

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

EXTRAÇÃO E MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNA VEGETAL DE
CASTANHA-DO-BRASIL (*BERTHOLLETIA EXCELSA*) POR
TÉCNICAS NÃO TRADICIONAIS

RAFAELA SOARES CASAES ASSUMPÇÃO

MANAUS

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAFAELA SOARES CASAES ASSUMPÇÃO

EXTRACÃO E MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNA VEGETAL DE
CASTANHA-DO-BRASIL (*BERTHOLLETIA EXCELSA*) POR TÉCNICAS
NÃO TRADICIONAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel S. C. Nunes

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A851e Assumpção, Rafaela Soares Casaes
Extração e modificação de proteína vegetal de castanha-do-Brasil
(Bertholletia Excelsa) por técnicas não tradicionais / Rafaela Soares
Casaes Assumpção . 2023
63 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Pedro Henrique Campelo Felix
Coorientadora: Raquel Soares Casaes Assumpção
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. ultrassom de alta intensidade. 2. isolado proteico. 3.
propriedades. 4. funcionais. 5. extração. I. Felix, Pedro Henrique
Campelo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Extração e Modificação de Proteína Vegetal da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) por Técnicas não Tradicionais”

DISCENTE: RAFAELA SOARES CASAES ASSUMPÇÃO

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 20/04/2023.

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA
Data: 24/04/2023 15:49:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:**

Documento assinado digitalmente
 PEDRO HENRIQUE CAMPELO FELIX
Data: 20/04/2023 16:53:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix
Orientador e Presidente da Banca (UFV)

Documento assinado digitalmente
 BRUNO NICOLAU PAULINO
Data: 20/04/2023 16:51:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Nicolau Paulino
Membro (UFBA)

Documento assinado digitalmente
 JAQUELINE DE ARAUJO BEZERRA
Data: 20/04/2023 17:43:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Jaqueline de Araújo Bezerra
Membro (IFAM)

Dedico este trabalho ao meu marido, Davi, quem eu amo partilhar a vida, pelo carinho, paciência e suporte, aos nossos filhos, Laura e Rafael, nossa verdadeiro razão de felicidade e a minha mãe e irmãs que pelo incentivo e apoio constantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora por estarem sempre comigo, me guiando, abençoando e iluminando cada passo. Obrigada por darem a fé e a força necessária para lutar e enfrentar todos os obstáculos, sem nunca pensar em desistir.

Agradeço à minha linda família, meu esposo, Davi, nossos filhos Laura e Rafael, meus pais, Roberto, em memória, minha mãe Rosa, minhas irmãs, Raquel e Roberta, minha avó, Creuza, que não pode acompanhar essa minha trajetória, mas sempre esteve em memória. Obrigada pela compreensão, pelo incentivo, por desejarem o melhor para mim e pelo amor intenso que vocês têm por mim.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro que acreditou no meu trabalho, depositando sua confiança em mim nesses anos de mestrado, e sobretudo pela sua orientação na execução deste trabalho.

Agradeço ainda, a Profa. Dra. Jaqueline que sempre me apoiou quando eu precisei, esteve ao meu lado durante praticamente todo o período do mestrado.

Ao grupo de pesquisa NECTAM pelo apoio, em especial ao colega Josias que me auxiliou em vários momentos na execução das análises.

A persistência é o menor caminho para o êxito.
(Charles Chaplin).

RESUMO

Proteínas à base de vegetais podem ser consumidas por diferentes tipos de indivíduos, em especial àqueles que não podem consumir proteína de origem animal. A castanha-do-Brasil é um fruto extremamente utilizado por suas qualidades nutricionais. Formas de melhorar a concentração de proteínas em alimentos vêm sendo estudadas a fim de obter resultados promissores em sua concentração. Técnica de ultrassom de alta intensidade está sendo utilizada para extrair proteínas sem uso de substâncias químicas com a finalidade de ser uma alternativa mais sustentável ao meio ambiente. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do método convencional e método alternativo nas propriedades físico-químicas de proteínas isoladas de castanha-do-Brasil. A obtenção da torta desengordurada de castanha-do-Brasil foi realizada pelo método convencional da prensa. Em seguida, a amostra foi extraída por diferença de pH para alcançar o isolado proteico (método 1), por extração por ultrassom (método 2) e extração combinada (método 3). Trata-se de um estudo experimental com abordagem quantitativa, onde foi utilizado o isolado proteico da castanha-do-Brasil para a análise da composição centesimal (umidade, cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos), propriedades físicas (solubilidade, capacidade de absorção de água e óleo e formação e estabilidade de espuma) e atividade antioxidante realizadas em triplicatas no laboratório da Central de Analítica do IFAM-CMC, Manaus/AM. Com os resultados obtidos, observou-se que a amostra extraída pelo método 1 apresentou um alto teor de umidade (41,53%), cinzas (0,667) e lipídios (23,5%), e ainda, dentre as três amostras analisadas, destacou-se na concentração proteica (16,09%), apontando que o uso do isolado proteico pode ser uma excelente opção proteína vegetal, contribuindo para a promoção da saúde. Em relação a amostra tratada pelo método 2, notou-se baixo teor de cinzas (0,0032%) e lipídios (16,72%). Nas propriedades físicas da proteína extraída, a extração pelo método 3 apresentou 17,70% de nitrogênio solúvel, sendo a maior solubilidade comparada aos tipos de extração estudada, na capacidade de absorção água e de óleo, a amostra extraída por ultrassom ganhou destaque (232%) e 87,64%, respectivamente. Na formação/estabilidade de espuma, a amostra extraída pelo método 3 formou um volume maior de espuma e a manteve pelo maior tempo estável. Ainda, pode-se observar um efeito antioxidante do isolado proteico gerado a partir da imersão em sonificação. A extração assistida por ultrassom é uma técnica promissora para o setor de tecnologia de alimentos, apresenta baixo impacto ambiental, menor consumo de energia e solventes, e está de acordo com a química verde tecnologia e conceitos sustentáveis.

Palavras-chaves: ultrassom de alta intensidade, isolado proteico, propriedades funcionais.

ABSTRACT

Plant-based proteins can be consumed by different types of individuals, especially those who cannot consume protein of animal origin. The Brazil nut is a fruit extremely used for its nutritional qualities. Ways to improve protein concentration in foods have been studied in order to obtain promising results in its concentration. High intensity ultrasound technique is being used to extract proteins without the use of chemical substances in order to be a more sustainable alternative to the environment. This work aims to evaluate the effect of the conventional method and alternative method on the physicochemical properties of proteins isolated from Brazil nuts. Obtaining the Brazil nut degreasing cake was carried out using the conventional press method. Then, the sample was extracted by pH difference to reach the protein isolate (method 1), by ultrasound extraction (method 2) and combined extraction (method 3). This is an experimental study with a quantitative approach, where Brazil nut protein isolate was used to analyze the chemical composition (moisture, ash, protein, lipids and carbohydrates), physical properties (solubility, absorption capacity of water and oil and foam formation and stability) and antioxidant activity carried out in triplicates in the analytical center of IFAM-CMC, Manaus/AM. With the results obtained, it was observed that the sample extracted by the method 1 presented a high moisture content (41.53%), ash (0.667) and lipids (23.5%), and yet, among the three samples analyzed, stood out in protein concentration (16.09%), indicating that the use of protein isolate can be an excellent vegetable protein option, contributing to the promotion of health and environmental sustainability. Regarding the sample treated with ultrasound (method 2), a low ash (0.0032%) and lipid (16.72%) content was noted. In the physical properties of the extracted protein, the method 3 presented 17.70% of soluble nitrogen, being the highest solubility compared to the types of extraction studied, in the water and oil absorption capacity, the sample extracted by ultrasound was highlighted (232%) and 87.64%, respectively. In foam formation/stability, the sample extracted by the combined method formed a larger volume of foam and kept it stable for a longer time. Furthermore, an antioxidant effect of the protein isolate generated from immersion in sonification can be observed. Ultrasound-assisted extraction is a promising technique for the food technology sector, it has low environmental impact, lower energy and solvent consumption, and is in line with green chemistry technology and sustainable concepts.

