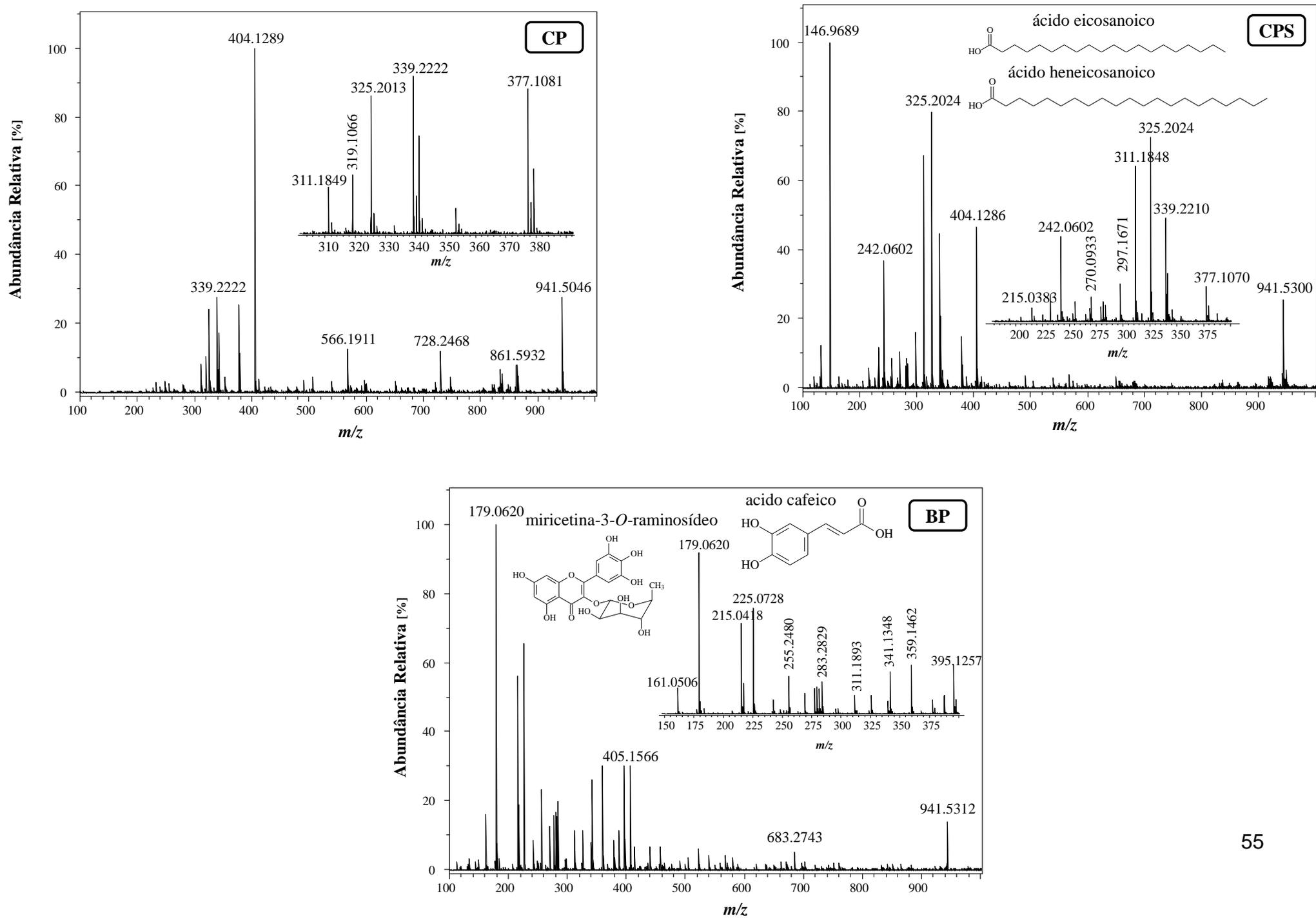
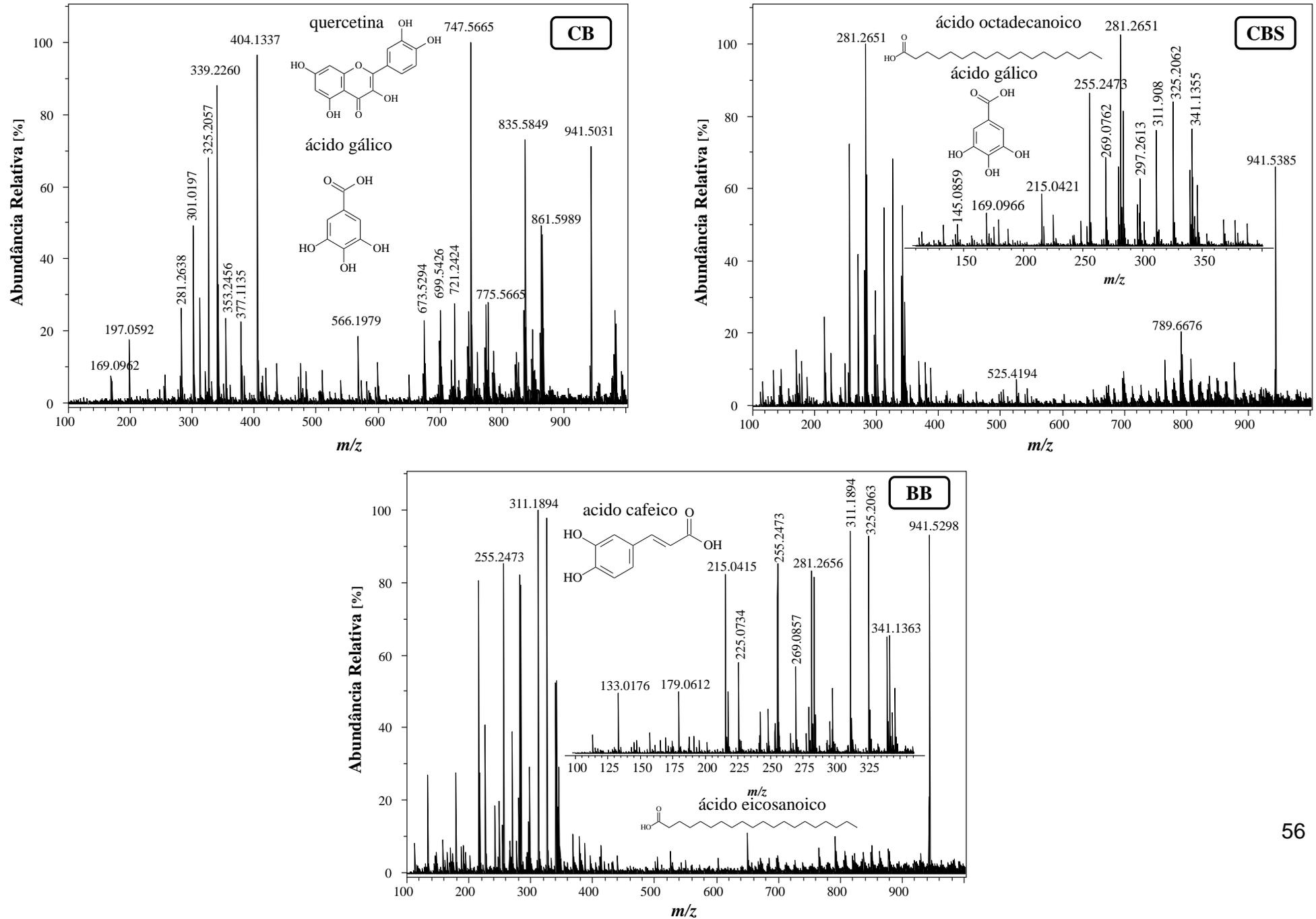


