UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de noz macadâmia (*Macadamia integrifolia*, Maiden e Betche) submetida aos processos de secagem e de torra

Paula da Costa Garcia

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2010

Paula da Costa Garcia

Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de noz macadâmia (*Macadamia integrifolia*, Maiden e Betche) submetida aos processos de secagem e de torra

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Área de Concentração: Bromatologia
Orientador: Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Garcia, Paula da Costa
G216c Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de noz macadâmia (*Macadamia integrifolia,* Maiden e Betche) submetida aos processos de secagem e de torra / Paula da Costa Garcia. -- São Paulo, 2010.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Antioxidante : Ciência dos alimentos 2. Macadâmia : Ciência dos alimentos 3. Secagem : Preservação : Tecnologia de alimentos I. T. II. Mancini Filho Jorge, orientador.

641.19 CDD

Paula da Costa Garcia

Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de noz macadâmia (*Macadamia integrifolia*, Maiden e Betche) submetida aos processos de secagem e de torra

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho
Orientador/Presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

A DEUS, meu Pai Querido, por tomar as rédeas da minha vida e me conduzir até aqui...

AOS MEUS PAIS, Fátima e Mario, pelo amor incondicional e pela sabedoria de nos direcionar, minha irmã e eu, para caminhos bons...

À MINHA IRMÃZINHA, Carla, que sempre foi a minha força para continuar a crescer...

AO MARCELO, por ser meu ombro, meu colo, meu companheiro e grande amor...

... dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jorge Mancini-Filho, não apenas pela orientação, mas principalmente pelo seu exemplo (hoje em dia tão raro) de um docente que busca a formação de grandes profissionais.

Aos amigos do Laboratório de Lípides que me acompanharam nestes anos de trabalho: Ana Mara, Claudimar, Eliane, Felipe, Fernanda, Gabriela, Illana, Lucillia, Mahyara, Milessa e Rosângela. Vocês reafirmaram a concepção de que um grupo multidisciplinar pode, com a soma de grandes conhecimentos, tornar-se uma equipe brilhante através de muito respeito.

À Ana Elsa e ao Prof. Alexis Vidal, da Universidade de Havana (Cuba), pela oportunidade de aprender e compartilhar experiências durante o período que permaneceram conosco, no laboratório.

À família do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF-USP pela dedicação e comprometimento com a pesquisa científica desenvolvida ali, em especial, aos amigos Edilson, Cléo, Mônica, Lurdinha, Tânia, Lúcia e Rosa.

Ao Laboratório de Patologia, sobretudo ao Diogo e à Profª Sílvia B. M. Barros, pelo suporte junto às análises de cromatografia líquida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realizar este trabalho.

À QueenNut Macadâmia, por ter incentivado este estudo e fornecido as amostras de macadâmia.

Às professoras Marisa A. B. Regitano-d'Arce e Thais M. F. S. Vieira, da ESALQ-USP, pela contribuição essencial na minha formação como Cientista de Alimentos.

Aos amigos Claudinéia (Açaí), Danilo, Graziela (Buriti), Michele (Mirta) e Ricardo (Ronaldiño) que, desde os tempos gloriosos de graduação na ESALQ-USP, estiveram ao meu lado com todo o carinho e o apoio de grandes amizades.

Ao Grupo de Estudantes Adventistas (GEA-USP), especialmente ao Fred, Simone, Natália e Evanildo, no qual encontrei pessoas tão consagradas a Deus que chegam a fazer de suas jornadas acadêmicas mais um momento de crescimento espiritual.

Às amigas Marta e Giovana, pelos dias de descontração, piadas e joguinhos de tranca.

Citados aqui ou não, sou profundamente grata a todos aqueles que direta ou indiretamente foram fundamentais para minha formação pessoal e profissional e para a realização deste trabalho!

Todo saber e desenvolvimento real têm sua fonte no conhecimento de Deus. Qualquer que seja o ramo da pesquisa a que nos dediquemos com sincero propósito de chegar à verdade, somos postos em contato com a Inteligência invisível e poderosa que opera em tudo e através de tudo. A mente humana é colocada em comunhão com a mente divina, o finito com o Infinito. O efeito de tal comunhão sobre o corpo, o espírito e a alma está além de qualquer avaliação (WHITE, 1937).

RESUMO

GARCIA, P.C. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de noz macadâmia (*Macadamia integrifolia*, Maiden e Betche) submetida aos processos de secagem e de torra.** 2010. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A macadâmia (*Macadamia integrifolia*) é considerada comercialmente uma das nozes mais importantes do mundo por seus atributos sensoriais e nutricionais. Dentre as etapas do beneficiamento desta noz, destacam-se a secagem e a torra como processos térmicos diretamente ligados a sua qualidade. Contudo, eles têm sido relacionados à diminuição da estabilidade oxidativa e da capacidade antioxidante de compostos bioativos, como os ácidos fenólicos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar a noz macadâmia submetida às etapas de secagem (crua) e de torra, quanto a composição química e sua atividade antioxidante *in vitro*. Os ensaios realizados para a composição centesimal demonstraram que não houve diferença ($p<0,05$) entre as amostras crua e torrada, exceto pela umidade e cinzas. Observou-se que macadâmia, cura ou torrada, é uma grande fonte de lipídeos (~77g/100g amostra). Não se verificou diferença no perfil dos ácidos graxos entre as amostras analisadas, prevalecendo monoinsaturados (~58g/100g amostra). Para a avaliação da atividade antioxidante, foram obtidos, das amostras cruas e torradas, os extratos etéreo (EE), alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq) e as frações de ácidos fenólicos livre (AFL), esterificados solúveis (AFS) e insolúveis-ligados (AFI). Quanto ao teor de fenólicos totais, através do método com o reagente de Folin-Ciocalteau, o extrato que se destacou foi o EAq, tanto para macadâmia crua quanto para torrada, com os maiores valores em relação aos outros extratos, mas ainda foram menores que as frações. A macadâmia torrada obteve os maiores teores de fenólicos totais com AFL e AFS. A atividade antioxidante foi testada através dos métodos de redução do radical DPPH, de co-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico e de oxidação lipídica acelerada em Rancimat. No teste de redução do $DPPH^{\bullet}$, a macadâmia crua foi mais eficiente que a torrada apenas no EE e na AFI. Já para o EAq, o EAlc, a AFL e a AFS, a macadâmia torrada apresentou as melhores porcentagens de redução. No sistema β-caroteno/ácido linoleico, os EAqs tiveram maiores porcentagens de inibição da oxidação que os demais extratos; todas as frações apresentaram porcentagens de inibição muito superiores às dos extratos, mesmo em concentrações menores. Notou-se também que houve queda na capacidade de inibição da oxidação do EE e das três frações (AFL, AFS e AFI), quando se comparam a amostra crua em relação à torrada. No ensaio em Rancimat, o EAlc foi o único, entre extratos e frações de ambas as amostras, a diferir significativamente do controle-negativo em sua ação protetora, entretanto não foi mais eficiente que o TBHQ, utilizado como controle-

positivo. Neste estudo, a diferença de atividade entre os métodos ficou clara, contudo também se evidenciou que o tratamento térmico da torra é capaz de alterar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na macadâmia.

Palavras-chave: macadâmia; processo térmico; atividade antioxidante; fenólicos.

ABSTRACT

GARCIA, P.C. Chemical characterization and evaluation of *in vitro* antioxidant capacity of dried and roasted macadamia nuts (*Macadamia integrifolia*, Maiden e Betche). 2010. 75p. Dissertation (Master Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, 2010.

Macadamia (*Macadamia integrifolia*) is considered one of the most important nuts in the world for their nutritional and sensory attributes. In the macadâmia nut processing, drying and roasting steps stand out because they are thermal processes directly related with its quality. However, they have been associated to the decrease of oxidative stability and antioxidant activity of bioactive compounds such as phenolic acids. Therefore, the aim of this study was to characterize and compare the dried (raw) and roasted macadamia nuts, their chemical composition and *in vitro* antioxidant activity. The composition assays shown that there was no difference between raw and roasted samples of macadamia ($p<0,05$), except for moisture and ash. It was also observed that both samples are source of oil (~77g/100g macadamia). There was no difference ($p<0,05$) in the fatty acids profile of the samples, with the predominance of monounsaturated fatty acids (~58g/100g macadamia). For the evaluation of antioxidant activity, the ether (EE), alcoholic (EAlc) and aqueous (EAq) extracts and the free phenolic acids (AFL), soluble esterified acids (AFS) and insoluble-bound acids (AFI) fractions were obtained from raw and roasted samples. In the total phenolic content, by Folin-Ciocalteau method, the EAq stood out for raw and roasted macadamia nuts with a high content, compared with the other extracts, but it was lower than the acid phenolic fractions. The roasted macadamias showed the highest levels of total phenolics in AFL and AFS. The antioxidant activity was obtained by the methods of DPPH radical reduction, of β-carotene/linoleic acid co-oxidation system and accelerated lipid oxidation in Rancimat. In the $DPPH^{\bullet}$ test, raw macadamia reduced more efficiently than roasted only in EE and AFI. For the EAq, EAlc, AFL and AFS, the roasted macadamia nuts showed the best percentages of reduction. In β-carotene/linoleic acid system, EAqs of both samples showed similar results and had the highest percentage of oxidation inhibition than the other extracts. All of fractions showed much higher percentages of inhibition than extracts, even at lower concentrations. A

decrease in the ability to inhibit oxidation of EE and the three fractions (AFL, AFS and AFI) was also noticed, when comparing the raw samples with the roasted. In Rancimat test, the EAlc was the only, of the extracts and fractions of both samples, witch differed significantly from negative control in its protective activity; however it was not more effective than TBHQ, used as positive control. In this study, the differences between the methods were noticeable, but it was also showed that the thermal treatment of the roasting was able to modify the antioxidant capacity of phenolic compounds in macadamia nuts.

Keywords: Macadamia; thermal process, antioxidant activity, phenolics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Carpelo, casca e amêndoa da noz macadâmia (INTERMAC, 2010a) 3
Figura 2: Etapas do beneficiamento da noz macadâmia (adaptado de AMS, 2010a).5
Figura 3: Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ (SHAHIDI; NACZK, 2003).....18
Figura 4: Estrutura química geral dos flavonoides (ANGELO; JORGE, 2006).....22
Figura 5: Estrutura química do ácido tânico (BRAVO, 1998). 22
Figura 6: Estruturas químicas gerais dos tocóis e dos tocotrienóis (SHAHIDI; NACZK, 2003). 23
Figura 7: Estrutura química geral dos ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, pertencentes à classe dos ácidos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2006). 23
Figura 8: Estrutura química do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH$^{\bullet}$) (LIMA, 2007).....28
Figura 9: Extração sequencial para se obter os extratos etéreo (EE), alcoólico (EALc) e aquoso (EAq).....38
Figura 10: Extração das frações de ácidos fenólicos (DABROWSKI; SOSULSKI, 1984). 41
Figura 11: Cromatogramas das frações de ácidos fenólicos livres das amostras de macadâmia crua (A) e torrada (B) a 275nm, com o gradiente do Pool 1.....54
Figura 12: Inibição da oxidação (%) obtida pelos extratos etéreo, alcoólico e aquoso das macadâmias crua (A, B, C, respectivamente) e torrada (D, E, F, respectivamente). 58
Figura 13: Inibição da oxidação (%) obtida pelas frações livre, esterificada solúvel e insolúvel ligada das macadâmias crua (A, B, C, respectivamente) e torrada (D, E, F, respectivamente).....60
Figura 14: Índices de atividade antioxidante dos extratos etéreo (EE), alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq) de macadâmia crua (A) e torrada (B).....62
Figura 15: Índices de atividade antioxidante das frações fenólicas livre (AFL), esterificadas solúveis (AFS) e insolúveis-ligadas (AFI) de macadâmia crua (A) e torrada (B).....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classe dos compostos fenólicos presentes em plantas e respectivas estruturas (ANGELO; JORGE, 2006). 21
Tabela 2: Gradiente binário utilizado nos ensaios com os pools 1 e 2 e com o ácido elágico 43
Tabela 3: Composição centesimal de amostras de macadâmia crua e torrada 48
Tabela 4: Perfil de ácidos graxos das amostras de macadâmia crua e torrada (em g/100 de amostra) 49
Tabela 5: Porcentagem de redução do radical sintético DPPH dos extratos etéreo (EE) alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq), nas concentrações de 100 a 400 ppm para amostras de macadâmia crua e torrada 55
Tabela 6: Porcentagem de redução do radical sintético DPPH das frações de ácidos fenólicos livre (AFL), esterificada solúvel (AFS) e insolúvel (AFI), nas concentrações de 10 a 80ppm, para amostras de macadâmia crua e torrada 56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação em estilos pela AMS (2010b).....8

Quadro 2: Composição centesimal de macadâmia (em g/100g amostra).....11

Quadro 3: Perfis de ácidos graxos de *Macadamia integrifolia* encontrados por diferentes autores.....13

Quadro 4: As três etapas da auto-oxidação: iniciação, propagação e término. Adaptado de Akoh e Min (2002) e Damodaran, Parkin e Fennema (2007). 14

LISTA DE ABREVIATURAS

ABM	Associação Brasileira de Noz Macadâmia
AFI	Ácidos fenólicos insolúveis-ligados
AFL	Ácidos fenólicos livres
AFS	Ácidos fenólicos esterificados solúveis
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
B.S.	Base seca
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalente em ácido gálico
EAlc	Extrato alcoólico
EAq	Extrato aquoso
EE	Extrato etéreo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
NIS	Nut in Shell (Noz em casca)
PET	Politereftalato de etileno
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
THF	Tetrahidrofurano

USDA	United States Department of Agriculture
VLDL	Very low density lipoprotein (lipoproteínas de muito baixa densidade)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 A noz macadâmia 3
2.2 Beneficiamento 5
2.2.1 Colheita e descarpelamento 5
2.2.2 Secagem 6
2.2.3 Quebra e seleção 7
2.2.4 Torra 9
2.2.5 Armazenamento e transporte 9
2.3 Composição centesimal 10
2.3.1 Perfil de Ácidos Graxos 12
2.4 A oxidação de lipídeos 14
2.5 Antioxidantes 17
2.5.1 Compostos fenólicos 19
2.6 Atividade antioxidante 26
2.6.1 Métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* 27
2.6.2 Paradoxo polar 30
2.7 Efeito do tratamento térmico sobre compostos bioativos de alimentos 31
3 OBJETIVO GERAL 33
3.1 Objetivos específicos 33
4 MATERIAL E MÉTODOS 34
4.1 Material 34
4.1.1 Amostra 34
4.1.2 Reagentes utilizados 34
4.2 Métodos 36
4.2.1 Composição centesimal 36
4.2.2 Perfil de ácidos graxos 37
4.2.3 Obtenção dos extratos etéreo, alcoólico (etanol) e aquoso da macadâmia crua e torrada 37
4.2.4 Obtenção dos ácidos fenólicos livres e esterificados (solúveis e insolúveis) 39

4.2.5 Quantificação dos compostos fenólicos totais 42
4.2.6 Identificação dos ácidos fenólicos nas frações (AFL, AFI e AFS) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 42
4.2.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* 44
4.2.8 Análise estatística.....47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....48
5.1 Composição centesimal e perfil de ácidos graxos.....48
5.2 Quantificação dos compostos fenólicos totais.....51
5.3 Identificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 53
5.4 Avaliação da atividade antioxidante 55
5.4.1 Método de redução do radical sintético DPPH 55
5.4.2 Ensaio em sistema de co-oxidação de β-caroteno/ácido linoleico.....57
5.4.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Rancimat® 62
5.4.4 Comparação da atividade antioxidante entre os métodos *in vitro*.....65
6 Conclusões 66
7 BIBLIOGRAFIA 68
ANEXO.....76

1 INTRODUÇÃO

Nozes e castanhas comestíveis são cultivadas em uma grande variedade de condições de clima e de solo. São mundialmente valorizadas por seus atributos sensoriais e nutricionais, como fontes de lipídeos, proteínas, vitaminas, minerais, e de fibras. A macadâmia (*Macadamia integrifolia*, Maiden e Betche) é considerada, mundialmente, uma das nozes comestíveis mais populares e, em termos de comercialização, uma das mais importantes (VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

No Brasil, classificado como 7º maior produtor mundial da noz macadâmia, ainda não há legislação específica que regulamente seus padrões de identidade e de qualidade (SEBRAE, 2005), e os estudos publicados sobre a caracterização química desta e de outras diversas nozes frequentemente geram resultados fragmentados (VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

Os compostos bioativos, como os fenólicos, também se tornaram alvo de pesquisas com castanhas e nozes em geral, principalmente quando se menciona a resistência desses compostos ao processamento pelo qual elas são submetidas, pois normalmente envolvem tratamentos térmicos capazes de induzir processos oxidativos.

Já há algum tempo se tem notado que os alimentos processados termicamente têm menor valor nutricional do que produtos frescos, devido à degradação de alguns compostos e à perda de características físico-químicas. Hoje, os consumidores têm uma preocupação crescente quanto à segurança e à qualidade dos alimentos e, como resultado, procuram produtos processados o mínimo possível, a fim de que mantenham seus atributos nutricionais preservados. Para desenvolver uma tecnologia térmica efetiva na a produção de alimentos de alta qualidade sensorial e

nutricional, é necessária uma investigação aprofundada sobre as mudanças funcionais durante o tratamento térmico (ROY et al., 2007).

O beneficiamento básico da noz macadâmia envolve duas etapas fundamentais nas quais se emprega o tratamento térmico: a secagem, processo longo sob temperaturas brandas, com a noz ainda em casca; e a torra da amêndoa, tratamento rápido em temperaturas elevadas.

Dentro da perspectiva de se obter maiores informações sobre as características químicas da noz macadâmia, este estudo foi realizado levando em consideração as possíveis perdas nutricionais ocasionadas pela torra, não somente de seus macronutrientes, mas também de compostos bioativos, como os ácidos fenólicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A noz macadâmia

A macadâmia (*Macadamia integrifolia*) é uma nogueira nativa da Austrália pertencente à família botânica *Proteaceae* e ao gênero Macadâmia. Dentre as oito espécies existentes, apenas a *M. integrifolia* e a *M. tetraphylla* produzem nozes consideradas comestíveis. Estas possuem ciclo de vida longo, necessitando de cinco a oito anos para maturação dos tecidos reprodutivos. As folhas são simples, podendo ser no número de três (no caso de *M. integrifolia*) ou quatro (no caso de *M. tetraphylla*), enquanto as flores, também consideradas simples, estão dispostas em rácemos, e florescendo entre maio e setembro. As nozes são envoltas em um fruto de forma esférica que, na época de maturação, caem da árvore naturalmente (DIERBERGER; MARINO NETTO, 1985; SOBIERAJSKI; GARCIA, 2009).

Os frutos da *M. integrifolia*, espécie mais cultivada para fins comerciais, são globulares e verde-escuro, quando ainda no carpelo, enquanto a amêndoa é envolvida por uma casca marrom muito resistente. A coloração da amêndoa pode variar do creme-branco para o amarelo (Figura 1) (SOBIERAJSKI et al., 2006).

