

**Universidade Estadual Paulista  
“Júlio Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Avaliação da capacidade antioxidante e  
compostos fenólicos em três sementes  
oleaginosas: castanha-do-brasil, castanha de  
caju e noz pecã**

**Ivânia Santos de Souza**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Alimentos e Nutrição para obtenção  
do título de Mestre em Alimentos e  
Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos  
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria  
de Sylos

Coorientador: Prof. Dr. Luís Vitor  
Silva do Sacramento

Araraquara

2018

**Avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos em três sementes oleaginosas: castanha-do-brasil, castanha de caju e noz pecã**

**Ivânia Santos de Souza**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Célia Maria de Sylos

Coorientador: Prof. Dr. Luís Vitor Silva do Sacramento

**Araraquara**

**2018**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**S726a** Souza, Ivânia Santos de  
Avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos em três sementes oleaginosas: castanha-do-brasil, castanha de caju e noz pecã / Ivânia Santos de Souza. -- Araraquara, 2018. 80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Célia Maria de Sylos.  
Coorientador: Luís Vitor Silva do Sacramento.

1. Semente. 2. Compostos fenólicos. 3. Ação antioxidante. 4. Castanha. 5. Noz. I. Sylos, Célia Maria de, orient. II. Sacramento, Luís Vitor Silva do, coorient. III. Título.

**CAPES: 50700006**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



IVÂNIA SANTOS DE SOUZA

**Avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos em três sementes oleaginosas: castanha-do-brasil, castanha de caju e noz pecã**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre(a) em Alimentos e Nutrição

Araraquara, 25/06/2018

BANCA EXAMINADORA

---

LUIS VITOR SILVA DO SACRAMENTO  
(Coorientador)

---

SEVERINO MATIAS DE ALENCAR

---

JOSE PASCHOAL BATISTUTI

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Seção Técnica de Pós-graduação  
Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1 - CEP 14801-902 - Araraquara - SP.  
- Brasil  
tel 16 3301-6900 - fax 16 3301.6901 - posgrad@f FAR.unesp.br

*A Deus pelo fortalecimento durante  
toda essa caminhada nada fácil.  
Aos meus pais, Maria Lúcia e  
Iralci, pelo apoio físico e emocional.  
Sem eles, nada disso seria possível.*

## **Agradecimentos**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao Instituto Federal de São Paulo (IFSP) pelo afastamento que me permitiu desenvolvê-lo e finalizá-lo.

À minha orientadora Profa. Dra. Célia de Sylos pela orientação.

Ao Prof. Dr. Luís Vitor por aceitar ser meu coorientador e por todo apoio e esforço para que esse trabalho fosse concluído.

À Profa. Dra. Magali Monteiro pelas sugestões, incentivo e empréstimo de materiais.

Às professoras Thaís César e Juliana Campos pelo apoio.

Ao Prof. Christiann Davis Tosta do IFSP Matão pelo empréstimo de material e pelo apoio.

À técnica de laboratório Elisene (Lica) pelos ensinamentos e auxílio.

À Bianca Ferreira pelo empenho e auxílio na análise em HPLC.

À Maria Rita e Estela por todo o auxílio prestado.

Aos meus colegas de trabalho do IFSP Matão Guilherme Pegler, Janaína, José Antônio, Yuri e Guilherme Christiani pelas sugestões, apoio e compreensão.

## Resumo

**Objetivos:** Determinar a composição centesimal da castanha-do-brasil, castanha de caju crua e da noz pecã, estabelecer as melhores condições de extração dos compostos fenólicos totais, avaliar sua capacidade antioxidante *in vitro* e identificar os compostos fenólicos presentes. **Métodos:** Foi realizada a composição centesimal utilizando-se o método da AOAC e Bligh & Dyer para os lipídeos. A extração dos compostos fenólicos foi otimizada com os fatores solvente (%) (acetona e etanol) e tempo de extração utilizando-se Planejamento Composto Central. O teor de compostos fenólicos totais foi estimado utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu. A capacidade antioxidante foi verificada através do ensaio do ABTS e DPPH. O perfil dos compostos fenólicos foi analisado por HPLC. **Resultados:** Além dos lipídeos, as sementes oleaginosas apresentaram as proteínas como componente majoritário. Na otimização da extração, a porcentagem de solvente e o tempo de extração mais eficiente foi etanol 55,56% e 15,86 min., etanol 70% e 44,14 min., acetona 66,39% e 28,02 min. para a castanha-do-brasil, castanha de caju crua e noz pecã, respectivamente. Nas análises de compostos fenólicos totais e de capacidade antioxidante a noz pecã apresentou valor bem superior à castanha-do-brasil e castanha de caju crua, sendo que essas diferiram estatisticamente entre si apenas no ensaio do DPPH. Os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante demonstraram correlação positiva e significativa. Os compostos fenólicos identificados foram o ácido gálico, presente nas três sementes oleaginosas; a catequina na castanha-do-brasil e na castanha de caju crua e a epicatequina na castanha de caju crua. **Conclusão:** A polaridade contribuiu de forma significativa para a eficiência da extração dos compostos fenólicos. A noz pecã apresentou maior quantidade de compostos fenólicos e de capacidade antioxidante. O ácido gálico foi identificado em todas as sementes oleaginosas analisadas.

**Palavras-chave:** Semente; Compostos fenólicos; Ação antioxidante; Castanha; Noz.

## Abstract

**Objectives:** To determine the centesimal composition of the Brazil nuts, cashew nuts and pecan nuts, the best phenolic compounds extraction conditions, to evaluate the antioxidant capacity *in vitro* and to identify the phenolic compounds profile. **Methods:** Centesimal composition was performed using the AOAC method and Bligh & Dyer for the lipids. Extraction of the phenolic compounds was optimized with the factors solvent (%) (acetone and ethanol) and extraction time using Central Composite Design. Total phenolic compounds were estimated using the Folin-Ciocalteu method. Antioxidant capacity was verified through the ABTS and DPPH assay. Individual phenolic compounds were analyzed by HPLC. **Results:** In addition to the lipids, nuts showed the proteins as major component. In the optimization of the extraction, the most efficient solvent and extraction time were ethanol 55.56% and 15.86 min., ethanol 70% and 44.14 min., acetone 66.39% and 28.02 min. for Brazil nuts, raw cashew nuts and pecan nuts, respectively. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of pecan nuts presented a much higher value than Brazil nuts and raw cashew nuts, which differed statistically only in the DPPH assay. Phenolic compounds identified were gallic acid, present in all nuts; catechin in Brazil nuts and raw cashew nuts and epicatechin in raw cashew nuts. **Conclusion:** Polarity contributed significantly for extraction efficiency of the phenolic compounds. Pecan nuts showed the highest amount of phenolic compounds and antioxidant capacity. Gallic acid was identified in all nuts analyzed.

**Key-words:** Seed; Phenolic compounds; Antioxidant; Nuts.



## **Lista de Apêndices**

Apêndice 1. Curvas de calibração dos compostos fenólicos totais da matriz de otimização da noz pecã, castanha-do-brasil e castanha de caju extraídos com etanol.

Apêndice 2. Curva de calibração dos compostos fenólicos totais da matriz de otimização da noz pecã, castanha-do-brasil e castanha de caju crua extraída com acetona.

Apêndice 3. Curvas de calibração dos compostos fenólicos totais da castanha-do-brasil, castanha de caju crua e da noz pecã.

Apêndice 4. Curva de calibração do ensaio DPPH.

Apêndice 5. Curva de calibração do ensaio ABTS.

Apêndice 6. Cromatograma dos padrões de compostos fenólicos.

## Sumário

Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Apêndices	vi
1. Introdução	8
2. Revisão bibliográfica	9
2.1. Sementes oleaginosas	9
2.1.1. Castanha-do-brasil ( <i>Bertholletia excelsa</i> )	10
2.1.2. Castanha de caju ( <i>Anacardium occidentale L.</i> )	12
2.1.3. Noz pecã ( <i>Carya illinoensis</i> )	14
2.2. Compostos fenólicos	16
2.3. Capacidade antioxidante	18
3. Objetivo	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.1.1. Objetivos Específicos	22
4. Material e Métodos	23
4.1. Material	23
Preparo das amostras	23
4.2. Métodos	23
4.2.1 Composição centesimal	23
4.2.2 Extração dos compostos fenólicos	24
4.2.3. Determinação de compostos fenólicos totais	26
4.2.4. Determinação da capacidade antioxidante	26
4.2.4.1. ABTS	26
4.2.4.2. DPPH	27
4.2.5. Perfil de compostos fenólicos	27
4.3. Análise Estatística	28
5. Resultados e Discussão	28
5.1. Composição centesimal	28
5.2. Extração dos compostos fenólicos	31
5.2.1. Compostos fenólicos totais	41

5.3. Capacidade antioxidante	44
5.4 Compostos fenólicos individuais	46
6. Conclusão	51
7. Referências	52
Apêndices	72

## **1. Introdução**

Nos últimos anos tem-se evidenciado o aumento da avaliação da capacidade antioxidante em plantas e principalmente em alimentos, que por sua vez tem sido associado a benefícios a saúde humana (1-2).

Os antioxidantes auxiliam o combate e a prevenção à ação de espécies reativas, radicais livres e o estresse oxidativo da célula que conduzem a diversas formas de dano celular, como a peroxidação de lipídeos de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e membranas, às enzimas e DNA, desencadeando inúmeras doenças (3).

Vários estudos têm demonstrado que o aumento do consumo de frutas, vegetais e oleaginosas têm elevado os benefícios à saúde por apresentar compostos fenólicos com atividade antioxidante, que interagem com os radicais livres prevenindo a ativação do oxigênio. Esses compostos auxiliam na prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas, incluindo as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e alguns tipos de câncer (4-5).

No Brasil, a produção das nozes e castanhas tem recebido destaque devido ao aumento da produção e investimentos no setor, sendo criadas associações próprias para essa classe de alimento (6).

As nozes e castanhas possuem muitos nutrientes e são bastante consumidas de várias formas, seja integralmente ou na composição de diversos pratos e produtos. Apesar disso, ainda há poucos trabalhos realizados que abordem os compostos bioativos e seus efeitos na capacidade antioxidante da castanha-do-brasil e da castanha de caju, e principalmente da noz pecã (7-8).

A extração dos compostos bioativos é considerada etapa importante para o êxito das análises. No entanto, na literatura há variados métodos de extração dos compostos fenólicos para plantas e alimentos e em relação às sementes oleaginosas há poucos trabalhos que abordem a extração desses compostos.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### *2.1. Sementes oleaginosas*

As nozes e castanhas são conhecidas por conterem vários de compostos fitoquímicos que são benéficos à saúde humana. Dentre esses benefícios estão a prevenção à doenças cardiovasculares, câncer, Parkinson, estimulação do sistema imunológico (7-10).

Alguns dos compostos encontrados nas nozes e castanhas são ácidos graxos insaturados, proteína, fibras, vitaminas E e algumas do complexo B, minerais como magnésio, potássio e o cobre, fitoesteróis, compostos fenólicos como catequinas, resveratrol, ácidos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas, carotenoides, fitatos (8-9,11-13).

Os fitoesteróis são compostos estruturalmente semelhantes ao colesterol e estão presentes na fração oleosa das sementes oleaginosas, principalmente o  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol. A importância desses compostos bioativos reside no fato de que estudos demonstraram sua capacidade de redução dos níveis séricos do colesterol em humanos (14-18).

Dentre as nozes e castanhas mais populares estão a amêndoa, castanha-do-brasil, castanha de caju, avelã, macadâmia, noz, pistache e pinhão (11,13).

A produção mundial de castanhas e nozes na safra 2016/2017 foi de 4,2 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos o maior produtor, com 1,696,804 milhões de toneladas, que representa 41% da produção. A China ocupa a segunda posição com 408,063 mil toneladas, seguida pela Turquia com 407,450 mil toneladas. Cada um corresponde a 10% da produção mundial (19).

A amêndoa é a mais produzida mundialmente, seguida da noz e do pistache. O consumo de nozes e castanhas em 2015 foi de aproximadamente 3,6 milhões de toneladas no mundo todo, sendo os maiores consumidores a Europa e a América do Norte. Na América Latina o consumo de nozes e castanhas ainda é pequeno quando comparado ao restante do mundo e essa situação contribui para a escassez de dados referentes ao seu consumo no Brasil (19-20).

A produção de nozes e castanhas vem ganhando importância no Brasil devido ao aumento do consumo e a necessidade de expansão da comercialização para outros países. A produção pode ser dividida por regiões, sendo na Região Norte a castanha-do-brasil, na Região Nordeste a castanha de caju e na Região Sul a noz pecã (6,20).

### *2.1.1. Castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa)*

Uma das espécies mais importantes da Região Amazônica, a castanha-do-brasil, conhecida cientificamente como *Bertholletia excelsa*, pertence à

família Lecythidaceae e é caracterizada como uma amêndoa nutritiva contida no interior do fruto da castanheira (21).

No Brasil, os Estados do Acre, Amazonas e Pará são responsáveis por mais de 80% do extrativismo da castanha-do-brasil (22).

A produção da Bolívia representa 84% do mercado internacional de castanha, enquanto que Peru e Brasil representam 14% e 2%, respectivamente. Em 2015 a produção de castanha-do-brasil pelo Brasil chegou a 40.643 toneladas, enquanto que em 2016 a produção apresentou queda, ficando em 34.664 toneladas. Esse fato ocorre devido à forma sustentável como a castanha-do-brasil é colhida, o que pode ocasionar variação na produção de um ano para outro (20,23).

O consumo mundial da castanha-do-brasil foi de 29.150 toneladas em 2015, onde os Estados Unidos, o Reino Unido e a Alemanha figuraram entre os países mais consumidores. Os dados sobre o consumo brasileiro são escassos e desatualizados. Segundo dados de 2005, o consumo interno brasileiro de castanha-do-brasil foi pouco mais de 13 mil toneladas (19,24).

Possui entre seus ácidos graxos majoritários o oléico e o linoleico. Apresenta expressiva quantidade de selênio, um mineral que além de exercer vários benefícios à saúde, atua também como cofator de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (12,25-32).

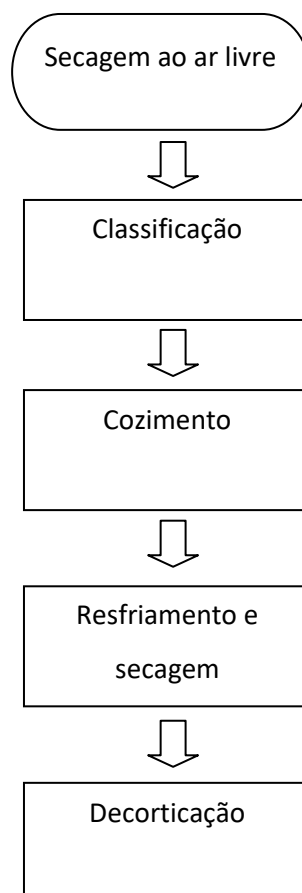
A castanha-do-brasil apresenta alguns compostos bioativos como os compostos fenólicos, mais especificamente alguns ácidos fenólicos e fitoesteróis, como  $\beta$ -sisterol, campesterol, estigmasterol e sitostanol (8,29,31,33-35).

### 2.1.2. Castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.)

O cajueiro caracteriza-se como uma planta tropical originária do Brasil. O caju é constituído pelo pedúnculo e pela castanha, sendo essa última o verdadeiro fruto. A partir do caju obtêm-se vários produtos, sendo sua castanha o produto mais conhecido (36-37).