Figura 20 – Perfis obtidos para amostras de castanhas de baru *in natura* (CB), processadas (CBS) e ultraprocessadas (BB).



2.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O objetivo deste capítulo foi alcançado satisfatoriamente, por trazer novas informações referentes à extratabilidade de compostos fenólicos utilizando planejamento centroidal e a metodologia superfície resposta aliado a análise por ESI(-)-Q-TOF MS combinado a análises de componentes principais (PCA) e agrupamento hierárquico (HCA).

O modelo cúbico especial não apresentou falta de ajuste e descreveu melhor a variância dos dados, apresentando uma variação máxima explicada de 89,2%. A mistura binária de água:etanol e ternária de água:acetona:metanol apresentaram efeito antagônico, enquanto que acetona:metanol e acetona:metanol:etanol apresentaram efeito sinérgico. O etanol puro e a mistura ternária de acetona, metanol e etanol forneceram as maiores respostas para o conteúdo fenólico total. No entanto, as análises dos extratos por ESI(-)-Q-TOF MS mostraram que a mistura ternária tem uma extractabilidade abrangente, sendo detectados sinais associados a açúcares (m/z 683 e 503) que podem ter fornecido um conteúdo fenólico total (CFT) aparentemente pela falta de especificidade do método do Folin-Ciocalteu. As análises quimiométricas de PCA e HCA revelaram que etanol puro apresenta-se bastante dissimilar das demais amostras por extrair preferencialmente os ácidos fenólicos simples identificados pelos picos m/z 341, 343 e 345. Portanto, este estudo mostrou que a condição ótima de extração de compostos fenólicos de castanha de caju consiste no uso de etanol como solvente extrator.

Ao aplicar a metodologia de extração dos compostos fenólicos para as demais castanhas nos diferentes níveis de processamento observou-se que a castanha-do-pará foi a que apresentou maior CFT, enquanto que o encontrado na castanha de baru foi o menor. Em relação ao processamento, o estágio que apresentou menor teor de fenóis foi o ultraprocessado, seguido pelo processado e *in natura*, indicando que o consumo da forma *in natura* é mais desejável para maior absorção desses compostos pelo organismo. O efeito do processamento na composição química das amostras foi confirmado pela análise exploratória realizada. A castanha de caju apresentou-se bastante dissimilar das demais amostras, sendo que sua forma ultraprocessada apresenta-se bastante dissimilar da suas formas *in natura* e processada. As castanhas do-pará e de baru revelaram-se similares

extraindo flavonoides como apigenina (m/z 269), quercetina e ácido elágico (m/z 301) e miricetina-3-O-raminosídea (m/z 463) , ácidos fenólicos como ácido cafeíco (m/z 179) e ácido gálico (m/z 169) e ácidos graxos (m/z 255, 279, 281, 283, 297 311, 325, 339).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os objetivos deste projeto foram satisfatoriamente alcançados. Os resultados revelam novas informações sobre a extração de compostos fenólicos em castanhas, bem como o efeito do processamento na concentração e solubilidade de proteínas. A estratégia de utilizar planejamento centroide simplex combinado a análise por ESI(-)-Q-TOF MS aliada as técnicas quimiométricas PCA e HCA foi eficiente para obter uma solução de extração ótima, sendo esta condição alcançada com etanol puro. Nesse meio, os extratos apresentaram maior concentração e composição representativa dos compostos fenólicos da castanha de caju, consequências desejáveis para um processo de extração ideal. Comparativamente o processamento influenciou no conteúdo fenólico total (CFT) de forma que o estágio ultraprocessado revelou menores teores que o processado e *in natura*, porém não interferiu na natureza química desses. Entre as castanhas a do-pará apresentou maiores teores de fenóis revelando-se como uma boa fonte desses compostos. A análise exploratória por PCA e HCA dos perfis obtidos por ESI(-)-Q-TOF MS revelou que a castanha de caju é constituída principalmente de ácido anacárdico (m/z 341, 343 e 345) e apresentou-se bastante dissimilar das castanhas do-pará e de baru, que possuem em sua composição flavonoides como apigenina (m/z 269), quercetina e ácido elágico (m/z 301) e miricetina-3-O-raminosídea (m/z 463), ácidos fenólicos como ácido cafeico (m/z 179) e ácido gálico (m/z 169) e ácidos graxos (m/z 255, 279, 281, 283, 297 311, 325, 339).