Key-words: high intensity ultrasound, protein isolate, functional properties.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Aparelho de prensa.....	31
Figura 2 – Peso final da TDCB.....	32
Figura 3 – TDCB armazenada na sacola plástica.....	32
Figura 4 - Etapas das extrações de isolado proteico da castanha-do-Brasil.....	33
Figura 5 – Banho ultrassônico da amostra.....	35
Figura 6 – Amostra convencional.....	41
Figura 7 – Amostra US.....	41
Figura 8 – Amostra Combinada.....	41
Gráfico 1. Solubilidade dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil por diferentes tratamentos.....	47
Gráfico 2. Porcentagem de formação de espuma.....	51
Gráfico 3. Volume de espuma formada após repouso em temperatura ambiente.....	52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Classificação da aplicação de ultrassom em potência e frequência.....	21
Tabela 2. Composição centesimal do isolado proteico de castanha-do-Brasil obtido por diversos métodos.....	44
Tabela 3. Capacidade de absorção água e óleo.....	49
Tabela 4. Dados de estabilidade de espuma da torta desengordurada de castanha-do-Brasil...	52
Tabela 5. Efeito antioxidante nas amostras de isolado proteico de castanha-do-Brasil.....	53
Quadro 1: Diferentes tipos de proteínas vegetais modificadas por US.....	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs – Absorbância
ABTS - ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
ANS - anilino-naftaleno-sulfonato
BHT - 2,6-di-(tert-butil)-4- metilfenol
CAO – Capacidade de absorção de água
CAO – Capacidade de absorção de óleo
CFE – Capacidade de formação de espuma
Cm - Centímetros
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH -difenil-picrilhidrazila
DTNB - reagente de Ellman
EAI - atividade de emulsão
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI - estabilidade da emulsão
g - gramas
h – Hora
HCL – Ácido clorídrico
HIU - ultrassom de alta intensidade
INPA - Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas
IP - isolado proteico
IPE – Isolado Proteico da Ervilha
M – Molar
min – Minutos
mL – Mililitros
mM – Milimolar
NaCl – Cloreto de Sódio
NANOPOL - Microno Laboratório de Polímeros Nanoestruturados
NaOH – Hidróxido de Sódio
nm – Nanômetro
OAC – óleo / água
PBS – Tampão fosfato-salino
pH – Potencial hidrogeniônico
RFI - intensidade da fluorescência
RPM – Rotações por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
TDCB - Torta Desengordurada da Castanha-do-Brasil
Vis - Visível
UFAM – Universidade Federal do Amazonas
UV – Ultravioleta
V – Voltagem
V – Volume
µg – Micrograma
% Porcentagem
°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Castanha-do-Brasil.....	18
2.2	Torta Desengordurada da Castanha-do-Brasil.....	18
2.3	Propriedades da proteína após o efeito do pH.....	19
2.4	Técnica de Ultrassom.....	21
2.4.1	Fundamentos da Ultrassom.....	21
2.4.2	Influência na extração / modificação de proteínas.....	22
2.5	Qualidade das proteínas após modificação pela técnica US.....	23
2.5.1	Efeitos da US sobre as propriedades emulsificantes de proteínas.....	23
2.5.2	Efeitos da US sobre tamanho da partícula e solubilidade de proteínas.....	23
2.5.3	Efeitos da US sobre a hidrofobicidade de proteínas.....	24
2.5.4	Efeitos da US sobre formação de espuma.....	24
2.6	Benefícios da modificação das propriedades físicas das proteínas.....	29
2.7	Técnica de Ultrassom ambientalmente correta.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo Geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	Obtenção da Torta Desengordurada de Castanha-do-Brasil (TDCB).....	32
4.2	Delineamento experimental.....	34
4.2.1	Extração de proteínas por método convencional de diferença de pH.....	34
4.2.2	Extração de proteínas por método de ultrassom assistido.....	36
4.2.3	Extração de proteínas por métodos combinados.....	37

4.2.4 Análises Físico-Químicas.....	38
4.2.4.1 Umidade	38
4.2.4.2 Cinzas.....	40
4.2.4.3 Proteínas.....	42
4.2.4.4 Lipídeos.....	44
4.2.4.5 Carboidratos.....	45
4.3 Propriedades funcionais dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil por diversos métodos.....	45
4.3.1 Solubilidade.....	46
4.3.2 Hidrofobicidade.....	46
4.3.3 Capacidade do extrato de isolado proteico de castanha-do-Brasil na absorção de água.....	46
4.3.4 Formação de espuma.....	47
4.4 Efeitos Antioxidantes dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil.....	48
4.4.1 Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	48
4.4.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS.....	49
4.5 Análise estatística.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1 Composição centesimal.....	51
5.2Propriedades Funcionais.....	53
5.2.1 Solubilidade.....	53
5.2.2 Capacidade de absorção água e óleo.....	55
5.2.3 Capacidade de Formação e Estabilidade de Espuma.....	57
5.3 Efeito antioxidante.....	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O processo de fabricação de alimentos deve ser verificado para garantir uma melhor eficiência e segurança, permitindo um produto final com qualidade adequada. Neste cenário, o uso de tecnologias limpas e sustentáveis é preferido (BERNARDI et al., 2021). O consumo de proteínas vegetais contribui com efeitos benéficos para a saúde, enquanto a alta ingestão de proteína animal pode gerar doenças. Logo, uma alimentação à base de vegetais é uma possibilidade para suprir uma fonte de proteína de base para o meio ambiente e ao público em questões de saúde. As proteínas simbolizam um grupo de ingredientes com extensa utilização na indústria de alimentos, como texturizado, concentrado, proteínas isoladas ou hidrolisadas, particularmente aquelas obtidas de fontes vegetais. Além disso, elas possuem propriedades adicionais, emulsificantes e de formação de espuma, absorção de água, capacidade de absorção de óleo/água (OAC), viscosidade e gelificação, que são dependentes da solubilidade. Esse grupo de nutriente fornece um papel primordial para a sociedade e alimentação animal. As propriedades funcionais são atingidas por agentes químicos e físicos usados na extração de proteínas, o que comprova a avaliação da funcionalidade da proteína extraída por outros métodos não tradicionais.

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é consumida ao redor do mundo por suas qualidades nutricionais e sua ótima composição. Os derivados da castanha-do-Brasil têm conseguido espaço no mercado, entretanto estudos voltados para a extração e conservação do concentrado proteico, por exemplo, podem aumentar o seu valor comercial. A castanha-do-Brasil tem características importantes em relação ao valor econômico para a região Amazônica. Sua exploração extrativista acarreta impacto direto na geração de emprego e renda da população ribeirinha (OLIVEIRA, 2019).

A extração de compostos bioativos depende de vários fatores, como a técnica de

extração, as matérias-primas e o solvente de extração que são utilizados. As técnicas podem ser classificadas em convencionais ou não convencionais. As técnicas convencionais requerem o uso de solventes orgânicos, temperatura e agitação. As técnicas não convencionais, são técnicas verdes ou limpas devido à redução do uso de energia e à aplicação de solvente orgânico, que são benéficas em relação ao meio ambiente (GARCÍA-RAGHAVAN, 2022).

O efeito do ultrassom de alta intensidade (US) na modificação da proteína tem sido tema de muitas pesquisas. Certos trabalhos investigaram a aplicação de US durante a reação química de proteínas ou como pré-tratamento, a fim de promover modificações (HAO et al., 2013).

O tratamento ultrassônico, como uma tecnologia de processamento físico não térmico verde, é amplamente utilizado em modificação de proteína, como alterar a estrutura molecular da proteína da ervilha, proteína de soja, proteína de arroz, e proteína de gérmen de trigo (YIHE et al., 2020).

O ultrassom pode modificar a estrutura das proteínas, destruindo as ligações moleculares, como ligações de hidrogênio e força eletrostática através do efeito de cavitação. E tais modificações podem melhorar as características de solubilidade, gelificação, emulsão e formação de espuma das proteínas (YIHE et al., 2020).

O tratamento com ultrassom possui efeito eficiente para formação de conjugados de proteína e polissacarídeo. O uso de pré-tratamento com ultrassom pode aumentar a hidrólise enzimática de proteínas. Outros estudos aplicaram US para modificar diretamente as propriedades funcionais e físicas de proteínas, como solubilidade, gelificação, emulsões e formação de espuma. A ultrassonicação de proteínas de soro de leite significou um aumento consideravelmente da solubilidade e viscosidade aparente. Da mesma forma, o tratamento com ultrassom de alta intensidade (US) permite modificar as propriedades reológicas de forma acentuada, aumenta a solubilidade, especificamente com área de superfície e valores de índice de atividade emulsificante de concentrados de proteína de soja, bem como a solubilidade da

proteína e a capacidade de gelificação do isolado de proteína. A sonicação em escala piloto, operando a uma frequência de 20 kHz, poderia ser usada para reduzir a viscosidade e melhorar a gelificação de soro de leite e caseína contendo ingredientes lácteos (HAO et al., 2013).

Portanto, os tratamentos de US são capazes de modificar a estrutura da proteína sem o uso de aditivos ou tratamentos térmicos extremos, simplificando o processamento desses ingredientes e gerando uma fonte limpa para consumidores (ZHIFENG-YOULING, 2020).

No entanto, o tratamento de ultrassom sozinho é considerado insuficiente para modificar a estrutura da proteína para melhorar a funcionalidade. Essa limitação pode ser superada com a aplicação de termossonicação, ou seja, a combinação de ultrassom e aquecimento. A termossonicação pode alterar a conformação da proteína devido à sinergia do efeito de cavitação de ultrassom e a entrada de energia térmica (ZHIFENG-YOULING, 2020). Foi demonstrado em estudos que o processamento de ultrassom com tempos variados (até 45 min) sob diferentes temperaturas (40°- 85°C) produziu alterações mais extensas da estrutura secundária e da atividade de superfície da albumina de soro bovino do que o ultrassom sozinho.

A extração verde de produtos naturais pode ser um novo conceito para enfrentar os desafios deste século, para proteger o meio ambiente e atender aos consumidores e, entretanto, aumentar a competitividade das indústrias para serem mais ecológicas, econômicas e inovadoras (FARID et al., 2017).

Assim, US não representa apenas uma alternativa com rápido efeito eficiente e confiável para melhorar a qualidade da proteína alimentar, mas também tem potencial para desenvolver novos produtos na indústria de alimentos.

Desse modo, pode-se inferir que a técnica de ultrassom para modificação de proteínas de origem vegetal, como no estudo da castanha-do-Brasil, tornar-se-á uma alternativa viável para a indústria de alimentos na garantia de fornecer uma opção mais sustentável na composição

de alimentação que atenda ao público com restrição de consumo de proteínas de origem animal.

Ainda, projetou-se com esse estudo, obter informações formais do concentrado proteico da castanha-do-Brasil para caracterizá-lo como isolado proteico (IP). Atingindo esta definição, as proteínas vegetais, desta substância, possuem valor nutricional ainda mais importante.