A castanha de caju é recoberta por uma casca escura que possui em seu interior um líquido caústico e inflamável, rico em alquilfenóis, conhecido como Líquido da Castanha de Caju (LCC). Abaixo da casca há uma película aderida à castanha, sendo necessário um processamento bem complexo para a retirada de ambas (36,38-39).

O processamento da castanha de caju necessita de várias etapas até a obtenção do produto final, conforme pode ser observado na Figura 1 abaixo (36).





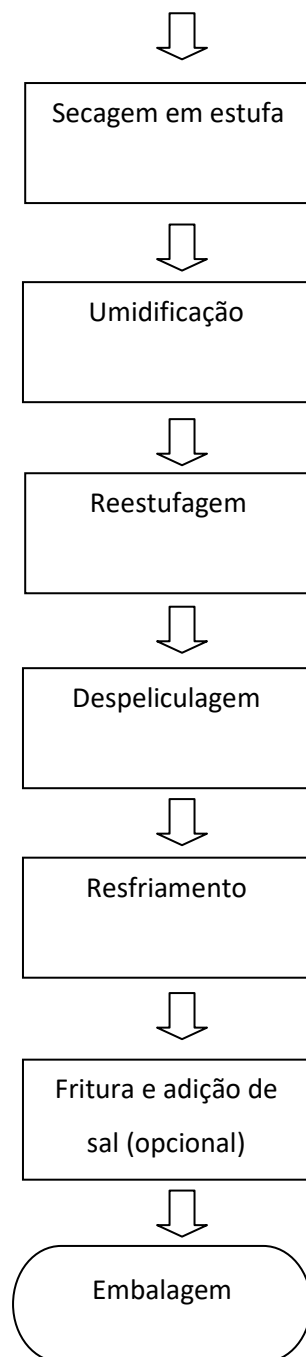


Figura 1. Fluxograma do processamento da castanha de caju.

As etapas de cozimento da castanha e da secagem da amêndoa são primordiais para a obtenção da qualidade final da castanha de caju, como coloração marfim e a integralidade das castanhas (36).

A Região Nordeste é responsável por quase toda a produção, destacando-se os Estados do Ceará, responsável por metade da produção

nacional, Rio Grande do Norte e Piauí. Outra pequena parte é produzida pelos Estados da Bahia, Maranhão e Pernambuco (37- 40).

O Brasil ocupa o quinto lugar na produção mundial de castanha de caju, sendo que sua produção em 2016 ficou em 74.548 toneladas. Os maiores produtores mundiais são a Costa do Marfim e a Índia (19,41).

A castanha de caju está entre as cinco sementes oleaginosas mais produzidas no mundo. Sua produção mundial apresenta crescimento nos últimos anos, passando de 576,431 mil toneladas em 2011 para 754,700 mil toneladas em 2017 (19).

Índia e Estados Unidos são responsáveis por grande parte do consumo de castanha de caju, 257.190 e 141.119 toneladas, respectivamente. Mundialmente, o consumo em 2015 ficou em 724.556 toneladas. No Brasil, cerca de 15% da castanha de caju produzida é destinada ao mercado interno, distribuídos entre fábricas de sorvete e chocolate, supermercados e padarias, sendo os restantes 85% destinados ao mercado externo (19,42).

A castanha de caju apresenta ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oleico, minerais como potássio, fósforo e magnésio; vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>1</sub> (25,43-44).

Dentre seus compostos bioativos estão flavonoides, proantocianidinas, isoflavona, ácido anacárdico, tocoferol, fitoesteróis como o  $\beta$ -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (8-9,31,38,45-46).

### *2.1.3. Noz pecã (Carya illinoensis)*

Originária da América do Norte, a noqueira pecã foi trazida ao Brasil por imigrantes americanos para o Estado de São Paulo (47).

A noz pecã é considerada uma drupa, ou seja, possui uma única semente. Sua casca apresenta coloração amarronzada com manchas escuras. A semente é alongada, recoberta por uma película marrom (48-49).

Na safra 2016/2017 foram produzidas 118.213 toneladas de noz pecã no mundo todo, apresentando crescimento na quantidade produzida na última década. Entre seus maiores produtores, destacam-se o México, com 50% da produção e os Estados Unidos, com 44% (19).

Em 2016 a produção brasileira de noz foi de 5.453 toneladas, divididas entre os Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, sendo esse último o maior produtor (41).

O consumo mundial da noz pecã em 2015 foi de 117.064 toneladas, estando entre os principais países consumidores os Estados Unidos e o México. No Brasil o consumo tem aumentado nos últimos anos devido principalmente à divulgação pelos veículos de informação sobre seus benefícios à saúde. Alguns desses benefícios estão relacionados à redução dos níveis de lipídeos séricos, Parkinson, proteção do DNA contra danos oxidativos, proteção das funções cognitivas (10,19,48,50-53).

A noz pecã apresenta grandes quantidades de fibra, minerais como o potássio, fósforo e vitamina B<sub>3</sub>. Em sua composição também pode ser observada a presença de fitoesteróis, principalmente  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta$ 5-avenasterol e campesterol (26,46,54).

As nozes possuem vários tipos de compostos fenólicos, dentre eles alguns ácidos fenólicos, flavanóis, flavonóis, elagitaninos (55-60).

## *2.2. Compostos fenólicos*

Produto do metabolismo secundário das plantas, os compostos fenólicos constituem-se em um grupo de substâncias amplo e complexo, apresentando estruturas simples ou altamente polimerizadas. Sua importância é dada através da sua contribuição para o crescimento e desenvolvimento da planta e na defesa contra infecções e injúrias (1,61-63).

A maioria dos compostos fenólicos é formada através da fenilalanina, pertencente à rota do ácido chiquímico, sendo os flavonóides formados por uma rota mista que envolve a do ácido chiquímico e a do acetato/malonato (64-66).

A estrutura dos compostos fenólicos constitui-se de pelo menos um anel aromático no qual um ou mais grupos hidroxilas (OH) estão ligados. Os fenóis simples apresentam em sua constituição apenas um anel aromático que, além de estarem ligados à hidroxilas, podem também ter ligações com outros grupos funcionais (éteres, alquilas, carboxilas, entre outros) (61,63,67).

Os ácidos fenólicos são caracterizados por possuírem em suas estruturas o anel aromático ligado tanto ao grupo hidroxila (OH) quanto a um grupo carboxílico (COOH), sendo compostos por dois grupos: hidroxibenzóicos (ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico) e hidroxicinâmicos (ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico) (61, 67- 69).

Os flavonoides possuem dois anéis aromáticos que são ligados através de um heterociclo de oxigênio, estando entre seus representantes os flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianinas, flavanóis, flavanonas (61,63,70).

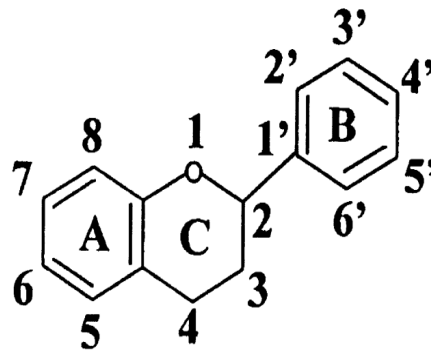


Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides (71).

A propriedade antioxidante dos compostos fenólicos é bastante estudada. Alguns autores esclarecem que seu mecanismo de ação pode ocorrer de várias formas, dentre elas, na inibição da atividade de enzimas que participam da produção das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), como também na eliminação dessas espécies, impedindo dessa forma a cascata de reações que levam à peroxidação lipídica; na quelação de íons de metais, principalmente ferro e cobre envolvidos no processo de formação dos radicais livres (61,70,72-73).

Além de sua atividade antioxidante, os compostos fenólicos possuem outras propriedades como atividade anti-inflamatória, antitumoral, antiproliferativa, anticâncer, antimutagênica, antiviral e antimicrobiana (74-77).

Alguns trabalhos realizados com os compostos fenólicos das nozes e castanhas apontam que os mesmos apresentam capacidade antioxidante e antimicrobiana (38,78-80).

As formas de extração dos compostos fenólicos em alimentos são diversas, visto que cada alimento possui particularidades e a natureza de sua matriz possui influência nesse processo (65,81).

A variação no processo de extração ocorre principalmente em relação ao solvente utilizado. No caso das sementes oleaginosas os mais utilizados são etanol, metanol, acetona e água. Porém, ainda são poucos os trabalhos que tratam da otimização da extração desses compostos nas sementes oleaginosas (46,57,82).

### *2.3. Capacidade antioxidante*

Os radicais livres são formados através do desemparelhamento de um ou dois elétrons na última camada. São capazes de produzirem espécies não-radicaais que apresentam propriedade oxidante, podendo ocasionar vários danos celulares nos organismos vivos (83-85).

Tanto os compostos considerados como radicais livres quanto as espécies reativas são incluídos em dois grupos: Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN). São conhecidas por causarem danos teciduais e celulares nos sistemas biológicos, desencadeando doenças como a mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (30,84-85).

Ambas as espécies são provenientes do metabolismo do oxigênio. Grande parte do oxigênio consumido pelos organismos vivos em processos fisiológicos normais, como a respiração e o metabolismo, é convertido em água através da cadeia transportadora de elétrons, localizada na mitocôndria. Outra pequena parte, cerca de 10% do oxigênio consumido, sofre primeiramente redução com a aceção de um elétron, transformando-se em ânion-radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Em uma segunda redução, ocorre a adição de dois prótons, formando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Após sua formação, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ainda pode obter mais um elétron e se transformar em

radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ) e anion hidroxil ( $\text{OH}^-$ ), sendo que o radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ) forma uma molécula de água depois que recebe mais um elétron (85-86).

Há três tipos de fatores que podem influenciar a formação dos radicais livres. Os fatores internos, como a mitocôndria (cadeia respiratória), a ação de enzimas, fagócitos, metais de transição, inflamação. Os fatores externos, como poluição, álcool, cigarro, drogas, radiação, luz UV e dieta pobre em nutrientes. Os fatores fisiológicos, como emocionais, o estresse, o acometimento por doenças (3,85,87).

Quando no organismo há desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, ocorre o chamado estresse oxidativo. Entre as causas para que esse fenômeno se desenvolva estão a autooxidação de compostos endógenos (catecolaminas) e exógenos (xenobióticos); esgotamento das reservas de antioxidantes; inativação e declínio na produção de enzimas antioxidantes e de antioxidantes de baixa massa molecular (30,86,88).

As Espécies Reativas (ER) causam danos ao organismo devido ao ataque aos vários componentes celulares, como aos lipídeos de membrana, às proteínas e enzimas intracelulares, aos carboidratos e ao DNA nuclear das células e tecidos. As consequências dessas ações são o desenvolvimento de doenças como as cardiovasculares, diabetes, câncer, Alzheimer, Parkinson (30,85,87,89,90-92).

Os compostos que auxiliam a evitar os danos causados pelos radicais livres são conhecidos como antioxidantes. A definição de antioxidante pode ser dada de acordo com a área à qual se relaciona. Quando o aspecto da conservação dos alimentos é o principal objetivo, pode ser definido como “substância utilizada para preservar alimentos através do retardo da

deterioração, rancidez, ou descoloração devido à oxidação”, conforme é definido pelo (93). Do ponto de vista biológico, como qualquer substância que promova o retardo, a prevenção ou remoção do dano oxidativo de uma molécula alvo (3).

As defesas antioxidantes podem ocorrer de duas formas: endógena e exógena. Os antioxidantes endógenos são aqueles produzidos pelo organismo humano, como a glutathiona reduzida (GSH), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Os antioxidantes exógenos são aqueles provenientes da dieta, como as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos (85-87).

As substâncias antioxidantes podem agir de várias formas no combate às espécies reativas, como catalisar a remoção, diminuir a formação, eliminar a presença, oxidar para proteger biomoléculas importantes (3).

Para avaliar a capacidade antioxidante de um determinado composto há dois tipos de teste: *in vivo* e *in vitro*.

Nos testes *in vivo*, os compostos que serão testados são administrados em animais como camundongos e ratos, que após determinado período são sacrificados, sendo seu sangue ou tecidos utilizados para a realização do ensaio. Alguns exemplos de ensaios *in vivo* são Ensaio da Peroxidação Lipídica (LPO), Catalase (CAT), Método da Superóxido Dismutase (SOD) e Estimação da Glutathiona Peroxidase (GSHPx) (94).

Já os testes *in vitro* utilizam radicais livres como armadilhas e são mais simples de serem realizados. Para avaliar a capacidade antioxidante de determinados compostos presentes em alimentos são utilizados métodos de ensaio que avaliem a inibição da oxidação de um substrato, medindo ao final o grau de oxidação através de métodos químicos, instrumentais ou sensoriais.



Diante disso, para que o método seja eficiente é necessário um substrato adequado, um iniciador de oxidação e uma medida adequada do ponto final (30,94). Entre alguns exemplos de métodos *in vitro* estão o DPPH, o ABTS, o FRAP e o ORAC.

Conhecida como DPPH, a molécula 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil é um radical livre que apresenta características como estabilidade e coloração violeta. O ensaio objetiva avaliar a capacidade de eliminação do radical DPPH pelos antioxidantes, onde o átomo de nitrogênio do DPPH é reduzido pelo átomo de hidrogênio doado pelo antioxidante da amostra, transformando o hidrazil presente na molécula do radical livre em hidrazina, ocasionando a perda da coloração. Essa mudança é observada através da espectrofotometria (30,94-96).

O ensaio TEAC/ABTS (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox/ 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) baseia-se na capacidade dos antioxidantes diminuírem a coloração verde-azulada do radical livre ABTS<sup>•+</sup> através do processo de redução, sendo observada a diminuição da absorbância em espectrofotômetro na faixa entre 600 e 750 nm. Utiliza-se como padrão o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchoman-2-ácido carboxílico) para quantificar a capacidade antioxidante como equivalente. O Trolox é um análogo da vitamina E e solúvel em água (30,97-99).

O ensaio FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power) tem como objetivo medir a capacidade dos antioxidantes de reduzir o ferro férrico. Neste ensaio, o complexo formado pelo Fe (III) e pela TPTZ [2,4,6-(tri-(2-piridil-s-triazina))], de coloração amarela, é reduzido para a forma de complexo ferroso (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ), de coloração azul escura, na presença de pH baixo. A reação de redução é

monitorada através da variação na absorção a 593 nm por espectrofotometria (32,96,100-101).

No ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) o objetivo consiste na medida da capacidade dos antioxidantes da amostra em proteger uma proteína adicionada da degradação oxidativa causada por um radical peróxil. A diminuição da fluorescência da proteína ocasionada pela perda da conformação ao sofrer danos oxidativos provenientes de uma fonte de radicais peróxil é avaliada através da espectrofotometria. O antioxidante retarda a perda da fluorescência eliminando o radical peróxil através da transferência de átomo de hidrogênio (96,99,102-103).

### **3. Objetivo**

#### *3.1. Objetivo Geral*

Determinar a composição centesimal em amostras de castanha-do-brasil, castanha de caju crua e de noz pecã, o teor de compostos fenólicos totais, avaliar sua capacidade antioxidante *in vitro* e separar compostos fenólicos empregando Cromatografia Líquida.

#### *3.1.1. Objetivos Específicos*

- I. Determinar a composição centesimal da castanha-do-brasil, castanha de caju crua e da noz pecã;
- II. Otimizar a extração dos compostos fenólicos;
- III. Determinar o teor de compostos fenólicos totais;
- IV. Avaliar a capacidade antioxidante através dos ensaios DPPH e ABTS;
- V. Separar alguns compostos fenólicos presentes utilizando HPLC.