Figura 1: Carpelo, casca e amêndoa da noz macadâmia (INTERMAC, 2010a)

A indústria da noz macadâmia tem crescido economicamente a um nível significativo em diversos países ao redor do mundo. Esse desenvolvimento se

iniciou no Havaí, na década de 1890, quando as nozes foram trazidas de seu país original, a Austrália (MASON, 2000).

A expansão mundial da cultura ocorreu principalmente na década de 1990, como resultado do interesse dos produtores em diversificar sua produção agrícola (SOBIERAJSKI et al., 2006).

Devido ao seu local de origem, a Floresta Subtropical Australiana, a nogueira macadâmia se adaptou bem às condições climáticas do sudoeste brasileiro, o que colaborou para que o Brasil se tornasse, em 2005, o sétimo maior produtor mundial de macadâmia em casca (NIS – *nut in shell*), com uma produção estimada, em 2006, de 3.350 toneladas (SOBIERAJSKI; GARCIA, 2009; TOLEDO PIZA, 2006).

Os Estados Unidos são o principal destino da produção brasileira (63,15%), seguidos pela União Européia (23,04%) e pela da Ásia (1,97%). O mercado interno possui uma participação em apenas 11,84% da nossa produção. Contudo, a meta da Associação Brasileira de Noz Macadâmia (ABM) é reservar 20% para o mercado doméstico, sem que haja prejuízo às exportações, uma vez que a produção nacional está em expansão (AGUIAR, 2006).

A cultura da macadâmia tem se difundido pelos estados brasileiros, principalmente em São Paulo, responsável, em 2006, por 33% da produção, Espírito Santo (31%), Bahia (18%) e Rio de Janeiro (10%). As regiões dos municípios paulistas de Dois Córregos e Bauru se destacam pelo tamanho da área plantada (SOBIERAJSKI et al., 2006).

A macadâmia é considerada uma das nozes mais finas em todo mundo, devido ao seu *flavour* delicado, textura crocante e coloração creme. Pode ser usada em produtos como chocolates, pralinés, cremes, além do consumo nas formas: crua, torrada, torrada e salgada, temperada (STEPHENSON, 2005; FADINI et al., 2006).

2.2 Beneficiamento

A Figura 2 apresenta as etapas do beneficiamento da noz macadâmia, desde a colheita até o momento da expedição das nozes.

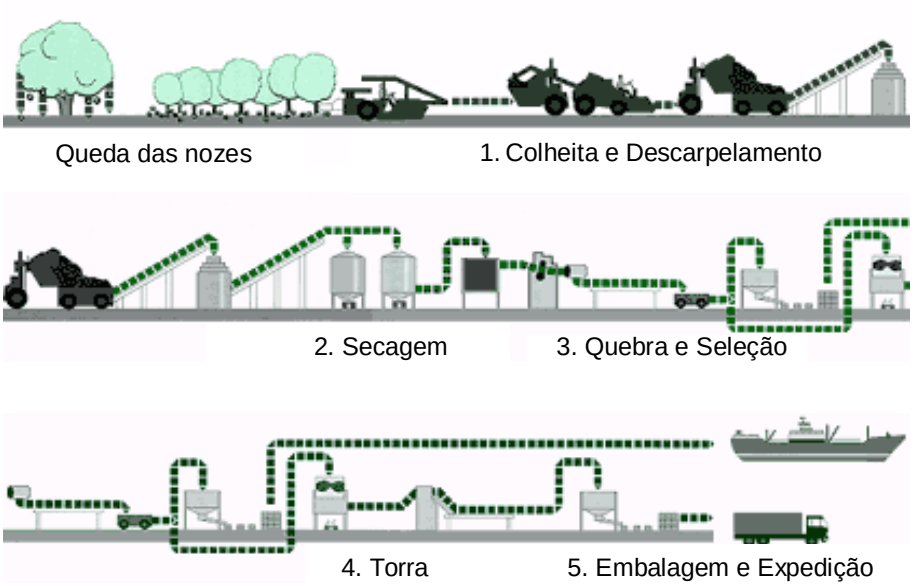


Figura 2: Etapas do beneficiamento da noz macadâmia (adaptado de AMS, 2010a)

2.2.1 Colheita e descarpelamento

O pericarpo é a parte verde e carnosa que reveste as nozes. Quando caem das árvores, as nozes estão envoltas pelo pericarpo, chamado carpelo. Não convém deixar passar mais que dois ou três dias para fazer-se o descarpelamento, porque, após este período, o pericarpo seca e endurece, tornando a sua remoção difícil. Dentro das primeiras 24 horas depois da colheita, o descarpelamento reduz o calor da respiração e facilita a secagem (DIERBERGER; MARINO NETTO, 1985).

O carpelo removido é geralmente utilizado como cobertura orgânica para o solo, enquanto as nozes em casca (NIS – *nut in shell*) seguem para as etapas seguintes do processamento (AMS, 2010a).

2.2.2 Secagem

A secagem é uma das etapas mais importantes do processamento da noz macadâmia. No momento da colheita, as nozes podem chegar a 30% de umidade, que deve ser reduzida a menos de 10%, a fim de prevenir a hidrólise lipídica e o aparecimento de mofo. Nozes com umidade de 7,5% na base seca – b.s. (NIS) não devem ser armazenadas por mais de um mês antes da secagem a 3,5% b.s (NIS) sem refrigeração a, no mínimo, 5ºC (MASON, 2000).

O processo industrial de secagem comumente empregado à noz macadâmia possui a desvantagem de exigir um ciclo total muito longo de secagem, estendendo-se por um período de mais de um mês. A primeira fase começa quando as nozes em casca (recém-descarpeladas), com um teor de umidade de 20% a 30% b.s no campo, são submetidas à secagem por convecção de ar à temperatura ambiente e na sombra, utilizando caixas, bandejas e silos aerados. É um procedimento que leva de três a quatro semanas, a fim de reduzir o teor de umidade do produto a 10% b.s (SILVA et al., 2006).

As nozes pré-secas são encaminhadas para a próxima fase de secagem, na planta industrial da área de produção, na qual seguem para um silo do tipo secador por convecção de ar quente forçado em condições controladas de temperatura e permanecem por aproximadamente seis dias (144h) (SILVA et al., 2006).

Nos primeiros dois dias, é utilizada uma temperatura igual a 40°C, depois 50°C e, nos dois últimos dias, a temperatura é elevada a 60°C, que reduzirá a umidade da noz em casca a 3,5% b.s. NIS (1,5% b.s. na amêndoa). (SILVA et al., 2007).

A 1,5% de umidade, a amêndoa diminui de tamanho dentro da casca, permitindo uma quebra com menores danos e evitando o escurecimento em seu interior após a torra. Essa reação de escurecimento (reação de Maillard) ocorre quando a noz é submetida a uma secagem mais rápida e pouco eficiente, que gera o acúmulo de umidade e açúcares redutores na região central da noz (CAVALETTO, 1983; MASON, 2000).

2.2.3 Quebra e seleção

Após a secagem, as amêndoas diminuem de tamanho e se soltam da casca, facilitando a etapa de quebra e minimizando os danos à amêndoa. Os métodos de separação de amêndoas das cascas variam: alguns incluem a combinação do uso de telas, separadores de ar, de sistemas de flotação, classificadores eletrônicos avançados e seleção manual (MACNUTS, 2010).

As nozes são abertas e as amêndoas são higienizadas e classificadas em estilos (Quadro 1), levando-se em conta o tamanho e o grau de integridade da noz. De acordo com a Australian Macadamia Society Ltda (2010b), a chamada AMS, os estilos variam de 0 (zero) a 8 (oito). O estilo 0 indica a presença de, no mínimo, 98% de amêndoas inteiras com um diâmetro maior que 20mm. Já o estilo 8 contém apenas pedaços pequenos de nozes que atinjam, no máximo, 4mm.

Estilo 0	Super Premium Wholes	Min 98% de amêndoa inteira e grande: >20 mm	
Estilo 1	Premium Wholes	Min 95% de amêndoas inteiras: >17mm	
Estilo 2	Premium Wholes and Halves	Mistura de 50% inteiras e de 50% metades: >13mm	
Estilo3	Premium Cocktail Mix	Min 15% de inteiras e demais de metades: >13mm	
Estilo 4	Premium Halves	Min 80% de metades: 10mm a 14mm	
Estilo 5	Premium Large Chips	Fragmentos entre 8mm e 12mm	
Estilo 6	Premium Chips	Fragmentos entre 5mm e 9mm	
Estilo 7	Premium Small Chips	Fragmentos entre 3mm e 6mm	
Estilo8	Premium Fine Granule	Máximo: 4mm	

Quadro 1: Classificação em estilos pela AMS (2010b)

As amêndoas de primeira qualidade são processadas e preparadas para vendas ao consumidor de varejo, enquanto a macadâmia de qualidade inferior, isto

é, em pedaços, é usada como ingrediente em bolos, tortas, bombons, sorvetes e na cozinha asiática (SEBRAE, 2005).

2.2.4 Torra

A macadâmia pode ser torrada e salgada, de acordo com o que se deseja como produto final. É importante garantir que as amêndoas sejam torradas lenta e uniformemente, mas se ressalta que temperaturas elevadas e/ou por um tempo excessivo provocarão um escurecimento em níveis inaceitáveis (INTERMAC, 2010b).

O binômio tempo/temperatura da torra varia de acordo com o tamanho da amêndoa e com o grau de coloração e *flavour* desejados no produto final. Recomenda-se que o processo se inicie com uma ou duas camadas de amêndoas, a 150ºC por 10 minutos, seguido de um resfriamento imediato até a temperatura ambiente, antes de serem embaladas. Se necessário, a salga deve ser realizada durante esse período de resfriamento, para garantir a aderência adequada (INTERMAC, 2010b).

2.2.5 Armazenamento e transporte

A macadâmia exige condições ambientais de armazenamento que combinem concentrações de umidade e de oxigênio muito baixas. Isso pode ser alcançado de maneira eficaz através de injeção de uma mistura de dióxido de carbono e nitrogênio e a embalagem hermeticamente fechada sob vácuo parcial (o vácuo parcial evita a fricção entre as nozes durante o transporte) (AMS, 2010b).

Uma vez que a embalagem é aberta, e as macadâmias são expostas ao ar ambiente. Caso a exposição se prolongue por muitas horas, ocorrerá a absorção de umidade e a perda da crocância. Ao longo de muitas semanas, iniciar-se-á então o desencadeamento do processo oxidativo, o ranço (AMS, 2010b).

A oxidação também pode ocorrer, se as amêndoas forem empacotadas em embalagens cujo material é de baixa qualidade, como o polietileno ou o celofane. A vida de prateleira de macadâmias embaladas nessas condições pode ser menor do que um mês (AMS, 2010b).

A indústria de macadâmia recomenda o uso dos seguintes materiais no empacotamento das amêndoas (crua, torrada, etc): hermeticamente fechadas em latas de metal ou recipientes de vidro e embalagens flexíveis de alta barreira. Entretanto, seja lata ou vidro ou embalagem flexível, as nozes também podem sofrer danos durante uma vibração excessiva ou manipulação rude. Sendo assim, aconselha-se muito cuidado no transporte do produto (AMS, 2010b).

2.3 Composição centesimal

Nozes comestíveis, em geral, são cultivadas e crescem em uma variedade de condições ambientais; são populares e valorizadas por suas características sensoriais e nutricionais (VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

As nozes e as sementes comestíveis contêm teores elevados de lipídeos (cerca de 40% a 60%) e de proteínas (de 8% a 20%). Na macadâmia. O perfil de ácidos graxos é um dos destaques, por conter, sobretudo, os ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) (FREITAS; NAVES, 2010).

O Quadro 2 apresenta a composição centesimal da noz macadâmia obtida por diferentes autores.

Tipo de Amostra	Origem da Amostra	Composição Centesimal	Referências
Macadâmia Crua*	EUA	Umidade – 1,36 ± 0,07 Cinzas – 1,14 ± 0,03 Lipídeos Totais – 75,77 ± 1,15 Proteínas – 7,91 ± 0,35 Carboidratos (por diferença) – 13,82	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, (USDA, 2009)
	São Paulo, Brasil	Umidade – 1,20 a 5,50 Cinzas – 1,20 a 2,40 Lipídeos Totais – 70,00 a 78,00 Proteínas – 7,20 a 10,20 Carboidratos (por diferença) – 8,40 a 16,70	Silva (2003)
	Califórnia, EUA	Umidade – 2,10 ± 0,12 Cinzas – 1,16 ± 0,04 Lipídeos Totais – 66,16 ± 0,92 Proteínas – 8,40 ± 0,71 Açúcares Solúveis Totais – 1,36 ± 0,05	Venkatachalam e Sathe (2006)
Macadâmia Torrada	EUA	Umidade – 1,61 ± 0,12 Cinzas – 1,14 ± 0,02 Lipídeos Totais – 76,08 ± 1,04 Proteínas – 7,79 ± 0,28 Carboidratos (por diferença) – 13,38	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2009)

Quadro 2: Composição centesimal de macadâmia (em g/100g amostra).
*Macadâmia crua = submetida apenas ao processo de secagem.

A noz macadâmia é conhecida por teores interessantes de proteína (entre 7 e 10g/100g) e de carboidratos (entre 8 e 17g/100g). Entretanto é a quantidade de lipídeos que a torna diferenciada, alcançando valores de 78g de óleo em 100g de macadâmia crua.

2.3.1 Perfil de Ácidos Graxos

O elevado teor de óleo não somente contribui com a textura e o *flavour* da macadâmia, como também é o ponto-chave da estabilidade da noz, devido à degradação do óleo, seja por mecanismo oxidativo quanto hidrolítico (MASON, 2000).

Venkatachalam e Sathe (2006) destacaram que a composição de ácidos graxos é importante para nozes/castanhas em muitos aspectos, entre eles:

a. Qualidade nutricional: os ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) e poli-insaturados (AGPIs) presentes oferecem propriedades nutricionais superiores em relação aos ácidos graxos saturados (AGSs);
b. Possíveis benefícios dos AGMIs e AGPIs à saúde: redução das lipoproteínas de baixa e de muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente);
c. Atributos sensoriais: *flavours* e textura desejáveis são atribuídos à presença desses ácidos graxos;
d. Vida de prateleira (s*helf life*): AGMIs e AGPIs são mais suscetíveis à oxidação e, por conseguinte, à formação de *flavours* desagradáveis (*off flavours*).

Estes mesmos autores, Venkatachalam e Sathe (2006), analisaram amostras de *Macadamia integrifolia* obtidas no estado da Califórnia (EUA), que apresentaram um teor de lipídeos totais de 66,16% e, assim como outras nozes, contêm predominantemente ácidos graxos monoinsaturados (77,43% do total de lipídeos), destacando-se os ácidos oleico (C18:1) e o palmitoleico (C16:1).

Kaijser, Dutta e Savage (2000) encontraram valores de lipídeos totais que variaram entre 69 e 78g/100g b.s. em amostras de quatro cultivares de macadâmias

(Jordan, PA 39, Beaumont e GT 207) produzidas em diferentes regiões da Nova Zelândia. A variação nos teores de lipídeos entre as amostras evidenciaram a interferência direta das diferenças entre as cultivares, das características edafoclimáticas (solo e clima) distintas entre as áreas produtoras e do manejo na composição de ácidos graxos, bem como na concentração de antioxidantes lipossolúveis.

O Quadro 3 apresenta os perfis de ácidos graxos da noz macadâmia encontrados por diferentes autores, confirmando o predomínio dos AGMIs e o elevado teor de lipídeos.

Ácidos Graxos	Venkatachalam e Sathe (2006)*	Maguire et al. (2004)**	USDA (2009)*** Macadâmia Crua	USDA (2009)*** Macadâmia Torrada
Total Saturados	18,18 ± 0,18	15,10	12,06	11,95
12:0	0,09 ± 0,00	nd	0,07	0,07
14:0	0,90 ± 0,01	0,95	0,66	0,67
16:0	8,88 ± 0.03	8,37	6,03	5,93
17:0	0,00 ± 0,00	nd	0,12	0,15
18:0	4,26 ± 0,07	3,17	2,33	2,28
20:0	2,95 ± 0,06	2,28	1,94	1,94
22:0	0,79 ± 0,02	0,20	0,61	0,62
24:0	0,32 ± 0,01	nd	0,28	0,27
Total Monoinsaturados	77,43 ± 0,16	82,40	58,88	59,27
16:1	18,69 ± 0,15	17,28	12,98	12,72
18:1	58,51 ± 0,01	65,15	43,75	44,38
20:1	0,00 ± 0,00	nd	1,89	1,92
22:1	0,23 ± 0,00	nd	0,23	0,24
Total Polinsaturados	4,39 ± 0,02	2,40	1,50	1,50
18:2	1,81 ± 0,02	2,31	1,29	1,30
18:3	2,58 ± 0,00	0,06	0,20	0,19
20:3	nd	0,01	0,00	0,00
22:6	nd	0,27	0,00	0,00

Quadro 3: Perfis de ácidos graxos de *Macadamia integrifolia* encontrados por diferentes autores.

*Dados expressos em média ± desvio-padrão (n=2), em g/100g de óleo. **Dados expressos em médias (n=3), em g/100g de óleo. ***Dados expressos em g/100g de amostra de macadâmia. nd = não determinado.

2.4 A oxidação de lipídeos

A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração dos alimentos. É uma grande preocupação econômica para a indústria alimentícia, pois desencadeia, em óleos e produtos oleaginosos, o desenvolvimento de *off flavors* e odores indesejáveis, comumente chamados de ranço (ranço oxidativo), que diminuem, assim, sua aceitabilidade. Essas reações oxidativas podem causar perda da qualidade nutricional dos alimentos, e seus produtos são potencialmente tóxicos. (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007).

Os dois componentes mais envolvidos na oxidação lipídica são os ácidos graxos insaturados e o oxigênio. Neste processo, o oxigênio da atmosfera é adicionado a determinados ácidos graxos, gerando intermediários instáveis que eventualmente se quebram para formar os compostos de aroma indesejável. Embora a oxidação enzimática (através da atuação da lipoxigenase, por exemplo) e a foto-oxidação (envolve a ação do oxigênio singlete) desempenhem um papel importante, o processo mais comum e significativo pelo qual ácido graxo insaturado e oxigênio interagem é um mecanismo ocasionado pela presença de radical livre, chamado de auto-oxidação caracterizado por três fases principais: Iniciação, Propagação e Término (Quadro 4) (AKOH; MIN, 2002).

INICIAÇÃO	$I^{\bullet} + RH \rightarrow IH + R^{\bullet}$
PROPAGAÇÃO	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + RH \rightarrow R^{\bullet} + ROOH$
TÉRMINO	$R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow R_2$ $2RO_2^{\bullet} \rightarrow O_2 + RO_2R$ $RO_2^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RO_2R$

Quadro 4: As três etapas da auto-oxidação: iniciação, propagação e término. Adaptado de Akoh e Min (2002) e Damodaran, Parkin e Fennema (2007).