Quanto ao teor de proteínas solúveis, o processamento do alimento interferiu significativamente nessa propriedade nutricional. A castanha de caju e do do-pará no estágio ultraprocessado apresentaram teores de proteína ca. 5 e 20 vezes menor ao da *in natura*. Sobre a solubilidade proteica, as amostras apresentaram menores valores em pH ácido na faixa de 3 a 5 devido esses estarem próximos ao pIs das proteínas de sua composição. Para castanha de caju, a solubilidade mínima foi obtida em pH 3,0 e para a do-pará foi em pH 4,0. A solubilidade proteica aumenta para valores de pH > 5,0, sendo máxima em meio alcalino de pH entre 10 e 12.

Como atividade futura pode-se avaliar quantitativamente a polaridade dos solventes puros e das misturas binárias, ternárias e quaternária frente a um soluto solvatocrômico, com o intuito de compreender os possíveis fatores que

condicionaram o etanol como melhor solvente para extração de compostos fenólicos. Além disso, pode-se estudar o efeito da solubilidade na digestibilidade de proteínas e peptídeos. De forma a ampliar e obter novas informações para caracterização nutricional de amostras de castanhas.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira**. Brasília: Editora MS, 2014.
- 2 STEFANO, V. D. et al. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 74–85, 2012.
- 3 FUENTEALBA, C. et al. Colour and in vitro quality attributes of walnuts from different growing conditions correlate with key precursors of primary and secondary metabolism. **Food Chemistry**, v. 232, p. 664–672, 2017.
- 4 KAFAOGLU, B. et al. Determination and evaluation of element bioaccessibility in some nuts and seeds by in-vitro gastro-intestinal method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 45, p. 58–65, 2016.
- 5 MOREDA-PIÑEIRO, J. et al. Bioavailability assessment of essential and toxic metals in edible nuts and seeds. **Food Chemistry**, v. 205, p. 146–154, 2016.
- 6 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases**. 30. 2002.
- 7 HU, J. et al. Rapid evaluation of the quality of chestnuts using near-infrared reflectance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 231, p. 141–147, 2017.
- 8 FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 269–279, 2010.
- 9 CABALLERO, B. **Encyclopedia of human nutrition**. 3. ed. USA: Academic Press, 2012.
- 10 CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 113–132, 2016.
- 11 TAHERGORABI, R., HOSSEINI, S. V. Proteins, Peptides, and Amino Acids. In: **Nutraceutical and Functional Food Components**. EUA: Academic Press, 2017.

- 12 CHAIDEZ-LAGUNA, L. D. et al. Corn proteins solubility changes during extrusion and traditional nixtamalization for tortilla processing: A study using size exclusion chromatography. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 351–357, 2016.
- 13 DAMODARAN, S.; AGYARE, K. K. Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 12–18, 2013.
- 14 KHALID, E. K.; BABIKER, E. E.; ELTINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of wheat bran proteins as influenced by pH and/or salt concentration. **Food Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 361-366, 2003.
- 15 PAGNO, C. H. et al. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentação nutricional**, v. 20, p. 231–239, 2009.
- 16 RAGAB, D. D. M.; BABIKER, E. E.; ELTINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 207–212, 2004.
- 17 WU, H. et al. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. **Food Research International**, v. 42, n. 3, p. 343–348, 2009.
- 18 MUNEKATA, P. E. S. et al. Characterization of phenolic composition in chestnut leaves and beer residue by LC-DAD-ESI-MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 52–58, 2016.
- 19 CHANG, S. K. et al. Nuts and their co-products: The impact of processing (roasting) on phenolics, bioavailability, and health benefits - A comprehensive review. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 88–122, 2016.
- 20 FERREIRA, I. C. F. R.; MARTINS, N.; BARROS, L. Phenolic Compounds and Its Bioavailability: In Vitro Bioactive Compounds or Health Promoters? In: **Advances in Food and Nutrition Research**. V, 82, p. 1–44, 2017.
- 21 CHEN, M. et al. The antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (*Beta vulgaris*) molasses polyphenols against selected food-borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 354–360, 2017.

- 22 LIANG, J. et al. Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review. **Food hydrocolloids**, v. 69, p. 286–292, 2017.
- 23 PULIGUNDLA, P. et al. Nanotechnological approaches to enhance the bioavailability and therapeutic efficacy of green tea polyphenols. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 139–151, 2017.
- 24 MARTINI, D. et al. Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 48, p. 1–8, 2017.
- 25 KARAS, D.; ULRICHOVÁ, J.; VALENTOVÁ, K. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 223–240, 2017.
- 26 MEXIS, S. F.; KONTOMINAS, M. G. Effect of γ -irradiation on the physicochemical and sensory properties of cashew nuts (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1501–1507, 2009.
- 27 LIMA, A. C. S. et al. In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 161, p. 142–147, 2014.
- 28 ENCARNAÇÃO, S. et al. Total phenolic content, antioxidant activity and pre-clinical safety evaluation of an *Anacardium occidentale* stem bark Portuguese hypoglycemic traditional herbal preparation. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 171–178, 2016.
- 29 DIONÍSIO, A. P. et al. Cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) functional beverage improve the diabetic state in rats. **Food Research International**, v. 77, p. 171–176, 2015.
- 30 MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D. Óleo da castanha de caju: Oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 732–741, 2009.
- 31 OGUNWOLU, S. O. et al. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. **Food Chemistry**, v.