## **4. Material e Métodos**

### *4.1. Material*

A noz e as castanhas foram adquiridas em quatro pontos de venda comum da cidade de Araraquara e Campinas entre os meses de dezembro e janeiro de 2018. Foram então armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz.

#### *4.1.1. Preparo das amostras*

As sementes oleaginosas foram trituradas em moedor de café. Em seguida, os grânulos foram peneirados e pesados.

### *4.2. Métodos*

#### *4.2.1. Composição centesimal*

As análises de umidade, cinzas e proteínas foram realizadas de acordo com AOAC (104) com algumas modificações. A umidade foi obtida em estufa a 105°C durante 5 horas e as cinzas através de mufla a 550°C durante 6 horas. O valor da proteína total foi obtido pelo método de Kjeldahl e aplicado o fator de correção de 5,46 para a castanha-do-brasil e 5,30 para castanha de caju crua e para a noz pecã. A análise dos lipídeos totais foi realizada através do método de Bligh & Dyer (105).

#### 4.2.2. Extração dos compostos fenólicos

Na literatura os compostos fenólicos das sementes oleaginosas são extraídos utilizando-se vários métodos e tipos de solventes. Devido a esse fato, foi realizado um processo de otimização da extração dos compostos fenólicos totais das sementes oleaginosas através do Planejamento Composto Central. Para tanto, estudou-se duas variáveis independentes: a concentração do solvente (%) e o tempo de extração (min.). No caso do solvente, foram testados a acetona e o etanol.

Tabela 1. Variáveis independentes testadas com seus códigos e níveis.

Variáveis	Código	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração do solvente (%)	X1	55,86	60	70	80	84,14
Tempo de extração (min.)	X2	15,86	20	30	40	44,14

Tabela 2. Matriz codificada do Planejamento Composto Central.

<b>Ensaio</b>	<b>X1</b>	<b>X2</b>
1	+1	+1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1	-1
5	0	0
6	0	+1,41
7	0	0
8	0	-1,41
9	-1,41	0
10	+1,41	0
11	0	0

Foi pesado 1 g<sup>-1</sup> das castanhas do Brasil e de caju crua e da noz pecã trituradas e misturado com 10 mL<sup>-1</sup> do solvente mais adequado de acordo com o Planejamento Composto Central para cada uma em agitador de tubos do tipo vortex durante 1 minuto. Em seguida, permaneceram em banho termostático a 30°C durante o tempo mais adequado de acordo com o Planejamento Composto Central e foram centrifugadas a 4300 x g por 10 minutos. A extração foi repetida 2 vezes.

Para a retirada da gordura, 10 mL<sup>-1</sup> de hexano foram adicionados aos extratos e permaneceram durante 10 minutos em banho ultrassônico. Após a separação de fases, os extratos desengordurados foram recolhidos, secos com

nitrogênio, ressuspendidos em metanol e armazenados sob congelamento e protegidos da luz.

#### *4.2.3. Determinação de compostos fenólicos totais*

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu utilizando-se espectrofotômetro para leitura das amostras conforme Scalbert et al. (106) e Singleton et al. (107), com algumas modificações. Foram misturados 0,5 mL<sup>-1</sup> da amostra com 2,25 mL<sup>-1</sup> de água destilada e com 0,25 mL<sup>-1</sup> do reagente Folin-Ciocalteu. Após 1 minuto e antes de 8 minutos da mistura, foram adicionados 2,0 mL<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% para neutralizar o meio. As amostras foram então encubadas por 30 minutos a 37°C em banho termostático e depois lidas a 764 nm em espectrofotômetro UV/Vis (Beckman DU® 640, Fullerton, CA, USA). Foi realizada curva padrão com ácido gálico utilizando concentrações de 10 a 35 µg.mL<sup>-1</sup> e o teor de fenólicos totais expresso como mg<sup>-1</sup> equivalente de ácido gálico.100 g<sup>-1</sup> de semente oleaginosa.

#### *4.2.4. Determinação da capacidade antioxidante*

##### *4.2.4.1. ABTS*

A análise da atividade sequestrante de radicais livres ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)) foi determinada segundo o método descrito por Arnao et al. (108) e modificado por Rufino et al. (109). Em ambiente escuro, 30 µL<sup>-1</sup> do extrato das oleaginosas foi reagido com 3 mL<sup>-1</sup> da

solução do radical ABTS e lidos após 6 minutos em espectrofotômetro UV/Vis (Beckman DU® 640, Fullerton, CA, USA) a 755 nm. Foi preparada uma curva padrão utilizando trolox nas concentrações de 100 a 2000  $\mu\text{M}.\text{mL}^{-1}$  e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox (TE). $\text{g}^{-1}$  de massa fresca de semente oleaginosa.

#### *4.2.4.2. DPPH*

A atividade sequestrante do radical DPPH (1,1-diphenil- 1,2-picrilhidrazil) foi determinada de acordo com o método de Brand-Williams et al. (110) adaptado por Sánchez-Moreno et al. (111) e Rufino et al. (112). Em ambiente escuro, 0,1  $\text{mL}^{-1}$  dos extratos das oleaginosas foram adicionados a 3,9  $\text{mL}^{-1}$  de solução metanólica do radical DPPH. Após 30 minutos no escuro, a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis (Beckman DU® 640, Fullerton, CA, USA) a 510 nm. Foi preparada uma curva padrão de trolox nas concentrações de 1 a 180  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e os valores obtidos foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox (TE). $\text{g}$  de massa fresca de semente oleaginosa.

#### *4.2.5. Perfil de compostos fenólicos*

Antes de serem analisados no HPLC, os extratos secos foram ressuspensos em metanol e aplicados em filtro de membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,20  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Alemanha). Os compostos fenólicos foram analisados em um sistema HPLC modelo LC-10ATvp, marca Shimadzu (Japão), com controlador de sistema SCL-10Avp, desgaseificador DGU-14A e detector de arranjo de fotodiodo (PDA) SPD-M10Avp. O volume de

injeção foi de 20  $\mu\text{L}^{-1}$  e fluxo de 1  $\text{mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$  para os padrões e amostras. A eluição dos compostos fenólicos foi realizada através de uma coluna PFP (5  $\mu\text{m}$  x 150mm x 4,6mm; Phenomenex, EUA), com a fase móvel composta por eluente A ácido fórmico aquoso 0,4% e eluente B acetonitrila. O modo do gradiente de eluição foi: 0-1,5 min. (4% B), 1,5-21 min. (4-10% B), 21-23 min. (10-100% B), 23-28 min. (100% B), 28-28,5 min. (100-4% B), 28,5-42 min. (4% B). A temperatura do forno da coluna foi de 40 °C e a detecção foi realizada por lâmpadas de deutério e tungstênio, monitorada através de varredura (190 – 800 nm).

#### *4.3. Análise Estatística*

Em todas as análises realizadas utilizou-se para a amostra de cada semente oleaginosa analisada  $n= 4$ , em quadruplicata. Os resultados foram analisados através de Regressão Linear via método de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) utilizando o software estatístico R (versão 3.4.1). Os níveis de probabilidade menores que 5% ( $p<0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos. Os dados também foram submetidos ao teste de correlação de Spearman.

### **5. Resultados e Discussão**

#### *5.1. Composição centesimal*

A composição centesimal da castanha-do-brasil, da castanha de caju crua e da noz pecã é apresentada na Tabela 3.



Tabela 3. Composição centesimal da castanha-do-brasil, castanha de caju e noz pecã expressa em porcentagem (%).

	Castanha-do-brasil	Castanha de caju crua	Noz pecã
Carboidratos*	18,92	31,64	21,32
Umidade	1,41±0,24	3,01±0,25	1,75±0,39
Cinzas	4,72±0,57	3,71±0,52	2,69±0,54
Proteína	12,00±0,49	16,26±2,35	7,84±0,84
Lipídeos	62,95±1,27	45,36±0,95	66,40±1,48

\*Obtidos por diferença.

Os carboidratos são a maior fonte de energia para as células e tecidos do corpo humano. Além disso, mantém o nível de glicose normal e os carboidratos não-degeríveis ou fibras insolúveis, auxiliam no funcionamento do trato gastrointestinal (113-114).

O teor de carboidratos da castanha-do-brasil está próximo ao encontrado na literatura, 17,12% e 15,1% (25-26). Já a quantidade de carboidratos da noz pecã está acima da literatura, 13,86% (44).

O teor de umidade da castanha de caju crua está abaixo do encontrado na literatura, 5,05% (43). O valor encontrado para a castanha-do-brasil está abaixo do encontrado por outros autores, 3,5%, 3,15%, 3,13% (25-26,115). Em relação à noz pecã, o teor de umidade está abaixo do divulgado pela literatura, 3,52% (44). Um fator que pode justificar a baixa umidade das sementes oleaginosas nesse trabalho é o armazenamento sob refrigeração, o que pode ter facilitado a desidratação das sementes. A umidade presente nos alimentos contribui de forma relevante para alguns aspectos como a estocagem, a

embalagem e o processamento, interferindo na qualidade final do produto (116).

No processo para a obtenção da amêndoa da castanha de caju, a umidade é um dos fatores mais preponderantes para a qualidade na maioria das etapas, como na estocagem do produto bruto, no cozimento, na estufagem e na embalagem do produto final (36).

A castanha-do-brasil apresentou teor de cinzas próximo ao encontrado por outros autores, 3,4%, 3,13% e 3,84% (25-26,115). O teor de cinzas da castanha de caju crua está acima do encontrado na literatura, 2,40% (43).

O teor de cinzas é definido como sendo a matéria inorgânica restante após a incineração da matéria orgânica. Contém grandes quantidades de potássio, sódio, cálcio e magnésio. Contudo pode não indicar a quantidade real de minerais da amostra devido à possibilidade de volatilização de alguns elementos durante a incineração (116-117).

Muitas condições de cultivo são responsáveis pela variação do conteúdo mineral, tais como a fertilidade do solo, adubação, disponibilidade de água no ambiente, assim como fatores intrínsecos à espécie cultivada, por exemplo a genética (118).

A castanha de caju apresentou quantidade de proteínas abaixo do encontrado na literatura, 22,11% (43). A noz pecã apresentou quantidade abaixo do teor da literatura, 9,17% (44). O teor encontrado na castanha-do-brasil está abaixo do encontrado por outros trabalhos, 15,60%, 14,5% e 14,29% (25-26,115).

As proteínas exercem funções significativas, como o crescimento e manutenção dos tecidos, a produção de enzimas e anticorpos, a manutenção

do equilíbrio de fluidos. Dentre os alimentos fontes de proteínas, as sementes oleaginosas são uma das mais utilizadas (113-114,118).

Os lipídeos são integrantes dos alimentos caracterizados por serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Dentre suas funções no corpo humano estão a reserva de energia, o auxílio no transporte e absorção de vitaminas lipossolúveis, a síntese de hormônios através do colesterol (113-114,116,119).

Na literatura consultada, a determinação de lipídeos totais foi realizada utilizando o extrator Soxhlet, diferente do ocorrido nesse trabalho que utilizou outro método (105). No entanto, quando comparados ao desse trabalho, os valores são semelhantes aos da literatura, 46,28% na castanha de caju crua (43); na castanha-do-brasil 61% e 67,30% (26,115); na noz pecã 59,4% e 71,97% (25,44).

## *5.2. Extração dos compostos fenólicos*

Nas tabelas 4 e 5 apresentam-se os teores de compostos fenólicos totais obtidos através da otimização de extração da castanha-do-brasil e de caju crua e da noz pecã conforme o tipo de solvente.

Tabela 4. Teor de compostos fenólicos totais determinados no processo de otimização de extração das três sementes oleaginosas utilizando etanol.

Ensaio	Condições de extração	mg equivalente de ácido gálico/100 g de castanha-do-brasil*	mg equivalente de ácido gálico/100 g de castanha de caju crua*	mg equivalente de ácido gálico/100 g de noz pecã*
1	80:20; 40 min.	45,29±0,50	50,17± 1,05	262,66± 18,91
2	80:20; 20 min.	43,28±0,98	49,10±1,35	249,23± 34,89
3	60:40; 40 min.	49,32±1,78	52,83± 2,57	289,16± 23,68
4	60:40; 20 min.	49,11±2,36	52,54± 1,62	266,29± 20,88
5, 7 e 11 (C)	70:30; 30 min.	45,29±2,81	51,53± 2,53	283,09± 33,29
6	70:30; 44.14 min.	48,41±1,47	54,10± 1,80	259,47± 31,43
8	70:30; 15.86 min.	47,31±1,37	50,86± 1,25	277,32± 6,56
9	55,86: 44,14; 30 min.	51,85±2,30	50,82± 1,55	273,14± 13,54
10	84,14: 15,86; 30 min.	40,04±1,28	44,24± 2,34	265,61± 19,23

\* Resultados expressos em média ± desvio padrão

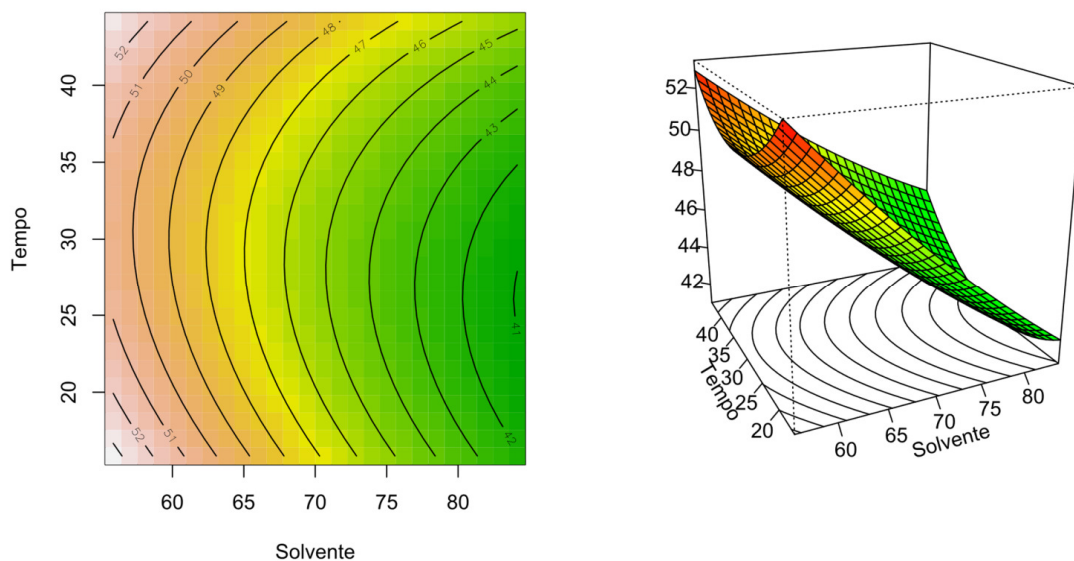
Tabela 5. Efeito dos fatores no teor dos compostos fenólicos totais utilizando-se etanol como solvente.

Fatores	Castanha-do-brasil	Castanha de caju crua	Noz pecã
	Valor p		
Solvente	0,000	0,000	0,222
Tempo	0,289	0,092	0,800
Interação	0,472	0,747	0,760

O maior teor de compostos fenólicos totais da castanha-do-brasil com a utilização do etanol foi com 55,86% do solvente e 30 minutos de extração. Para a castanha de caju crua, o maior teor obtido foi com 70% do solvente e 44,14 minutos de extração. Em relação à noz pecã, o maior teor encontrado foi com 60% do solvente e 40 minutos de extração.