A etapa de iniciação ocorre quando um hidrogênio é abstraído de um ácido graxo insaturado (RH) por um iniciador ($I^{\bullet}$), resultando em um radical livre lipídico ($R^{\bullet}$), que, por sua vez, reage com o oxigênio molecular para formar um radical peroxil ($ROO^{\bullet}$). Enquanto a irradiação pode abstrair diretamente esse hidrogênio dos lipídeos, a iniciação, comum à maioria dos alimentos, é identificada pela reação de ácidos graxos com espécies reativas de oxigênio (EROs). A etapa de propagação é promovida pela interação lipídeo-lipídeo, na qual o radical peroxil ($ROO^{\bullet}$) abstrai o hidrogênio de uma molécula adjacente (RH), resultando em um hidroperóxido lipídico (ROOH) e um novo radical livre ($R^{\bullet}$). Interações como esta ocorrem de 10 a 100 vezes antes de dois radicais livres se ligarem e terminar o processo. Um acréscimo no processo da oxidação lipídica, entretanto, ocorre através de reações de ramificação (também conhecidas como iniciação secundária): $Fe^{2+} + ROOH \rightarrow LO^{\bullet} + OH^{\bullet}$. Os radicais formados darão sequência, desta forma, à abstração do hidrogênio dos ácidos graxos insaturados (AKOH; MIN, 2002).

Para interromper a repetição dessa sequência de propagação, duas reações de terminação são encontradas: o acoplamento radical-radical e desproporcionamento radical-radical, processos nos quais dois produtos estáveis são formados a partir um radical A e outro radical B ($2RO_2^{\bullet} \rightarrow O_2 + RO_2R$ ou $RO_2^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RO_2R$) por um processo de transferência de um átomo ou grupo. Em ambos os casos, produtos não radicalares são formados (AKOH; MIN, 2002).

Os hidroperóxidos participam de numerosas reações complexas envolvendo a degradação e a interação com o substrato, resultando em números imensuráveis de compostos estáveis de vários pesos moleculares, *flavour* e significância biológica, como epóxidos e compostos voláteis e não-voláteis (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007; RAMALHO; JORGE, 2009).

Pokorný (2007) descreve os tipos de inibidores que podem atuar no processo de oxidação lipídica:

- ✓ Inibidores das reações de oxidação por radicais livres, chamados de antioxidantes preventivos, que inibem a formação de radicais livres lipídicos; são compostos importantes que atuam na decomposição dos hidroperóxidos em radicais livres, durante o período de iniciação;
- ✓ Inibidores que interrompem a reação em cadeia do período de propagação;
- ✓ Supressores do oxigênio singlete (carotenóides, especialmente o licopeno);
- ✓ Sinergismo de propriedades antioxidantes, ou seja, substâncias que, sozinhas, não são eficientes, mas que aumentam a atividade de antioxidantes atuantes na propagação, quando estão misturadas a eles (o ácido cítrico é um exemplo);
- ✓ Agentes redutores, como tioéteres, que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis;
- ✓ Queladores de metais, que convertem metais pró-oxidantes, especialmente ferro e derivados do cobre, em produtos estáveis. Se não forem quelados, esses metais promovem a decomposição dos hidroperóxidos lipídicos em radicais livres. A quercetina, os taninos e os fitatos são bons exemplos da eficiência dos queladores de metais;
- ✓ Inibição de enzimas pró-oxidantes (especialmente a lipoxigenase).

Garantir a alta qualidade de lipídeos e de produtos oleaginosos e prolongar o tempo de estocagem são características interessantes que estão diretamente associadas com a estabilidade, quer pela adição de antioxidantes, quer pela

presença de compostos ativos intrínsecos do próprio vegetal. A alta estabilidade oxidativa de lipídeos é importante tanto para a proteção da saúde, quanto por razões econômicas (MARINOVA; YANISHLIEVA, 2003).

2.5 Antioxidantes

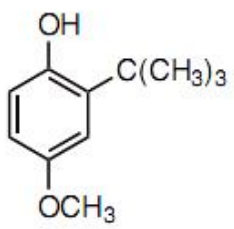
Os antioxidantes são qualquer substância que, em baixas concentrações, comparadas a um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação daquele substrato (HALLIWELL et al., 1995).

Os antioxidantes atuam em etapas diferentes na sequência oxidativa que envolve as moléculas de lipídeos. Podem agir na diminuição da concentração de oxigênio, na interceptação do oxigênio singlete, na prevenção da iniciação ao sequestrar os primeiros radicais, como o radical hidroxil, na ligação com íons metálicos catalisadores do processo oxidativo, na decomposição dos produtos primários da oxidação a espécies não radicais e na prevenção da abstração do hidrogênio dos substratos (SHAHIDI; NACZK, 2003).

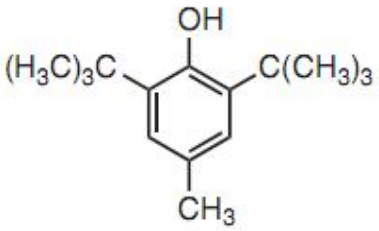
Os antioxidantes são utilizados em alimentos para prevenir a deterioração durante o processamento, armazenamento e cocção, pois a formação de peróxidos de ácidos graxos saturados e produtos secundários da oxidação lipídica podem ser prejudiciais à saúde e comprometerem a qualidade do alimento (WÜRTZEN, 1990).

O butil hidroxianisol (BHA), o butil hidroxitolueno (BHT) e o terc-butil hidroquinona (TBHQ) são três dos antioxidantes fenólicos sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos permitidos pelo Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010; FDA, 2010; SHAHIDI; NACZK, 2003).

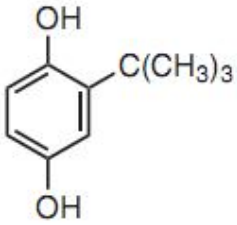
A Figura 3 apresenta as estruturas químicas do BHA, do BHT e do TBHQ.



BHA
(2-*terc*-butil-4-hidroxianisol;
3-*terc*-butil-4-hidroxianisol)



BHT
(2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol;
3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxitolueno)



TBHQ
(2-(1,1-Dimetiletil)-1,4-benzenodiol)

Figura 3: Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Esses antioxidantes sintéticos exibem polaridade variada e podem ser ordenados, do mais apolar para o mais polar, em: BHT > BHA > TBHQ. O mecanismo de ação antioxidante desses compostos envolve a formação de um radical fenólico estável que não mais catalisam a oxidação de outras moléculas nem reagem com o oxigênio para formar peróxidos de antioxidantes capazes de se auto-oxidar. Os fenólicos sintéticos são efetivos em diversos sistemas alimentícios; entretanto, seu uso vem diminuindo como reflexo da preocupação com a segurança e a demanda por produtos totalmente naturais (AKOH; MIN, 2002).

Em 1990, Würtzen já alertava que extensivos testes toxicológicos estavam sendo desenvolvidos para garantir a segurança na ingestão de aditivos antioxidantes sintéticos, pois estes apresentavam efeitos tóxicos devido à sua reatividade em processos de oxi-redução.

Tendo em vista os indícios de problemas oriundos do consumo desses antioxidantes sintéticos, as pesquisas passaram a se dirigir no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que permitiriam a substituição dos sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002).

Os antioxidantes naturais, principalmente com estrutura fenólica, têm sido utilizados pelas indústrias alimentícias para prevenir a deterioração de seus produtos e manter o valor nutricional. Esse grupo de antioxidantes de origem natural também tem chamado a atenção de profissionais da saúde, pois contribuem com o combate a espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs) e de cloro (ERCls) no organismo, que estão associados a doenças degenerativas (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Segundo Soares (2002), pesquisas têm sido centralizadas nos compostos fenólicos de origem vegetal, pois estes atuam como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia da auto-oxidação, e como queladores de metais catalisadores do processo oxidativo, tanto *in vitro*, como *in vivo*.

2.5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos em alimentos e em nutracêuticos têm origem em uma das principais classes de metabólitos secundários em plantas, derivada da fenilalanina e, em número menor, da tirosina. Eles podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático trazendo um ou mais grupos hidroxila. Seus derivados funcionais também estão incluídos (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Os fenólicos variam entre simples moléculas de fenóis, como os ácidos fenólicos, e compostos altamente polimerizados de alto peso molecular, como os taninos (BRAVO, 1998).

A ocorrência desses compostos em tecidos animais ou em outros materiais que não sejam plantas é devido, normalmente, à ingestão dos alimentos de origem vegetal, que contêm uma grande variedade de derivados fenólicos, incluindo os

próprios fenólicos simples, fenilpropanoides, derivados do ácido hidroxibenzoico, flavonoides, taninos, lignanas e ligninas. Essa variedade de substâncias é essencial para o crescimento e reprodução de plantas e ações antinutricionais e antipatogênicas. Alguns fenólicos podem contribuir com a pigmentação do vegetal e também atuar como antibióticos, pesticidas naturais, atrativo para polinizadores, proteção contra luz ultravioleta e impermeabilizante de parede celular (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Durante muito tempo, os polifenóis foram classificados como fatores antinutricionais, devido ao efeito adverso dos taninos na digestibilidade de proteínas. Contudo, houve um aumento no interesse sobre compostos fenólicos em alimentos, a respeito de sua capacidade antioxidante (inibição da propagação do radical livre e atividade quelante de metais), e de sua possível implicação benéfica na saúde humana (BRAVO, 1998).

O consumo de alimentos de origem vegetal ricos em polifenóis atribui à dieta as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e o potencial quimiopreventivo do câncer (indução de apoptose em células cancerosas ou interrupção de alguma fase do ciclo celular). A maioria dessas ações biológicas tem sido atribuída à sua capacidade redutora intrínseca (HAN; SHEN; LOU, 2007). Os compostos fenólicos podem também contribuir com a inibição da patogênese de doenças ainda mais complexas, tais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), câncer, aterosclerose e diabetes (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Todas as classes de fenólicos possuem a estrutura de sequestradores de radicais livres. Entretanto, a atividade desses antioxidantes pode variar muito. Os fatores que influenciam a atividade antioxidante de fenólicos de origem vegetal incluem: a posição e o grau de hidroxilação, a polaridade, a solubilidade, o potencial

de redução, a estabilidade do fenólico ao processamento de alimentos e a estabilidade do radical fenólico. Ao mesmo tempo, muitos fenólicos apresentam grupamentos ácidos e anéis que podem participar da quelação de metais. Em certas condições, essas mesmas propriedades de quelar metal, além do elevado potencial redução, podem acelerar as reações oxidativas catalisada pelos metais, levando a atividade pró-oxidante dos compostos fenólicos de plantas (AKOH; MIN, 2002).

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos se deve à grande variedade de combinações que acontece na natureza. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em classes, que são apresentadas na Tabela 1 (ANGELO; JORGE, 2006).

Tabela 1: Classe dos compostos fenólicos presentes em plantas e respectivas estruturas (ANGELO; JORGE, 2006).

CLASSE	ESTRUTURA
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxihidroxibenzoicos	C_6–C_1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6–C_2
Ácidos hidroxihidroxicinâmicos, fenilpropanoides	C_6–C_3
Nafitoquinonas	C_6–C_4
Xantonas	C_6–C_1–C_6
Estilbenos, antoquinonas	C_6–C_2–C_6
Flavonoides, isoflavonoides	C_6–C_3–C_6
Lignanas, neolignanas	$(C_6–C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6–C_3–C_6)_2$
Ligninas	$(C_6–C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6–C_3–C_6)_n$

Dentre as classes de compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, os taninos, os tocoferóis e os ácidos fenólicos (divididos em derivados do ácido hidroxibenzoico e do ácido hidroxicinâmico) como os antioxidantes mais comuns (ANGELO; JORGE, 2006).

Os flavonoides (Figura 4) estão amplamente distribuídos no reino vegetal, presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídios ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C_6-C_3-C_6 (ANGELO;JORGE, 2006). Neste grupo se encontram as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002).

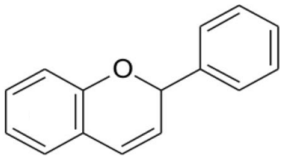


Figura 4: Estrutura química geral dos flavonoides (ANGELO; JORGE, 2006).

Os taninos (Figura 5) possuem o peso molecular relativamente alto e constituem uma classe de polifenóis (ANGELO; JORGE, 2006). São moléculas altamente hidroxiladas e podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. Essa característica é a responsável pela adstringência de alimentos ricos em taninos, devido à precipitação das proteínas salivares (BRAVO, 1998).

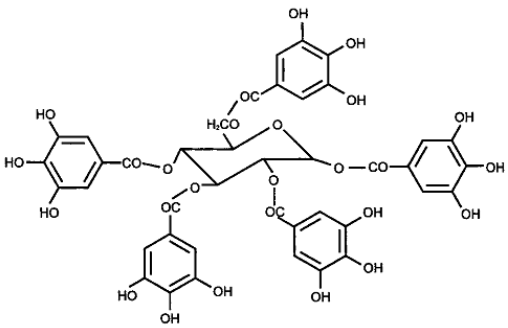


Figura 5: Estrutura química do ácido tânico (BRAVO, 1998).

Os tocoferóis (Figura 6) são compostos monofenólicos, existentes em vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas, que possuem atividade

antioxidante e vitamina E. Eles estão agrupados em duas séries de compostos que possuem estrutura química semelhante e recebem o nome genérico de tocóis e tocotrienóis. Os compostos da série tocóis possuem cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis, enquanto que os da série tocotrienóis possuem cadeia insaturada A nomenclatura desses compostos recebem o prefixo de α, β, γ, δ dependendo do número e posição do grupo metila ligado ao anel aromático. O α-tocoferol é o composto que apresenta maior atividade (ANGELO; JORGE, 2006).

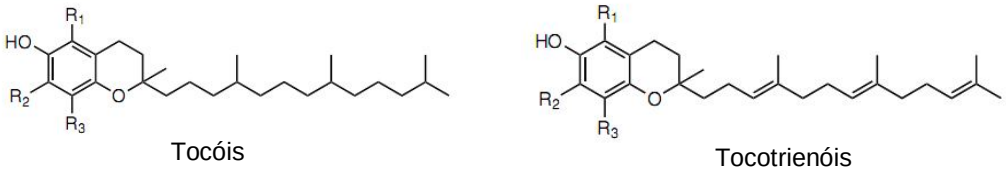


Figura 6: Estruturas químicas gerais dos tocóis e dos tocotrienóis (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Os ácidos fenólicos (Figura 7) são divididos em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico,

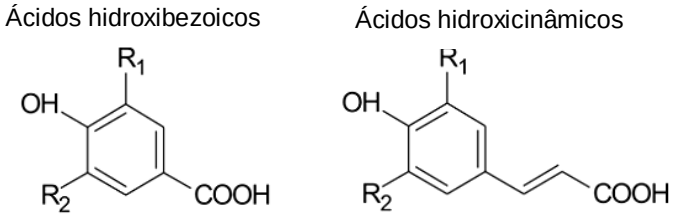


Figura 7: Estrutura química geral dos ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, pertencentes à classe dos ácidos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2006).

vanílico e siríngico, que apresentam a estrutura comum C_6–C_1; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C_6–C_3), como os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sináptico (ANGELO; JORGE, 2006).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos mais ativos do que os derivados do ácido hidroxibenzoico. A presença do grupo CH=CH–COOH em derivados do ácido hidroxicinâmico garante mais eficiência do que o grupamento COOH dos ácidos hidroxibenzoicos (MARINOVA; YANISHLIEVA, 2003). Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido hidroxicinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido hidroxibenzoico não apresentam essa característica (ANGELO; JORGE, 2006).

Não há alterações na atividade antioxidante de derivados de ácido hidroxibenzoico, quando ocorre aumento na temperatura; entretanto, a atividade de derivados de ácido hidroxicinâmico aumenta nessa circunstância (MARINOVA; YANISHLIEVA, 2003).

Os diferentes fenólicos pertencentes às classes dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, flavonoides e taninos podem se apresentar nas formas livre e esterificada solúvel ou insolúvel-ligada (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Broinizi et al. (2007) demonstraram, com a avaliação de frações fenólicas do pseudofruto do caju, que a potencialização da atividade antioxidante não se deve apenas a um ácido fenólico, mas possivelmente à associação deles.

Esse efeito de sinergismo entre compostos antioxidantes também foi notado por Melo et al. (2003) em extrato aquoso de coentro, considerado como um antioxidante em potencial, devido à presença dos fenólicos, cuja ação pode ser intensificada ao serem empregados juntamente com BHT. Isso significaria uma redução no emprego do antioxidante sintético, por conta do seu sinergismo com os compostos fenólicos presentes naturalmente no alimento (MELO et al., 2003).

2.5.1.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Uma série de métodos espectrofotométricos para a quantificação de compostos fenólicos em materiais vegetais tem sido desenvolvida. Baseados em princípios distintos, esses ensaios são usados para determinar vários grupos estruturais presentes em compostos fenólicos. Os métodos espectrofotométricos podem quantificar todos os compostos fenólicos extraíveis como um grupo ou pode determinar uma substância fenólica específica, como o ácido sinápico, ou uma de suas classes, como os ácidos fenólicos. O teste com o reagente Folin-Ciocalteau é um dos mais frequentemente utilizados (SHAHIDI; NACZK, 2003).

O reagente Folin-Ciocalteau não é considerado específico e detecta todos os grupos fenólicos em extratos, incluindo os que estão ligados a proteínas (SHAHIDI; NACZK, 2003). A ação desse reagente consiste de uma solução ácida amarela, contendo um complexo de íons poliméricos formados pelos ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico. Este reagente oxida o fenolato, resultando na produção do complexo molibdênio-tungstênio, de coloração azul. Os fenóis são oxidados rapidamente apenas em soluções alcalinas, gerando então concentrações desejáveis de íons fenolatos. As condições ótimas para uma produção razoavelmente rápida e uma retenção mais longa da coloração devem incluir uma concentração elevada do reagente molibdo-tungstato e alcalinidade moderada (SINGLETON; ROSSI, 1965).

2.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de compostos naturais e sintéticos tem sido estudada através de vários métodos, que se diferem quanto à duração, modo de mensuração e condições de temperatura, oxigenação e o meio. O meio pode ser lipídico, emulsionado ou aquoso (CUVELIER; BONDET; BERSET, 2000).

A atividade antioxidante é fortemente influenciada pela composição do sistema-teste e pode variar significativamente em sistemas multifásicos, devido às diferenças de polaridade do antioxidante (FRANKEL; MEYER, 2000).

A atividade dos antioxidantes é frequentemente determinada em ensaios de competição. Nestes ensaios, um antioxidante A e uma molécula-detector D competem pela espécie reativa R. O efeito inibitório competitivo de A na reação de D com R é uma forma de medir a atividade antioxidante de A. As constantes da taxa de reação de D e de A são comparadas, e a concentração inicial das espécies reativas deve ser tão baixa quanto possível, a fim de se avaliar essa atividade com precisão (BALK; BAST; HAENEN, 2009).

Em contraste com o ensaio de competição, os ensaios de capacidade antioxidante medem o número de radicais que podem ser sequestrados por um antioxidante. A taxa de reação do antioxidante com as espécies reativas é menos importante, nestes casos, do que nos ensaios de competição (BALK; BAST; HAENEN, 2009).

2.6.1 Métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

2.6.1.1 Método de co-oxidação do β-caroteno e do ácido linoleico

Este método foi descrito por Marco (1968) e posteriormente modificado por Miller (1971). É um ensaio colorimétrico de competição entre o β-caroteno e o antioxidante-teste em um sistema emulsionado de óleo (ácido linoleico) em água. A leitura da absorbância, em espectrofotômetro, é realizada no comprimento de onda de 470nm.