115, n. 3, p. 852–858, 2009.

32 TROX, J. et al. Catechin and epicatechin in testa and their association with bioactive compounds in kernels of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 1094–1099, 2011.

33 KONAN, N. A. et al. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 30–38, 2007.

34 KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 237–242, 2007.

35 MICHODJEHOUN-MESTRES, L. et al. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 851–857, 2009.

36 FREIRE, F. C. O. et al. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, v. 21, n. 6, p. 489–494, 2002.

37 LIMA, J. R.; BORGES, M. D. F. Armazenamento de amêndoas de castanha de caju: influência da embalagem e da salga. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 104–109, 2004.

38 MOTA, M. **O cajueiro nordestino**. 4. ed. Recife: Companhia Editora de Pernambuco, 2011.

39 BAQUIÃO, A. C. et al. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chemistry**, v. 139, n. 4, p. 1127–1132, 2013.

40 WADT, L. H. O.; KAINER, K. A.; GOMES-SILVA, D. A. P. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 211, n. 3, p. 371–384, 2005.

41 DE LA CRUZ, S. et al. TaqMan real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in food products. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 105–113, 2013.

42 JAYASINGHE, S. B.; CARUSO, J. A. Investigation of Se-containing proteins in *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Brazil nuts) by ICPMS, MALDI-MS and LC-ESI-MS

methods. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 307, n. 3, p. 16–27, 2011.

43 PAREKH, P. P. et al. Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 332–335, 2008.

44 FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1434–1440, 2011.

45 MYERS, G. P.; NEWTON, A. C.; MELGAREJO, O. The influence of canopy gap size on natural regeneration of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in Bolivia. **Forest Ecology and Management**, v. 127, n. 3, p. 119–128, 2000.

46 RIBEIRO, M. B. N. et al. Brazil nut stock and harvesting at different spatial scales in southeastern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 319, p. 67–74, 2014.

47 SCOLES, R.; GRIBEL, R. The regeneration of Brazil nut trees in relation to nut harvest intensity in the Trombetas River valley of Northern Amazonia, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 265, p. 71–81, 2012.

48 JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 196–209, 2010.

49 YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573–1580, 2009.

50 DUMONT, E. et al. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 684–692, 2006.

51 SANTOS, P. et al. Supercritical CO₂ extraction of cumbaru oil (*Dipteryx alata* Vogel) assisted by ultrasound: Global yield, kinetics and fatty acid composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 75–83, 2016.

52 ROCHA, L. S.; CARDOSO SANTIAGO, R. A. Implicações nutricionais e sensoriais da polpa e casca de baru (*Dipterix Alata vog.*) na elaboração de pães. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 820–825, 2009.

- 53 VERA, R. et al. Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no cerrado do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 112–118, 2009.
- 54 FERREIRA, R. A. et al. Caracterização morfológica de fruto, semente, plântula e muda de *Dipteryx alata* Vogel - Baru (Leguminosae Papilionoideae). **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 73–87, 1998.
- 55 LIMA, J. C. R. et al. Qualidade microbiológica, aceitabilidade e valor nutricional de barras de cereais formuladas com polpa e amêndoa de baru. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 331–343, 2010.
- 56 TAKEMOTO, E. et al. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 113–117, 2001.
- 57 ARAKAKI, A. H. et al. O baru (*Dipteryx alata* Vog.) como alternativa de sustentabilidade em área de fragmento florestal do Cerrado, no Mato Grosso do Sul. **Interações**, v. 10, n. 1, p. 31–39, 2009.
- 58 MAGALHÃES, R. M. A Cadeia Produtiva da Amêndoa do Baru (*Dipteryx alata* Vog.) no Cerrado: uma análise da sustentabilidade da sua exploração. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 3, p. 665–676, 2014.
- 59 SIQUEIRA, E. M. de A. et al. Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 427–433, 2012.
- 60 LEMOS, M. R. B. et al. The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts [*Dipteryx alata* Vog.]. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 592–597, 2012.
- 61 MARQUES, F. G. et al. Identification of terpenes and phytosterols in *Dipteryx alata* (baru) oil seeds obtained through pressing. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 5, p. 522–525, 2015.
- 62 PINELI, L. et al. Tracing chemical and sensory characteristics of baru oil during storage under nitrogen. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 976–982, 2015.

63 BARCELOS, G. T.; RAUBER, F.; VITOLO, M. R. Produtos processados e ultraprocessados e ingestão de nutrientes em crianças. **Ciência & Saúde**, v. 7, n. 3, p. 155-161, 2014.

64 GOMES, F. da S.; CASTRO, I. R. R.; MONTEIRO, C. A. Publicidade de alimentos no Brasil: avanços e desafios. **Alimento/Artigos**, v. 62, n. 4, p. 48–51, 2010.

65 LEITE, F. H. M. et al. Availability of processed foods in the perimeter of public schools in urban areas. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 4, p. 328–334, 2012.

66 LOUZADA, M. L. da C. et al. Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Revista de Saude Pública**, v. 49, p. 1–11, 2015.

67 MARTINS, A. P. B. et al. Increased contribution of ultra-processed food products in the Brazilian diet (1987-2009). **Revista de Saude Pública**, v. 47, n. 4, p. 656–665, 2013.

68 MONTEIRO, C. A.; DE CASTRO, I. R. R. Por que é necessário regulamentar a publicidade de alimentos. **Artigos e Ensaios**, v. 61, n. 4, p. 56–59, 2009.

69 SPARRENBERGER, K. et al. Ultra-processed food consumption in children from a Basic Health Unit. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 6, p. 535–542, 2015.