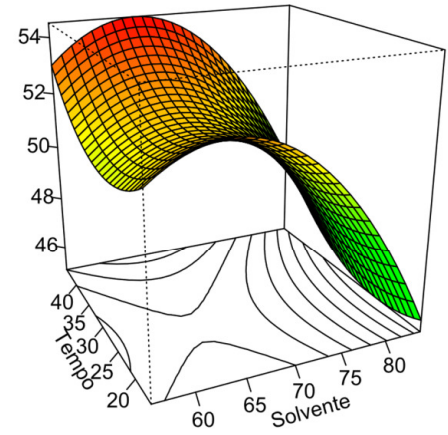
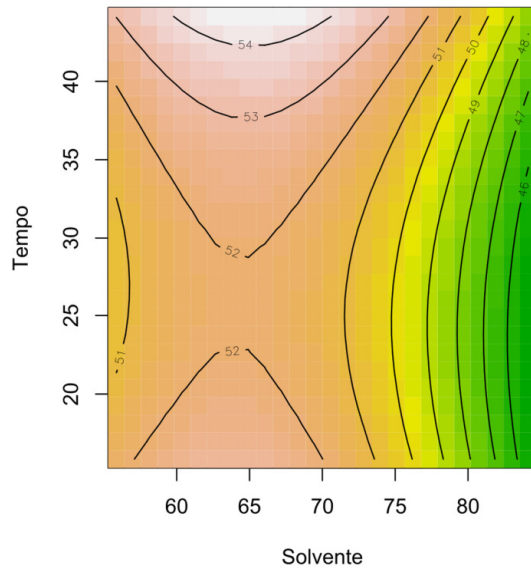
Apenas o fator solvente demonstrou influência na resposta experimental relacionada aos compostos fenólicos totais na castanha-do-brasil e na castanha de caju crua. No entanto, o fator solvente, assim como nenhum outro foi relevante para os compostos fenólicos da noz pecã. As superfícies de resposta da extração com etanol podem ser conferidas nas figuras 3 A), 3 B) e 3 C).

A)



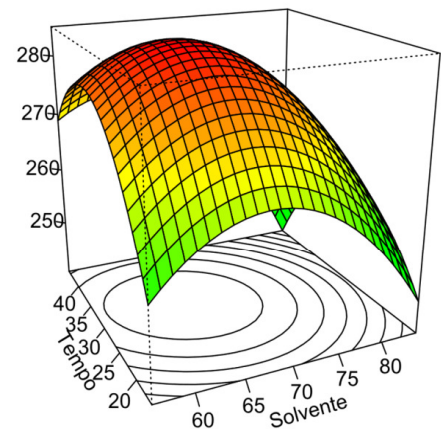
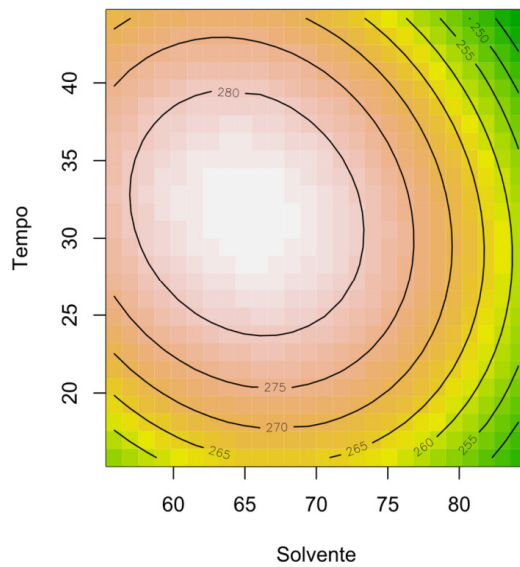
$$\beta = 45,29 - 3,32 x_1 + 0,47 x_2 + 0,45 x_1 x_2 + 0,29 x_1^2 + 1,25 x_2^2$$

B)



$$\beta = 51,53 - 1,93 x_1 + 0,74 x_2 + 0,20 x_1 x_2 - 1,71 x_1^2 + 0,76 x_2^2$$

C)



$$\beta = 283,09 - 6,78 x_1 + 1,38 x_2 - 2,36 x_1 x_2 - 7,37 x_1^2 - 7,86 x_2^2$$

Figura 3. Superfície de resposta dos compostos fenólicos totais da castanha-do-brasil A), castanha de caju crua B) e noz pecã C) utilizando o etanol como solvente.

Tabela 6. Teor de compostos fenólicos totais da otimização de extração das três sementes oleaginosas utilizando acetona.

Ensaio	Condições de extração	mg equivalente de ácido gálico.100 g <sup>-1</sup> de castanha-do-brasil*	mg equivalente de ácido gálico.100 g <sup>-1</sup> de castanha de caju crua*	mg equivalente de ácido gálico.100 g <sup>-1</sup> de noz pecã*
1	80:20; 40 min.	40,04±2,38	31,65± 3,14	509,26± 81,68
2	80:20; 20 min.	39,72±3,27	29,37±2,79	509,80± 27,57
3	60:40; 40 min.	49,62±1,89	44,05± 1,70	536,35± 39,96
4	60:40; 20 min.	50,59±0,70	41,66± 1,81	548,52± 28,35
5, 7 e 11 (C)	70:30; 30 min.	45,37±2,69	39,56± 3,02	559,13± 32,87
6	70:30; 44.14 min.	45,31±1,80	41,41± 1,18	563,43± 35,57
8	70:30; 15.86 min.	45,08±1,90	38,27± 0,26	555,82± 19,61
9	55,86: 44,14; 30 min.	51,29±0,12	41,64± 1,53	542,19± 24,72
10	84,14: 15,86; 30 min.	36,96±1,14	26,64± 2,49	498,72± 66,05

\* Resultados expressos em média ± desvio padrão

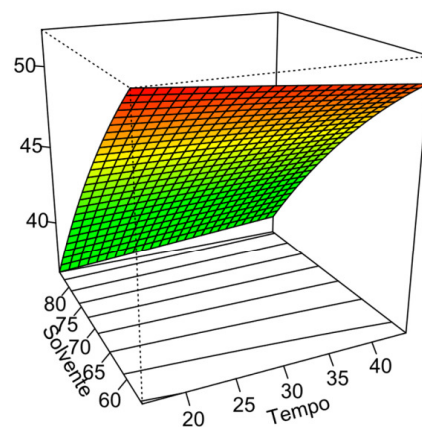
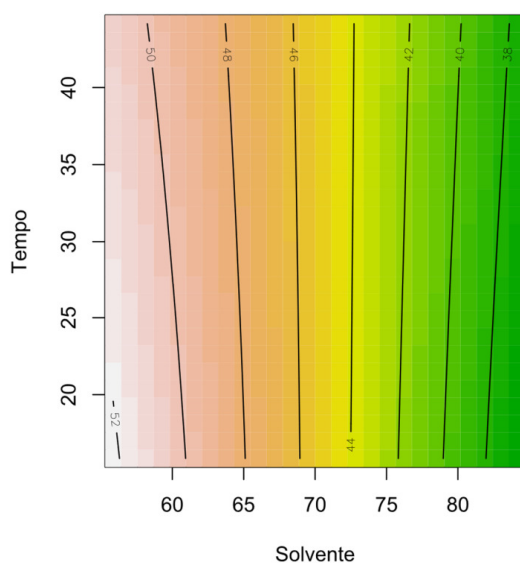
Tabela 7. Efeito dos fatores no teor dos compostos fenólicos totais utilizando-se acetona como solvente.

Fatores	Castanha-do-brasil	Castanha de caju crua	Noz pecã
	Valor p		
Solvente	0,000	0,000	0,061
Tempo	0,926	0,024	0,976
Interação	0,593	0,967	0,802

Utilizando-se acetona como solvente, o maior teor de compostos fenólicos totais da castanha-do-brasil foi obtido com 55,86% (acetona:água) e com 30 minutos de extração. A castanha de caju crua obteve seu maior teor com 60% (acetona:água) e com 40 minutos de extração e a noz pecã com 70% (acetona:água) e com 40 minutos.

O fator solvente foi relevante quanto a resposta dos compostos fenólicos da castanha-do-brasil foi o solvente. No caso da castanha de caju, o solvente e o tempo de extração interferiram na resposta e para a noz pecã nenhum fator foi observado. As superfícies de resposta da extração com acetona podem ser conferidas nas figuras 4 A), 4 B) e 4 C).

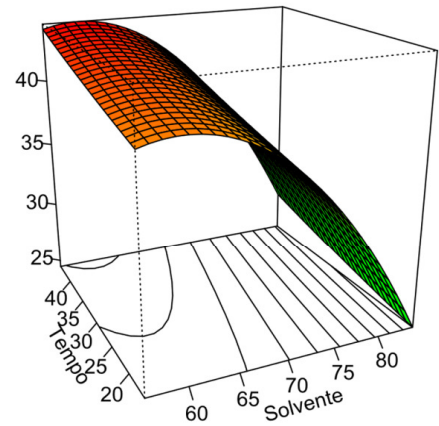
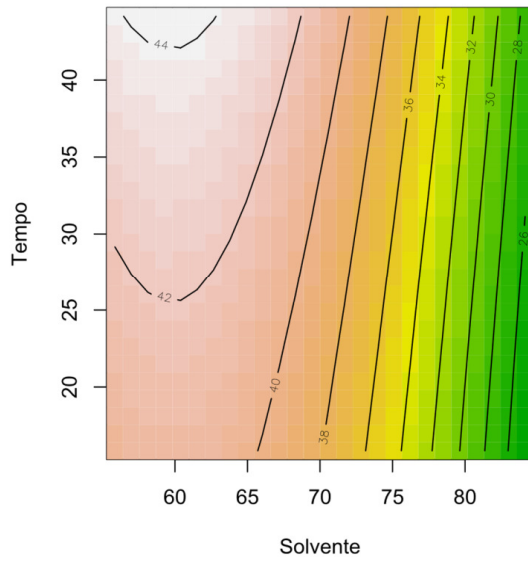
A)



$$\beta = 45,37 - 5,09 x_1 - 0,04 x_2 + 0,32 x_1 x_2 - 0,54 x_1^2 - 0,01 x_2^2$$

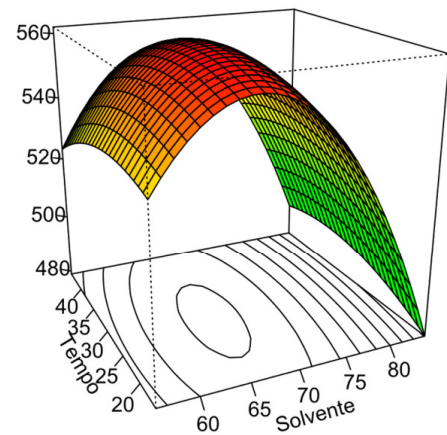
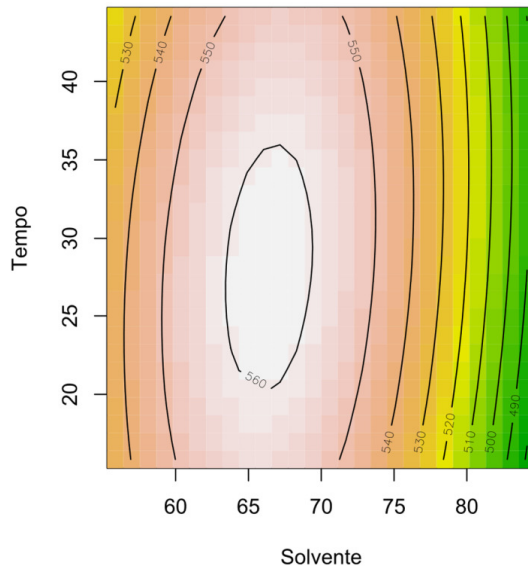


B)



$$\beta = 39,56 - 5,74 x_1 + 1,14 x_2 - 0,03 x_1 x_2 - 2,79 x_1^2 + 0,06 x_2^2$$

C)



$$\beta = 559,13 - 15,91 x_1 - 0,24 x_2 + 2,91 x_1 x_2 - 22,86 x_1^2 - 3,27 x_2^2$$

Figura 4. Superfície de resposta dos compostos fenólicos totais da castanha-do-brasil A), castanha de caju crua B) e noz pecã C) utilizando a acetona como solvente.

De acordo com o ponto máximo encontrado (Tabela 8), as extrações foram realizadas com o solvente que apresentou maior extração de compostos fenólicos totais. Sendo assim, a castanha-do-brasil e a castanha de caju crua foram extraídas com etanol e a noz pecã com acetona.

Tabela 8. Pontos de máximo da extração dos compostos fenólicos totais das castanhas do Brasil e de caju crua e da noz pecã.

Tipo	Solvente	Ponto de máximo na área avaliada	
		Solvente (%)	Tempo de extração (min.)
Castanha- do- Brasil	Etanol	55,56	15,86
	Acetona	55,56	15,86
Castanha de caju crua	Etanol	70,00	44,14
	Acetona	55,56	44,14
Noz pecã	Etanol	65,14	31,61
	Acetona	66,39	28,02

A etapa da extração dos compostos bioativos é de suma importância para o êxito da análise a qual se pretende submetê-los e conseqüentemente, dos resultados obtidos. Essa etapa visa vários propósitos, como a remoção de interferentes da amostra, o aumento da concentração do composto de interesse, a transformação do composto para uma forma mais apropriada ao método analítico, a eliminação de variações da matriz da amostra que prejudiquem a robustez e reprodutibilidade do método analítico (120-122).

Alguns fatores contribuem para a eficiência da extração dos compostos fenólicos, como a temperatura, a solubilidade do analito, a transferência de massa entre o soluto e o solvente, o tamanho das partículas do alimento, o tempo de contato das partículas com o solvente extrator, a interação com interferentes da amostra (65,123-124).

O solvente é considerado o fator principal responsável pela eficiência da extração dos compostos bioativos. Portanto, algumas características devem ser observadas para a sua escolha: a) a afinidade molecular com o soluto (polaridade); b) a alta seletividade para o composto de interesse; c) a capacidade de proporcionar a transferência de massa; d) a necessidade da utilização de um co-solvente; e) a toxicidade ambiental e humana; f) a viabilidade financeira (121,125).

Muitos trabalhos têm utilizado o etanol como solvente extrator de compostos fenólicos, estando entre as vantagens de sua utilização a baixa toxicidade e o baixo custo (125-127).

O etanol é completamente solúvel em água, assim como o metanol. No entanto, a toxicidade do primeiro é bem mais baixa do que a do segundo. Isso ocorre devido ao ácido fórmico, um metabólito tóxico formado enzimaticamente quando o metanol sofre oxidação (126,128-130).

A propanona, mais conhecida como acetona, é bastante utilizada como solvente. Quando pura, não possui a habilidade de formar ligações de hidrogênio, porém, devido ao fato do átomo de oxigênio presente na estrutura da sua molécula formar ligações fortes com o hidrogênio da molécula da água, sua solubilidade torna-se completa, comparável a dos alcoóis (128,131).

A solubilidade dos compostos fenólicos está relacionada aos arranjos de estrutura química, a qual apresenta uma porção polar, o grupo hidroxila (OH), e outra apolar, o anel aromático, e também às ligações de hidrogênio estabelecidas com as moléculas do solvente (131-132).

As ligações de hidrogênio formadas entre o hidrogênio presente no grupo hidroxila (OH) tanto dos compostos fenólicos quanto dos alcoóis, como o

etanol, e o oxigênio eletronegativo também presente nas duas substâncias, facilita a solubilização dos compostos fenólicos (132).