O mecanismo de descoloração rápida do β-caroteno é um fenômeno resultante da formação de hidroperóxidos a partir do ácido linoleico e da ausência de um antioxidante. Os radicais livres atacam as duplas ligações das moléculas altamente insaturadas do β-caroteno, que perde seu cromóforo, ocasionando a descoloração da solução alaranjada característica. Essa reação pode ser monitorada espectrofotometricamente, pois os valores referentes à absorbância tendem a diminuir com o passar do tempo devido à peroxidação. A presença do antioxidante pode impedir o ataque ao β-caroteno, ao reagir com os radicais livres do sistema, e alterar o padrão de decréscimo da absorbância. Geralmente, considera-se elevada a atividade antioxidante quanto mais lentamente ocorre a diminuição dos valores da absorbância (HUANG; WANG, 2004).

Normalmente se utiliza o antioxidante sintético BHT como controle-positivo para se comparar os resultados. Esse método tem sido utilizado para analisar várias matrizes alimentares, principalmente frutos e sementes ricas em lipídeos (LIMA, 2008).

2.6.1.2 Método de redução do radical sintético DPPH

Este é um método descrito em 1958 por Blois, que foi adaptado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset, em 1995. A capacidade antioxidante de compostos específicos ou extratos é avaliada espectrofotometricamente pela reação do antioxidante com o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Figura 8), em solução metanólica (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

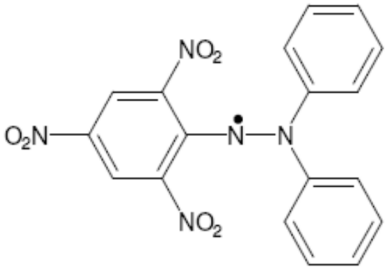


Figura 8: Estrutura química do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH$^{\bullet}$) (LIMA, 2007).

A redução do DPPH$^{\bullet}$ é acompanhada através do decréscimo do valor da absorbância em seu comprimento de onda característico, durante a reação. Em sua forma radicalar, o DPPH$^{\bullet}$ absorve em 515nm; entretanto, após a redução por um antioxidante (AH) ou por outra espécie de radical (R$^{\bullet}$), a absorção desaparece, devido à perda do cromóforo (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow DPPH\text{-}R$$

Neste ensaio, o decaimento da absorbância pode variar significativamente, devido ao tipo e à concentração do agente antioxidante (FRANKEL; MEYER, 2000).

2.6.1.3 Determinação do índice de atividade antioxidante pelo método de oxidação acelerada em Rancimat®

Este método é comumente utilizado para avaliar as propriedades de antioxidantes, baseando-se no aumento da condutividade elétrica, devido à formação de ácidos dicarboxílicos voláteis resultantes da oxidação lipídica (HAN; WENG; BI, 2008).

O método do Rancimat determina o período de indução (PI), em horas, mensurando o aumento da acidez volátil de subprodutos liberados pela oxidação do óleo a 110ºC, sob um fluxo de ar de 20L/h. A concentração dos produtos da degradação do óleo, transferidos a um recipiente com água deionizada, é avaliada através da medição da condutividade. Períodos mais longos de indução sugerem maior atividade do aditivo antioxidante (PAREJO et al., 2003)

Sob as temperaturas elevadas, o mecanismo de oxidação lipídica, no Rancimat, apresenta alterações significativas, observando-se a ocorrência de reações laterais (polimerização, ciclização e cisão), normalmente irrelevantes em temperaturas normais de armazenamento (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Quando este método é utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de compostos, verifica-se que o índice de proteção global, medido a alta temperatura, é em regra inferior ao verificado a temperaturas mais baixas. De fato, na presença de um antioxidante, a velocidade do processo oxidativo diminui, devido ao aumento da energia de ativação da reação. Porém, este é compensado pelo fornecimento de energia térmica. O grau de eficácia dos antioxidantes, medido a alta temperatura, pode também refletir a maior ou menor estabilidade térmica dos compostos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.6.2 Paradoxo polar

Os antioxidantes apresentam comportamentos distintos, de acordo com o meio no qual se inserem, que pode ser lipídico, emulsionado e aquoso (CUVELIER; BONDET; BERSET, 2000).

O fenômeno, no qual antioxidantes polares são mais ativos em sistemas lipídicos, e antioxidantes apolares em lipídeos suspensos em sistema aquoso (emulsão), foi denominado “Paradoxo Polar” por Porter, em 1980 (FRANKEL; MEYER, 2000).

Em 1989, Porter, Black e Drolet afirmaram que, com exceção dos tocoferóis, os antioxidantes são compostos preponderantemente polares (ácidos fenólicos, flavonoides, catequinas, taninos hidrolisados e condensados), e, em concentrações equimolares, poder-se-ia esperar que fossem relativamente ineficazes em membranas de tecidos intactas de alimentos e emulsões (leites desidratados, produtos de padaria, alimentos de conveniência), comparados a compostos lipofílicos ou de baixo balanço hidrofílico-lipofílico. Entretanto, esse nem sempre é o resultado que se observa.

Este comportamento paradoxal de antioxidantes foi confirmado através de observações nas quais antioxidantes hidrofílicos (trolox, ácido ascórbico, compostos provenientes do alecrim, como o ácido rosmarínico e o ácido carnósico) foram mais eficientes em óleos do que antioxidantes lipofílicos correspondentes (α-tocoferol, palmitato de ascorbila e carnosol) (FRANKEL; MEYER, 2000).

Tal fenômeno é explicado por diferenças na afinidade de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos com o ar, óleo e água, e com a interface. Portanto, em óleos, os antioxidantes hidrofílicos podem ser mais eficientes por atuarem na interface óleo-ar, inibindo a oxidação lipídica. Em sistemas emulsionados de óleo-em-água,

antioxidantes hidrofóbicos atuam no óleo e na interface óleo-água, onde são mais protetores do que antioxidantes hidrofílicos, que estão dispersos na fase aquosa e são incapazes de proteger adequadamente os lipídeos na interface água-óleo. Quando dissolvidos em fase aquosa, a eficiência dos antioxidantes hidrofílicos pode ser ofuscada pela sua atividade pró-oxidante, resultado da redução de metais para o estado mais ativo de valência (FRANKEL; MEYER, 2000).

2.7 Efeito do tratamento térmico sobre compostos bioativos de alimentos

O processamento de alimentos e de ingredientes frequentemente exerce importante efeito em seus constituintes, incluindo compostos bioativos (SHAHIDI, 2009).

Na produção de proteína isolada e concentrada de soja, há um substancial decréscimo no teor de isoflavonas, sugerindo o efeito negativo do processamento no teor de bioativos (SHAHIDI, 2009).

Em azeite de oliva extra virgem, alimento conhecidamente rico em compostos fenólicos, houve um aumento do índice de peróxido de amostras submetidas ao aquecimento de 180ºC por mais de uma hora (CARRASCO-PANCORBO et al., 2007).

Durante o tratamento térmico, devido à alta temperatura e a absorção de oxigênio e de água, os triacilgliceróis do óleo podem sofrer uma série de reações, como a hidrólise, a oxidação, a isomerização e a polimerização (CARRASCO-PANCORBO et al., 2007). Contudo, um número de fenólicos, em cereais, por exemplo, especialmente em produtos torrados, pode ser formado como produtos da

degradação térmica ou enzimática de substitutos dos ácidos hidroxicinâmico e benzoico, o que minimizaria os efeitos dos ataques de espécies reativas de oxigênio (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Outro efeito interessante pode ser observado no licopeno do tomate. O tratamento térmico altera a configuração da dupla ligação da estrutura para *cis*, tornando o composto mais biodisponível. A torra da canola também parece ter efeito positivo sobre a estabilidade de seus ácidos graxos poli-insaturados, devido à formação de produtos da reação de Maillard, que possuem potencial antioxidante (SHAHID, 2009).

Os antioxidantes fenólicos geralmente se degradam durante o processo de oxidação de óleos e gorduras e produzem uma gama de produtos, especialmente dímeros de antioxidantes. A maioria dos produtos da oxidação dos fenólicos ainda mantém certa atividade antioxidante (SHAHIDI; NACZK, 2003).

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar a noz macadâmia (*Macadamia integrifolia*, Maiden e Betche) submetida aos processos de secagem e de torra, quanto a composição química e a atividade antioxidante *in vitro*.

3.1 Objetivos específicos

- Caracterizar as amostras através da composição centesimal e do perfil de ácidos graxos;
- Determinar o teor total de compostos fenólicos e identificá-los;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos e de frações de ácidos fenólicos da macadâmia crua e torrada, através dos métodos de redução do radical sintético DPPH, de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico e de Rancimat®;
- Comparar o comportamento dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso entre si e entre a macadâmia crua e torrada, bem como das frações de ácidos fenólicos livre e esterificada solúvel e insolúvel de ambas as amostras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Amostra

As amostras de macadâmia crua (submetida apenas à secagem: temperaturas não maiores que 60ºC, por aproximadamente 30 dias) e torrada (150ºC por aproximadamente 10 minutos) foram fornecidas gentilmente pela empresa Queen Nut Macadâmia, localizada na cidade de Dois Córregos-SP, com a garantia de que a macadâmia torrada pertencia ao mesmo lote que a crua, e não houve seleção por cultivar, já que a empresa processa nozes de diferentes produtores da região onde está instalada.

As duas amostras recebidas eram do estilo 2 (50% inteira e 50% metade) e permaneceram armazenadas a -20ºC sob atmosfera inerte (N_2) até a realização das análises, quando foram, então, trituradas em gral e tamisadas.

4.1.2 Reagentes utilizados

Composição Centesimal

Extrato Etéreo

Éter etílico	Synth E1017

Proteína

Sulfato de potássio	Synth 35490
Sulfato de cobre	Nuclear 1260
Ácido sulfúrico	Synth A 1 063
Hidróxido de sódio	PA H 1017.01. AH
Ácido bórico	Nuclear 0025
Ácido clorídrico	Merck 100317.1000

Perfil de ácidos graxos

Ácido pirogálico	Synth A1052.01.AE
Ácido clorídrico	Merck 100317.1000
Padrão interno TG 13:0	Sigma
Éter etílico	Synth E1017
Éter de petróleo	Synth E1015
Etanol 95%	Synth A1082
Hexano	Merck 1.04374.1000
Tolueno	Merck 1.04374.1000
Clorofórmio	Synth C1062
Sulfato de sódio anidro	Synth S2032.01.AH
Trifluoreto de boro 7%	Sigma B1252 (14%)

Extratos aquoso, alcoólico e etéreo

Água destilada	
Etanol	Synth E1008
Éter etílico	Synth E1017

Frações de ácidos fenólicos

Tetrahidrofurano	Synth T100801
Acetato de etila	Synth A1001
Éter etílico	Synth E1017
Hidróxido de sódio	Synth H2000
Ácido clorídrico	Merck 100317.1000
Hexano	Synth H1007
Sulfato de sódio anidro	Synth S2032.01.AH

Determinação dos fenólicos totais

Carbonato de sódio	Synth C2011
Reagente Folin-Ciocalteau	Merck 1.09001
Ácido gálico	Fluka 48630

Identificação dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Ácido metafosfórico – padrão analítico	Carlo Erba 407460
Acetonitrila – padrão cromatográfico	Merck 1.00029.1000
Etanol	Merck
Água deionizada	Millipore Corporation
Padrão de ácido gálico	Sigma G7384
Padrão de ácido ferúlico	Sigma 46278
Padrão de ácido cafeico	Sigma C0625
Padrão de ácido clorogênico	Sigma C3878

Padrão de ácido elágico	Sigma E2250
Padrão de ácido protocatecuico	Sigma P-5630
Padrão de ácido p-cumárico	Sigma C9008
Padrão de ácido p-hidroxibenzoico	Sigma H-5376

Ensaio da redução do radical sintético DPPH

2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)	Sigma D4139
Metanol	Synth A1085

Ensaio em sistema β-caroteno/ácido linoléico

β-caroteno	Sigma C4589
Ácido linoléico (C18:2)	Sigma L1268
Tween 40	Sigma P1504
BHT	Sigma B1253

Atividade antioxidante pelo método Rancimat®

Óleo de soja desodorizado isento de antioxidante	Cargill
TBHQ	Sigma B9161
Etanol	Synth E1008
Água deionizada	Millipore Corporation

4.2 Métodos

4.2.1 Composição centesimal

A determinação da umidade foi feita em estufa a 105ºC até peso constante (AOAC, 2005; método 985.14). Para o resíduo mineral fixo, as amostras foram submetidas à estufa a 550ºC até peso constante (AOAC, 2005; método 923.03). O extrato etéreo foi obtido por fluxo intermitente de éter etílico em aparato de Soxhlet, por 16h (AOAC, 2005; método 948.22). As proteínas foram determinadas pelo método de Micro-Kjeldahl, e o fator de conversão utilizado foi 5,3 (AOAC, 2005; método 950.48; CHANG, 1998; VENKATACHALAM; SATHE, 2006). Os carboidratos foram calculados por diferença.

4.2.2 Perfil de ácidos graxos

Para a análise do perfil de ácidos graxos, os lipídeos foram extraídos por hidrólise ácida, esterificados, e os resultados convertidos em triacilgliceróis, de acordo com AOAC (2005; método 996.06). Os fatores teóricos de correção para o detector de ionização de chama foram aplicados, segundo a metodologia da AOCS (2004; método Ce 1h-05). A tridecanoína (C13:0) foi utilizada como padrão interno, e as condições de análise foram:

- Cromatógrafo a gás Shimadzu (modelo GC 17A, Kyoto, JPN), acoplado com o *software* Class GC 10.
- Coluna cromatográfica de sílica fundida Supelcowax 10 de 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno.
- Programação de temperatura da coluna: aquecimento a 1ºC/min, de 170ºC até 225ºC, permanecendo nesta temperatura por 10 min.
- Temperatura do vaporizador: 250ºC.
- Temperatura do detector: 270ºC.
- Gás de arraste: hélio (fluxo de 1 mL/min).
- Razão de divisão da amostra no injetor = 1:200.

4.2.3 Obtenção dos extratos etéreo, alcoólico (etanol) e aquoso da macadâmia crua e torrada

O processo de obtenção dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso, da macadâmia crua e da torrada, foi realizado de acordo com Jardini e Mancini-Filho (2007), no qual as amostras foram submetidas a uma extração sequencial, à temperatura ambiente (25ºC), com cada um dos três solventes em ordem crescente de polaridade: éter etílico, etanol e água destilada.

As extrações foram realizadas na proporção de 1:20 m/v (amostra:solvente), e os solventes utilizados foram o éter etílico, o etanol e a água destilada, de acordo com a polaridade (da menor para a maior). As amostras foram homogeneizadas durante uma hora com o solvente, sendo, em seguida, filtradas em funil de Büchner com auxílio de uma bomba de vácuo. O volume do filtrado foi aferido e completado com solvente, mantendo a proporção de 1:20 m/v. O resíduo proveniente da filtração foi seco, pesado e submetido à extração com o solvente subsequente. Os extratos obtidos foram coletados em frasco de vidro âmbar e estocados a -20°C. A Figura 9 representa as etapas da extração sequencial.

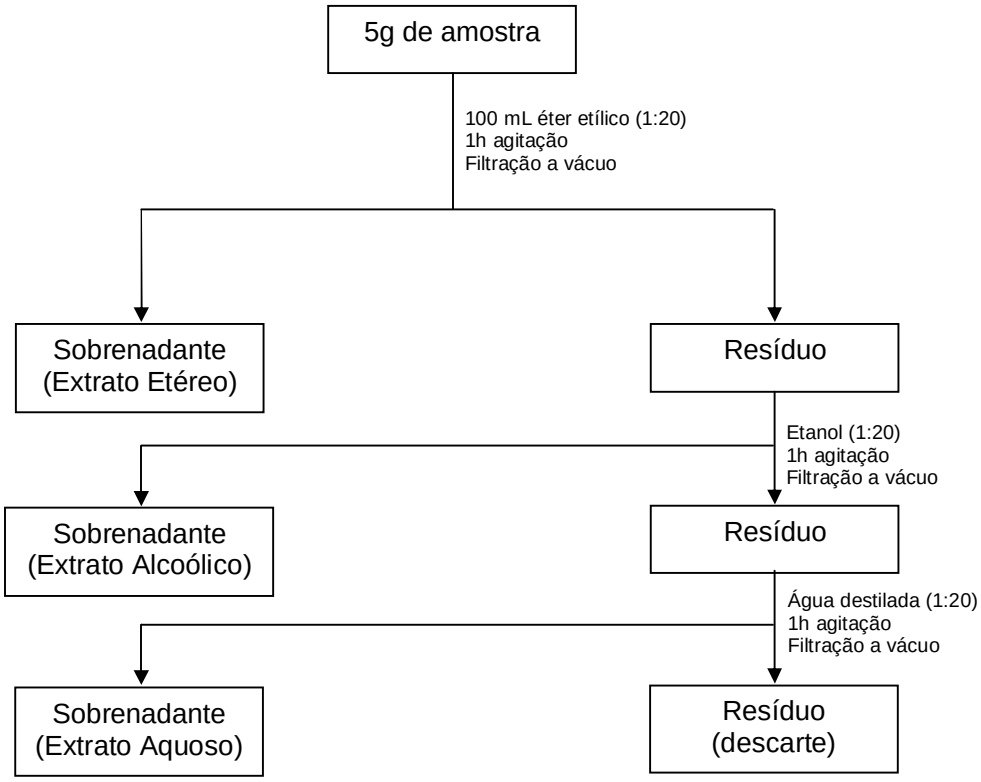


Figura 9: Extração sequencial para se obter os extratos etéreo (EE), alcoólico (EALc) e aquoso (EAq).

4.2.4 Obtenção dos ácidos fenólicos livres e esterificados (solúveis e insolúveis)

Para a extração dos ácidos fenólicos de cada uma das amostras (crua e torrada), utilizou-se o método descrito por Dabrowski e Sosulski (1984), no qual é feita uma extração sequencial com a finalidade de se obter as frações de ácidos fenólicos livres (AFL), de ácidos fenólicos esterificados solúveis e de ácidos fenólicos insolúveis ligados (AFI).

Para a extração dos ácidos fenólicos livres (AFL), foram adicionados 20mL de tetrahidrofurano (THF) a 1g da amostra previamente desengordurada, homogeneizando-os durante um minuto em ultra-turrax IKA (modelo DI 25 basic, Staufen, DEU). Esse procedimento foi repetido por mais cinco vezes. A cada uma das repetições, o sobrenadante era filtrado, desidratado em sulfato de sódio anidro, e recolhido em balão protegido da luz. O solvente foi removido em rotaevaporador da Micronal (modelo B18, Piracicaba, BRA), a 38ºC sob vácuo, restando os ácidos fenólicos livres que foram reconstituídos em 5 mL de metanol e armazenados a -20ºC.

O resíduo dessa etapa foi submetido a outras seis extrações com 20 mL de uma mistura de metanol/acetona/água destilada (7:7:6) cada, homogeneizando-os por cinco minutos em ultra-turrax e filtrando em papel de filtro. O filtrado foi rotaevaporado a 38ºC, sob vácuo, até restar apenas a fase aquosa, cujo volume foi aferido. Essa solução aquosa e o resíduo foram reservados para a próxima etapa.