Mas também, através da modificação proteica pela técnica não tradicional de ultrassom, essas proteínas foram analisadas quanto às melhorias das características a fim de utilizar como adjuvantes na composição da conservação de alimentos pastosos.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo atingir essas particularidades de forma positiva com a finalidade de ajudar o meio ambiente utilizando de técnicas preservadoras e substratos da própria floresta, além de contribuir com alternativas alimentícias ao público restrito de consumo de proteínas de origem animal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Castanha-do-Brasil

A castanha-do-Brasil é encontrada na floresta Amazônica brasileira. A castanheira (*Bertholletia excelsa*) é uma espécie oriunda da América do Sul e seu crescimento dá-se em floresta de terra firme e com boa drenagem. Na região Amazônica, a castanheira representa uma das importantes fontes de recurso local. Devido sua presença em toda a floresta Amazônica, esta espécie pode ser também encontrada em áreas adjacentes como, por exemplo, Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela e Guiana (OLIVEIRA, 2019).

A Castanheira-do-Brasil tem aproximadamente 50 metros de altura e até 2 metros de diâmetro na base. O fruto, denominado, "ouríço", é uma cápsula (pixídio) de forma quase esférica, medindo de 8 a 15 centímetros de diâmetro e contendo de 12 a 30 sementes (castanhas) angulosas, mais ou menos triangulares (FERREIRA et al., 2018).

A castanha-do-Brasil é apreciada por seu sabor característico, mas também pelo seu elevado valor nutricional. A castanha possui grande valor energético e alto valor biológico proveniente de seus macronutrientes (OLIVEIRA, 2019). Nas sementes das castanhas-do-Brasil estão presentes lipídios, proteínas, carboidratos e fibras, caracterizando-o como um alimento de nível energético elevado (PACHECO, 2007; FREITAS et al., 2007). Também são encontradas vitaminas (A, E, B1, B2 e B3) e minerais, como cálcio, sódio, ferro, potássio, magnésio e selênio, entre outros (SCHONS et al., 2017).

Quanto à composição da castanha-do-Brasil, os valores médios encontrados para seus macronutrientes são: 15,52% de proteínas, 12,36% de carboidratos, 66,16% de lipídeos e 7,7% de fibras (CARDOSO et al, 2017). O óleo bruto de castanha-do-Brasil é majoritariamente constituído por ácidos graxos insaturados (74% - 85%). Estes são importantes por estarem relacionados à diminuição da incidência de doenças cardiovasculares (OLIVEIRA, 2019).

Além dos ácidos graxos supracitados, na composição do óleo de castanha-do-Brasil, podem-se encontrar tocoferóis e tocotrienóis que são conhecidos como um grupo de lipídeos antioxidantes naturais que impedem danos oxidativos em estruturas celulares (OLIVEIRA, 2019). As características da castanha-do-Brasil tornam este produto alvo de estudos e investimentos, pois com seu importante valor nutricional e comercial é capaz de proporcionar condições benéficas à saúde humana.

2.2 Torta Desengordurada de Castanha-do-Brasil

Um potencial aumento no teor de proteína suscita o interesse em viabilizar a sua introdução na alimentação humana, como as tortas. A utilização da torta da castanha-do-Brasil beneficia tanto cooperativas, que fazem uso da castanha como matéria-prima para extração de óleo, como também toda a população, com mais uma fonte de proteína na alimentação encontrada facilmente na natureza. Ao extrair o óleo da torta da castanha-do-Brasil com solvente, obtém-se um produto que pode ser denominado de torta desengordurada de castanha-do-Brasil (TDCB). Alguns pesquisadores que estudaram o valor nutritivo da castanha propuseram introduzi-la na alimentação humana na forma de torta desengordurada. Os solventes que podem ser utilizados na extração do óleo são etanol, isopropanol, isobutanol, tetracloreto de carbono e hexano. O hexano é o solvente mais comumente usado pelas indústrias de extração de óleo vegetal (ALAITZ et al., 2018).

2.3 Propriedades das proteínas após efeito do pH

Apesar do alto valor nutricional da castanha, sua utilização como ingrediente proteico com um valor nutracêutico atrativo, depende grandemente de suas propriedades funcionais. Essas estão estreitamente relacionadas com suas características estruturais que por sua vez dependem das condições utilizadas no processo de extração (GLÓRIA, 2006). As propriedades

funcionais requeridas para a utilização de produtos proteicos envolvem solubilidade, absorção de água e óleo, gelificação e coagulação, entre outras.

A produção de isolados proteicos de arroz consiste, quase sempre, em uma extração alcalina de seus subprodutos, seguindo pela precipitação das proteínas pelo ajuste do pH no ponto isoelétrico. Acredita-se que o mesmo possa ser efetuado com o IP da castanha. Alguns métodos têm sido reportados na literatura descrevendo o uso de soluções alcalinas para extração de proteínas do arroz (HOU et al., 2017).

Os métodos geralmente compreendem a solubilização de proteínas em pH entre 7 e 11, com ou sem a adição de NaCl na solução e precipitação em pH que varia entre 2 e 5. O teor proteico desses concentrados ou isolados varia de 32% a cerca de 80% (GLÓRIA, 2006), dependendo das condições de extração. O rendimento em proteína, importante parâmetro do processo, raramente é avaliado em estudos de obtenção de produtos proteicos. Ainda, não há basicamente estudos avaliando o isolado proteico da castanha-do-Brasil até o presente momento para permitir uma referência para este estudo.

O tratamento de mudança de pH é simples e modifica a estrutura química através da técnica de cátions, para aumentar a funcionalidade da proteína e diversificar o uso da proteína. Ele aumenta a repulsão de carga sob condições extremas de ácido e alcalino por meio de uma mudança na carga superficial, hidrofobicidade e estrutura molecular. Foi demonstrado que o processo de mudança de pH é capaz de aumentar a solubilidade, emulsionando a atividade / estabilidade da proteína do soro de leite. E essa melhora foi associada à redução do dissulfídrico. Também há relatos de que a capacidade de emulsificação da proteína da ervilha em pH 3 foi superior àquela em condições neutras ou alcalinas. Outros estudos também examinaram o efeito da mudança de pH na solubilidade, hidrofobicidade, tamanho de partícula e permeabilidade do gel da proteína de soja, que forneceu a base fundamental para a aplicação de mudança de pH. O tratamento de mudança de pH pode efetivamente melhorar as propriedades funcionais das

proteínas. No entanto, a modificação ainda é insatisfatória para atender às necessidades da indústria de alimentos. Portanto, é necessária a exploração de outras tecnologias para atuar sinergicamente com esse método (LIN et al., 2020).

Para melhorar a eficácia da proteína da castanha no processamento de alimentos, tratamentos físicos, químicos, enzimáticos e combinados são, portanto, explorados para modificar a estrutura inerente para um estado mais funcional.

2.4 Técnica de Ultrassom

O ultrassom é uma alternativa eficiente e confiável para melhorar a qualidade dos alimentos, que tem potencial para desenvolver novo produto com funcionalidade única. A aplicação da tecnologia ultrassônica na indústria de alimentos está despertando muita atenção (O`SULLIVAN et al., 2016).

2.4.1 Fundamentos da Ultrassom

O ultrassom é uma onda acústica com uma frequência, geralmente, > 20 kHz. Baseia-se na propagação das ondas ultrassônicas e das forças de cavitação resultantes, onde as bolhas geradas podem se chocar de forma intensa e gerar pressão local causando a ruptura dos tecidos, favorecendo a liberação de substâncias intracelulares no solvente (SCHONS et al., 2017).

A aplicação do ultrassom promove o aparecimento de ondas sonoras, as quais dissipam através de meios líquidos, resultando em ciclos diferenciais de pressão, com taxas dependendo da frequência. Estes ciclos de pressão criam zonas de vácuo no líquido que eventualmente colapsam durante o ciclo de alta pressão provocando alta turbulência local, forças de cisalhamento, pressões e temperaturas (OLIVEIRA, 2020).

O ultrassom pode ser classificado em duas categorias, as quais são baseadas na frequência e na potência como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação da aplicação de ultrassom em potência e frequência.

Categoria	Classificação	Faixa abrangida
Frequência	Baixa	20 a 100 kHz
	Alta	100 kHz a 1 MHz
Potência	Baixa	$< 1 \text{ W cm}^{-2}$
	Alta	10 a 1000 W cm^{-2}

Fonte: O'Sullivan et al. (2016).

A Ultrassom de alta intensidade (US, 20 - 100 kHz) pode ter uma ampla variedade de aplicações na indústria de alimentos que podem alterar as propriedades físico-químicas e / ou estrutura e propriedades funcionais devido aos efeitos de cavitação nas proteínas vegetais, por exemplo, isolado de proteína de soja, ervilha e arroz (XIONG et al., 2018).

A produção do ultrassom é um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases. Este processo é denominado cavitação, onde em um meio líquido, promove um efeito de ativação em reações químicas. Durante a etapa de compressão, a pressão é positiva, enquanto que a expansão resulta em vácuo chamado de pressão negativa, constituindo-se em um ciclo de compressão-expansão que gera as cavidades (EMERICK et al., 2019).

As vantagens do ultrassom estão na simplicidade do equipamento, na redução da quantidade dos reagentes utilizados, na possibilidade de usar diferentes solventes para a extração, bem como diminuir o tempo necessário para realizá-las.

2.4.2 *Influência na extração / modificação de proteínas*

O uso de ultrassom para extração de proteínas visa reduzir tempo de extração, custos de energia, consumo de solvente, obter uma mistura mais homogênea, maior taxa de transferência de energia, fornecer extração seletiva e redução do tamanho. Neste contexto, a aplicação de US tem sido amplamente utilizados para extrair proteínas de fontes vegetais e / ou animais aumentando o rendimento de extração em cerca de 20% em comparação com o convencional métodos tradicionais (BERNARDI et al., 2021).