70 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

71 VOET, D. **Fundamentos de Bioquímica: a Vida em Nível Molecular**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

72 O’SULLIVAN, J. J. et al. Investigation of the fabrication and subsequent emulsifying capacity of potato protein isolate/k-carrageenan electrostatic complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p. 282–289, 2017.

73 FERREYRA, J. C. et al. Propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas de harina de cacahuete (*Arachis hypogaea* Lineau). **Grasas Y Aceites**, v. 58, n. 3, p. 264–269, 2007.

74 FERREYRA, J. C. et al. Propiedades emulsificantes y espumantes de las

proteínas de harina de cacahuete (*Arachis hypogaea* Lineau). **Grasas Y Aceites**, v. 58, n. 3, p. 264–269, 2007.

75 PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 77–80, 2005.

76 ISLAM, M. M.; KHAN, M. A.; KURODA, Y. Analysis of amino acid contributions to protein solubility using short peptide tags fused to a simplified BPTI variant. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 10, p. 1144–1150, 2012.

77 KRAMER, R. M. et al. Toward a molecular understanding of protein solubility: Increased negative surface charge correlates with increased solubility. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 8, p. 1907–1915, 2012.

78 XIAOHUI, N. et al. Predicting the protein solubility by integrating chaos games representation and entropy in information theory. **Expert Systems with Applications**, v. 41, p. 1672–1679, 2014.

79 ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino**. Barueri: Manole, 2003.

80 DUARTE, Â. J. et al. Propriedades emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: 1. Efeito do pH e do tempo de hidrólise. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 303–308, 1998.

81 TREVINO, S. R.; SCHOLTZ, J. M.; PACE, C. N. Amino Acid Contribution to Protein Solubility: Asp, Glu, and Ser Contribute more Favorably than the other Hydrophilic Amino Acids in RNase Sa. **Journal of Molecular Biology**, v. 366, n. 2, p. 449–460, 2007.

82 FRANCO, L. F. M.; PESSÔA FILHO, P. de A. On the solubility of proteins as a function of pH: Mathematical development and application. **Fluid Phase Equilibria**, v. 306, n. 2, p. 242–250, 2011.

83 BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 2004.

84 HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

- 85 MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 2007.
- 86 MURATE, E. H.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Propriedades funcionais de concentrado protéico extrusado de sementes de girassol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, p. 213–222, 1999.
- 87 HERHUT, M.; BRANDENBUSCH, C.; SADOWSKI G. Modeling and prediction of protein solubility using the second osmotic virial coefficient. **Fluid Phase Equilibria**, v. 422, p. 32–42, 2016.
- 88 CARLSSON, N. et al. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. **Analytical Biochemistry**, v. 411, n. 1, p. 116–121, 2011.
- 89 GLYK, A. et al. Comparison of colorimetric methods for the quantification of model proteins in aqueous two-phase systems. **Analytical Biochemistry**, v. 477, p. 35–37, 2015.
- 90 GOLUNSKI, S. M. et al. Interference of salts used on aqueous two-phase systems on the quantification of total proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 30–33, 2016.
- 91 NICOLÁS, P.; LASSALLE, V. L.; FERREIRA, M. L. Quantification of immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) using ICP-AES combined with Bradford method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 97, p. 97–103, 2017.
- 92 REDMILE-GORDON, M. A. et al. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 67, p. 166–173, 2013.
- 93 ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.
- 94 KU, H. K. et al. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models. **Analytical Biochemistry**, v. 434, n. 1, p. 178–180, 2013.

- 95 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- 96 MIWA, A. C. P.; FALCO, P. B. de; CALIJURI, M. C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 236–242, 2008.
- 97 WANG, L. et al. Prediction of peanut protein solubility based on the evaluation model established by supervised principal component regression. **Food Chemistry**, v. 218, p. 553–560, 2017.
- 98 YULIANA, M. et al. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 621–626, 2014.
- 99 NEVES, V. A. et al. Características da solubilidade protéica e isolamento da globulina principal de caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivar BR 14-mulato. **Alim. Nutr.**, v. 14, n. 1, p. 47–55, 2003.
- 100 MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61–66, 2009.
- 101 LAWAL, O. S. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: Effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 345–355, 2004.
- 102 CAVALCANTI, M. T.; BORA, P. S.; CARVAJAL, J. C. L. Propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) com e sem espinhos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 597–602, 2009.
- 103 SILVA, B. L. A. et al. Propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da munguba (*Pachira aquatica* Aubl.). **Rev. Bras. Frutic**, v. 37, n. 1, p. 193–200, 2015.
- 104 BUČKO, S. et al. Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 271–278, 2016.

- 105 MELO, M. L. P. et al. Caracterização físico-química da amêndoa da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) crua e tostada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 184–187, 1998.
- 106 GHUMMAN, A.; KAUR, A.; SINGH, N. Functionality and digestibility of albumins and globulins from lentil and horse gram and their effect on starch rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 843–850, 2016.
- 107 SATHE, S. K. et al., Biochemical characterization and *in vitro* digestibility of the major globulin in cashew nut (*Anacardium occidentale*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 2854–2860, 1997.
- 108 GUINÉ, R. P. F. et al. Artificial neural network modelling of the antioxidant activity and phenolic compounds of bananas submitted to different drying treatments. **Food Chemistry**, v. 168, p. 454–459, 2015.
- 109 SILVA, M. L. C. et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.
- 110 ZARDO, D. M. et al. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em fermentados de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 829–838, 2008.
- 111 ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 2016.
- 112 ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- 113 ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.
- 114 Sousa, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.
- 115 AIRES, A.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols,

- tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. **Waste Management**, v. 48, p. 457–464, 2016.
- 116 ARROYO-MAYA, I. J. et al. Characterization of flavonoid-protein interactions using fluorescence spectroscopy: Binding of pelargonidin to dairy proteins. **Food Chemistry**, v. 213, p. 431–439, 2016.
- 117 HE, L. L. et al. Studies on the interaction between promethazine and human serum albumin in the presence of flavonoids by spectroscopic and molecular modeling techniques. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 820–829, 2016.
- 118 IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, 2011.
- 119 ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.
- 120 CHUN, S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809–816, 2005.
- 121 DA SILVA, C. E. de L. et al. Avaliação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em extrato metanólico obtido de folhas da *Commiphora Myrrha*. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 1, p. 117–124, 2013.
- 122 SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.
- 123 ALU'DATT, M. H. et al. Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 93–99, 2013.
- 124 CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.
- 125 VÁZQUEZ, C. V. et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. **Food Chemistry**, v. 176, p. 480–486, 2015.