A solução e o resíduo foram então submetidos a uma hidrólise alcalina com NaOH 4M por quatro horas (mesmo volume para a solução e 15 mL para o resíduo), sob agitação magnética e protegidos da luz, a fim de liberarem os fenólicos solúveis que estavam esterificados com proteínas da fase aquosa e os fenólicos insolúveis

ligados do resíduo. Em seguida, o pH de ambas as soluções foi corrigido para 2 (±0,1) com HCl 6M e os respectivos volumes aferidos e transferidos para funis de separação. Foram realizadas mais cinco lavagens com hexano (volumes iguais aos aferidos após o acerto do pH), sob agitação manual, a fim de remover a fase superior com possíveis resíduos de ácidos graxos, glicosídeos e outros contaminantes. Após a lavagem com o hexano, os volumes das duas soluções foram aferidos e transferidos para novos funis de separação, nos quais foram adicionadas as mesmas quantidades de uma mistura de éter etílico/acetato de etila/THF (1:1:1). Os funis foram agitados manualmente, e essa extração foi repetida por mais quatro vezes. A cada agitação, a fase superior das duas soluções foi filtrada, desidratada em sulfato de sódio anidro e recolhida em balão protegido da luz, seguindo para a rotaevaporação a 38ºC, sob vácuo. Os ácidos fenólicos solúveis (provenientes da fase aquosa) e os ácidos fenólicos insolúveis (provenientes do resíduo) foram reconstituídos, cada um, em 5 mL de metanol e armazenados em e frascos âmbar, a -20ºC.

Nesse tipo de extração, a etapa de hidrólise tem por objetivo minimizar as possíveis interferências de glicosídeos na subsequente cromatografia. A hidrólise alcalina, uma das opções mais utilizadas, é interessante devido à estabilidade dos fenólicos vegetais ser suficiente para suportar todo o processo e à fácil liberação os ácidos fenólicos encontrados em formas conjugadas (TURA; ROBARDS, 2002).

A Figura 10, a seguir, apresenta de forma esquematizada as etapas de extração dos ácidos fenólicos.

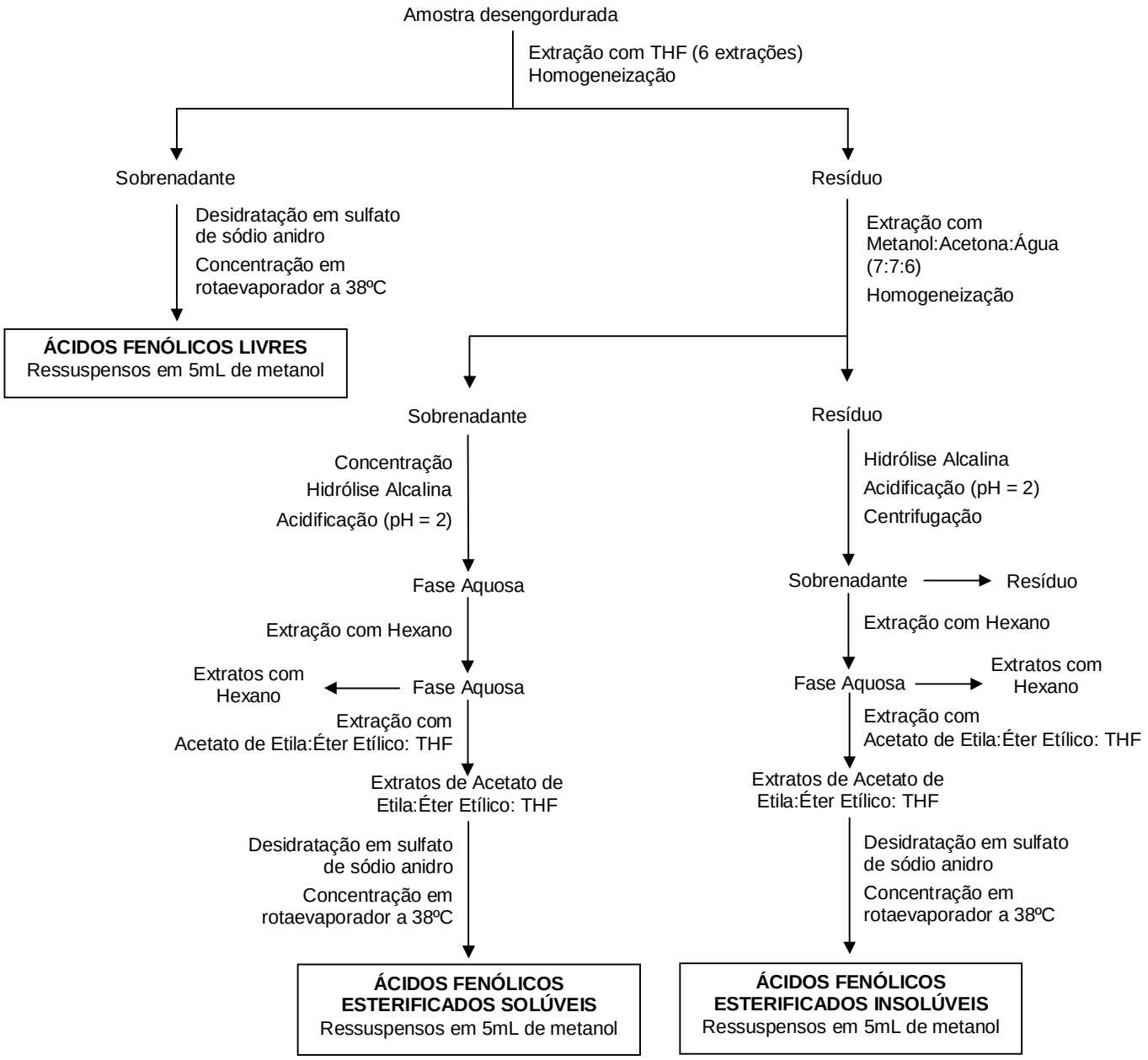


Figura 10: Extração das frações de ácidos fenólicos (DABROWSKI; SOSULSKI, 1984).

4.2.5 Quantificação dos compostos fenólicos totais

A quantificação dos fenólicos totais nos extratos e nas frações fenólicas foi realizada empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteau (SWAIN; HILLS, 1959).

A uma alíquota de 0,5 mL da solução-teste (antioxidante) foram adicionados 8mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau. A solução foi homogeneizada e, após 3min, acrescentou-se 1mL de solução saturada de Na_2CO_3. Após uma hora em repouso, as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro de luz visível Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA) a 720nm. O ácido gálico foi utilizado para obtenção da curva de calibração (Gráfico 1), e os resultados expressos em µg equivalente de ácido gálico/g extrato seco.

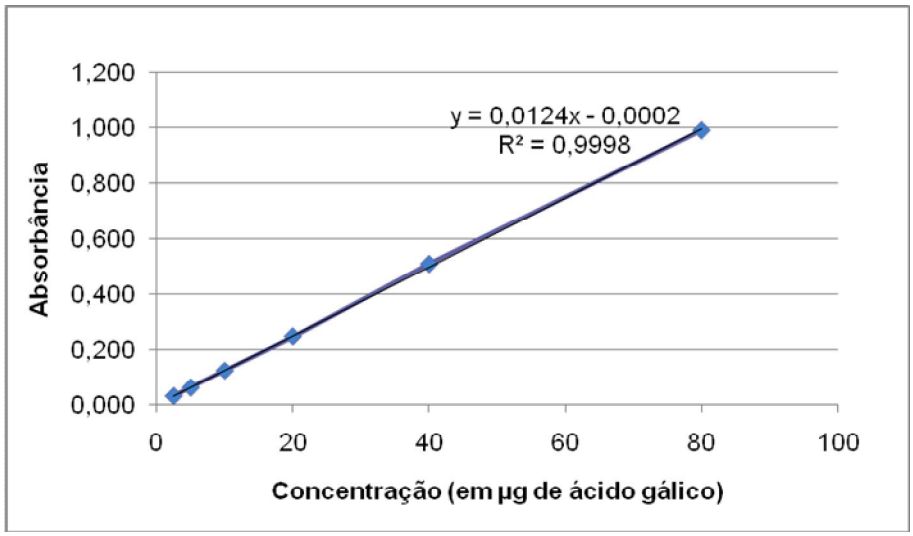


Gráfico 1: Curva de calibração do ácido gálico

4.2.6 Identificação dos ácidos fenólicos nas frações (AFL, AFI e AFS) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a identificação dos ácidos fenólicos presentes nas frações livre, solúvel e insolúvel das amostras de macadâmia crua e torrada, foram utilizados oito padrões.

São eles: ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido elágico, protocatecuico, p-cumárico e p-hidroxibenzoico.

Foram preparados dois pools de ácidos fenólicos em etanol 50%, e o ácido elágico (em tampão glicina 100mM, pH 10) foi analisado separadamente.

O sistema de gradiente binário, constituído pelo ácido metafosfórico 0,2% (eluente A) e pela acetonitrila (eluente B), foi diferente para cada um dos dois pools e para o ácido elágico e é apresentado na Tabela 2.

Foram injetados dois pools de padrões e o ácido elágico separadamente, de acordo com o comprimento de onda absorvido.

Tabela 2: Gradiente binário utilizado nos ensaios com os pools 1 e 2 e com o ácido elágico

Pool 1			**Pool 2**			**Ácido Elágico**		
Tempo (min)	Eluente A	Eluente B	Tempo (min)	Eluente A	Eluente B	Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0	95	5	0	90	10	Isocrático	70	30
10,1	90	10	10	90	10			
15	80	20	10,1	80	20			

Eluente A = ácido metafosfórico 0,2%
Eluente B = acetonitrila

O primeiro pool (Pool 1), que continha os padrões dos ácidos gálico, ferúlico, cafeico e clorogênico, na concentração de 100µg/mL, foi injetado e analisado nos comprimentos de onda de 275 e 330nm, e o ácido elágico (100µ/mL) apenas em 275nm. Para o segundo pool (Pool 2), composto pelos ácidos protocatecuico, p-cumárico e p-hidroxibezoico, na concentração de 100µg/mL, os comprimentos de onda utilizados foram de 260 e 310nm.

As três frações de ácidos fenólicos (AFL, AFS e AFI) da macadâmia crua e da torrada foram injetadas nas mesmas condições que os padrões, e os tempos de

retenção dos picos encontrados foram comparados com os padrões. Para a confirmação dos picos encontrados nas amostras, foram adicionadas a elas concentrações conhecidas dos padrões.

As condições cromatográficas foram:

- Coluna: coluna analítica de fase reversa Luna C18 (Phenomenex, Torrance, USA);
- Dimensões da coluna: 300 x 3,90mm x 10µm;
- Fluxo: 1 mL/min - Bombas Constametric SP (modelos 3500 e 3200, Fremont, USA);
- Injetor manual Rheodyne (modelo 7125, Cotati, USA): *loop* de 20µL;
- Detector LabAlliance (modelo 525, State College, USA).

4.2.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

4.2.7.1 Método de redução do radical DPPH

O método desenvolvido por Blois (1958) e adaptado por Brand-Willians (1995) tem por princípio a redução do radical sintético DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), provocando a descoloração da solução metanólica, que é detectada através de espectrofotometria.

Neste ensaio, 1,5 mL da solução de $DPPH^{\bullet}$ em metanol ($6x10^{-5}$M) foram adicionados a 0,5 mL de extrato/fração (antioxidante). As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro de luz visível Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA), a 517nm, após 30min de reação.

A porcentagem de inibição do radical foi calculada pela queda na leitura da densidade óptica das amostras em relação ao controle-negativo (apenas com o solvente), através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução do DPPH}^{\bullet} = 100 - (Abs_{am}/Abs_{c} \times 100)$$

Sendo,

Abs_c = leitura da absorbância do controle-negativo

Abs_{am}= leitura da absorbância da amostra

4.2.7.2 Ensaio em sistema β-caroteno/ácido linoleico

Neste ensaio, a atividade antioxidante foi determinada pelo método espectofotométrico (470nm) descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), baseado na descoloração do β-caroteno em uma emulsão em água, devido à formação de radicais provenientes da oxidação do ácido linoleico.

Foram misturados 20 µL de solução de β-caroteno em clorofórmio (20 mg/mL), 40 µL de ácido linoleico, 530 mg do emulsificante Tween 40 e 1 mL de clorofórmio. O clorofórmio foi volatilizado com nitrogênio gasoso (N_2). Acrescentou-se a água destilada previamente oxigenada e se agitou até que se formasse a emulsão, que deveria atingir a densidade ótica entre 0,6 e 0,7, a 470nm.

Em tubos para leitura em espectrofotômetro, concentrações diferentes de cada extrato e fração foram adicionadas a 5 mL da emulsão. Testaram-se também o antioxidante sintético BHT (como controle-positivo), sua associação com os extratos/frações e apenas o solvente destes (como controle-negativo). Após a primeira leitura (tempo zero), os tubos foram colocados em banho com água a 50ºC.

A leitura seguinte foi realizada após duas horas de reação (120min) em espectrofotômetro de luz visível Genesys (modelo Spectronic 20, Rochester, USA).

A porcentagem de inibição da oxidação do ácido linoléico foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição da Oxidação} = 100 - (Abs_{am}/Abs_c \times 100)$$

Sendo,

Abs_c = leitura da absorbância do controle-negativo

Abs_{am}= leitura da absorbância da amostra

4.2.7.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Rancimat®

Neste ensaio, 5g de óleo de soja desodorizado e isento de antioxidante foram pesados em tubos, aos quais também se adicionaram os extratos/frações em diferentes concentrações. O mesmo solvente de cada extrato ou fração foi adicionado ao controle-negativo, e o TBHQ foi o antioxidante sintético utilizado como controle-positivo, devido à sua maior resistência a altas temperaturas em relação a outros antioxidantes como o BHT (AKOH e MIN, 2002). Os tubos foram acoplados ao equipamento Rancimat Metrohm (modelo 743, Herisau, CHE), programado para a temperatura de 110ºC e fluxo de oxigênio de 20L/h. Os períodos de indução (em horas) foram obtidos através do software PC 743 Rancimat 1.0, e os resultados expressos pelo Índice de Atividade Antioxidante (IA) (METROHM, 2010), calculado pela fórmula a seguir:

$$IA = \frac{\text{PI com antioxidante}}{\text{PI sem antioxidante}}$$

Sendo,

IA = Índice de atividade antioxidante

PI = Período de indução (h)

Ou seja, quanto maior o valor do IA, mais elevada é a atividade antioxidante (METROHM, 2010).

4.2.8 Análise estatística

O teste t foi utilizado para verificar diferença entre duas médias, enquanto a análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey, para comparar médias múltiplas ($p < 0,05$). O programa empregado foi o GraphPad Prisma para Windows, versão 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal e perfil de ácidos graxos

A caracterização das amostras quanto à composição centesimal foi a primeira etapa deste trabalho. As análises foram realizadas para se determinar os teores de umidade, cinzas, extrato etéreo, proteínas e carboidratos (por diferença).

A Tabela 3, a seguir, apresenta os resultados encontrados para as amostras de macadâmia crua e torrada.

Tabela 3: Composição centesimal de amostras de macadâmia crua e torrada

CONSTITUINTES	CRUA	TORRADA
UMIDADE	$1,85 \pm 0,08^{a}$	$1,33 \pm 0,08^{b}$
EXTRATO ETÉREO	$77,19 \pm 2,50^{a}$	$77,50 \pm 0,21^{a}$
CINZAS	$1,29 \pm 0,00^{a}$	$1,36 \pm 0,01^{b}$
PROTEÍNA	$7,23 \pm 0,05^{a}$	$7,32 \pm 0,68^{a}$
CARBOIDRATOS	$12,43 \pm 0,83^{a}$	$12,50 \pm 0,82^{a}$

As análises foram realizadas em triplicata (n=3), e os valores estão expressos em g/100g de amostra ± desvio padrão. O teste t foi aplicado para $p < 0,05$. Letras distintas expressam diferença estatística significativa entre as colunas.

Os valores encontrados foram muito similares entre as duas amostras, revelando que houve diferenças mínimas entre os dois tratamentos térmicos. Estes resultados também estão muito próximos dos encontrados por SILVA (2003) e pela tabela de composição nutricional do USDA (2009) tanto para as amostras cruas quanto para as torradas, conforme apresentado anteriormente no Quadro 2 (Revisão Bibliográfica).

A composição centesimal da macadâmia foi semelhante à de outras nozes/castanhas, como a castanha-do-Brasil, a noz e a pecã, caracterizadas pelas

quantidades consideráveis de lipídeos e proteínas e reconhecidas como fontes energéticas (FREITAS; NAVES, 2010; USDA, 2009).

O teor de lipídeos do extrato etéreo deste estudo (77g/100g amostra) foi significativamente maior do que valor encontrado por Venkatachalam e Sathe (2006) em macadâmias obtidas na Califórnia (EUA) de 66g/100g. Essa variação pode ser explicada pelas diferenças de clima, solo, práticas agrícolas e características genéticas (FREITAS; NAVES, 2010).

Devido ao elevado teor de lipídeos obtido nas análises de composição centesimal, foi traçado então o perfil de ácidos graxos por cromatografia a gás, apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos das amostras de macadâmia crua e torrada (em g/100 de amostra)

Ácido Graxo	CRUA	TORRADA
12:0	0,04 ± 0,00[a]	0,05 ± 0,00[b]
14:0	0,37 ± 0,01[a]	0,50 ± 0,02[b]
16:0	5,15 ± 0,04[a]	4,79 ± 0,38[a]
18:0	2,18 ± 0,00[a]	2,58 ± 0,24[b]
20:0	1,95 ± 0,03[a]	2,14 ± 0,16[a]
22:0	0,61 ± 0,00[a]	0,60 ± 0,04[a]
24:0	0,25 ± 0,00[a]	0,24 ± 0,01[a]
Total Saturados	10,55 ± 0,06[a]	10,93 ± 1,04[a]
16:1	11,22 ± 0,06[a]	10,82 ± 0,78[a]
17:1	0,04 ± 0,00[a]	0,05 ± 0,00[b]
18:1	45,17 ± 0,29[a]	47,03 ± 1,04[b]
20:1	1,91 ± 0,02[a]	1,89 ± 0,10[a]
22:1	0,21 ± 0,00[a]	0,20 ± 0,01[a]
Total Monoinsaturados	58,55 ± 0,48[a]	58,83 ± 3,73[a]
18:2	0,52 ± 0,70[a]	0,81 ± 0,04[a]
18:3	0,61 ± 0,75[a]	0,07 ± 0,01[a]
Total Poli-insaturados	1,13 ± 0,05[a]	0,88 ± 0,04[b]
Total	**76,03 ± 0,51[a]**	**75,04 ± 6,00[a]**

As análises foram realizadas em triplicata (*n*=3), e os valores estão expressos em g/100g de amostra ± desvio padrão. O teste t foi aplicado para $p<0,05$. Letras distintas expressam diferença estatística significativa entre as colunas.