Pode-se observar nos estudos citados, que, em geral, o ultrassom atua sobre as proteínas, diminuindo o tamanho das partículas, melhorando a solubilidade das mesmas, além de expor grupos hidrofóbicos e sulfidrilas que se encontravam no interior da cadeia polipeptídica. Estes eventos contribuem para que ocorra uma alteração das propriedades técnico-funcionais de tais proteínas, otimizando sua utilização pela indústria de alimentos.

Por isso, é valioso para a indústria de alimentos investigar um método que seja capaz de melhorar as propriedades de obter um concentrado proteico mais eficaz na composição de alimentos a fim de conquistar um mercado adepto a esta substância e também à população restrita a proteína animal.

2.5 Qualidade das proteínas após modificação pela técnica US

2.5.1 *Efeitos da US sobre as propriedades emulsificantes de proteínas*

As proteínas podem ser desnaturadas de acordo com o tratamento de ultrassom condições mentais devido à exposição do grupo hidrofóbico que leva à agregação de proteínas. Portanto, há um equilíbrio entre a agregação e ocorre a exposição dos grupos hidrofóbicos, contribuindo para a formação de emulsão. Jiang et al., (2014) descobriram que suspensões de proteína isolada de feijão preto em baixa frequência (20 kHz) e em diferentes potências (150,

300 e 450 W) e o tempo (12 e 24 min) resultaram em proteínas com mudanças estruturais e físicas.

Schons et al., (2022) observaram mudanças na condutividade, capacidade emulsionante e suspensões com maior viscosidade para proteína de milho isolada e amostra de concentrado proteico extraídos pelo US (20 kHz ou 40 kHz, 15 min). O tratamento de ultrassom com sonda de 20 kHz levou a alterações de proteínas, como aumento do índice de emulsificação.

2.5.2 Efeitos da US sobre tamanho da partícula e solubilidade de proteínas

A redução do tamanho das partículas de proteína por ultrassom foi relatada em vários estudos. A proteína de leite e o tamanho das partículas de proteína diminuíram quando submetido a tratamento ultrassônico usando uma sonda a 20 kHz por 15 min, e usar um banho ultrassônico a 40 kHz causou uma proteína com baixo peso molecular das frações e formação de agregados moleculares (SCHONS, et al., 2022).

A redução do tamanho da partícula de proteína por tratamento de ultrassom foi associada a um aumento na solubilidade da proteína de soja (HU et al., 2013). De acordo com Xiong et al., 2018, pode ser devido ao aumento nas bolhas de cavitação causadas pelo aumento da pressão em torno deles, fazendo-os entrar em colapso, interrompendo parcialmente a estrutura terciária das proteínas e causando desdobramento parcial, o que leva a um aumento nos grupos sulfidrila livres na superfície da proteína.

2.5.3 Efeitos da US sobre a hidrofobicidade de proteínas

A hidrofobicidade de proteínas pode ser modificada após tratamento com ultrassom. A hidrofobicidade e a solubilidade das proteínas aumentaram após tratamento por ultrassom, principalmente em potência média (300 W). Portanto, o ultrassom tem um efeito no tamanho

da partícula de proteína e é responsável pela alteração da solubilidade e hidrofobicidade da proteína. Essas propriedades da proteína são essenciais e podem afetar outras propriedades tecno-funcionais, como gelificação, emulsificação, formação de espuma, capacidade de formação de espuma e viscosidade (JHIANG et al., 2014).

2.5.4 Efeitos da US sobre formação de espuma

A capacidade e estabilidade de formação de espuma de proteínas estão ligadas à capacidade de reduzir a tensão superficial na interface água-ar. Morales et al., (2013) observaram que o tratamento com ultrassom melhorou a capacidade de formação de espuma de soja isolada, reduzindo o tamanho da partícula de proteína, mantendo a espuma estável. O concentrado e isolado proteico de soja, obtido pela US, observou-se uma melhoria na capacidade de espuma deste composto. A alteração da propriedade de espumação pode ser devido a um aumento da solubilidade da proteína e rápido desdobramento em uma camada em torno de gotas de gás/ar (SCHONS et al., 2022).

Quadro 1: Diferentes tipos de proteínas vegetais modificadas por US

Fonte vegetal	Variáveis de Processo	Principais resultados	Referência
Proteína de feijão preto	<ul style="list-style-type: none"> - Potência do ultrassom: 0, 150, 300 e 450 W - Tempo: 12 e 24 min 	<ul style="list-style-type: none"> - os tratamentos de ultrassom de baixa e média potência causaram a abertura da cadeia de proteínas e a exposição de grupos hidrofóbicos ocultos, aumentando a interação entre as moléculas de proteína e água e a solubilidade; - a tecnologia de ultrassom pode ser usada como um método ecologicamente correto para melhorar as propriedades funcionais das proteínas e atender às necessidades complexas dos produtos alimentícios modernos. 	Li et al. (2020)

<p>Proteína de ervilha em pó</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Potência do ultrassom: 20 kHz com variação de amplitude 0, 30%, 60% e 90%; - Tempo: 30 min. 	<ul style="list-style-type: none"> - Os resultados indicaram que o tratamento US pode causar desdobramento parcial do IPE, conforme demonstrado por alterações na redução do tamanho das partículas e aumento da hidrofobicidade da superfície. Essas mudanças levaram a um aumento de 1,38 vezes na capacidade de formação de espuma; - US promoveu a interação de proteínas e formou um sistema relativamente suave na interface ar-água, melhorando assim a estabilidade da espuma; - Esses resultados sugeriram que o tratamento de US pode ser uma abordagem útil para modificar a capacidade de formação de espuma do isolado proteico (IP). 	<p>Xiong et al. (2018)</p>
<p>Proteína do leite</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Potência do ultrassom: 20 kHz (sonda) e 40 kHz (banho ultrassônico) - Tempo: 15 min 	<ul style="list-style-type: none"> - Formação de pequenas frações de proteínas com baixo peso molecular, resultando na melhora da solubilidade; - a alteração da propriedade de espumação pode ser devido a um aumento da solubilidade da proteína e rápido desdobramento em uma camada em torno de gotas de gás / ar. 	<p>Schons et al. (2022)</p>

Proteína de soja	- Potência do ultrassom: 20 kHz em potência variável (200, 400 ou 600 W) - Tempo: 15 min ou 30 min	- Redução do tamanho da partícula de proteína por tratamento de ultrassom foi associado a um aumento na solubilidade da proteína de soja	Hu et al. (2013)
	- Potência do ultrassom: 20 kHz em 20% de amplitude - Tempo: 5, 10, 15 e 20 min	- O tratamento ultrassom melhorou a capacidade de formação de espuma de soja isolada, reduzindo o tamanho da partícula de proteína, mantendo a estabilidade da espuma.	Morales et al. (2013)
Proteína da clara do ovo	- Potência do ultrassom: 20 kHz em potência de 500W - Tempo: 0, 10, 20 e 30 min	- Modificação das propriedades físicas e funcionais da proteína, como solubilidade, coagulação, emulsificação e capacidade de formação de espuma.	Amiri et al. (2018)

Fonte: o autor (2023).

2.6 Benefícios da modificação das propriedades físicas das proteínas

Vários estudos relataram que o ultrassom influencia nas propriedades estruturais e melhora as propriedades funcionais das proteínas dos alimentos, como a proteína do soro de leite, isolados de proteína de soja e proteínas de clara de ovo. Outros estudos usaram US para modificar as propriedades físicas e funcionais da proteína, como solubilidade, coagulação, emulsificação e capacidade de formação de espuma (AMIRI et al., 2018).

Por exemplo, Amiri et al., (2018), descobriram que o tratamento ultrassônico de caseína poderia atrasar o ponto de coagulação e aumentar a firmeza do gel de caseína. Além disso, relataram uma diminuição na opacidade das soluções de caseína por radiação ultrassônica. Xioung et al., (2018), mostraram que a radiação ultrassônica das proteínas do soro aumentou consideravelmente a solubilidade e a viscosidade aparente, e o comportamento do fluxo foi alterado pelo espessamento de cisalhamento. Ainda, há relatos de que as reações de sonicação a uma frequência de 20 kHz podem ser usadas para reduzir a viscosidade e melhorar a gelificação da caseína e da proteína do soro de leite em produtos lácteos. O ultrassom de alta intensidade não é apenas um rápido, eficiente procedimento e confiável para melhorar a qualidade da proteína alimentar, mas também tem potencial para o desenvolvimento de novos produtos na indústria alimentícia (AMIRI et al., 2018).

2.7 Técnica Ultrassom ambientalmente correta

Hoje em dia a extração verde de produtos naturais pode ser um novo conceito para enfrentar os desafios do século XXI, para proteger o meio ambiente e os consumidores e, entretanto, aumentar a competitividade das indústrias para serem mais ecológicas, econômicas e inovadoras (FARID et al., 2017).

O ultrassom é uma tecnologia-chave para alcançar o objetivo da técnica "verde" sustentável e extração. O ultrassom é bem conhecido por ter um efeito significativo na taxa de vários processos na indústria farmacêutica, química e alimentar. Usando ultrassom, extrações completas agora podem ser concluídas em minutos com alta reprodutibilidade, reduzindo o consumo de solvente, simplificando a manipulação, dando maior pureza ao produto final, eliminando pós-tratamento de águas residuais e consumindo apenas uma fração da energia fóssil normalmente necessário para um método de extração convencional (FARID et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do método convencional e método alternativo nas propriedades físico-químicas de proteínas isoladas de castanha-do-Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Obter o isolado proteico da castanha-do-Brasil;
- 2) Avaliar o efeito da potência do ultrassom no rendimento de extração de proteínas da castanha-do-Brasil;
- 3) Identificar as propriedades funcionais dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil; e
- 4) Verificar o efeito antioxidante dos isolados proteicos de castanha-do- Brasil.