Quadro 1. Condições utilizadas para a extração de compostos fenólicos totais de acordo com o tipo de semente oleaginosa.

Semente	Solvente	Solvente (%)	Tempo de extração (min.)
Castanha-do-brasil	Etanol	55,56	15'51"
Castanha de caju crua	Etanol	70,00	44'14"
Noz pecã	Acetona	66,39	28'01"

A concentração de água juntamente com os solventes também apresentou influência sobre a obtenção dos compostos fenólicos, sendo observado que em alguns casos, como da castanha-do-brasil, sua maior concentração foi favorável para essa finalidade. Esse fato pode ser explicado pela propriedade da hidrossolubilidade que os compostos fenólicos apresentam, estando condicionada a alguns fatores como a polaridade do solvente, ao grau de polimerização, a interação com outros componentes e a formação de complexos insolúveis (65,67).

Informações da literatura que abordam a extração de compostos fenólicos indicam que extrações realizadas apenas com o solvente absoluto não se mostram eficientes para esta finalidade. Em uma mistura hidroalcoólica, a água além de propiciar um meio com maior polaridade, exerce também o papel de facilitar a penetração do solvente na matriz através da expansão de seu tecido vegetal, ocasionando melhora na extração (132-135).

A solução aquosa da acetona tem sido apontada como a mais eficiente para a extração de taninos, o que pode ser observado em relação à noz pecã, que contém altos teores dessas substâncias e apresentou melhor extratibilidade nesse solvente (134,136-138).

O período de tempo destinado à extração de compostos fenólicos é outro fator relevante, considerando que a exposição constante a certas temperaturas pode contribuir para o aumento do rendimento dos compostos ou pode ocasionar sua degradação devido a longa exposição ao oxigênio e a luz. Esse fato pode ser observado na castanha-do-brasil e na noz pecã, que obtiveram seus pontos máximos de extração abaixo do tempo máximo testado (133-135,139).

### 5.2.1. Compostos fenólicos totais

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados decorrentes da extração de compostos fenólicos, considerando-se as condições indicadas para o processo extrativo.

Tabela 9. Teor de compostos fenólicos totais da castanha-do-brasil e de caju crua e da noz pecã em mg .100 g<sup>-1</sup>.

Oleaginosa	mg equivalente de ácido gálico.100 g <sup>-1</sup>
Castanha-do-brasil	66,40±7,37 <sup>b</sup>
Castanha de caju crua	64,01±6,07 <sup>b</sup>
Noz pecã	776,72±106,52 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas entre os resultados de acordo com o método GEE ( $\alpha=5\%$ ).

A noz pecã apresentou valor bem acima das outras oleaginosas estudadas, apresentando diferença significativa em relação às demais e com

isso evidenciando sua importância como fonte de compostos fenólicos. O contrário ocorreu com a castanha de caju crua que apresentou a menor quantidade entre as três sementes analisadas.

Os compostos fenólicos possuem influência algumas sobre algumas características sensoriais dos alimentos, como o aroma, adstringência, coloração (63,67,74-75).

Os teores de compostos fenólicos da castanha-do-brasil e de caju crua ficaram abaixo do encontrado dos seguintes trabalhos. Abe et al. (57) encontraram  $106 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  e Gomes & Torres (135)  $182 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  na castanha-do-brasil, enquanto que Chandrasekara e Shahidi (46) e Abe et al. (57) encontraram, respectivamente,  $114 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  e  $381 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  na castanha de caju crua. Em relação à noz pecã, o valor encontrado apresentou-se acima ao de Abe et al. (57),  $703 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Essas diferenças podem ser explicadas devidas às várias formas de extração dos compostos fenólicos entre os trabalhos, como a utilização de solventes e temperaturas diferentes.

Outros fatores também podem contribuir para o teor dos compostos fenólicos, como a variedade da planta, a exposição à luz solar, o grau de maturação, a forma de armazenamento e principalmente, por condições climáticas e fatores genéticos (61,67,137,140).

A temperatura é outro fator que pode influenciar quantitativamente e qualitativamente os compostos fenólicos. Temperaturas acima de  $60^\circ\text{C}$  podem degradar os compostos fenólicos, prejudicando o rendimento no processo de extração e posteriormente, na capacidade antioxidante (67,133,135,141-142). Diante disso, optou-se nesse trabalho pela utilização de temperatura a  $30^\circ\text{C}$  para a extração dos compostos fenólicos.

Dentre as oleaginosas analisadas nesse estudo, a castanha de caju é a única que possui a necessidade de passar por tratamento térmico para estar apta ao consumo (36). Temperaturas altas utilizadas nesse processo podem favorecer maior rendimento na extração de alguns tipos de compostos fenólicos presentes na castanha de caju (46).

Outro aspecto que pode ser levado em consideração é a interação dos compostos fenólicos com os demais nutrientes presentes nos alimentos, principalmente com as macromoléculas. O complexo formado entre os compostos fenólicos e os macronutrientes pode ter efeitos sobre a bioacessibilidade, a biodisponibilidade e a atividade biológica dos primeiros (56).

Alterações sensoriais são relatadas devido à interação com carboidratos, como a diminuição na adstringência ocasionada pela formação de um complexo entre pectina e taninos (56,143-145).

O complexo formado com as proteínas tem impacto negativo na biodisponibilidade e na atividade biológica dos compostos fenólicos. Algumas características dos compostos fenólicos facilitam a formação de complexo com as proteínas, como o peso molecular, a flexibilidade e o número de grupos OH presentes na molécula. Fatores externos também favorecem essa interação, como a temperatura, o pH, a concentração de sal (145-146).

O ensaio de Folin-Ciocalteu possui como desvantagem a possibilidade de interagir com outros componentes presentes na amostra, o que pode superestimar o teor dos compostos fenólicos. Dentre esses componentes estão as proteínas, o que pode afetar a quantificação dos compostos fenólicos nas sementes oleaginosas, já que apresentam quantidade considerável desse nutriente (65,81).

### 5.3. Capacidade Antioxidante

Os ensaios do ABTS e DPPH são baseados na reação química que consiste na transferência de elétron (ET), onde ocorre uma reação entre um redutor (antioxidante) e um oxidante (radical livre) que é um indicador do ponto final da reação, através da mudança de coloração (147).

Na Tabela 10 apresentam-se os resultados da capacidade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH em  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox por grama de oleaginosa.

Tabela 10. Capacidade antioxidante em equivalente Trolox expresso em  $\mu\text{mol}$  por grama de oleaginosa.

Oleaginosa	ABTS $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox. $\text{g}^{-1}$ *	DPPH $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox. $\text{g}^{-1}$ *
Castanha-do-brasil	$23,32 \pm 1,91^b$	$1,20 \pm 0,20^c$
Castanha de caju crua	$24,49 \pm 2,64^b$	$2,81 \pm 0,33^b$
Noz pecã	$238,17 \pm 25,43^a$	$142,12 \pm 16,72^a$

\*Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas entre os resultados de acordo com o método GEE ( $\alpha=5\%$ ).

Os resultados obtidos através do ensaio com o radical ABTS mostraram que não houve diferença significativa entre as castanhas, que por sua vez foram significativamente menores que a capacidade antioxidante da noz pecã.

O valor de trolox equivalente encontrado na castanha-do-brasil utilizando o ensaio ABTS está acima do encontrado por Gomes e Torres (135),  $4,07 \mu\text{mol.g}^{-1}$ . Alguns fatores que podem ter influência nessas diferenças observadas são a variedade, a safra e o armazenamento das sementes oleaginosas.



A forma de extração dos compostos fenólicos também interfere na sua capacidade antioxidante. O tempo de extração, temperatura utilizada e a concentração do solvente são alguns dos fatores que devem ser considerados (135).

A polaridade do solvente possui papel importante no mecanismo de transferência de elétrons e átomos de hidrogênio. No caso do ensaio do ABTS e do DPPH, solventes polares mostram-se melhores na resposta da capacidade antioxidante (148).

A capacidade antioxidante demonstrada através do ensaio com o radical DPPH indicou diferença significativa entre as três sementes oleaginosas. Da mesma forma que ocorreu com o ensaio com o radical ABTS, a noz pecã foi a que apresentou maior capacidade antioxidante.

Estudo realizado por Abe et al. (57) utilizando o método do DPPH indicaram quantidade maior de equivalente trolox na castanha-do-brasil,  $2,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$ . Na castanha de caju crua, o mesmo estudo encontrou  $3,0 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , valor aproximado ao encontrado nesse presente estudo e  $58 \mu\text{mol.g}^{-1}$  na noz pecã, apresentando valor bem inferior comparado a esse estudo. Assim como ocorreu no teor de compostos fenólicos totais, as diversas formas de extração dos trabalhos podem estar relacionadas a esses resultados.

Algumas características da estrutura química dos flavonoides favorecem sua atividade antioxidante, como a presença de uma hidroxila (OH) ligada ao carbono da posição C4' do anel B ou ligada ao carbono da posição C3 do anel C (67,73,149).

As sementes oleaginosas analisadas possuem teor considerável de proteína, principalmente as castanhas. Como já mencionado anteriormente, a interação com as proteínas pode afetar a atividade biológica dos compostos

fenólicos, incluindo sua capacidade antioxidante e que pode ser um fator que contribua para os resultados encontrados (146,150).

A correlação entre a capacidade antioxidante e os compostos fenólicos totais das sementes oleaginosas obteve resultado significativo e positivo tanto para o ensaio com DPPH ( $r=0,71$ ;  $p < 0,0001$ ) quanto para o ABTS ( $r=0,90$ ;  $p < 0,0001$ ). A ação antioxidante dos compostos fenólicos acontece quando há a doação do elétron do grupo OH para o radical livre, estabilizando-o e impedindo sua reação em cadeia (67).

Os compostos fenólicos atuam na eliminação de radicais peroxil que causam a peroxidação lipídica, o que pode favorecer a proteção dos lipídeos que são componentes majoritários nas sementes oleaginosas. O grupo OH da estrutura fenólica possui a propriedade de se ligar íons como o ferro e o cobre, causando a quelatação, que é uma forma pouco ativa, impedindo a reação desses íons com outras moléculas, gerando radicais livres (3).

#### *5.4. Compostos fenólicos individuais*

Os cromatogramas da castanha-do-brasil, da castanha de caju crua e da noz pecã podem ser observados nas figuras 5, 6 e 7 abaixo.

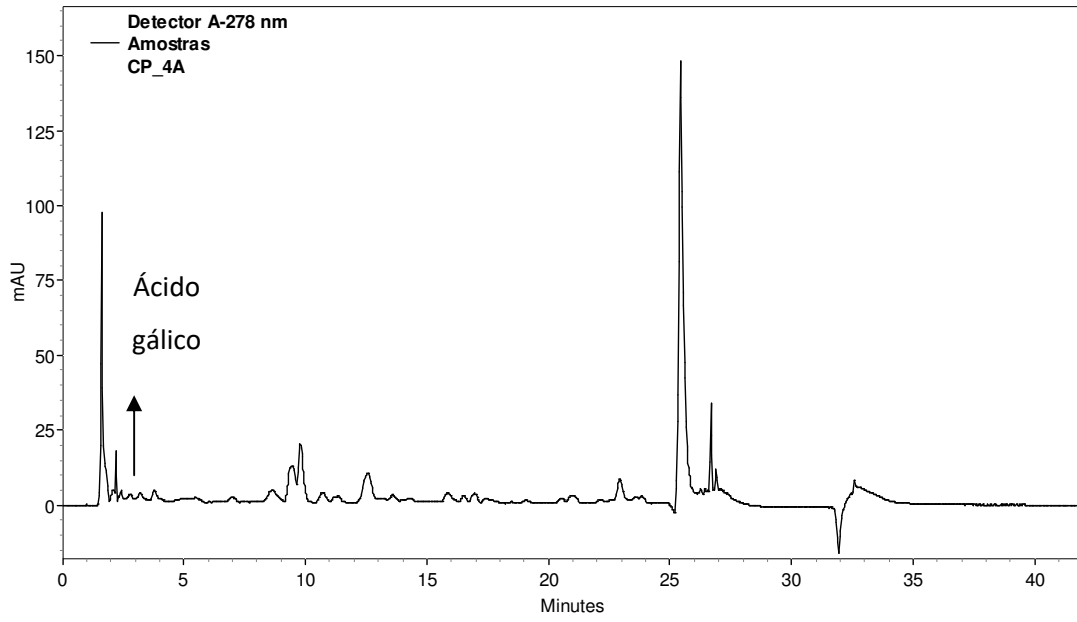


Figura 5. Cromatograma castanha-do-brasil.

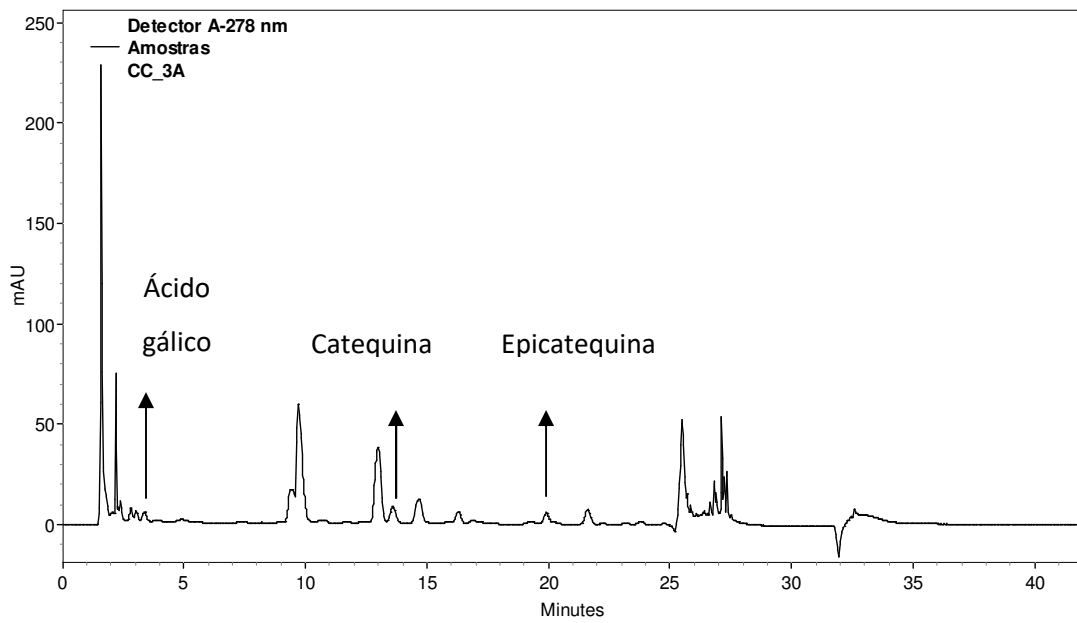


Figura 6. Cromatograma da castanha de caju crua.