Os valores da Tabela 4 deixam claro que as diferenças entre os perfis das duas amostras foram muito pequenas para todos os ácidos graxos identificados. Estes resultados também foram bem superiores aos encontrados por Maguire et al. (2004) e por Venkatachalam e Sathe (2006), mas similares ao perfil lipídico das macadâmias crua e torrada encontrado na base de dados do USDA (2009).

De acordo com Kaijser, Dutta e Savage (2000), as diferenças encontradas entre os resultados de composição de trabalhos distintos podem ser atribuídas às condições ambientais de cultivo e de manejo e à variedade da cultura.

A macadâmia se confirmou como uma importante fonte de lipídeos, em torno de 75g/100g de amostra, tanto na crua quanto na torrada. Os ácidos graxos monoinsaturados se destacaram por teores próximos a 58g/100g, principalmente pela presença dos ácidos oleico (C 18:1) e palmitoleico (C 16:1).

Uma dieta considerada saudável, da qual a macadâmia também faça parte, tem potenciais efeitos benéficos nos níveis de LDL, devido aos elevados teores de ácidos graxos monoinsaturados presentes na noz (CURB et al., 2000). Os AGMIs possuem uma vantagem sobre os AGPIs, pois as lipoproteínas constituídas por monoinsaturados se tornam mais resistentes à oxidação (ROS; MATAIX, 2006).

O óleo de macadâmia, obtido por prensagem a frio, apresenta grande versatilidade para o uso em serviços de alimentação (além dos cosméticos), devido à grande concentração de monoinsaturados, conhecidamente mais estáveis à oxidação. Entretanto essas propriedades ainda permanecem ofuscadas pela popularidade e disponibilidade de outros tipos de óleos vegetais, como o azeite de oliva (INTERMAC, 2010b).

5.2 Quantificação dos compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados através do reagente Folin-Ciocalteau, para os extratos etéreo (EE), alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq), bem como para as frações de ácidos fenólicos livres (AFL) e para as esterificadas solúveis (AFS) e insolúveis (AFI). Os resultados foram expressos em µg equivalente em ácido gálico (EAG)/mg extrato seco.

O Gráfico 2 apresenta os teor de fenólicos dos extratos de macadâmia crua e torrada, obtidos com solventes de diferentes polaridade.

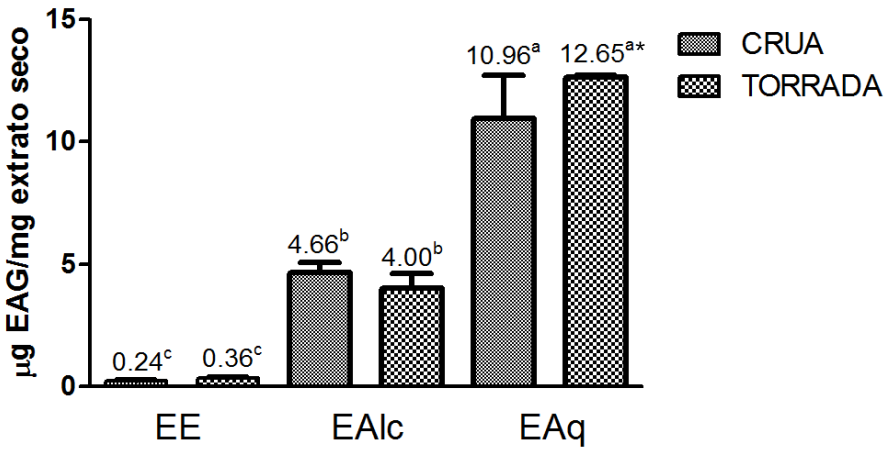


Gráfico 2: Fenólicos totais (em µEAG/mg extrato seco) para os extratos etéreo (EE), alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq) obtidos da macadâmia crua e da torrada.
*Ensaios realizado em triplicata (*n*=3). Foram aplicados a ANOVA e o teste de Tukey, para $p < 0,05$. Letras distintas expressam diferença estatística significativa.

Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que a água (EAq) foi o solvente mais eficiente na extração dos compostos fenólicos, por ser mais polar que os demais, seguida pelo etanol (EAlc) e depois pelo éter etílico (EE), em ambas as amostras. Essa constatação já era esperada, pois outros autores também

observaram comportamentos semelhantes com romã, pequi cru e pseudofruto do caju, nos quais a água foi o melhor solvente na extração dos fenólicos (BROINIZI et al., 2007; JARDINI; MANCINI-FILHO, 2007; LIMA, 2008). Entretanto, os teores de fenólicos totais encontrados nas amostras de macadâmia foram bem menores do que os resultados destes mesmos autores.

Não houve diferença significativa entre as amostras de macadâmia crua e torrada, quando comparadas pelo mesmo tipo de extrato. Pode-se inferir, então, que no caso dos extratos (EE, EAlc e EAq), o tratamento térmico da torra não alterou significativamente o teor de compostos fenólicos em relação à macadâmia submetida apenas ao processo de secagem (crua).

O Gráfico 3 mostra os teores de fenólicos totais das frações de ácidos fenólicos livres (AFL), esterificados solúveis (AFS) e insolúveis (AFI) extraídas da macadâmia crua e da torrada:

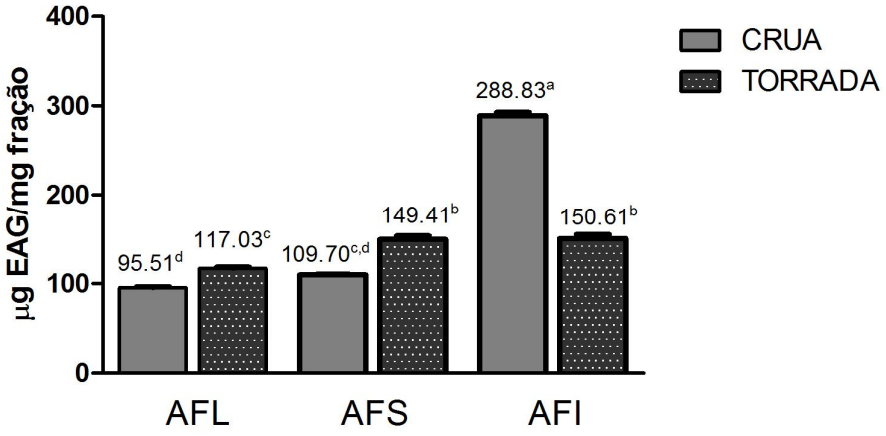


Gráfico 3: Fenólicos totais (em µEAG/mg fração) para as frações livre (AFL), esterificada solúvel (AFS) e esterificada (AFI) obtidas da macadâmia crua e da torrada.

*Ensaios realizado em triplicata (*n*=3). Foram aplicados a ANOVA e o teste de Tukey, para $p < 0,05$. Letras distintas expressam diferença estatística significativa.

Através dos resultados do Gráfico 3, observou-se que as frações livre e solúvel obtidas das amostras de macadâmia torrada mostraram teores maiores de fenólicos em relação à crua. Todas as frações diferiram significativamente, quando as frações das amostras de macadâmia crua são comparadas com as da torrada.

Os teores de fenólicos superiores da AFL e AFS das amostras de macadâmia torrada podem sugerir a formação de uma variedade de dímeros provenientes da degradação oxidativa desses antioxidantes durante o processamento térmico. De acordo com Shahidi e Naczk (2003), a maioria deles ainda retém alguma atividade antioxidante.

Comparando-se os Gráficos 2 e 3, é possível notar que as frações possuem concentrações de compostos fenólicos muito superiores que os extratos aquoso, alcoólico e etéreo, independente do tipo de amostra, crua ou torrada, comprovando que o método de extração de ácidos fenólicos, descrito por Dabrowski e Sosulski (1984), é mais eficiente que a extração simples com água, etanol e éter etílico. Broinizi et al. (2007), Jardini e Mancini-Filho (2007) e Lima (2008) também observaram o mesmo.

5.3 Identificação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Oito padrões de ácidos fenólicos (cromatogramas em anexo) foram utilizados na identificação dos compostos presentes nas frações das amostras de macadâmias crua e torrada. Entretanto, nenhum deles foi identificado nas amostras, apesar da detecção de picos em tempos de retenção coerentes a ácidos fenólicos com os eluentes utilizados. A Figura 11 apresenta os cromatogramas das frações de ácidos

fenólicos livres (AFL) que eluiram na mesma programação do gradiente do Pool 1, a 275nm.

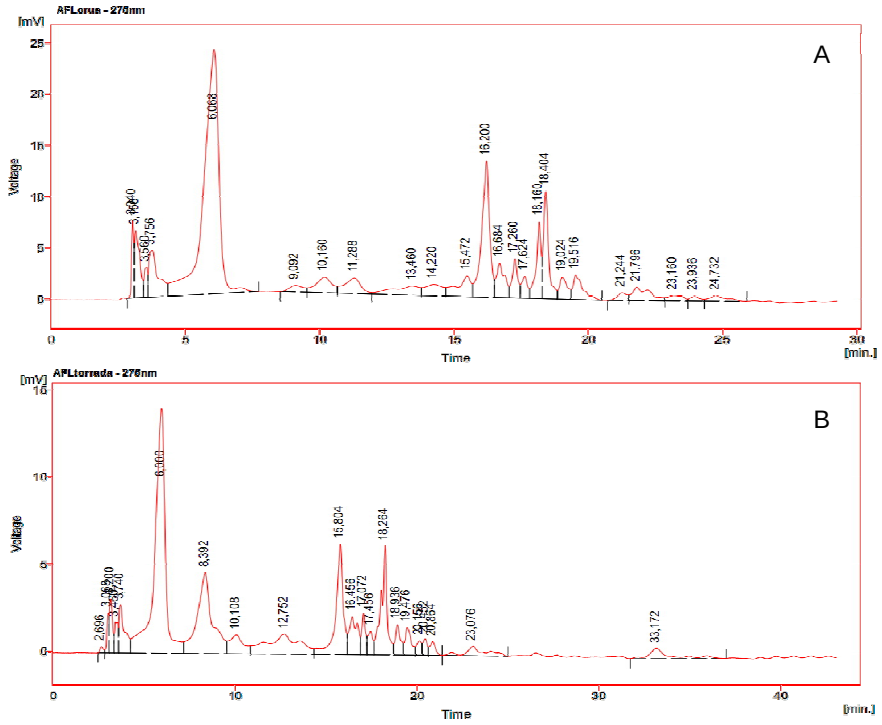


Figura 11: Cromatogramas das frações de ácidos fenólicos livres das amostras de macadâmia crua (A) e torrada (B) a 275nm, com o gradiente do Pool 1.

A exemplo das frações livres (AFL) da Figura 11, alguns picos das amostras de macadâmia crua, de uma maneira geral, repetiam-se na torrada, mas as áreas encontradas nesta última eram consideravelmente menores que a primeira, indicando que possivelmente o tratamento térmico da torra tenha degradado compostos de estrutura molecular semelhantes a fenólicos, pois eluíram em tempos de retenção próximos aos dos padrões utilizados (em anexo).

5.4 Avaliação da atividade antioxidante

5.4.1 Método de redução do radical sintético DPPH

Neste método, a capacidade do antioxidante em reduzir DPPH$^{\bullet}$ é avaliada espectrofotometricamente pela descoloração da solução ao decorrer do tempo. A atividade das amostras foi comparada ao controle negativo, a fim de se obter a porcentagem de redução do radical.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos com os extratos etéreo, alcoólico e aquoso, das amostras crua e torrada, no método DPPH$^{\bullet}$.

Tabela 5: Porcentagem de redução do radical sintético DPPH dos extratos etéreo (EE) alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq), nas concentrações de 100 a 400 ppm para amostras de macadâmia crua e torrada

Concentração (ppm)	% REDUÇÃO DO RADICAL DPPH					
	EE		EAlc		EAq	
	CRUA	TORRADA	CRUA	TORRADA	CRUA	TORRADA
100	3,80 ± 1,28^{a}	0,33 ± 1,71^{b}	2,28 ± 0,52^{a}	2,37 ± 1,19^{a}	3,94 ± 0,90^{a}	4,59 ± 0,47^{a}
200	5,30 ± 1,53^{a}	2,70 ± 1,38^{a}	2,74 ± 0,46^{a}	3,42 ± 0,41^{a}	4,13 ± 0,61^{a}	3,85 ± 1,35^{a}
400	9,23 ± 1,29^{a}	7,43 ± 1,88^{a}	3,07 ± 0,71^{a}	6,25 ± 0,39^{b}	5,21 ± 1,06^{a}	7,44 ± 0,39^{b}

As análises foram realizadas em triplicata (n=3) e apresentadas em média ± desvio-padrão. O Teste t foi aplicado entre a amostra crua e torrada de um mesmo extrato. Letras distintas expressam diferença estatística significativa, para $p < 0,05$.

A capacidade de reduzir o radical sintético DPPH, pelos extratos das duas amostras, foi visivelmente baixa quando comparada a de outros alimentos. Em pseudofruto de caju, essa porcentagem atingiu 65% em 125µg de extrato aquoso e 36% em 125µg de extrato alcoólico (BROINIZI et al., 2007). Em extrato hidroalcoólico da polpa de romã, a redução do radical chegou a 93,09% em uma concentração de apenas 8 ppm (JARDINI et al., 2007).

Esperava-se que os extratos aquoso e alcoólico obtivessem os melhores desempenhos neste ensaio, conforme o observado por Broinizi et al. (2007) e LIMA (2007), entretanto isso não foi observado. O extrato etéreo da amostra de macadâmia crua foi o responsável pela maior redução, ocasionada pela possível presença de tocoferóis e tocotrienóis, já detectados por Kaijser, Dutta e Savage (2000). Houve um decréscimo dessa porcentagem de redução quando se compara com o resultado do extrato etéreo da amostra de macadâmia torrada, provavelmente devido à maior sensibilidade destes antioxidantes lipofílicos ao tratamento com elevadas temperaturas, como a torra.

Segundo a ANVISA, o limite máximo de adição de antioxidantes sintéticos é 200mg/kg para o BHA e o TBHQ e 100mg/g para o BHT (BRASIL, 1999). Neste ensaio, a concentração de 400ppm, elevada quando se compara com os limites dos antioxidantes sintéticos, foi a que obteve o maior percentual de redução em todos os extratos, e mesmo assim não chegou a atingir 15% de redução.

A Tabela 6 apresenta o desempenho das frações fenólicas livre (AFL), esterificada solúvel (AFS) e insolúvel (AFI), quando avaliadas pelo método de DPPH$^{\bullet}$.

Tabela 6: Porcentagem de redução do radical sintético DPPH das frações de ácidos fenólicos livre (AFL), esterificada solúvel (AFS) e insolúvel (AFI), nas concentrações de 10 a 80ppm, para amostras de macadâmia crua e torrada

Concentração (ppm)	% REDUÇÃO DO RADICAL DPPH					
	AFL		AFS		AFI	
	CRUA	TORRADA	CRUA	TORRADA	CRUA	TORRADA
10	9,23 ± 0,15^{a}	36,91 ± 0,52^{b}	10,88 ± 0,52^{a}	43,95 ± 0,38^{b}	18,73 ± 0,52^{a}	22,19 ± 0,40^{b}
20	7,92 ± 0,60^{a}	53,30 ± 1,02^{b}	15,36 ± 0,43^{a}	64,91 ± 0,48^{b}	33,82 ± 2,41^{a}	37,44 ± 0,96^{a}
40	18,25 ± 0,32^{a}	73,53 ± 0,31^{b}	27,82 ± 0,52^{a}	81,95 ± 0,50^{b}	57,99 ± 0,24^{a}	49,49 ± 0,96^{b}
60	26,65 ± 2,51^{a}	83,25 ± 0,51^{b}	34,81 ± 1,02^{a}	90,50 ± 0,27^{b}	70,18 ± 0,73^{a}	56,95 ± 0,27^{b}
80	40,15 ± 0,93^{a}	87,27 ± 0,42^{b}	48,28 ± 1,26^{a}	89,36 ± 0,19^{b}	70,59 ± 1,25^{a}	63,55 ± 0,40^{b}

As análises foram realizadas em triplicata (n=3) e apresentadas em média ± desvio-padrão. O Teste t foi aplicado entre a amostra crua e torrada de uma mesma fração. Letras distintas expressam diferença estatística significativa, para $p < 0,05$.

Ao se observar o comportamento das frações fenólicas na Tabela 6, nota-se que, mesmo em concentrações menores, a capacidade de redução foi maior que a dos extratos (Tabela 5). Esse comportamento também foi observado por Lima (2007) tanto na polpa do pequi quanto na amêndoa, confirmando a eficiência da extração de ácidos fenólicos pelo método de Dabrowski e Sosulski (1984).

A fração de ácidos fenólicos insolúveis (AFI) foi a que mostrou ser mais eficiente em reduzir o DPPH$^{\bullet}$ nas amostras de macadâmia crua, pois as frações livre (AFL) e solúvel (AFS) obtiveram o melhores resultados na macadâmia torrada.

Esse bom desempenho das frações das amostras de macadâmia torrada pode ser explicado pela menor concentração de ácidos fenólicos na amostra crua em relação à torrada (determinada pelo método do reagente Folin-Ciocalteau – Gráfico 3) ou pelo possível aparecimento de produtos da degradação dos ácidos hidroxicinâmico e benzoico durante o processo de torra, com maior afinidade com o sistema-teste, capazes de minimizar os efeitos causados por espécies reativas, como o radical DPPH (CARRASCO-PANCORBO et al., 2007; FRANKEL; MEYER, 2000; SHAHIDI; NACZK, 2003; SHAHIDI, 2009).

5.4.2 Ensaio em sistema de co-oxidação de β-caroteno/ácido linoleico

Neste ensaio, foram testadas diferentes concentrações dos extratos e das frações num sistema emulsionado de β-caroteno e ácido linoleico em água. Os resultados foram comparados com o BHT (controle-positivo), um antioxidante sintético amplamente utilizado em alimentos, e com uma mistura de 50% de BHT e 50% do extrato/fração, para avaliar se há sinergismo entre os dois tipos de

antioxidantes. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação.

Os valores obtidos pelos extratos etéreo (EE), alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq) das macadâmias crua e torrada estão representados na Figura 12.