4 METODOLOGIA

A castanha-do-Brasil foi adquirida no mercado municipal da Cidade de Manaus, pertencente ao Estado do Amazonas. Os experimentos foram realizados nos Laboratório do Núcleo de Estudos em Composição e Toxicologia de Alimentos (NECTA), Laboratório de Polímeros Nanoestruturados, ambos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), e Laboratório de Central Analítica do IFAM-CMC.

4.1 Obtenção da Torta Desengordurada de Castanha-do-Brasil (TDCB)

Foi realizada a extração de óleo da castanha-do-Brasil no Laboratório NECTA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM. Os instrumentos utilizados para extração do óleo e obtenção da TDCB foram a prensa Tecnal modelo TE-098 (Figura 1) e balança digital da marca Urano modelo US 20/2 POP-S.

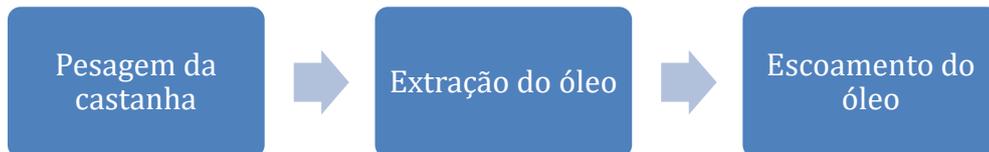


Figura 1 – Aparelho de prensa. Fonte: o autor.

Foram colocadas 450g de castanhas dentro do compartimento da prensa. A alavanca foi acionada manualmente até o início do escoamento do óleo dentro do béquer. Parou-se de

acionar a alavanca no momento que a força atingiu 6 Ton no manômetro ou no momento em que não havia mais escoamento de óleo (Fluxograma 1).

Fluxograma 1: Extração do óleo de castanha-do-Brasil:



A TDCB foi colocada numa vasilha e em seguida foi verificado o peso (Figura 2).



Figura 2 – Peso final da TDCB. Fonte: o autor.

Foram armazenadas em uma sacola plástica transparente (Figura 3) e conservadas no congelador a fim de realizar sua extração de isolado proteico posteriormente.



Figura 3 – TDCB armazenada na sacola plástica. Fonte: o autor.

4.2 Delineamento Experimental

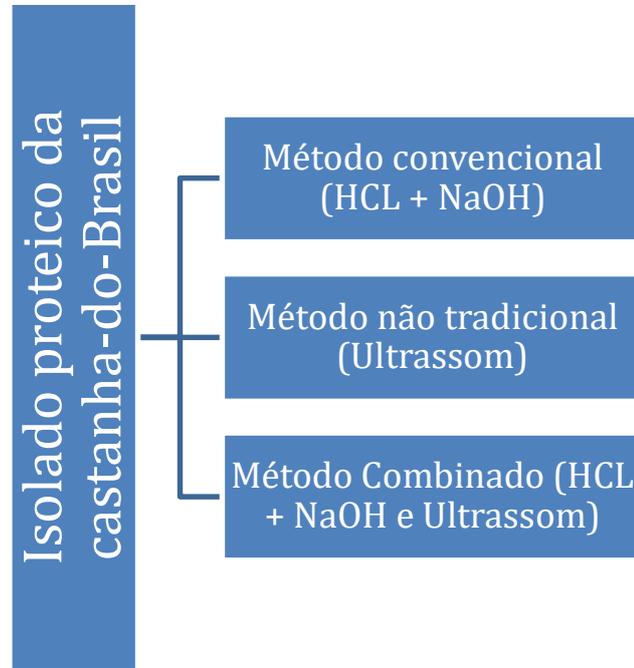


Figura 4 – Etapas realizadas das extrações de isolado proteico da castanha-do-Brasil.
Fonte: o autor.

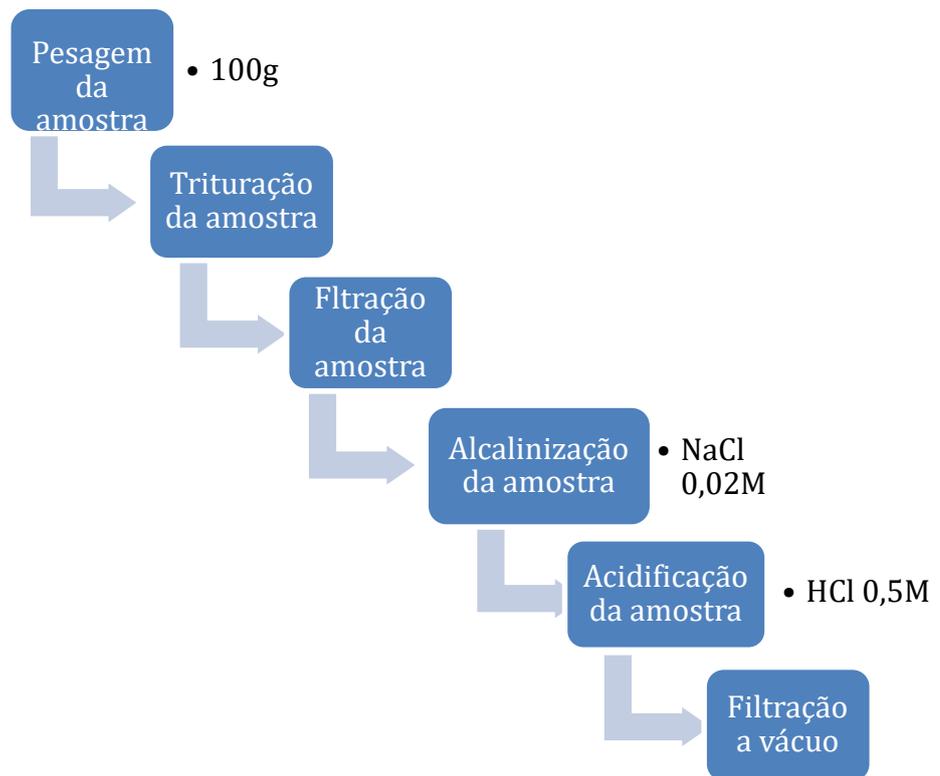
4.2.1 Extração de proteínas por método convencional (método 1)

Segundo Glória, (1996), com modificações para o objetivo deste trabalho, a produção de um isolado proteico de castanha-do-Brasil, obtido a partir da torta desengordurada, ocorreu através de uma extração alcalina, com uso de hidróxido de sódio (NaOH 0.02M), a qual pode variar de um pH perto da neutralidade para uma alcalinidade moderada (pH 9.0). Foi realizada a pesagem de 100g de TDCB e em seguida a trituração com 1,5 L de água destilada. Posteriormente, houve a filtração da amostra com pano microporoso. Nessa primeira etapa, os constituintes insolúveis foram separados da proteína solubilizada.

Na segunda etapa, o extrato contendo a proteína e os constituintes solúveis passaram por uma acidificação com HCL (0.5 M) o qual atingiu pH em torno de 3,5 a 4,0, para precipitar

as proteínas, separando-as dos demais constituintes solúveis. A amostra permaneceu em agitação mecânica por 1h e 30 minutos. Em seguida foi realizada a separação do precipitado dos constituintes solúveis através de filtração a vácuo (Fluxograma 2).

Fluxograma 2: Processo de extração do isolado proteico de castanha-do-Brasil pelo método 1



4.2.2 Extração de proteínas por método de ultrassom assistido

O sistema de sonda é considerado eficiente devido a uma intensidade ultrassônica fornecida através de uma menor superfície (apenas a ponta da sonda), quando comparada ao banho ultrassônico. Eles são geralmente operados em cerca de 20 kHz e usado transdutor ligado à sonda que está imerso no reator, resultando em uma entrega direta de ultrassom na mídia de extração com o mínimo de perda de energia ultrassônica (FARID et al., 2017).

As dispersões de isolado proteico da castanha-do-Brasil (IPCB) passou por tratamento de ultrassom, técnica US (BERNARDI et al., 2021), colocando a solução de proteína em um reator de banho ultrassônico nas seguintes condições: 20 kHz (frequência), 50 W (potência), 90° C, tempo de sonicação de 10 min (Figura 5).



Figura 5 – Banho ultrassônico da amostra

A amostra IPCB continha cerca de 1,5 L para realização do tratamento. Após o tratamento de ultrassom a amostra foi liofilizada e filtrada a vácuo, e então armazenada à temperatura de 2 a 8° C em recipientes herméticos, tubo de Falcon, até serem analisadas (HAO et al., 2013).

4.2.3 Extração de proteínas por métodos combinados

O extrato contendo a proteína e os constituintes solúveis passaram por alcalinização (NaOH 0.02M) e em seguida por uma acidificação com HCl (0.5 M) o qual atingiu pH em torno de 3,5 a 4,0, para precipitar as proteínas, separando-as dos demais constituintes solúveis. A amostra permaneceu em agitação mecânica por 1h e 30 minutos. Em seguida foi realizada a separação

do precipitado dos constituintes solúveis através de filtração a vácuo e mantido em temperatura ambiente por 1h. Logo após, a amostra passou por tratamento ultrassônico nas seguintes condições: 20 kHz (frequência), 50 W (potência), 90 ° C, tempo de sonicação de 10 min (YIRE et al., 2020).