- 126 NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.
- 127 ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **The Analyst**, v. 125, n. 5, p. 989–1009, 2000.
- 128 GOLI, A. H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 521–525, 2005.
- 129 GRANATO, D. et al. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 266–279, 2016.
- 130 PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidioscolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 20, p. 2310–2316, 2011.
- 131 CHEN, L. Y.; CHENG, C. W.; LIANG, J. Y. Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. **Food Chemistry**, v. 170, p. 10–15, 2015.
- 132 ROVER, M. R.; BROWN, R. C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, p. 366–371, 2013.
- 133 MONÇÃO, N. B. N. et al. Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpiniiifolia* stem bark: Possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of *M. caesalpiniiifolia* on human tumour cell lines. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4204–4224, 2015.
- 134 COSTA, L. M.; KORN, M. G. A.; CASTRO, J. T. Planejamento fatorial aplicado à digestão de amostras de feijão assistida por radiação microondas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 149–152, 2006.
- 135 PEREIRA, A. C.; KUBOTA, L. T. Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 725–729, 2004.

- 136 CUNICO, M. W. M. et al. Factorial Desing: a Valuable Statistic Tool To Define Experimental Parameters Applied in Scientific Research. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 2008.
- 137 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2001.
- 138 COSCIONE, A. R.; ANDRADE, J. C.; MAY, M. G. O modelamento estatístico de misturas: Experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. **Quimica Nova**, v. 28, n. 6, p. 1116–1122, 2005.
- 139 QUIRANTES-PINÉ, R. et al. HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 3, p. 213–223, 2013.
- 140 WYSOCKI, V. H. et al. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Methods**, v. 35, n. 3, p. 211–222, 2005.
- 141 LIU, Q. et al. Chemical profiling of San-Huang decoction by UPLC–ESI-Q-TOF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 20–32, 2016.
- 142 ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC-ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 108–117, 2012.
- 143 FIGUEROA, J. G. et al. Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Research International**, v. 105, n. December 2017, p. 752–763, 2018.
- 144 ZHOU, Z. et al. The extraction efficiency enhancement of polyphenols from *Ulmus pumila* L. barks by trienzyme-assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 401–408, 2017.
- 145 WOJDYŁO, A. et al. Characterisation of (poly)phenolic constituents of two interspecific red hybrids of Rondo and Regent (*Vitis vinifera*) by LC–PDA–ESI-MS QTOF. **Food Chemistry**, v. 239, p. 94–101, 2018.

- 146 ZHU, J. et al. Chemical profiling and antioxidant evaluation of Yangxinshi Tablet by HPLC–ESI-Q-TOF-MS/MS combined with DPPH assay. **Journal of Chromatography B**, v. 1060, p. 262–271, 2017.
- 147 CONTINI, M. et al. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 659–669, 2008.
- 148 PEREIRA, M. P.; TAVANO, O. L. Use of Different Spices as Potential Natural Antioxidant Additives on Cooked Beans (*Phaseolus vulgaris*). Increase of DPPH Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 4, p. 337–343, 2014.
- 149 CAPRIOTTI, A. L. et al. Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 158, p. 392–400, 2014.
- 150 OLIVEIRA, I. et al. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1801–1807, 2008.
- 151 MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68–76, 2016.
- 152 MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2013.
- 153 SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.
- 154 YAZDANSHENAS, R.; GHARIB, F. Spectrophotometric determination of preferential solvation and solvation shell composition of morin hydrate in some water-aliphatic alcohol mixed solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 243, p. 414–419, 2017.
- 155 SANTIN, L. R. R. et al. Study between solvatochromism and steady-state and time-resolved fluorescence measurements of the Methylene blue in binary mixtures. **Dyes and Pigments**, v. 119, p. 12–21, 2015.

- 156 NADERI, F.; FARAJTABAR, A.; GHARIB, F. Solvatochromic and preferential solvation of fluorescein in some water-alcoholic mixed solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 190, p. 126–132, 2014.
- 157 NADERI, F.; FARAJTABAR, A. Solvatochromism of fluorescein in aqueous aprotic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 221, p. 102–107, 2016.
- 158 CERÓN-CARRASCO, J. P. et al. Solvent polarity scales: determination of new $E_T(30)$ values for 84 organic solvents. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 27, p. 512–518, 2014.
- 159 DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.
- 160 ALTIOK, E. et al. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 2, p. 342–348, 2008.
- 161 CHIANG, P. S. et al. Antioxidant phenolic compounds from *Pinus morrisconicola* using compressional-puffing pretreatment and water-ethanol extraction: Optimization of extraction parameters. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 7–14, 2017.
- 162 ČESLA, P. et al. Characterization of anacardic acids by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, n. 1–2, p. 253–259, 2006.
- 163 PEIKERT, J. M. et al. The Efficacy of Various Degreasing Agents Used in Trichloroacetic Acid Peels. **The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology**, v. 20, n. 11, p. 724–728, 1994.
- 164 TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188–197, 2006.
- 165 NILAVARASI, K.; KARTHA, T. R.; MADHURIMA, V. Evidence of anomalous behavior of intermolecular interactions at low concentration of methanol in ethanol-methanol binary system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 188, p. 301–310, 2018.