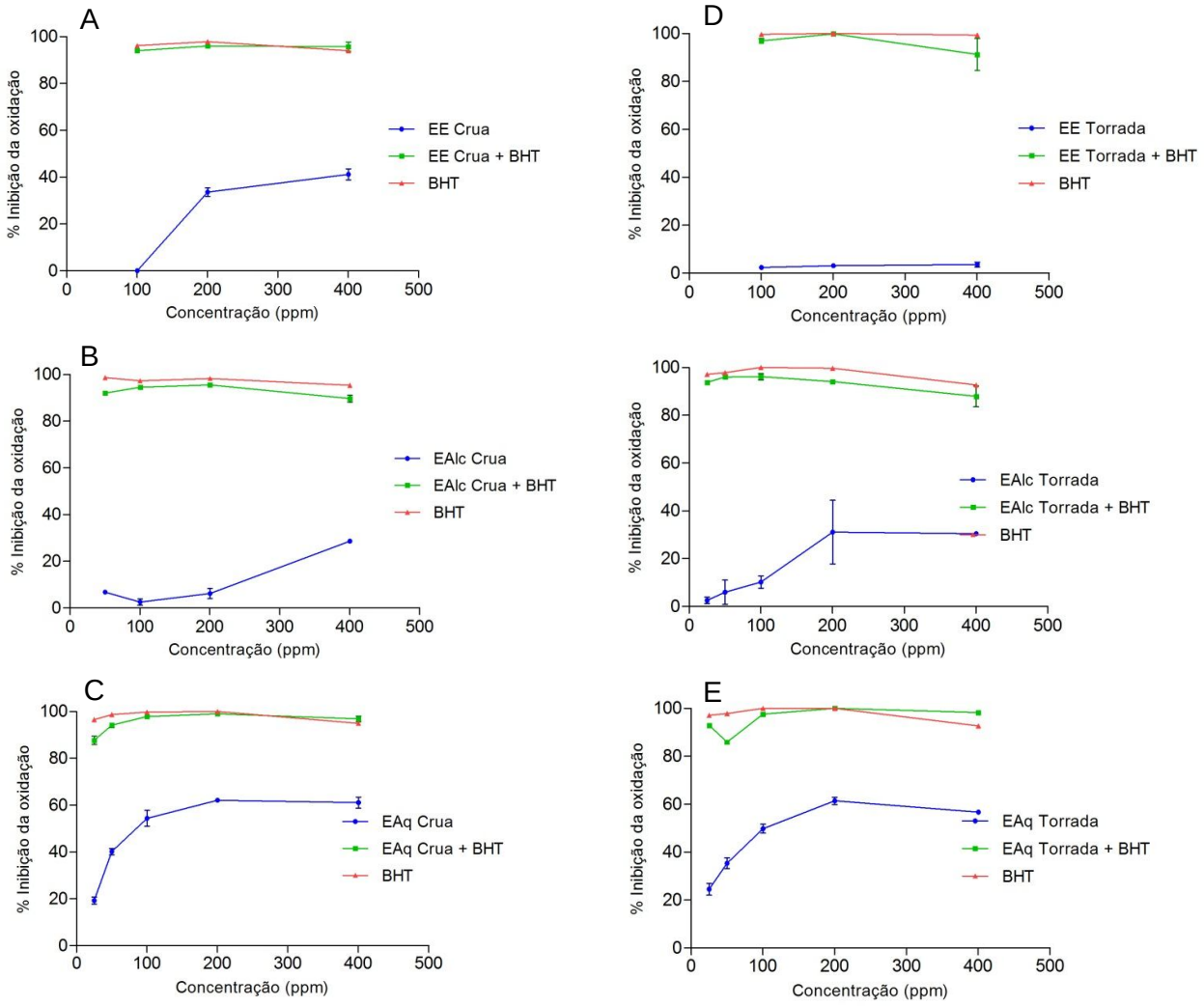


Figura 12: Inibição da oxidação (%) obtida pelos extratos etéreo, alcoólico e aquoso das macadâmias crua (A, B, C, respectivamente) e torrada (D, E, F, respectivamente).
As análises foram realizadas em triplicata (*n*=3); as barras representam o desvio-padrão.

A capacidade de inibir o processo de oxidação do β-caroteno pelos extratos foi, de uma maneira geral, bem menor que o BHT, mesmo na concentração mais elevada de 400ppm. A associação entre os extratos e o BHT refletiu apenas a ação

do antioxidante sintético, não sendo possível visualizar qualquer efeito de sinergismo.

O extrato etéreo das duas amostras, crua e torrada, apresentaram as menores porcentagens de inibição do processo oxidativo. Contudo, as Figuras 12A e 12D, que correspondem aos extratos etéreos das amostras de macadâmia crua e torrada respectivamente, confirmaram o indício, já detectado no método DPPH$^{\bullet}$, da presença de compostos antioxidantes termolábeis, como os tocoferóis e os tocotrienóis (KAIJSERl; DUTTA; SAVAGE, 2000), capazes de agir em óleo, mas que provavelmente foram degradados durante o tratamento térmico da torra.

Os extratos alcoólicos das duas amostras (Figuras 12B e 12E) apresentaram uma atividade maior que os extratos etéreos (Figuras 12A e 12D), embora nenhum deles tenha sido tão eficiente em inibir o processo de oxidação do sistema quanto os extratos obtidos com a água destilada (Figuras 12C e 12F). Sementes de linhaça, as polpas de pequi e de romã e pseudofruto de caju foram igualmente submetidos a uma extração sequencial com solventes de diferentes polaridades, dentre os quais o extrato aquoso também apresentou maior atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoleico (BROINIZI et al., 2007; GALVÃO et al., 2008; JARDINI; MANCINI-FILHO, 2007; LIMA, 2008). Exceto pelos tocoferóis, os compostos fenólicos são conhecidamente polares, devido ao grau de hidroxilação de suas moléculas, e possuem maior afinidade com a água do que com solventes menos polares, como o etanol, e apolares, como o éter etílico (SHAHIDI; NACZK, 2003).

O fato de esses antioxidantes polares atuarem de maneira efetiva em sistemas emulsionados é explicado pelo paradoxo polar de Porter. O antioxidante polar pode agir na interface óleo-água, protegendo o óleo do ataque de espécies reativas (FRANKEL; MEYER, 2000).

Neste estudo, os extratos aquosos atingiram os valores máximos de 62,24% (crua) e 61,44% (torrada) de inibição da oxidação, em 200ppm. As concentrações testadas diferiram pouco entre as duas amostras, demonstrando a interferência mínima do tratamento térmico da torra na atividade antioxidante do extrato neste método.

Na Figura 13, são apresentados os resultados da avaliação das frações de ácidos fenólicos livre (AFL), solúvel (AFS) e insolúvel (AFI) das macadâmias crua e torrada.

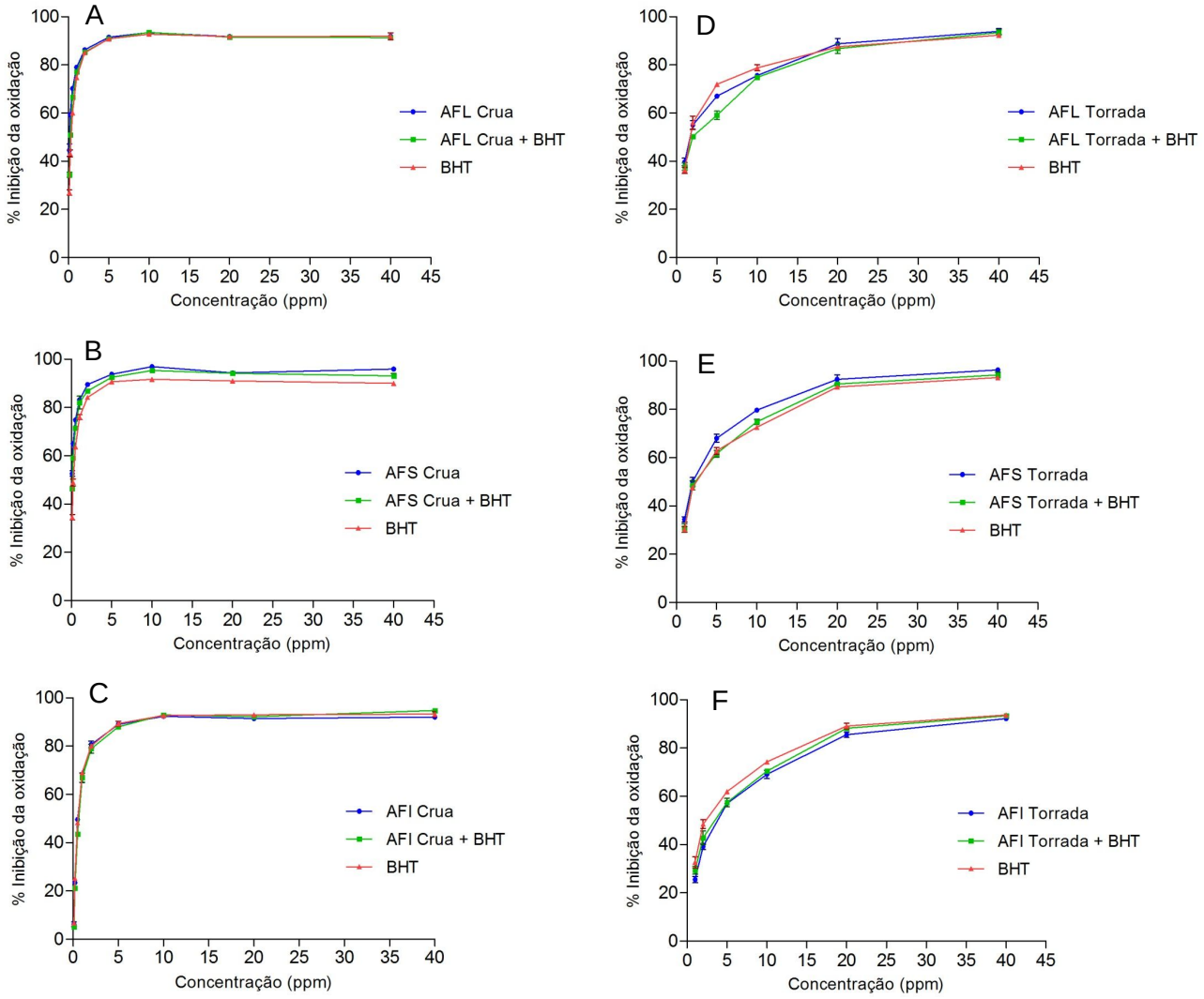


Figura 13: Inibição da oxidação (%) obtida pelas frações livre, esterificada solúvel e insolúvel ligada das macadâmias crua (A, B, C, respectivamente) e torrada (D, E, F, respectivamente).
As análises foram realizadas em triplicata (*n*=3); as barras representam o desvio-padrão.

A Figura 13 destaca claramente que, mesmo em baixas concentrações, todas as frações foram mais eficientes na inibição da oxidação do β-caroteno do que qualquer um dos extratos. Essa diferença novamente foi atribuída à eficiência do método de extração dos ácidos fenólicos preconizado por Dabrowski e Sosulski (1984).

A atividade antioxidante das seis frações avaliadas se assemelhou à do antioxidante sintético BHT e da associação fração+BHT. Assim como nos extratos, não foi possível verificar qualquer efeito de sinergismo entre o BHT e as frações fenólicas.

A atividade antioxidante das frações livre (AFL), esterificada solúvel (AFS) e insolúvel ligada (AFI) da macadâmia crua (Figuras 13A-C) pouco diferiu entre si, e atingiu o máximo de atividade na concentração de 5ppm, com 90% de inibição do processo oxidativo do sistema.

Igualmente, as três frações fenólicas provenientes das amostras de macadâmia torrada (Figura 13D-F) não apresentaram comportamentos distintos entre si. Entretanto, o máximo de atividade só foi alcançado a partir da concentração de 20ppm, com aproximadamente 88% de inibição da oxidação. Essa notória perda de atividade é o indicativo de que o tratamento térmico da torra, ao qual as amostras foram submetidas, pode ter degradado compostos fenólicos. Şensoy et al. (2006) também observaram que a atividade antioxidante do trigo sarraceno diminuiu após a torra (10min/200ºC).

5.4.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Rancimat®

Neste método, avaliou-se a estabilidade oxidativa do óleo de soja desodorizado e isento de aditivos na presença do antioxidante, submetido a um processo de oxidação lipídica acelerado no equipamento Rancimat Metrohm (modelo 743, Herisau, CHE), em temperatura elevada (110ºC) e sob o fluxo de oxigênio de 20L/h. O resultado obtido nesse ensaio é o chamado período de indução (PI), em horas, utilizado para se calcular o Índice de Atividade Antioxidante (IA) (razão entre o PI com o antioxidante e o PI sem antioxidante). O antioxidante sintético TBHQ, a 200ppm, foi utilizado como controle-positivo, pois, neste caso, o BHT não diferiu significativamente do controle-negativo (sem antioxidante). Cabe ressaltar que o IA do controle-negativo será sempre 1; portanto, quanto maior que 1 for o IA do antioxidante, maior será a atividade.

A Figura 14 apresenta os índices de atividade antioxidante encontrados nos extratos etéreo (EE), alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq) da macadâmia crua (A) e da torrada (B), nas concentrações de 200 e 400ppm.

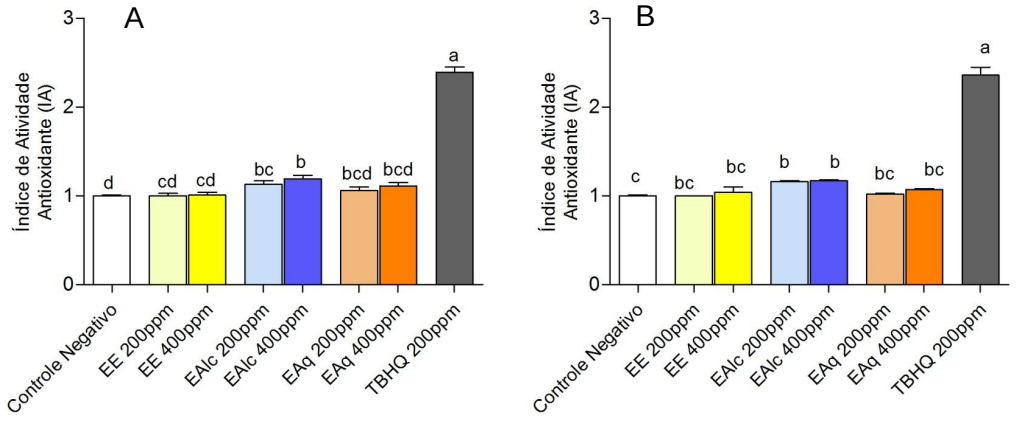


Figura 14: Índices de atividade antioxidante dos extratos etéreo (EE), alcoólico (EAlc) e aquoso (EAq) de macadâmia crua (A) e torrada (B).
As análises foram realizadas em duplicata (n=2), e a ANOVA e o teste de Tukey foram utilizados para $p < 0,05$. Letras distintas expressam diferença estatística significativa.

Observou-se que nenhum dos extratos, nem mesmo na concentração de 400ppm, atingiu o índice de atividade antioxidante (IA) do TBHQ (200ppm), de 2,39 ± 0,06, confirmando a termo resistência do TBHQ, amplamente utilizado em óleos destinados à fritura (AKOH; MIN, 2002).

Somente os extratos alcoólicos de ambas as amostras (crua e torrada) nas concentrações de 200 e 400ppm diferiram do controle negativo, sugerindo que o etanol foi capaz de extrair compostos antioxidantes mais resistentes a condições drásticas de oxidação. Entretanto, apesar da diferença estatística, os IAs foram baixos, quando comparados com o TBHQ.

Na Figura 15, pode-se observar os índices de atividade antioxidante das frações fenólicas da macadâmia crua e da torrada, nas concentrações de 40 e 80 ppm. As amostras foram comparadas ao TBHQ em sua concentração máxima permitida pela ANVISA, de 200ppm e com o controle-negativo isento de antioxidante.

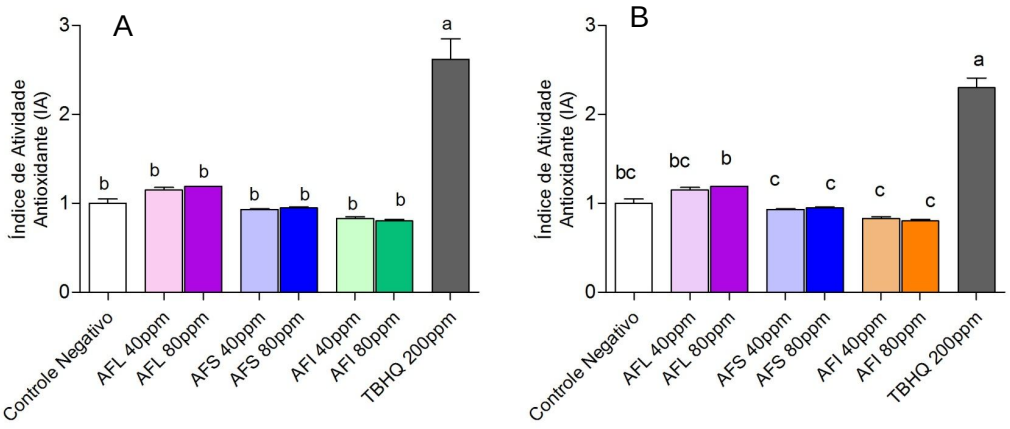


Figura 15: Índices de atividade antioxidante das frações fenólicas livre (AFL), esterificadas solúveis (AFS) e insolúveis-ligadas (AFI) de macadâmia crua (A) e torrada (B).
As análises foram realizadas em duplicata (*n*=2), e a ANOVA e o teste de Tukey foram utilizados para $p < 0,05$. Letras distintas expressam diferença estatística significativa.

Nenhuma das frações de ácidos fenólicos das amostras de macadâmia crua (Figura 15A) e torrada (Figura 15B) apresentaram diferença significativa em relação ao controle-negativo. Reproduzindo o resultado com os extratos, o TBHQ se mostrou eficiente em sua capacidade de inibir o processo oxidativo em condições aceleradas.

O fato dos extratos alcoólicos terem apresentado um desempenho relativamente melhor do que as frações pode significar que, neste método, a associação de diversos compostos antioxidantes extraídos pelo etanol tenha sido mais relevante do que a extração específica de ácidos fenólicos. A potencialização da atividade antioxidante não se deve apenas a um ácido fenólico, mas possivelmente à associação deles (BROINIZI et al, 2007).

O ensaio no equipamento Rancimat também ofereceu outro dado importante. Exceto pelos extratos etanólicos, de uma maneira geral, os extratos e as frações das macadâmias crua e torrada não surtiram o efeito esperado, já que, em sistema emulsionado (β-caroteno/ácido linoleico), os resultados foram tão elevados, principalmente das frações fenólicas. Isso sugere que os compostos antioxidantes presentes na macadâmia não são capazes de manter sua atividade sob temperaturas muito elevadas e oxigenação constante, exigindo que as etapas de processamento, sejam observadas com cautela, a fim de se preservar as características não somente sensoriais como também nutricionais do produto (ŞENSOY et al., 2006).

5.4.4 Comparação da atividade antioxidante entre os métodos *in vitro*

A atividade antioxidante é fortemente influenciada pela composição do sistema-teste, duração do ensaio, o modo de mensuração, condições de temperatura e oxigenação, podendo variar significativamente em sistemas multifásicos, devido às diferenças de polaridade do antioxidante (CUVELIER; BONDET; BERSET, 2000; FRANKEL; MEYER, 2000).

Dentre os três métodos de avaliação da atividade antioxidante utilizados em extratos e frações de macadâmia crua e torrada, o ensaio de competição em sistema de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico foi o que apresentou os melhores resultados. Possivelmente os compostos presentes na macadâmia atuaram na interface óleo-água do sistema, impedindo, assim, o ataque de espécies reativas ao material lipídico (FRANKEL; MEYER, 2000).

Os extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades apresentaram baixa atividade antioxidante de uma maneira geral. As frações fenólicas agiram com maior eficiência que os extratos nos métodos do β-caroteno/ácido linoleico e DPPH como já verificado por diversos autores (BROINIZI et al., 2007; GALVÃO et al., 2008; JARDINI; MANCINI-FILHO, 2007; LIMA, 2008), mas não demonstraram atividade quando submetidas ao teste acelerado de oxidação em Rancimat, sob temperatura elevada e oxigenação.