4.2.4 Análises Físico-Químicas

Todas as análises descritas foram realizadas conforme descrição do livro Métodos Físico-Químicos Para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.2.4.1 Umidade

A umidade corresponde à perda de peso perdido pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Na realidade, não é somente a água a ser removida, mas outras substâncias que se volatilizam nessas condições. O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado de resíduo seco. O aquecimento direto da amostra a 105°C é o processo mais usual. O procedimento foi pesar 2g da amostra na cápsula de porcelana, previamente tarada. Aquecida durante 3 horas. Resfriada em um dessecador até a temperatura ambiente. Foi pesada novamente e foi repetido o procedimento de aquecimento e resfriamento até o peso constante. O teor de umidade foi definido pela equação 1.

$$\%Umidade = \frac{P_f - P_i}{P_a} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

Pf = peso final da amostra;

Pi = peso inicial da amostra; e

Pa = peso da amostra

4.2.4.2 Cinzas

Resíduo por incineração ou cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a 550-570 °C. Nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento. Geralmente, as cinzas são obtidas por ignição de quantidade conhecida da amostra. O procedimento foi pesar 5g da amostra em uma cápsula, previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. O teor de cinzas foi definido pela equação 2.

$$\frac{Pf-Pi}{Pa} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

Pf = peso final da amostra;

Pi = peso inicial da amostra; e

Pa = peso da amostra

4.2.4.3 Proteínas

A determinação de proteínas baseia-se na determinação de nitrogênio, geralmente feita pelo processo de digestão Kjeldahl (LIMA et al., 2020). A matéria orgânica é decomposta e o nitrogênio existente é finalmente transformado em amônia. Sendo o conteúdo de nitrogênio das diferentes proteínas, aproximadamente 16%, introduz-se o fator empírico 6,25 para transformar o número de g de nitrogênio encontrado em número de g de proteínas. Material usado foi balança analítica, balão de destilação, frasco Erlenmeyer, chapa elétrica, bureta de 25 mL,

espátula, papel de seda, pipeta graduada de 25mL. Os reagentes foram ácido sulfúrico 0,05M, sulfato de cobre, sulfato de potássio, solução fenolftaleína, vermelho de metila, hidróxido de sódio (NaOH) e mistura catalítica. O procedimento foi pesar 0,2mg da amostra em papel de seda e transferida para o balão de Kjeldahl, adicionado 5 mL de ácido sulfúrico e cerca de 1g da mistura catalítica. Levado ao aquecimento em chapa elétrica, na capela, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos). Aquecido por mais uma hora, adicionado 2 gotas do indicador fenolftaleína e 0,2g de zinco. Em seguida foi para o balão de destilação e aquecido à ebulição e destilado para depois fazer a titulação. Para titulação foram adicionados no frasco Erlenmeyer 5mL de ácido sulfúrico e 1 gota de vermelho de metila. Posteriormente foi introduzido NaOH 0,05M até a mudança da coloração para transparente ou amarelo-claro. O volume do titulante (NaOH 0,05M) foi registrado para cálculo final conforme equação 3.

$$\%N = \frac{V \times 0,14 \times 6,25}{Pa} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

%N = % proteínas

V = volume de NAOH titulado

Pa = peso da amostra

4.2.4.4 Lipídeos

A determinação de lipídios em alimentos foi realizada pela extração com solvente. O material utilizado foi aparelho extrator de Soxhlet, bateria de aquecimento com refrigerador de bolas, balança analítica, estufa, papel de filtro, balão de fundo chato de 250 mL com boca esmerilhada, lâ desengordurada, algodão, espátula e dessecador com sílica gel. O reagente usado foi o hexano. O procedimento foi pesar 2g da amostra em papel de filtro e amarrado com

fio de lã previamente desengordurado. Em seguida, foi transferido o papel de filtro amarrado para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Então, o extrator foi acoplado ao balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Adicionado o solvente em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Foi mantido sob aquecimento em chapa elétrica, à extração contínua por 8 horas (quatro a cinco gotas por segundo). Retirado o papel de filtro amarrado, destilou o éter e transferido o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por aproximadamente uma hora. Resfriado em um dessecador até a temperatura ambiente. Pesado e resfriado até peso constante. O teor de lipídios foi definido pela Equação 4.

$$\%Lipídios = \frac{P1-P0}{Pa} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

P1 = peso final da amostra;

P0 = peso inicial da amostra; e

Pa = peso da amostra

4.2.4.5 Carboidratos

Os carboidratos foram determinados a partir da equação 5.

$$E = 100 - (A + B + C + D) \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde: A = Proteína, B = Lipídios, C = Umidade, D = Cinzas

4.3 Propriedades funcionais dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil por diversos métodos:

4.3.1 Solubilidade

Foi disperso 1g do material em estudo em 50 mL de água destilada com pH ajustado a 2 com HCl 0,5M e pH 12 com NaOH 0,02M diluídos. A dispersão foi mantida sob agitação por 1 hora e filtrada a vácuo. Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para a determinação de N total pelo método de Kjeldahl ligeiramente modificado. O método utilizado foi o adaptado de Glória (2006).

O índice de solubilidade de nitrogênio foi calculado da seguinte forma:

$$\% W = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde: W é a solubilidade da proteína (%), A é a concentração de proteína em solução (mg/mL) e A₀ é a concentração inicial de proteína.

4.3.2 Hidrofobicidade

Uma amostra de 0,5 g do material estudado foi homogeneizada com 3 g de óleo de milho refinado em tubo de centrífuga graduado por 1 minuto, deixada em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente (22 - 25°C) (GLÓRIA, 2006).

O sedimento no tubo da centrífuga, após separação do sobrenadante foi pesado e a capacidade de absorção de óleo (CAO) calculado pela expressão:

$$\% CAO = \frac{\text{Peso do sedimento}}{\text{Peso inicial da amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

4.3.3 Capacidade do extrato de isolado proteico de castanha-do-Brasil na absorção de água

Uma amostra de 0,5 g do material estudado foi homogeneizada em 5 mL de água destilada, em tubo de centrífuga graduado, por 1 minuto, deixada em repouso por 30 minutos à temperatura

ambiente (22 -25°C), para em seguida, ser centrifugada por 10 minutos a 6000 rpm. A água retida após a centrifugação foi considerada como água absorvida (GLÓRIA, 2006).

O sedimento no tubo da centrífuga, após separação do sobrenadante foi pesado e a capacidade de absorção de água (CAA) calculada pela expressão:

$$\% CAA = \frac{\text{Peso do sedimento (g)}}{\text{Peso inicial da amostra (g)}} \times 100 \text{ (Eq. 9)}$$

4.3.4 Formação de espuma

A medição da capacidade de espumação foi realizada pelo método de Amiri et al., 2018, com algumas modificações. Cinco gramas de amostra foram batidos com 100 mL de água destilada durante 5 minutos, usando-se a máxima rotação (600W) em misturador de haste, marca Black and Decker, modelo MMA. O volume aumentado pelo batimento foi medido em uma proveta de 250 mL à temperatura ambiente.



Figura 6 – Amostra Conv.



Figura 7 – Amostra US

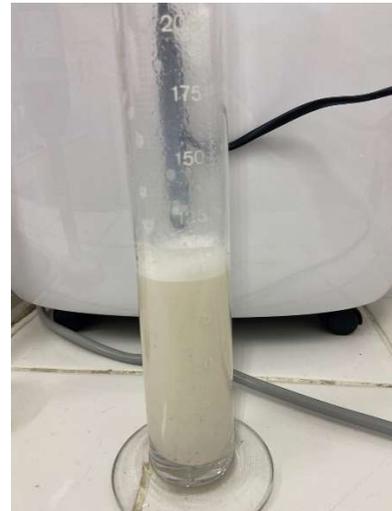


Figura 8 – Amostra Comb.

A capacidade de formação de espuma foi calculada da seguinte forma:

$$Vf - V0 = V0 \times 100 \text{ (Eq. 10)}$$

onde V_f é o volume de espuma no final da mistura (ml) e V_0 é o volume inicial da solução de proteína (ml).

O estudo da estabilidade da espuma foi feito, deixando-a em repouso à temperatura ambiente (22 - 25°C) e fazendo-se as leituras do volume total após intervalos de 5, 10, 15 e 30 minutos.

4.4 Efeitos Antioxidantes dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil:

4.4.1 Análise Antioxidante pelo Método DPPH

Para o ensaio com o radical DPPH, 100 μ L da amostra (0,25 g/mL) foram misturados com 3,9 mL de solução de DPPH (100 μ M) e incubados no escuro por 30 min. Posteriormente, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 515 nm. A curva padrão de Trolox foi construída nas concentrações 250, 500, 1000, 1500 e 2000 μ mol ET, com uma curva de calibração de $y = -0,0005x + 0,9616$, e $R^2 = 0,9996$. Este ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em μ mol ET (MOLYNEUX, 2004).

Este método consiste em adicionar 1mL do extrato líquido em concentrações que variam de 0,1-1000 μ g/mL. A este será adicionado 1mL de uma solução metanólica de DPPH – 0,1mM(1,1-difenil-2-picrilhidrazila), processando-se a reação em 1h à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH será verificada em 515nm em um espectrofotômetro UV-Vis. A atividade antioxidante de cada extrato será expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4- metilfenol (BHT). Após, o percentual sequestrador (PS%) de radicais livres será calculado. A capacidade de

sequestrar radicais livres será expressa como percentual de inibição da oxidação do radical e calculada mediante a seguinte fórmula (ALVES et al., 2017):

$$\% \text{ Inibição} = [((ADPPH - A)) / ADPPH \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

Onde ADPPH é a absorbância da solução de DPPH e A_{amostra} é a absorbância da amostra em solução.

4.4.2 Análise Antioxidante pelo Método ABTS

Para o ensaio com cátions radicais ABTS foi realizada a mistura de 5mL de solução de ABTS a 7mM e 88 uL de persulfato de sódio a 140 mM. A solução foi incubada no escuro à temperatura ambiente por 16h. Após esse período, 1mL da solução foi misturado com álcool etílico até a absorbância de 0,70 a 734nm. Dessa solução, 3 mL foram misturados com 30 mL da amostra (0,25 g/mL) e colocados para reagir no escuro por 6 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 734nm. A curva padrão de Trolox foi construída nas concentrações 250, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol ET}$, com curva de calibração de $y = -0,0003x + 0,6677$, e $R^2 = 0,9993$. Este ensaio foi realizado em triplicado e seus resultados expressos em $\mu\text{mol ET}$ (RE et al., 1999).