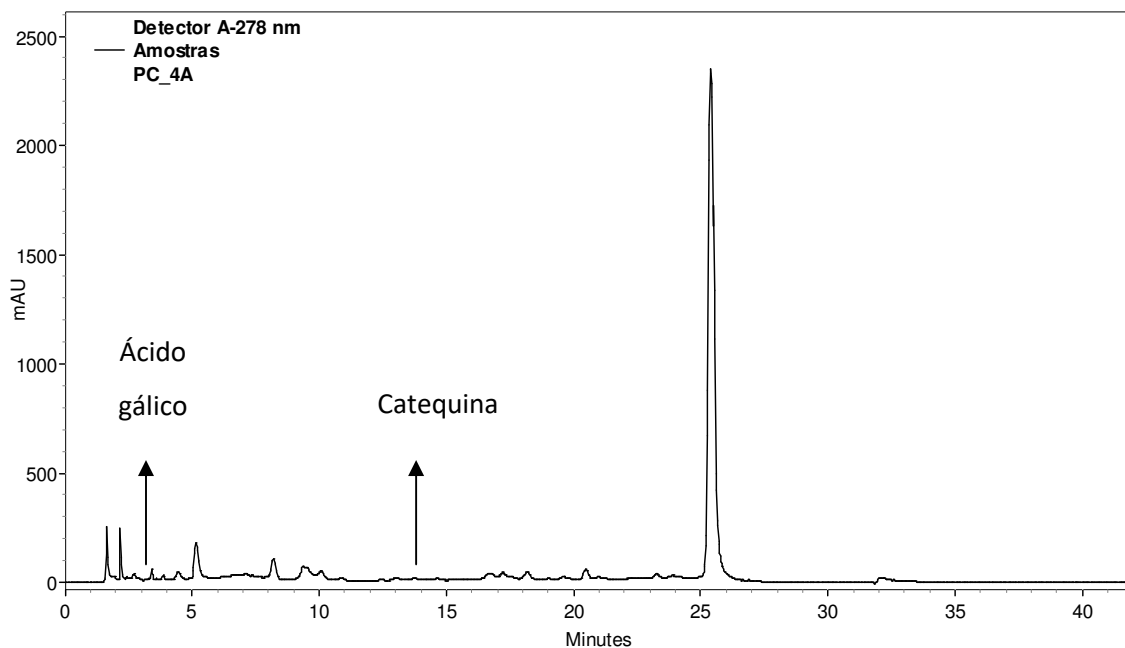


Figura 7. Cromatograma da noz pecã.

Tabela 11. Tempo de retenção e espectro máximo UV dos padrões dos compostos fenólicos analisados por HPLC-DAD.

Composto fenólico	Tempo de retenção (min.)	Espectro máximo UV (nm)
Ácido gálico	3,39	269
Catequina	13,49	233
Epicatequina	19,79	233

De acordo com os cromatogramas pode ser verificado que há indício que alguns compostos estejam presentes, porém devida à baixa concentração

das amostras houve dificuldade na confirmação da presença dos mesmos perante os espectros de ultravioleta.

Os compostos fenólicos que foram identificados são o ácido gálico, presente nas três sementes oleaginosas; a catequina na castanha-do-brasil e na castanha de caju crua e a epicatequina na castanha de caju crua.

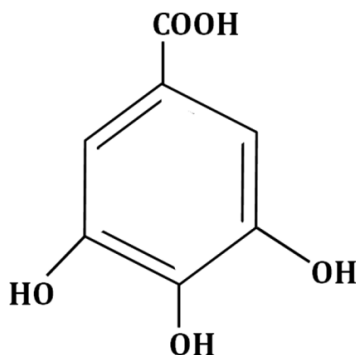


Figura 10. Estrutura do ácido gálico (151).

Algumas fontes de ácido gálico são folhas de chá verde e branco, mirtilo, cravo, nozes e uva. Estudos realizados com esse ácido fenólico indicam propriedades como a antioxidante, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, anticâncer, neuroprotetiva (5,151,153).

Em relação à sua capacidade antioxidante, alguns trabalhos realizados mostram que é potencializada na presença de açúcares, o que reforça a importância de seu consumo em frutas (77).

A catequina e a epicatequina são flavonoides pertencentes ao grupo flavanóis que podem assumir a forma monomérica livre, como também associadas entre si, compondo os taninos condensados (61,67).

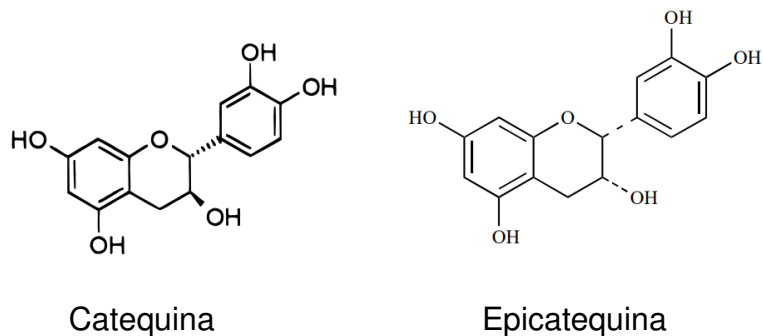


Figura 11. Estrutura da catequina e da epicatequina (64,154).

De acordo com estudos realizados, a catequina apresenta várias propriedades que beneficiam a saúde humana, como anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antitrombótica, redutora da absorção de gordura e dos níveis de colesterol no plasma sanguíneo (154-155).

A capacidade antioxidante do ácido gálico é maior do que a da epicatequina e da catequina, 3,01, 2,5 e 2,4 mM equivalente trolox, respectivamente. O galato de epicatequina e o galato de epigalocatequina possuem uma ligação de esterificação com o ácido gálico no 3-hidroxil de suas estruturas, o que favorece o aumento significativo da capacidade antioxidante, respectivamente 4,9 e 4,8 mM equivalente trolox (70,154,156).

O ácido gálico e a catequina são solúveis em água. A quantidade de grupos hidroxilas presentes em suas estruturas é fundamental para a solubilidade, visto que formam mais ligações de hidrogênio com a água (157-159). Essa propriedade dos compostos fenólicos é uma condição necessária para que sejam armazenados no vacúolo celular da planta, protegendo assim os compostos e impedindo-os de interagirem com as macromoléculas (76,160-161).

Nos cromatogramas da castanha-do-brasil e da noz pecã é possível observar a presença de um composto com intensidade de sinal alta no tempo de retenção a partir de 25 minutos. De acordo com o tempo de retenção, pode-se deduzir tratar-se do ácido ferúlico, porém, análises mais aprofundadas são necessárias para confirmar sua identidade. Nota-se que esse composto possui maior intensidade na noz pecã.

O ácido ferúlico, também conhecido como ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico, possui função antioxidante devida à presença de um grupo metoxil ( $\text{OCH}_3$ ) e de um grupo hidroxila ( $\text{OH}$ ) no anel benzênico. O grupo carboxílico também presente em sua molécula auxilia na proteção contra a peroxidação lipídica, o que pode ser um fator benéfico para os lipídeos presentes nas sementes oleaginosas (162-163).

A possível presença do ácido ferúlico na noz pecã pode ser uma condição que favoreça o entendimento de sua capacidade antioxidante demonstrada em relação à castanha-do-brasil e castanha de caju, já que esse composto possui intensidade de sinal bem maior quando comparado aos cromatogramas das outras duas sementes.

## **6. Conclusão**

A otimização do processo extrativo dos compostos fenólicos mostrou que as melhores condições para a castanha-do-brasil foi o etanol 55,56% e tempo 15'51", para a castanha de caju crua foi o etanol 70% e tempo 44'14", para a noz pecã a acetona 66,39% e tempo 28'01". A polaridade, proporcionada pela presença da água, contribuiu de forma significativa para a eficiência das extrações. O teor de compostos fenólicos não diferiu entre a

castanha-do-brasil e a castanha de caju crua, 66,40 e 64,01 mg.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. A noz pecã destacou-se pelo seu alto teor de compostos fenólicos, 776,72 mg.100g<sup>-1</sup>, diferindo significativamente das castanhas.

A capacidade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS não mostrou diferença significativa entre a castanha-do-brasil e a castanha de caju crua, 23,32 e 24,49 µmol equivalente Trolox.g<sup>-1</sup>, respectivamente. No ensaio DPPH houve diferença significativa entre as castanhas, 1,20 µmol equivalente Trolox.g<sup>-1</sup> na castanha-do-brasil e 2,81 µmol equivalente Trolox.g<sup>-1</sup>. A noz pecã apresentou diferença significativa em relação às castanhas nos dois ensaios realizados, 238,17 µmol equivalente Trolox.g<sup>-1</sup> no ABTS e 142,12 µmol equivalente Trolox.g<sup>-1</sup> no DPPH. A correlação entre o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante foi positiva e significativa.

Os compostos fenólicos identificados por CLAE nas sementes oleaginosas foram o ácido gálico, a catequina e a epicatequina, sendo observada a presença do ácido gálico nas três sementes oleaginosas.

A noz pecã destacou-se em relação às castanhas devido ao teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, reforçando a necessidade de mais estudos com essa semente, visto que ainda são escassos.

## **7. Referências**

- (1) Karakaya S, El SN, Tas AA. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *Int J Food Sci Nutr.* 2001; 52 (6): 501-508.
- (2) Johnson R, Bryant S, Huntley AL. Green tea and green tea catechin extracts: an overview of the clinical evidence. *Maturitas* 2012; 73: 280-287.



- (3) Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4. ed. New York: Oxford University Press; 2007. cap.1, 3
- (4) Mandel S, Youdim MBH. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 2004; 37 (3): 304-317.
- (5) Subramanian AP, John AA, Vellayappan MV, Balaji A, Jaganathan SK, Supriyanto E et al. Gallic acid: prospects and molecular mechanisms of its anticancer activity. *RSC Adv.* 2015; 5: 35608-35621.
- (6) Federação Das Indústrias Do Estado De São Paulo (FIESP). FIESP reúne indústria de alimentos, cosméticos e fármacos com produtores de nozes e castanhas. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/noticias/fiesp-reune-industria-de-alimentos-cosmeticos-e-farmacos-com-produtores-de-nozes-e-castanhas>. Acesso em: 29 jul. 2016.
- (7) Davis L, Stonehouse W, Loots DT, Mukuddem-Petersen J, Van Der Westhuizen FH, Hanekom SM, Jerling JC. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. *Eur J Nutr* 2007; 46: 155–164.
- (8) Bolling BW, Chen CYO, McKay DL, Blumberg JB. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutr Res Rev.* 2011; 24: 244–275.
- (9) Costa T, Jorge N. Compostos bioativos benéficos presentes em castanhas e nozes. *UNOPAR Cient., Ciênc. biol. Saúde* 2011; 13 (3): 195-203.
- (10) Essa MM, Subash S, Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Al-Adawi S, Guillemin GJ, Thenmozhi AJ. Dietary supplementation of walnut partially reverses 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced

neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2015; 40: 1283-1293.

(11) Kornsteiner M, Wagner KH, Elmadfa I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem.* 2006; 98: 381–387.

(12) Alasalvar C, Shahidi F. Natural antioxidants in tree nuts. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2009; 111: 1056-1062.

(13) Vadivel V, Kunyanga CN, Biesalski HK. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. *Nutrition* 2012; 28:1089-1097.

(14) Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr* 2004; 55 (3): 171-178.

(15) Fernandes P, Cabral JMS. Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresour Technol* 2007; 98: 2335–2350.

(16) Costa PA, Ballus CA, Teixeira-Filho J, Godoy HT. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Res Int.* 2010; 43: 1603–1606.

(17) Mackay DS, Jones PJH. Phytosterols in human nutrition: Type, formulation, delivery, and physiological function. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2011; 113: 1427–1432.

(18) Scholz B, Guth S, Engel KH, Steinberg P. Phytosterol oxidation products in enriched foods: occurrence, exposure, and biological effects. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59: 1339–1352.

(19) International Nut & Dried Fruit (INC). Nuts & dried fruits statistical yearbook 2016/2017. Disponível em:

[https://www.nutfruit.org/files/multimedia/1510229514\\_1497859419\\_Statistical\\_Yearbook\\_2016-2017.pdf](https://www.nutfruit.org/files/multimedia/1510229514_1497859419_Statistical_Yearbook_2016-2017.pdf). Acesso em: 9 mar. 2018.

(20) Federação Das Indústrias Do Estado De São Paulo (FIESP). Produção de castanhas e nozes no Brasil está aquém de seu potencial, dizem especialistas. FIESP, 19/10/2017. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/noticias/producao-de-castanhas-e-nozes-no-brasil-esta-aquem-de-seu-potencial-dizem-especialistas/>. Acesso em: 10 mar. 2018.

(21) Müller CH, Figueirêdo FJC, Kato AK, Carvalho JEU, Stein RLB, Silva AB. Coleção Plantar: castanha-do-brasil. Brasília: EMBRAPA, 1995.

(22) Tonini H. Castanheira-do-brasil: uma espécie chave na promoção do desenvolvimento com conservação. Centro de Inteligência em Florestas, jun. 2007. Disponível em: RL: [www.ciflorestas.com.br/conteudo.php?id=102](http://www.ciflorestas.com.br/conteudo.php?id=102). Acesso em: 27 jul. 2016.

(23) Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). Produção da extração vegetal e da silvicultura: 2016. Rio de Janeiro: IBGE, v. 31, 2017.

(24) Martins L, Silva ZPG, Silveira BC. Produção e comercialização da castanha do brasil (*bertholletia excelsa*, h.b.k) no Estado do Acre - Brasil, 1998-2006. In: Congresso Da Sociedade Brasileira De Economia, Administração E Sociologia Rural, 46, 2008, Rio Branco.

(25) Núcleo De Estudos E Pesquisas Em Alimentação (NEPA). Tabela brasileira de composição de alimentos. 4. ed. Campinas: NEPA, UNICAMP, 2011. 161 p.

(26) Ferreira ES, Silveira CS, Lucien VG, Amaral AS. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). Nutr. Alim Araraquara 2006 abr./jun.; 17 (2): 203-208.

- (27) Secor CL, Lisk DJ. Variation in the selenium content of individual Brazil nuts. *J Food Safe*. 1989; 9: 279-281.
- (28) Burk RF. Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care* 2002; 5 (2): 75-79.
- (29) Chunhieng T, Pétritis K, Elfakir C, Brochier J, Goli T, Montet D. Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 4318-4322.
- (30) Singh S, Singh RP. In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Rev Int*. 2008; 24; 392–415.
- (31) Yang J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. *LWT-Food Sci Technol* 2009; 42: 1573–1580.
- (32) Ferrari CKB, Percário S, Silva JCCB, Torres EAFS. An apple plus a brazil nut a day keeps the doctors away: antioxidant capacity of foods and their health benefits. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 189-195.
- (33) Ryan E, Galvin K, O'Connor TP, Maguire AR, O'Brien NM. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *J Food Sci Nutr* 2006; 57 (3/4): 219-228.
- (34) John J A, Shahidi F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *J Funct Foods* 2010; 2: 196-209.
- (35) Borges TH, Rodrigues N, Souza AM, Pereira JA. Effect of different extraction conditions on the antioxidant potential of baru almonds (*Dipteryx alata* Vog.): comparison to common nuts from Brazil. *J Food Nutr Res*. 2014; 53 (2): 180–188.
- (36) Paiva FFA, Silva Neto RM, Pessoa PFAP, Leite LAS. *Processamento de castanha de caju*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 53p.

(37) Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Sistema de produção do caju. 2.ed. Jul./2016. Disponível em: [https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=7705&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicold=10308](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=7705&p_r_p_-996514994_topicold=10308).

Acesso em: 11 mar. 2018.

(38) Trevisan MTS, Pfundstein B, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 188–197.

(39) Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Caboni MF. Chromatographic techniques for the determination of alkyl-phenols, tocopherols and other minor polar compounds in raw and roasted cold pressed cashew nut oils. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 7411-7417.

(40) Sindicato das Indústrias de Beneficiamento de Castanha de Caju e Amêndoas Vegetais do Estado do Ceará (SINDICAJU). Perfil do setor. Disponível em: <http://sindicaju.org.br/perfil-do-setor/perfil-do-setor/>. Acesso em: 21 jul. 2016.

(41) Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes 2016. Rio de Janeiro: IBGE, v. 43, 2017.