- 166 STONE, A. J. Physical Basis of Intermolecular Interactions. In: **Non-Covalent Interactions in Quantum Chemistry and Physics**. Cambridge: Elsevier Inc., 2017, p. 3–26.
- 167 BAÜMLER, E. R.; CARRÍN, M. E.; CARELLI, A. A. Diffusion of tocopherols, phospholipids and sugars during oil extraction from sunflower collets using ethanol as solvent. **Journal of Food Engineering**, v. 194, p. 1–8, 2017.
- 168 CUNHA, A. G. et al. UPLC-qTOF-MS/MS-based phenolic profile and their biosynthetic enzyme activity used to discriminate between cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) maturation stages. **Journal of Chromatography B**, v. 1051, p. 24–32, 2017.
- 169 MICHODJEHOUN-MESTRES, L.; AMRAOUI, W.; BRILLOUET, J. M. Isolation, Characterization, and Determination of 1-*O-trans*-Cinnamoyl- β -D-glucopyranose in the Epidermis and Flesh of Developing Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.) and Four of Its Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1377–1382, 2009.
- 170 KARVELA, E. et al. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. **Talanta**, v. 79, n. 5, p. 1311–1321, 2009.
- 171 FERREIRA, J. C.; TEIXEIRA, A.; ESTEVES, P. M. et al. A polyether glycol derived from cashew nutshell as a kinetic inhibitor for methane hydrate formation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 11–13, 2012.
- 172 GARCIA, M. C. et al. Application of roasted rice bran in cereal bars. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 718–724, 2012.
- 173 CARVALHO, V. S.; CONTI-SILVA, A. C. Cereal bars produced with banana peel flour: evaluation of acceptability and sensory profile. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 1, p. 134–139, 2018.
- 174 DAMASCENO, K. A. et al. Development of Cereal Bars Containing Pineapple Peel Flour (*Ananas comosus* L. Merrill). **Journal of Food Quality**, v. 39, n. 5, p. 417–424, 2016.
- 175 MATTISON, C. P. et al. Effects of industrial cashew nut processing on anacardic acid content and allergen recognition by IgE. **Food Chemistry**, v. 240, p.

370–376, 2018.

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

177 FALCÃO, S. I. et al. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 887–897, 2010.

ANEXOS

ANEXO I

Informações nutricionais da castanha de caju *in natura*, processada e ultraprocessada

Castanha de caju (*in natura*)

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Castanha de Caju Natural 200g

Ingredientes: Castanha de Cajú W1 240 selecionada. (Bom tamanho e paladar, experimente !!!)

Produto Natural, Rico em Ferro, Proteínas, Lipídios, Carboidratos e Fósforo.

Ajuda a reduzir a ansiedade, tpm, estresse e cansaço. Seu consumo deve ser associado a uma dieta equilibrada, e hábitos saudáveis.

Este produto não é torrado, passa apenas na estufa com temperatura baixa para retirada do excesso de umidade.

Nossas nozes e castanhas não possuem conservantes, colesterol e não são fritas, mantendo suas principais características.

Validade nesta embalagem: 06 meses

Não contém Glúten.

Presenteie alguém !!!

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL

Porção de 15 g (uma colher de sopa)

Quantidade por porção		%VD(*)
Valor energético	91 kcal / 382 kJ	4%
Carboidratos	5 g	2%
Proteínas	2 g	3%
Gorduras totais	7 g	13%
Gorduras saturadas	1,4 g	6%
Gorduras trans	0 g	0%
Fibra alimentar	0 g	0%
Sódio	0 mg	0%

* %Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

Castanha de caju salgada (CCS)

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Castanha de Caju Salgada 200g

Embalagem com Zip de fechamento

Ingredientes: Castanha de Cajú e Sal.

Classificação da Castanha de Cajú W1240 selecionada. (Bom tamanho e paladar, experimente !!!)

Produto Natural. Rico em Omega 7, Proteínas, Potássio, Magnésio, Fósforo, Vitaminas, Cálcio e Fibras.

Ajuda a proteger o coração e no rejuvenescimento do tecido facial. Seu consumo deve ser associado a uma dieta equilibrada e hábitos saudáveis.

Nossas nozes e castanhas não possuem conservantes, colesterol e não são fritas, mantendo suas principais características.

Não contém Glúten.

Presenteie alguém !!! Para presente, deixe a sua mensagem na finalização de seu pedido que a mesma acompanhará a sua mercadoria em papel timbrado Dona Castanha.

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL

Porção de 15 g (uma colher de sopa)

Quantidade por porção		%VD(*)
Valor energético	91 kcal / 382 kJ	4%
Carboidratos	5 g	2%
Proteínas	2 g	3%
Gorduras totais	7 g	13%
Gorduras saturadas	1,4 g	6%
Gorduras trans	0 g	**
Fibra alimentar	0,5 g	0%
Sódio	49 mg	2%

* %Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energética. **

Valor diário não estabelecido

Barra de castanha caju (BP)

Tabela Nutricional		
Informação Nutricional		
Porção de 10g (1 unidade)		
	Quantidade por porção:	% V.D. (*)
Valor energético	50kcal = 210kJ	3%
Carboidratos	3,6 g, dos quais:	1%
Açúcares	0 g	**
Proteínas	1,6g	2%
Gorduras Totais	4,0 g, dos quais:	7%
Gorduras Saturadas	0,6 g	3%
Gorduras Trans	0 g	**
Gorduras Monoinsaturadas	2,1 g, dos quais:	**
Ômega 9	2,0 mg	**
Gorduras Poliinsaturadas	1,3 g, dos quais:	**
Ômega 3	40 mg	**
Colesterol	0 mg	**
Fibra Alimentar	0,7 g	3%
Sódio	12 mg	1%

* % Valores diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. ** Valores diários não estabelecidos.