4.5 Dados estatísticos

Todos os valores analíticos serão conduzidos em três determinações independentes. Os dados representados como a média \pm desvio padrão. Análise de variância unilateral (ANOVA) para comparação utilizou-se teste de Tukey considerando p -valor $< 0,05$, utilizando-se o software BioEstat 3.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal encontram-se disposta na Tabela 2, cujos valores foram similares aos apresentados por CARLI et al., 2019.

Os resultados da composição centesimal do isolado proteico de castanha-do-Brasil indicaram teores de gordura, proteínas, cinzas e atividade de água, elevados podendo ser considerados produtos de alto valor nutricional e estão condizentes com estudos realizados por (SILVA, 2017).

Tabela 2 - Composição centesimal do isolado proteico de castanha-do-Brasil obtido pelos diversos métodos

Parâmetros (g.100 ⁻¹)	Amostras		
	Convencional	Ultrassom	Conv. + US
Umidade	41,53 ± 0,10	23,76 ± 0,10	35,16 ± 0,12
Cinzas	0,667 ± 0,11	0,0032 ± 0,01	0,0044 ± 0,02
Proteínas	16,09 ± 0,08	14,41 ± 0,11	15,34 ± 0,10
Lipídeos	23,50 ± 0,10	16,72 ± 0,08	20,04 ± 0,11
Carboidratos	18,24 ± 0,15	39,46 ± 0,14	30,92 ± 0,09

Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão das triplicatas. Carboidratos obtidos por diferença.

Fonte: o autor, (2023).

Foi observado que os teores de umidade pela composição centesimal foram mais elevados para a amostra de extração proteica pelo método convencional (41,53%) e menor para a amostra tratada com US (23,76%), indicativo de que há uma baixa quantidade de água total no alimento. Um desafio para sua reutilização é o seu alto teor de umidade, que acaba dificultando o armazenamento e o transporte, além de estar sujeito à rápida degradação microbiológica (IKRAM et al., 2017).

As cinzas representam a quantidade de minerais presentes em um alimento, e tal medida

é indicativo da qualidade nutricional do mesmo, podendo ser utilizada para identificá-los, já que cada alimento tem uma proporção de minerais diferentes uns dos outros (MOREIRA, 2021). Foi evidenciado menor valor de cinzas na amostra de tratamento com ultrassom (0,0032%). Este fato pode estar relacionado pelo fato de a US reduzir o tamanho das partículas, demonstrando uma perda considerável da massa da amostra. O tamanho da partícula diminuiu devido à alta força de cisalhamento associada à cavitação de ultrassom em líquidos. A diferença entre a quantidade de cinzas encontradas nas amostras de tratamento convencional (0,667%) e tratamento combinado (0,0044%) também está relacionada a esta última ter recebido banho ultrassônico. Outros estudos mostraram que o ultrassom levou à agregação de partículas, que está relacionada às interações proteína / proteína causadas por ambas as proteínas (HU et al., 2013).

A quantidade de proteínas teve destaque para a amostra obtida pelo método convencional (16,09%). Porém a amostra extraída com ambos os métodos (convencional e ultrassom) alcançou um valor aproximado (15,34%) de proteínas, ficando a amostra US com 14,41% de proteínas. Os dados relacionados neste estudo condizem com o valor nutricional de proteína de castanha-do-Brasil, que se encontra entre 14 a 17% (LOPES, 2021). Bernardi et al., (2021), estudou os efeitos do ajuste combinado da avaliação do pH e do tratamento por ultrassom em propriedades tecnofuncionais de um concentrado de proteína de ervilha comercial. Nenhum dos tratamentos de ultrassom / pH de alta intensidade alterou significativamente na concentração e digestibilidade da proteína sugerindo que esses tratamentos não diminuíram sua qualidade nutricional. Téllez-Morales (2019), mencionou que nenhuma alteração nos padrões eletroforéticos das proteínas aconteceu, o que indica que a sonicação não quebrou as ligações covalentes. Pequenas mudanças ocorreram na estrutura secundária por períodos curtos (5min - 10min). Ensejando que para mudanças mais significativas, precisaria de um tempo de banho ultrassônico maior em torno de 30 minutos

(MONROY et al., 2018).

Entretanto, no presente estudo, não foi realizada recuperação de proteínas, mas apenas a extração por métodos convencional e não convencional (US), com posterior liofilização do extrato proteico obtido, considerando um baixo rendimento de proteína quando comparado à recuperação de proteínas por ponto isoelétrico (LOPES, 2021).

As dosagens de lipídios obtidas nos valores de 23,50% na amostra de extração convencional, 16,72% na amostra US e 20,04% na amostra com método 3 (US + convencional) ficaram significativamente inferiores a valores encontrados na literatura de 63 a 69% de lipídios (LOPES, 2021). Desse modo, o isolado proteico tratado com US pode servir como alternativa de preparações de alimentos de origem vegetal que necessitem de baixos teores de gorduras.

O papel dos carboidratos na alimentação é prover energia, em especial para o cérebro que é glicose-dependente (CUPPARI, 2014), e o isolado proteico extraído por US obteve maior quantidade (39,46%). O fato de que alguns resultados se mostraram discrepantes com a literatura, pode ser devido às amostras não apresentarem homogeneidade.

5.2 Propriedades Funcionais

5.2.1 Solubilidade

A solubilidade proteica é definida como a quantidade de nitrogênio solúvel dissolvido em um líquido. Essa propriedade funcional é a primeira a ser testada para o desenvolvimento de um novo produto, ou ingrediente de alimentos ricos em proteína, principalmente de alimentos líquidos e dispersões coloidais, já que influencia diretamente em outras propriedades, como formação e estabilização de espumas (LOPES, 2021).

O isolado proteico que apresentou o mais alto índice de solubilidade de nitrogênio na amostra foi o com tratamento combinado 17,70% (Figura 15). Entretanto, a solubilidade da amostra convencional mostrou-se próxima ao do tratamento convencional (15,87%). Já a

solubilidade extraída pelo ultrassom (7,92%) demonstrou ser a menor entre as amostras analisadas (Figura 15). Essa solubilidade pode ter ocorrido devido ao tempo de agitação da proteína precipitada com a solução orgânica.

Para Glória (2006) embora a precipitação isoelétrica seja o método de recuperação de proteínas que causa menor desnaturação e conseqüentemente menores alterações nas propriedades funcionais, a exposição prolongada à ação do ácido pode causar perda da solubilidade, como já foi observado para proteínas de soja. Há estudos que encontraram solubilidade nula no ponto isoelétrico quando estudavam o concentrado proteico de algumas leguminosas.

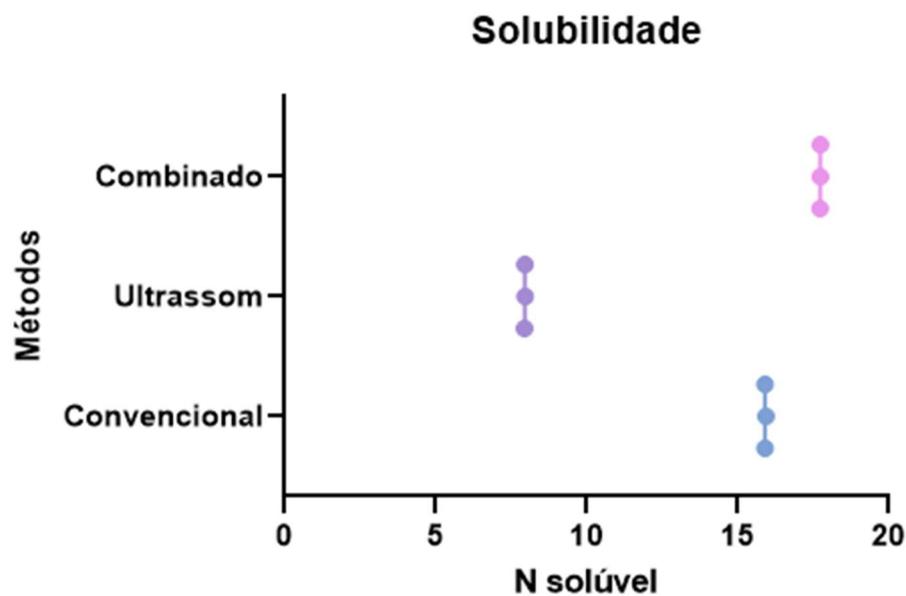


Gráfico 1 - Solubilidade dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil por diferentes tratamentos. Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão das triplicatas. Fonte: o autor (2023).

Rahaman et al. (2021), para amostras de concentrado de proteína de milho, também não observaram diferença significativa na solubilidade antes e depois da aplicação de ultrassom. Eles verificaram, porém, que a solubilidade de isolado de proteína do soro do leite sofreu aumento significativo diante da aplicação de ultrassom durante 15 minutos e 20 kHz. Ao

testarem os efeitos do ultrassom de alta intensidade em isolado e concentrado de proteína de soro do leite, verificaram um aumento na solubilidade das proteínas em água em relação às amostras de controle.

Em analogia com fontes vegetais, cuja parede celulósica pode ser um empecilho para extração de proteínas (KUMAR, 2021), o baixo rendimento proteico observado durante as extrações de proteínas de castanha-do-Brasil pode estar associado à presença da quitina (fibras insolúveis), que poderia dificultar a solubilização e migração das proteínas para o meio extracelular, reduzindo o rendimento das proteínas.