As diferenças entre a macadâmia crua e torrada foram evidenciadas principalmente no sistema β-caroteno/ácido linoleico, no qual as frações da amostra torrada só atingiram o máximo de atividade em uma concentração quatro vezes maior que a crua, e no método de redução do radical DPPH, no qual as frações livre e solúvel da macadâmia torrada foram mais capazes de inibi-lo.

6 Conclusões

Através dos resultados obtidos neste estudo, foi possível inferir que:

O tratamento térmico da torra não surtiu efeito sobre os teores de lipídeos, proteínas e carboidratos. Sob a ótica da composição centesimal, o binômio tempo/temperatura da torra da macadâmia pode ser considerado adequado, pois mantém as mesmas concentrações de macronutrientes presentes na amostra crua.

As amostras de macadâmia, tanto crua quanto torrada, podem ser consideradas como grande fonte de ácidos graxos, principalmente monoinsaturados, importantes na prevenção do risco de doenças cardiovasculares.

Entre os extratos de diferentes polaridades, a água foi o solvente com maior teor de fenólicos totais nas duas amostras, mas essa extração não foi mais eficaz que as das frações de ácidos fenólicos, nas quais a macadâmia torrada apresentou maiores concentrações de ácidos fenólicos, exceto na fração insolúvel, resultante da possível decomposição dos fenólicos em estruturas menores, durante a etapa de torra.

Tanto na capacidade de reduzir o radical DPPH, quanto na porcentagem de inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico, foram observados indícios de que ocorreu degradação dos compostos fenólicos, inclusive dos antioxidantes apolares (tocoferóis e tocotrienóis), no processo de torra.

O método do Rancimat foi fundamental para se observar a baixa resistência dos fenólicos da macadâmia a condições drásticas de oxidação, reforçando a necessidade de buscar a otimização do processo de torra, a fim de se obter as características sensoriais desejadas, mas manter as propriedades antioxidantes do produto final.

Embora a macadâmia não possa ser considerada uma fonte de ácidos fenólicos, ficou evidente que eles estão presentes e exercem papel fundamental na estabilidade dessa noz de tão elevado teor lipídico. Se preservada a atividade desses antioxidantes naturais, estender-se-ia a vida de prateleira do produto, reduzindo a necessidade do emprego de antioxidantes sintéticos.

Finalmente, a produção brasileira de macadâmia tem crescido bastante, contudo, pouco se conhece sobre as características nutricionais da noz produzida no país, visto que ainda não há padrões de identidade e de qualidade estabelecidos pela ANVISA. Sendo assim, os resultados deste trabalho abriram um leque de novas possibilidades para se elucidar as diferenças entre as diversas cultivares no Brasil, inclusive em relação aos seus compostos bioativos, visando o aprimoramento das etapas de beneficiamento e a identificação das cultivares mais nutritivas e rentáveis.

7 BIBLIOGRAFIA

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Aditivos para fabricação de alimentos**: tabela – lista de INS/nome do aditivo/sinonímias. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6a48a00042a608298316cbb134f70e0f/Tabela_Aditivo_GMC11-2006_LGH.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 jul 2010.

AGUIAR, I.D. Bem aceita no exterior, noz macadâmia será divulgada no Brasil. Gazeta Mercantil, São Paulo, 04 dez 2006. Fruticultura. Divulgado pela Associação Brasileira de Noz Macadâmia (ABM). Disponível em: <http://www.abm.agr.br/>. Acesso em 27 jun 2010.

AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids:** chemistry, nutrition and biotechnology. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. 1040p.

AMSa. The macadamia story. Produced by Australian Macadamia Society (AMS). Disponível em: <http://macadamias.org/pages/the-macadamia-story>. Acesso em: 16 mai 2010.

AMSb. Kernel Specification. Produced by Australian Macadamia Society (AMS). Disponível em: <http://macadamias.org/pages/kernel-specifications>. Acesso em: 18 mai 2010.

ANDRADE-WARTHA, E.R.S. **Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeitos sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal**. 2007. 111f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ANGELO, P.M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

AOCS. American Oil Chemists' Society. **Offcial methods and recommanded practices of the AOCS**. 5th edition. Champaign: AOCS, 2004.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th edition. Gaither: AOAC International, 2005.

BALK, J.M.; BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M. Evaluation of the accuracy of antioxidant competition assays: incorrect assumptions with major impact. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 135-144, 2009.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas. Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999. **Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes/aromas**, Brasília, maio, 1999.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry. dietary sources. metabolism. and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do psudofruto de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

CARRASCO-PANCORBO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; LERCKER, G.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, 2007.

CAVALETTO, C.G. Macadamia nuts. In: CHAN JR, H.T. **Handbook of Tropical Foods**. 1st edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 1983. p. 361-397.

CHANG, S.K.C. Protein analysis. In: NIELSEN, S.S. **Food analysis**. 2nd edition. Maryland: Aspen Publishers, Inc., 1998. p. 237-249.

CURB, J.D.; WERGOWSKE, G.; DOBBS, J.C.; ABBOTT, R.D.; HUANG. B. Serum lipid effects of a high–monounsaturated fat diet based on macadamia nuts. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 8, p. 1206-1207, 2000.

CUVELIER, M.E.; BONDET, V.; BERSET, C. Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: structure-activity relationship. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 8, 2000.

DIERBERGER, J. E.; MARINO NETTO, L. **Noz macadâmia:** uma nova opção para a fruticultura brasileira. 1ª Edição. São Paulo: Nobel, 1985. 120p.

DABROWSKI, K.J.; SOSULSKI, F.W. Quantitation of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 123-127, 1984.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Fennema's Food Chemistry**. 4th edition. Madison: CRC Press, 2007. 1160p.

FADINI, A.L.; SILVA, P.M.P.; JARDIM, D.C.P.; VISSOTTO, F.Z.; QUEIROZ, M.B.; BATISTA, G. Moisture sorption isotherm of panned macadamia. In: INTERNATIONAL MACADAMIA SYMPOSIUM, 3., 2006, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: Associação Brasileira de Noz Macadâmia, 2006. p. 25-28.

FDA. Food and Drug Administration. **Listing of food additive status**: part I. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/FoodAdditiveListings/ucm091048.htm>. Acesso em: 01 jul 2010.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

FREITAS, J.B.; NAVES, M.M.V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.

GALVÃO, E.; SILVA, D.C.F.; SILVA, J.O.; MOREIRA, A.V.B.; SOUSA, E.M.B. D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 551-557, 2008.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HAN, J.; WENG, X; BI, K. Antioxidants from a Chinese medicinal herb – *Lithospermum erythrorhizon*. **Food Chemistry**, v. 106, p. 2–10, 2008.

HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary polyphenols and their biological significance. **International Journal of Molecular Science**, v. 8, p. 950-988, 2007.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory practice**, v. 22, p. 475-476,1973.

HUANG, H.L.; WANG, B.G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 4993-4997, 2004.

INTERMACa. Quality and food safety. Prduced by International Macadamias Limited. Disponível em: <http://www.intermac.com.au/qualityandfoodsafety.html>. Acesso em: 24 jun 2010.

INTERMACb. Wholesale products: suggestions for roasting. Prduced by International Macadamias Limited. Disponível em: <http://www.intermac.com.au/wholesaleproducts.html#suggestionsforroasting>. Acesso em: 26 jun 2010.

JARDINI, F.A.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, 2007.

JARDINI, F.A; PINTO, J.R; MENDONÇA, R.M.Z.; MANCINI, D.A.P.; MANCINI-FILHO. J. Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da romã (Punica granatum, L.) sobre células da linhagem Caco-2. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, supl., p. 80-83, 2007.

KAIJSER, A.; DUTTA, P.; SAVAGE, G. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. **Food Chemistry**, v. 71, p. 67-70, 2000.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante, *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense,* Camb)**. 2008. 219f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MACNUTS. The Australian macadamia nut industry. Produced by Nambucca Macnuts. Disponível em: <http://www.macnuts.com.au/industry.htm>. Acesso em: 23 jun 2010.

MAGUIRE, L.S.; O'SULLIVAN, S.M.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T. P.; O'BRIEN, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 171-178, 2004.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, n. 9. p. 594-598. 1968.

MARINOVA, E.M; YANISHLIEVA, N. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p. 189-197, 2003.

MASON, R.L. Macadamia nut quality research: The processing challenge. **Food Australia**, v. 52, n. 9, p. 416-419, 2000.

MELO, E.A.; MANCINI-FILHO, J.; GUERRA, B.B.; MACIEL, G.A. Atividade antioxidante de extratos de coentro (Coriandrum sativum L.). Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23, supl., 2003.

METROHM. Determination of antioxidant activity by the Rancimat method. **Metrohm Application Bulletin**, n. 232/1e, 3p. Disponível em: <products.metrohm.com/vegetable-oils.../prod-AB-232.aspx>. Acesso em: 17 abr 2010.

MILLER, H.E. A simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p.91, 1971.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M.A.; JIMÉNEZ, A.M.; CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, p. 1667-1681, 2003.

PORKONÝ, J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 6, p. 629–642, 2007.

PORTER, W.L.; BLACK, E.D.; DROLET, A.M. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 615-624, 1989.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n.4, p. 755-760, 2006.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, v. 96, suppl. 2, p. S29–S35, 2006.

SEBRAE. Instituto Brasileiro de Frutas. Programa SEBRAE de Cadeias Produtivas Agroindustriais. **Estudo da cadeia produtiva de fruticultura do estado da Bahia:** análise das principais cadeias produtivas de frutas e da fruticultura orgânica no contexto baiano. São Paulo: SEBRAE-BA, 2005. 358p.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. 2nd edition. Florida: CRC Press, 2003. 576p.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: whole *versus* processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 376-387, 2009.

SILVA, F.A.; MARSAIOLI Jr, A.; MAXIMO, G.J.; SILVA, M.A.A.P.; GONÇALVES, L.A.G.. Microwave assisted drying of macadamia nuts. **Journal of Food Engineering**, v.77, p. 550–558, 2006.

SILVA, F.A.; MAXIMO, G.J.; MARSAIOLI Jr, A.; SILVA, M.A.A.P. Impacto da secagem com microondas sobre o perfil sensorial de amêndoas de noz macadâmia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.3, p. 553-561, 2007.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, M.T. **Macadâmia nacional: tocoferóis e caracterização físico-química**. 2003. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

ŞENSOY, I.; ROSEN, R.T.; HO, C.T.; KARWE, M.V. Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 99, p. 388–393, 2006.

SOBIERAJSKI, G.R.; FRANCISCO, V.L.F.S.; ROCHA, P.; GHILARDI, A.A.; MAIA, M.L. Macadamia nuts: production, market and situation in the state of São Paulo. In: INTERNATIONAL MACADAMIA SYMPOSIUM, 3., 2006, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: Associação Brasileira de Noz Macadâmia, 2006. p. 83-89.

SOBIERAJSKI, G.R.; GARCIA, A.A.F. Melhoramento genético de macadâmia. In: SEMINÁRIOS EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2009, Piracicaba. **Resumo...** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009. Disponível em: <http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/GRSobierajski-200902-Resumo.pdf>. Acesso em: 20 jun 2010.

STEPHENSON, R. Macadamia: domestication and comercialisation. **Chronica Horticulturae**, v. 45. n. 2. p. 11-15, 2005.

SWAIN. T.; HILLS. W.E. The phenolic constituents of Punnus domestica. I-quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63-68, 1959.

TOLEDO PIZA, P. World overview on macadamia nut: macadamia world resume. In: INTERNATIONAL MACADAMIA SYMPOSIUM, 3., 2006, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: Associação Brasileira de Noz Macadâmia, 2006. p. 15-16.

TURA, D.; ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 71-93, 2002.

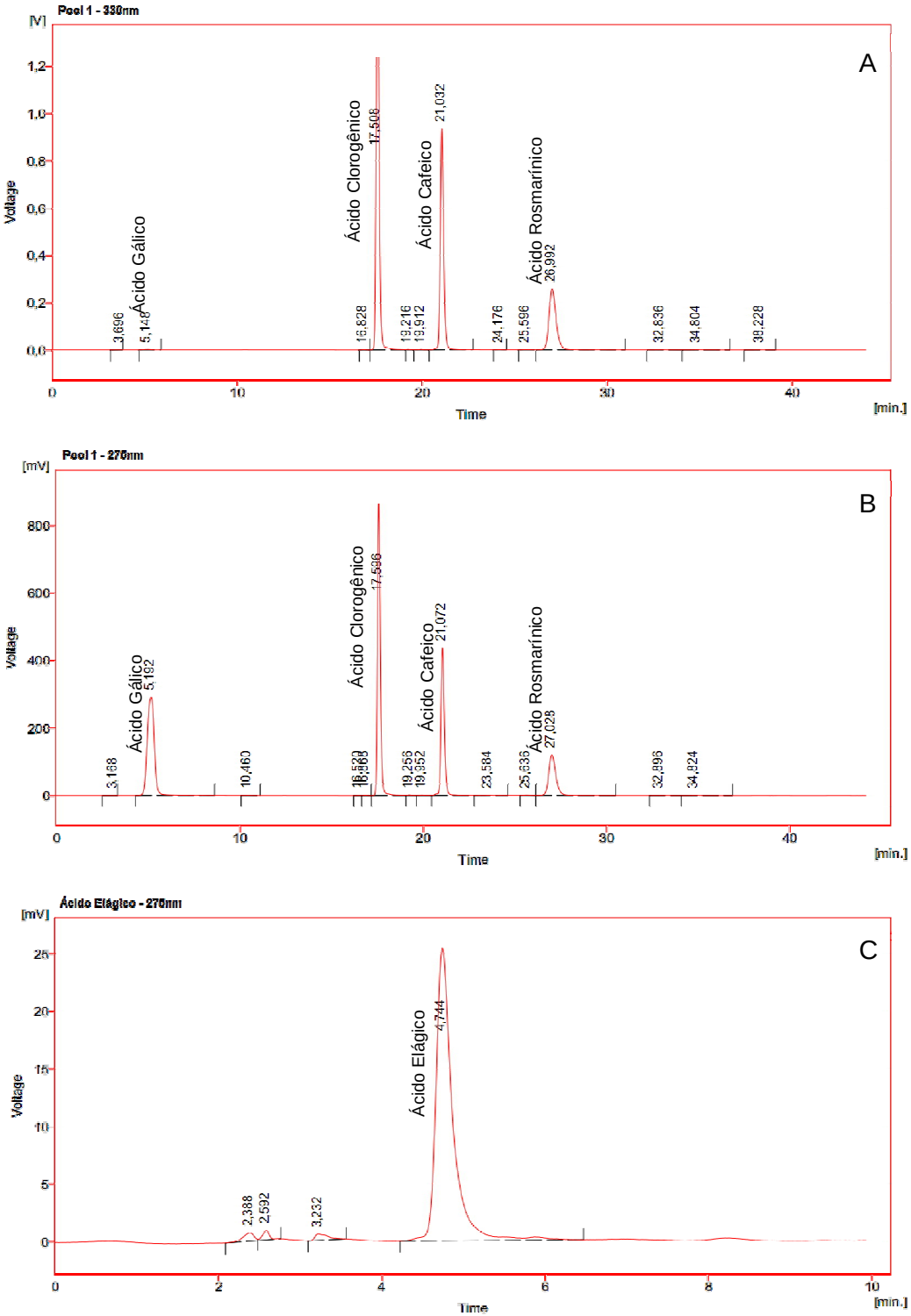
USDA. United States Department of Agriculture. **National Nutrient Database for Standard Reference**, release 22, Nutrient Data Laboratory, 2009. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acesso em: 30 jun 2010.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4705-4714, 2006.

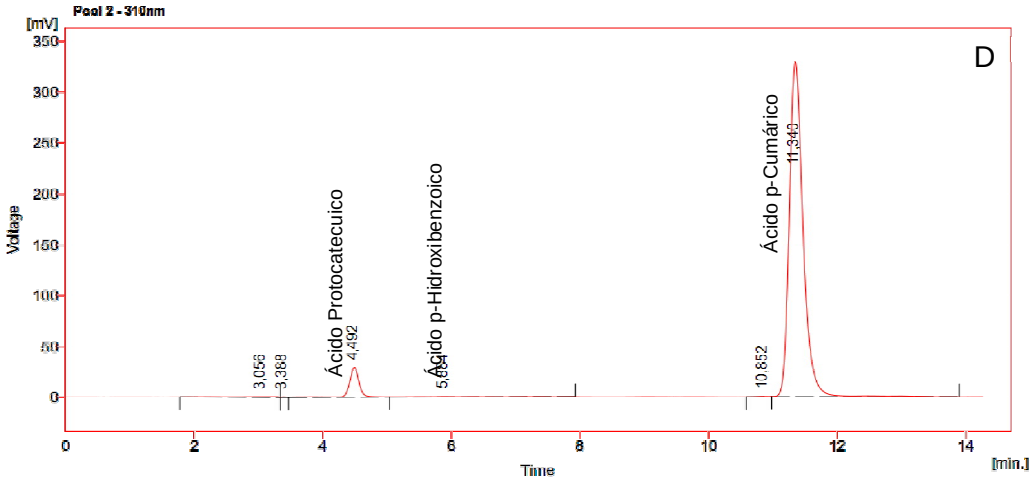
WHITE, E.G. **Educação**. 1ª edição. Tatuí: Casa Publicadora Brasileira, 1937. 328p.

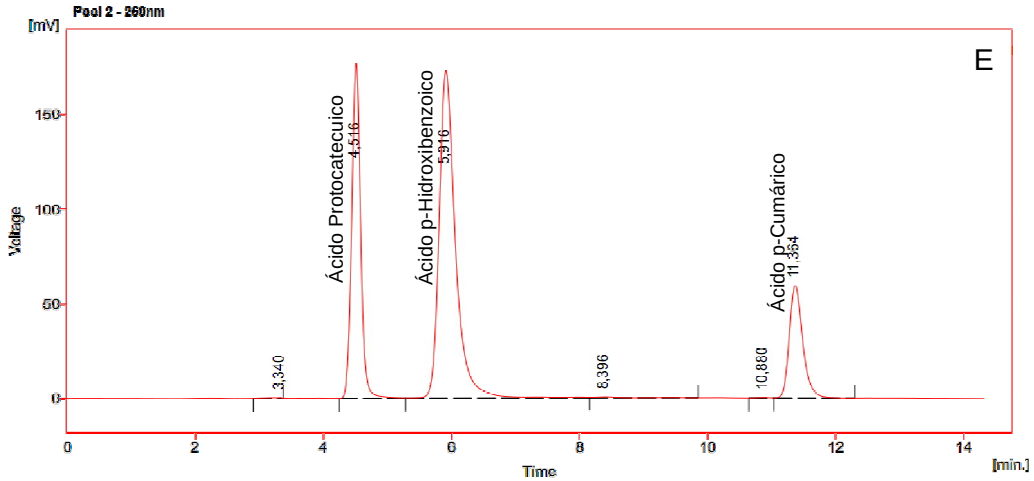
WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28. n. 11, p. 743-745, 1990.

ANEXO



Cromatogramas do Pool 1 (A e B) e do ácido elágico (C).





Cromatogramas do Pool 2 (D e E).