(42) Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). Mercado da castanha de caju. 2016. Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/mercado-da-castanha-de-caju/>. Acesso em: 21 jul. 2016.

- (43) Melo MLP, Maia GA, Silva APV, Oliveira GSF, Figueiredo RW. Caracterização físico-química da amêndoa da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) crua e tostada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, mai./jul. 1998; 18 (2): 184-187.
- (44) United States Department of Agriculture. USDA Food Composition Databases. 2015. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>. Acesso em: 21 jul. 2017.
- (45) Correia SJ, David JP, David JM. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Quím. Nova* 2006; 29 (6): 1287-1300.
- (46) Chandrasekara N, Shahidi F. Effect of roasting on phenolic content and antioxidant activities of whole cashew nuts, kernels, and testa. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 5006–5014.
- (47) Ortiz ERN, Camargo LEA. Doenças da Nogueira Pecan. In: Kimati H. et al. (Eds.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 501–505.
- (48) Poletto T, Lazarotto M, Baggio C, Muniz MFB, Poletto I, Hamann J. J. et al. Análise de características dos frutos de cultivares de noqueira-pecan cultivadas no Rio Grande do Sul. In: *Simpósio De Ensino, Pesquisa E Extensão*, 16, 2012, Santa Maria.
- (49) López RR, Palafox ARN, Medina SM, Ballesteros FGD, Rivera MM. Análisis de rentabilidad del cultivo de nogal pecanero em la costa de hermosillo. *Rev. Mex. Agroneg.* jan./jun. 2014; 34: 872-882.
- (50) Haddad EH, Gaban-Chong N, Oda K, Sabaté J. Effect of a walnut meal on postprandial oxidative stress and antioxidants in healthy individuals. *Nutr. J* 2014; 4 (13): 2-9.

- (51) Domínguez-Avila JA, Alvarez-Parrilla E, López-Díaz JA, Maldonado-Mendoza IE, Gómez-García MC, Rosa LA. The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. *Food Chem.* 2015; 168: 529–537.
- (52) Calcabrini C, De Bellis R, Mancini U, Cucchiari L, Stocchi V, Potenza L. Protective effect of *Juglans regia* L. walnut extract against oxidative DNA damage. *Plant Foods Hum Nutr.* 2017; 72 (2): 192-197.
- (53) Hicyilmaz H, Vural H, Delibas N, Sutcu R, Gultekin F, Yilmaz N. The effects of walnut supplementation on hippocampal NMDA receptor subunits NR2A and NR2B of rats. *Nutr Neurosci.* 2017; 20 (3): 203-208.
- (54) Bouali L, Trabelsi H, Herchi W, Martine L, Albouchi A, Bouzaïen G et al. Analysis of pecan nut (*Carya illinoensis*) unsaponifiable fraction. Effect of ripening stage on phytosterols and phytosterols composition. *Food Chem.* 2014; 164: 309–316.
- (55) Ito H, Okuda T, Fukuda T, Hatano T, Yoshida T. Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnuts. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 672-679.
- (56) Zhang H, Yu D, Sun J, Liu X, Jiang L, Guo H et al. Interaction of plant phenols with food macronutrients: characterisation and nutritional–physiological consequences. *Nutr Res Rev.* 2014; 27: 1–15.
- (57) Abe LT, Lajolo FM, Genovese MI. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2010; 30 (Supl. 1): 254-259.

- (58) Bakkalbasi E, Yilmaz OM, Yemis O, Artik N. Changes in the phenolic content and free radical-scavenging activity of vacuum packed walnut kernels during storage. *Food Sci Technol Res*, 2013; 19: 105-112.
- (59) Bujdosó G, Végvári G, Hajnal V, Ficzek G, Tóth M. Phenolic profile of the kernel of selected persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Not Bot Horti Agrobo* 2014; 42 (1): 24-29.
- (60) Slatnar A, Mikulic-Petkovsek M, Stampar F, Veberic R, Solar A. Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.). *Food Res Int.* 2015; 67: 255–263.
- (61) Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56 (11): 317-333.
- (62) Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 2001; 126: 485-493.
- (63) Ambriz-Pérez DL, Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Heredia JB. Phenolic compounds: natural alternative in inflammation treatment. A review. *Cogent Food & Agriculture* 2016; 2: 1-14.
- (64) Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by High-Performance Chromatography: a review. *J Agric Food Chem.* 2000; 48 (3): 577-599.
- (65) Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 2004; 1054 (1-2): 95-111.
- (66) Cheynier V, Comte G, Davies Km, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem.* 2013; 73: 1-20.



- (67) Wenzel GE. Radicais livres, antioxidantes nutracêuticos: fenólicos e polifenólicos vegetais. São Leopoldo: Ed. UNISINOS, 2012.
- (68) Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006; 99: 191-203.
- (69) Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 2007; 66 (1): 1-9.
- (70) Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63 (7): 1035-1042.
- (71) Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002; 13: 572-584.
- (72) Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe DV, Vlietinck AJ. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem* 2003; 10: 1345-1359.
- (73) Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Świerczek-Zięba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 2014; 19: 78-101.
- (74) Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Trop J Pharm Res.* 2008; 7 (3): 1089-1099.
- (75) Lule SU, Xia W. Food phenolics, pros and cons: a review. *Food Rev Int* 2005; 21: 367–388.
- (76) Bueno JM, Ramos-Escudero F, Sáez-Plaza P, Muñoz AM, Navas MJ, Asuero AG. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part I: General considerations concerning polyphenols and flavonoids. *Crit Rev Anal Chem* 2012; 42: 102–125.

- (77) Roche A, Ross E, Walsh N, O'Donnell K, Williams A, Klapp M et al. Representative literature on the phytonutrients category: phenolic acids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57 (6): 1089-1096.
- (78) Lima CAA, Pastore GM, Lima EDPA. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. *Ciênc. Tecnol. Aliment. set./dez.*, 2000; 20 (3): 358-362.
- (79) Fukuda T, Ito H, Yoshida T. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 2003; 63: 795-801.
- (80) Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2103–2111.
- (81) Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 2013; 18: 2328-2375.
- (82) Regueiro J, Sánchez-González C, Vallverdú-Queralt A, Simal-Gándara J, Lamuela-Raventós R, Izquierdo-Pulido M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* 2014; 152: 340-348.
- (83) Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1997; 43 (1): 61-68.
- (84) Ribeiro SMR, Queiroz JH, Pelúzo MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci J set./dez.* 2005; 21 (3): 133-149.

- (85) Wojtunik-Kulesza K A, Oniszczyk A, Oniszczyk T, Waksmundzka-Hajnos M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomed Pharmacother* 2016; 78: 39–49.
- (86) Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014; 224: 164–175.
- (87) Tegeli V, Karpe P, Katve V. Importance of free radical and antioxidant on human health. *JPCBS* 2014; 4 (4): 1038-1050.
- (88) Miller JW, Selhub J, Joseph JA. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of *O*-methylation and melatonin. *Free Radic Biol Med* 1996; 21 (2): 241-249.
- (89) Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, Bittencourt Jr PIH. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J.* 2016; 473: 4527–4550.
- (90) Ullah A, Khan A, Khan I. Diabetes mellitus and oxidative stress: a concise review. *Saudi Pharm J* 2016; 24: 547-553.
- (91) Niemann B, Rohrbach S, Miller MR, Newby DE, Fuster V, Kovacic JC. Oxidative stress and cardiovascular risk: obesity, diabetes, smoking, and pollution. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70 (2): 230-251.
- (92) Umeno A, Bijua V, Yoshida Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. *Free Radic Res.* 2017; 51 (4): 413-427.
- (93) Food and Drug Administration (FDA). Food and drugs: food additives. 2017, abr. Título 21, v. 3.
- (94) Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *SPJ* 2013; 21:143–152.

- (95) Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. *Food Chem.* 2012; 130: 1036–1043.
- (96) Foti MC. Use and Abuse of the DPPH• Radical. *J Agric Food Chem.* 2015; 63: 8765–8776.
- (97) Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compost Anal.* 2011; 24: 1043–1048.
- (98) Dawidowicz AL, Olszowy M. The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *Eur Food Res Technol.* 2013; 236: 1099–1105.
- (99) Schaich KM, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J Funct Foods* 2015; 14: 111–125.
- (100) Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
- (101) Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods* 2015; 18: 797-810.
- (102) Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 303-311.
- (103) Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* 2009; 114: 310-316.

- (104) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 19. ed. Gaithersburg: AOAC International; 2012. cap. 40.
- (105) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37 (8): 911-917.
- (106) Scalbert A, Monties B, Janin G. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J Agric Food Chem.* 1989; 37: 1324-1329.
- (107) Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 152-178.
- (108) Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 2001; 73: 239–244.
- (109) Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comunicado Técnico Online*, 127, jul. 2007.
- (110) Brand-Willians W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technol* 1995; 22: 25-30.
- (111) Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto FA. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agr.* 1998; 76: 270-276.
- (112) Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>. *Comunicado Técnico Online*, 128, jul. 2007.
- (113) Murano P. *Understanding Food Science and Technology*. Belmont, CA: Thomson/Wadsworth, 2003; 504 p.

- (114) Insel P, Ross D, McMahon K, Bernstein M. Nutrition: my plate update. 4 ed. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, 2013; 805 p.
- (115) Souza ML, Menezes HC. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. Ciênc. Tecnol. Aliment. jan./mar. 2004; 24 (1): 120-128.
- (116) Cecchi HM. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP; 2003.
- (117) Instituto Adolfo Lutz – IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- (118) Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. Química de Alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 900 p.
- (119) Chen B, McClements DJ, Decker EA. Design of foods with bioactive lipids for improved health. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2013; 4: 35–56.
- (120) Smith RM. Before the injection: modern methods of sample preparation for separation techniques. J Chromatogr A 2003; 1000: 3-27.
- (121) Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. J. Food Eng. 2013; 117: 426-436.
- (122) Plotka-Wasyłka J, Rutkowska M, Owczarek K, Tobiszewski M, Namiesnik J. Extraction with environmentally friendly solvents. Trends Analyt Chem. 2017; 91: 12-25.
- (123) Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chem. 2011; 126: 1821-1835.

- (124) Castro-Puyana M, Marina MI, Plaza M. Water as Green extraction solvent: principles and reasons for its use. *Curr Opin Green Sustain Chem* 2017; 5: 31-36.
- (125) Oroian M, Escriche I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int.* 2015; 74: 10-36.
- (126) Solomons TWG, Fryhle CB. Álcoois e éteres: sínteses e reações. IN: \_\_\_\_\_. *Química organica*, v. 1. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. cap. 11.
- (127) Tobiszewski M, Namiesnik J. Greener organic solvents in analytical chemistry. *Curr Opin Green Sustain Chem* 2017; 5: 1-4.
- (128) Tephly TR. The toxicity of methanol. *Life Sci J* 1991; 48 (11): 1031-1041.
- (129) Vale A. Methanol. *Medicine* 2007; 35 (12): 633-634.
- (130) Luttrell WE, Conley NL. Methanol. *Chem Health Saf.* 2011; 18 (5): 56-58.
- (131) Martins CR, Lopes WA, Andrade JB. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Quím. Nova* 2013; 36 (8): 1248-1255.
- (132) Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int J Food Prop.* 2013; 16 (2): 382-396.
- (133) Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng.* 2007; 81: 200-208.
- (134) Delgado T, Malheiro R, Pereira JA, Ramalhosa E. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels as a source of antioxidants and their potential in relation to other nuts. *Ind Crops Prod.* 2010; 32: 621-626.
- (135) Gomes S, Torres AG. Optimized extraction of polyphenolic antioxidant compounds from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake and evaluation of the polyphenol profile by HPLC. *J Sci Food Agric* 2016; 96 (8).

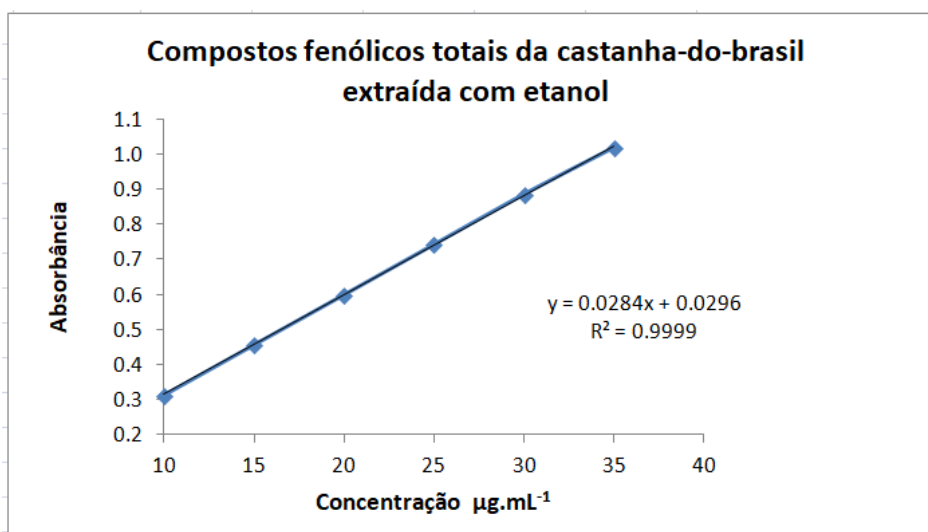
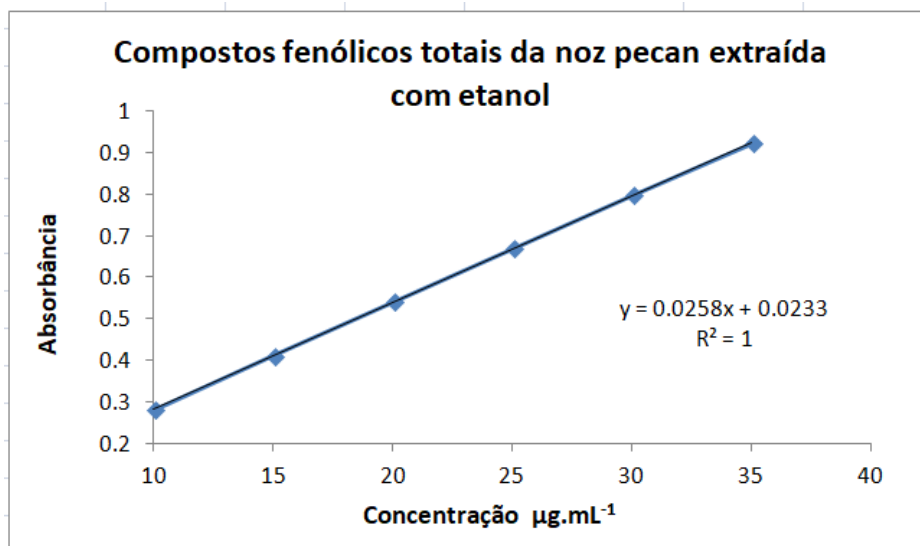
- (136) Downey MO, Hanlin RL. Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin grape skin. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2010; 31(2): 154-159.
- (137) Flores-Córdova MA, Sánchez E, Muñoz-Márquez E, Ojeda-Barrios DL, Soto-Parra JM, Preciado-Rangel P. Phytochemical composition and antioxidant capacity in Mexican pecan nut. *Emir J Food Agric* 2017; 29 (5): 346-350.
- (138) Gong Y, Pegg RB. Separation of ellagitannin-rich phenolics from U.S. pecans and chinese hickory nuts using Fused-Core HPLC columns and their characterization. *J Agric Food Chem.* 2017; 65: 5810-5820.
- (139) Lapornik B, Prosek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* 2005; 71: 214-222.
- (140) Manach C, Scalbert A; Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727-747.
- (141) Sultana B, Anwar F, Iqba S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. *IJFST* 2008; 43: 560–567.
- (142) Soares DJ, Câmara CRS, Figueiredo EAT, Maia GA, Sousa PHM, Figueiredo RW. Characterization and antioxidant activity of cashew nut bran in different stages of processing. *B.CEPPA jan./jun.* 2012; 30 (1): 147-153.
- (143) Taira S, Ono M, Matsumoto N. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biol Technol.* 1997; 12: 265–271.
- (144) Bordenave N, Hamaker BR, Ferruzzi MG. Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food Funct.* 2014; 5: 18–34.