Ingredientes

Gergelim, castanha de caju, maltodextrina, sal iodado, edulcorante natural isomalte e antiúmeclante bicarbonato de sódio. CONTÉM GLÚTEN.

ANEXO II

Informações nutricionais da castanha do-pará *in natura*, processada e ultraprocessada

Castanha do-pará (*in natura*)

DESCRIÇÃO DO PRODUTO	INFORMAÇÃO NUTRICIONAL
Castanha do Para Natural 200g	Porção de 15 g (uma colher de sopa)
Conhecida também como Castanha do Brasil.	Quantidade por porção %VD(*)
Embalagem com Zip de fechamento.	Valor energético 106 kcal / 445 kJ 5%
Ingredientes: Castanha do Pará.	Carboidratos 2 g 1%
Predominância de Castanhas do Tamanho Médio.	Proteínas 2 g 3%
Produto Natural, Rico em Vitamina E, Magnésio, Selênio e Tiamina.	Gorduras totais 10 g 18%
Castanha de origem de reserva Indígena, sem agrotóxicos e conservantes. Selo de produto orgânico junto a ECOCERT em fase de aprovação.	Gorduras saturadas 2,4 g 11%
Ajuda a prevenir tumores e baixar o colesterol. Seu consumo deve ser associado a uma dieta equilibrada e hábitos saudáveis.	Gorduras trans 0 g **
Nossas nozes e castanhas não possuem conservantes, colesterol e não são fritas, mantendo suas principais características.	Fibra alimentar 0,9 g 4%
Prazo de validade nesta embalagem: 06 meses.	Sódio 0 mg 0%
Não contém Glúten.	* %Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energética. **
Presenteie alguém !!!	Valor diário não estabelecido
Na finalização de seu pedido escreva a mensagem de presente e altere o endereço de entrega que enviaremos junto com a sua mercadoria em papel timbrado Dona Castanha.	

Castanha do-pará salgada (CPS)

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Castanha do Para Salgada 200g

Conhecida Também como Castanha do Brasil.

Embalagem com Zip de fechamento.

Ingredientes: Castanha do Pará e sal.

Predominancia de Castanhas do Tamanho Médio.

Produto Natural, Rico em Vitamina E, Magnésio, Selênio e Tiamina.

Castanha de origem de reserva Indígena, sem agrotóxicos e conservantes. Selo de produto orgânico junto a ECOCERT em fase de aprovação.

Ajuda a prevenir tumores e baixar o colesterol. Seu consumo deve ser associado a uma dieta equilibrada e hábitos saudáveis.

Nossas nozes e castanhas não possuem conservantes, colesterol e não são fritas, mantendo suas principais características.

Prazo de validade nesta embalagem: 06 meses.

Não contém Glúten.

Presenteie alguém !!!

Na finalização de seu pedido escreva a mensagem de presente e altere o endereço de entrega que enviaremos junto com a sua mercadoria em papel timbrado Dona Castanha.

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL

Porção de 15 g (uma colher de sopa)

Quantidade por porção		%VD(**)
Valor energético	106 kcal / 445 kJ	5%
Carboidratos	2 g	1%
Proteínas	2 g	3%
Gorduras totais	10 g	18%
Gorduras saturadas	2,4 g	11%
Gorduras trans	0 g	**
Fibra alimentar	0,9 g	4%
Sódio	49 mg	2%

* %Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energética. **

Valor diário não estabelecido

Barra de castanha do-pará

Informações Nutricionais

Porção de 25g (1 Barra)

	Quantidade por porção	% VD (*)
Valor energético	85Kcal = 361kJ	4
Carboidratos	16g	5
Proteínas	1g	1
Gorduras totais	2g	4
Gorduras saturadas	0,7g	3
Gordura trans	0g	-
Colesterol	0g	0
Fibra	2g	8
Cálcio	2,4mg	0
Sódio	18mg	1
Ferro	0,26mg	2

(*) % Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

Ingredientes:

Mel, flocos de milho, flocos de arroz, uva passa, maçã, goma acácia, óleo de coco, suco de uva, linhaça, flocos de quinoa, lecitina de soja, castanha do pará, capim santo, canela e sal.

SKU: 1181031052

ALÉRGICOS CONTÉM: castanha do para e derivados de milho e coco. **E PODE CONTER** aveia, amêndoa, macadâmia e castanha de baru.

ANEXO III

Informações nutricionais da castanha de baru ultraprocessada

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL PORÇÃO DE 25G (1 UNIDADE)		
QUANTIDADE POR PORÇÃO VD*		
Valor Energético	96Kcal/401KJ	5%
Carboidratos	18g	6%
Proteínas	1,5	2%
Gorduras totais	2,0	4%
Gorduras saturadas	0,6	3%
Gorduras Trans	0	**
Fibras alimentares	0,8	3%
Sódio	56mg	2%

%Valores diários de referência com base em uma dieta de 2000kcal ou 8400 KJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas**Vd não estabelecido.

Informação Nutricional Complementar: Redução de 30% de gorduras totais. Esta barra não possui redução no valor energético.

INGREDIENTES

Glicose de Milho, Flocos de Arroz, Aveia em Flocos, **Castanhas de Baru**, Flocos de Milho, Açúcar invertido, Açúcar Mascavo, Gordura de Palma, Estabilizane Lecitina de Soja INS 322 e Aroma Idêntico ao Natural da Castanha.

CONTÉM GLÚTEN. Conservar em local seco e fresco. Após abrir a embalagem consumir imediatamente.

0%Coolesterol como toda barra de cereais.

- ✓ Não foram fornecidas as informações nutricionais referentes às castanhas de baru nas formas *in natura* e processada.