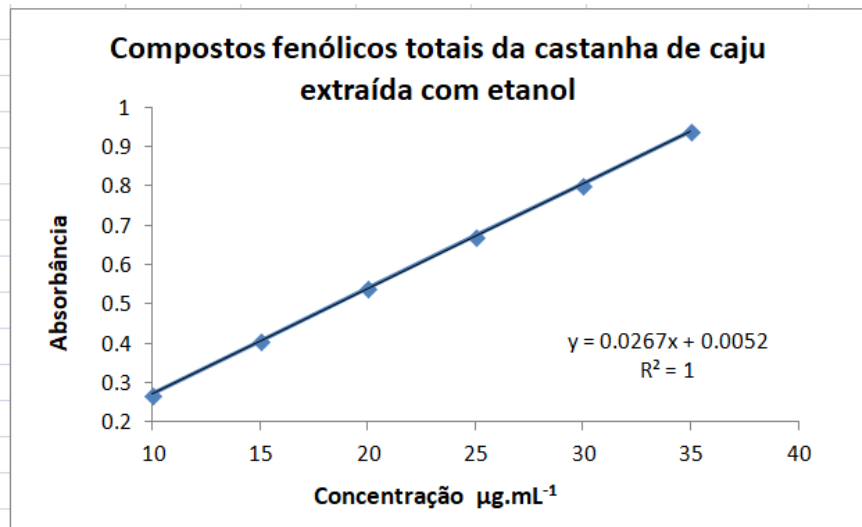


- (145) Jakobek L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem.* 2015; 175: 556–567.
- (146) Ozdal T, Capanoglu E, Altay F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Res Int.* 2013; 51: 954-970.
- (147) Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:1841-1856.
- (148) Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res. Int.* 2006; 39: 791-800.
- (149) Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 2774-2779.
- (150) Labuckas DO, Maestri DM, Perelló M, Martínez ML, Lamarque AL. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chem.* 2008; 107: 607-612.
- (151) Kosuru RY, Roy A, Das SK, Bera S. Gallic acid and gallates in human health and disease: do mitochondria hold the key to success? *Mol. Nutr. Food Res.* 2018; 62: 1-10.
- (153) Fernandes FHA, Salgado HRN. Gallic acid: review of the methods of determination and quantification. *Crit Rev Anal Chem* 2016; 46 (3): 257-265.
- (154) Babu VA, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem* 2008; 15: 1840-1850.
- (155) Bansal S, Vyas S, Bhattacharya S, Sharma M. Catechin prodrugs and analogs: a new array of chemical entities with improved pharmacological and pharmacokinetic properties. *Nat. Prod. Rep.* 2013; 30: 1438-1454.

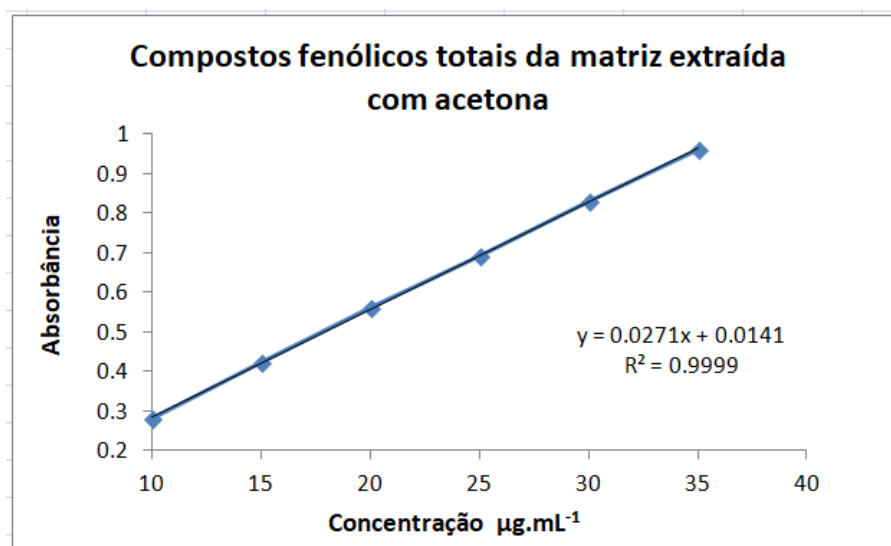
- (156) Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 1996; 20 (7): 933-956.
- (157) Noubigh A, Abderraba M, Provost E. Temperature and salt addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J. Chem. Thermodynamics* 2007; 39: 297-303.
- (158) Srinivas K, King JW, Howard LR, Monrad JK. Solubility of gallic acid, catechin, and protocatechuic acid in subcritical water from (298.75 to 415.85) K. *J. Chem. Eng. Data* 2010; 55: 3101-3108.
- (159) Cuevas-Valenzuela J, González-Rojas A, Wisniak J, Apelblat A, Pérez-Correa JR. Solubility of (+)-catechin in water and water-ethanol mixtures within the temperature range 277.6-331.2 K: fundamental data to design polyphenol extraction processes. *Fluid Phase Equilib.* 2014; 382: 279-285.
- (160) Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1998; 799: 101-110.
- (161) Corradini E, Foglia P, Giansanti P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Nat Prod Res* 2011; 25 (5): 469-495.
- (162) Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology & Medicine* 1992; 13: 435-448.
- (163) Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2007; 40: 92-100.

Apêndice 1. Curvas de calibração dos compostos fenólicos totais da matriz de otimização da noz pecã, castanha-do-brasil e castanha de caju extraídos com etanol.

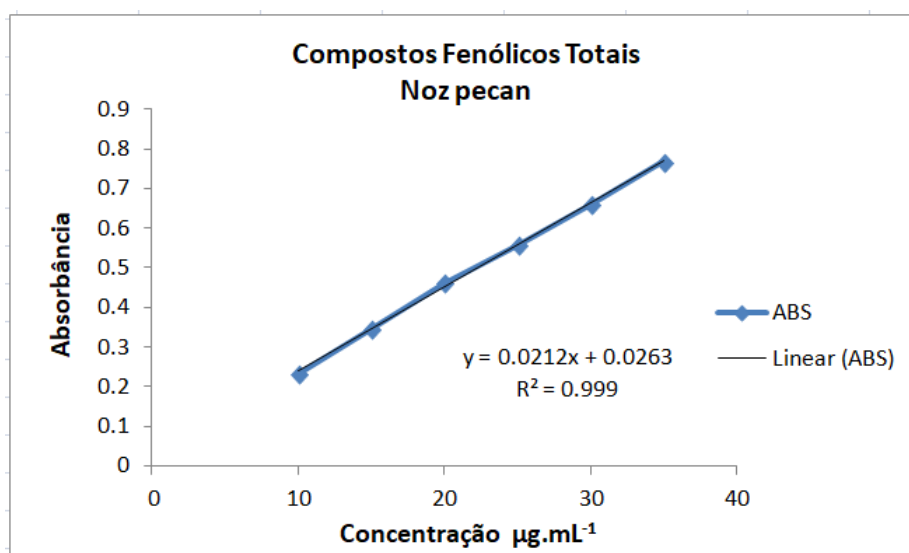
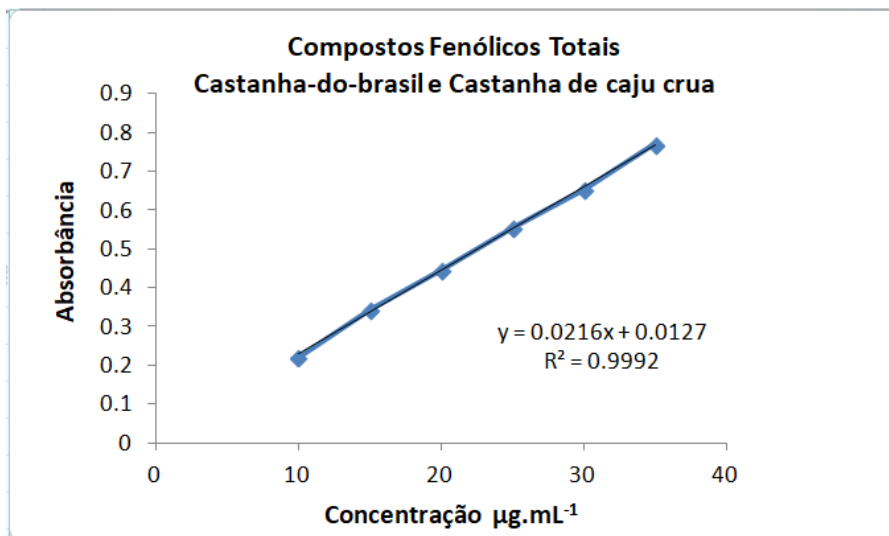




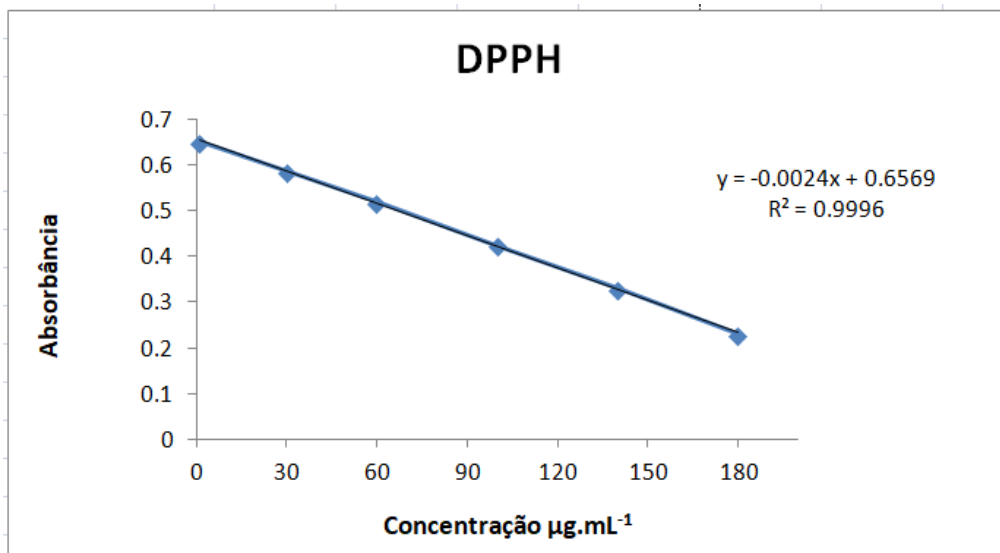
Apêndice 2. Curva de calibração dos compostos fenólicos totais da matriz de otimização da noz pecã, castanha-do-brasil e castanha de caju crua extraída com acetona.



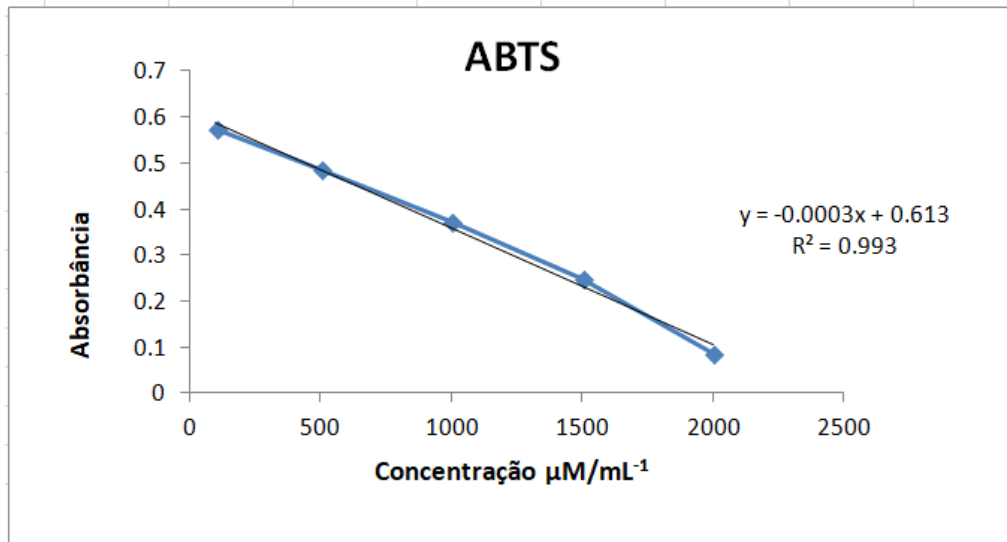
Apêndice 3. Curvas de calibração dos compostos fenólicos totais da castanha-do-brasil, castanha de caju crua e da noz pecã.



Apêndice 4. Curva de calibração do ensaio DPPH.

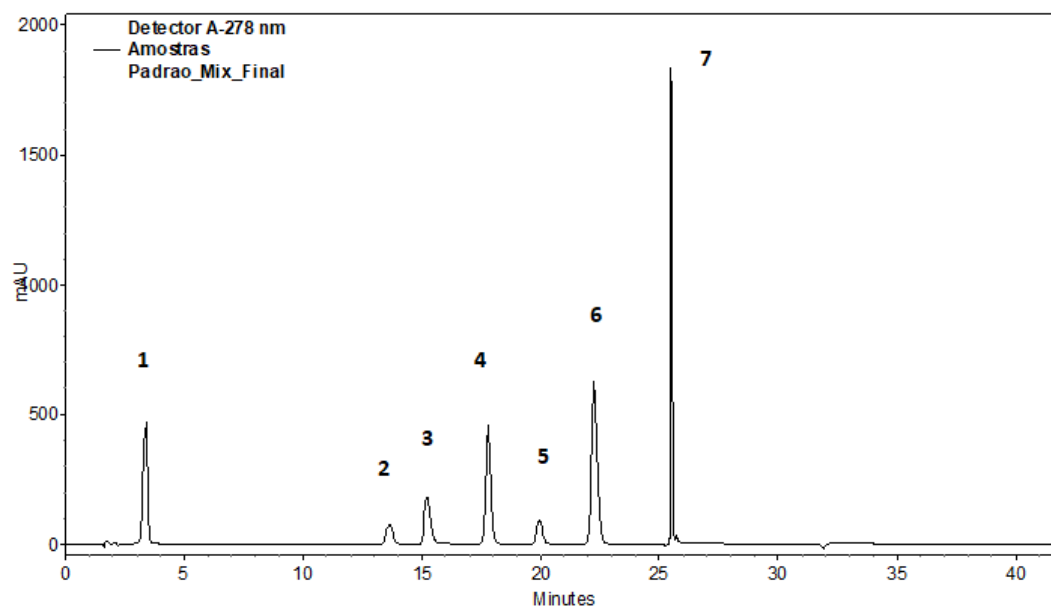


Apêndice 5. Curva de calibração do ensaio ABTS.





Apêndice 6. Cromatograma dos padrões de compostos fenólicos.



Legenda: **(1)** Ácido gálico; **(2)** Catequina; **(3)** Ácido clorogênico; **(4)** Ácido siríngico; **(5)** Epicatequina; **(6)** Ácido p-cumárico; **(7)** Ácido ferúlico.