5.2.2 Capacidade de Absorção de água e óleo

O CAA é uma propriedade funcional importante das proteínas em alimentos viscosos (sopas, assados e produtos de massa); já que esses alimentos podem se ligar à água sem dissolução de proteínas, o que prolonga o espessamento e a viscosidade. Já a CAO é um parâmetro significativo de retenção de sabor em alimentos e também é importante em produtos de panificação, atuando como agentes extensores. Os valores obtidos pelos testes de capacidade de absorção de água e de óleo revelam o grau de hidrofobicidade das moléculas. Os valores encontrados para os isolados proteicos utilizados neste estudo (Tabela 3) exibem uma maior absorção de água do que de óleo (Tabela 3) para todas as amostras. Para os valores de absorção de água pode-se perceber que houve diferença significativa entre os isolados proteicos extraídos pelo método convencional e por US, indicando capacidades distintas de absorção de água entre estes. Os isolados proteicos de castanha-do-Brasil apresentaram absorção de óleo consideráveis (Tabela 3), demonstrou que houve diferença significativa em da amostra extraída com US em comparação aos demais. Isto indica que os isolados proteicos utilizados possuem também capacidades distintas de absorção de óleo. Pelos resultados apresentados, o concentrado proteico com melhores absorções de água e óleo foi o de US. Estes resultados corroboram com

os apresentados na literatura de outras fontes de proteínas vegetais, que relata valores de absorção de água (447,6%) e óleo (133%) para concentrado proteico de soja (OLIVEIRA, 2019).

Tabela 3 – Capacidade de absorção água e óleo do isolado proteicos de diversos tratamento.

Tratamentos	CAA (%)	CAO (%)
I	152 ± 0,10	65,49 ± 0,08
II	232 ± 0,16	87,64 ± 0,11
III	229 ± 0,14	69,52 ± 0,12

Legenda: I – Tratamento convencional; II – Tratamento com ultrassom; e III – Tratamento combinado.

Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão das triplicatas.

Fonte: próprio autor (2023).

A hidrofobicidade das proteínas ocupa o principal papel na absorção de óleo e favorece a utilização de alimento proteico na produção de carnes emulsionadas, linguiças, salsichas, patês, bolos e massas. Os resultados encontrados podem ser explicados por Lin et al., (2020), pois provavelmente o tratamento com o ultrassom ocasionou a desnaturação parcial e dissociação das proteínas, expondo grupos hidrofílicos que resultaram em uma maior interação com as moléculas de água. Com isso, é possível justificar o fato de que a CAA foi maior quando comparado com a CAO. Ainda, a capacidade de desnaturação das proteínas com a aplicação do US pode melhorar a afinidade da proteína com a água varanda expressivamente sua capacidade de absorção frente ao óleo. Já na amostra extraída pelo método convencional não foi observada esta diferença entres as capacidades de absorção (CAA x CAO).

Segundo Carmo (2019), componentes não proteicos podem afetar muito a absorção de água de um preparado proteico. A capacidade de absorção de água varia com a fonte proteica, composição e presença de carboidratos, lipídios, sais, pH e pode ser influenciada por processamentos sofridos pela proteína com o aquecimento, alcalinização, entre outros.

Provavelmente, a absorção de gordura ocorre em função da composição da proteína e

dos números de grupos lipofílicos disponíveis.

5.2.3 Capacidade de Formação e Estabilização da Espuma

Proteínas com capacidade de formação de espuma que sejam estáveis, ou seja, que formem um sistema bifásico de bolhas de ar que são impedidas de se juntarem por finas camadas de água (fase lamelar), são importantes para produzir vários alimentos.

Os dados de capacidade de formação de espuma (CFE) dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil são apresentados no Gráfico 2.

A CFE do isolado proteico pelo método 1 (10%) foi inferior ao método 3 (13,33%) e superior ao tratado pelo método 2 (6,66%), diferindo significativamente ($p < 0,05$). O baixo valor da formação de espuma do tratamento com US pode estar relacionado ao fato do pH estar próximo ao pI das proteínas, pois as atrações eletrostáticas entre as cadeias das proteínas são máximas no pI, ocorrendo maior agregação proteica. Isso justifica a baixa formação de espuma, uma vez que está intimamente relacionada à interação das proteínas solúveis com a água, formando um sistema proteína-proteína e proteína-água que garante uma distribuição homogênea dessas proteínas solúveis, impedindo o aumento da tensão superficial existente em cada bolha, e uma maior eficiência de formação de bolhas (BICALHO, 2022). Logo, acredita-se que no presente experimento ocorreu elevada tensão superficial, pela baixa presença de proteínas solúveis, reduzindo a formação de espuma. No entanto, a aplicação deste matéria-prima pode estar condicionada a produtos que requeiram pouca espumação.

O isolado proteico tratado com método 3 mostrou boa capacidade espumante, De acordo com O`Sullivan (2016), o método 2 pode causar uma redução parcial no tamanho da proteína, resultando na exposição de grupos hidrofóbicos e assim permitindo uma absorção mais rápida da proteína para a interface óleo-água, aumentando as propriedades emulsificantes. Além disso, o pH alcalino promove um aumento nas propriedades emulsionantes devido aos

desdobramentos dos poli peptídeos devido às cargas negativas nessa faixa de pH. Como consequência dessa alteração, a repulsão permite uma maior orientação na interface e exposição de resíduos peptídicos hidrofílicos e hidrofóbicos que promovem interações importantes nas propriedades da emulsão.

Capacidade de Formação de Espuma

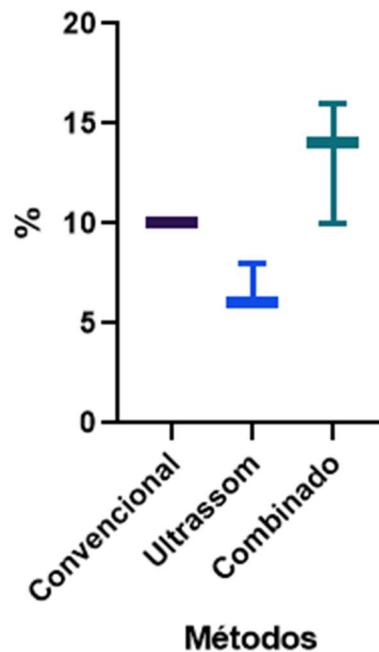


Gráfico 2 - Porcentagem de formação de espuma.
 Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão das triplicatas.
 Autor: o autor (2023).

O Gráfico 3 mostra os resultados percentuais obtidos para a estabilidade da espuma (EE) das amostras de isolado proteico da castanha-do-Brasil obtidas pelo método Convencional, tratadas com ultrassom, bem como método Combinado. A estabilidade foi verificada nos tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos (Gráfico 3).

A estabilidade da espuma (EE) é importante porque o sucesso de um agente espumante depende de sua habilidade de manter a espuma por mais tempo possível. Para que espuma proteica seja estável, necessita-se que em torno de cada bolha de gás se forme uma película proteica espessa, coesa, elástica, contínua e impermeável ao ar (GLÓRIA, 2006).

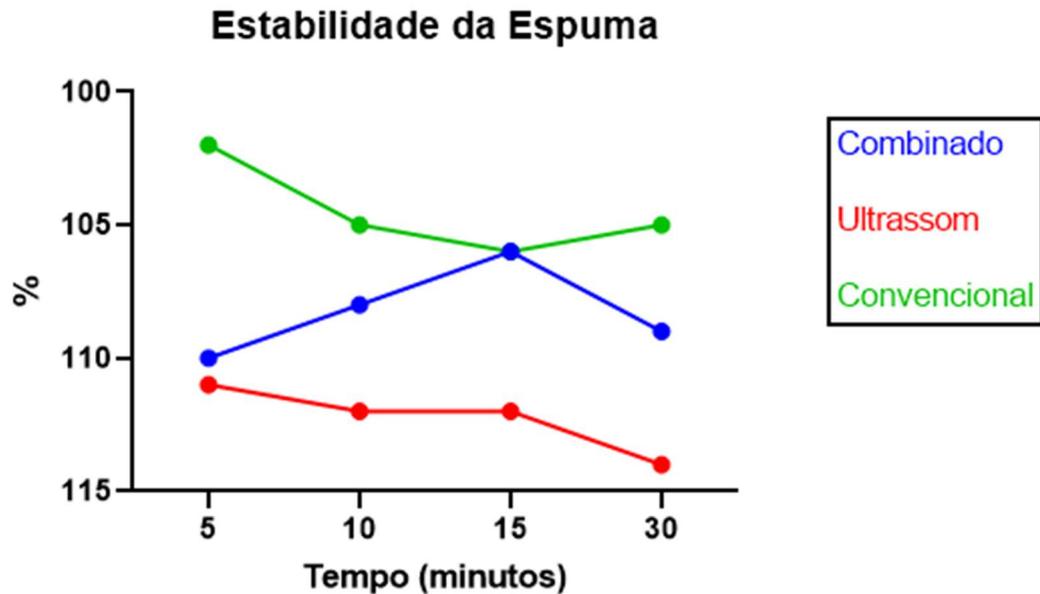


Gráfico 3 - Volume (mL) de espuma após repouso em temperatura ambiente (22° C).
 Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão das triplicatas.
 Fonte: o autor, (2023).

Ao se observar a variação da estabilidade da espuma de uma mesma amostra no decorrer do tempo, observou-se que, na maioria dos casos, não houve diferença significativa entre as estabilidades, principalmente comparando este índice após 10 e 15 minutos. Os menores valores de emulsificação foram encontrados no isolado proteico extraído por US, provavelmente porque pela redução do tamanho da proteína, esta permaneceu próxima ao ponto isoelétrico, onde algumas moléculas são precipitadas ou apresentam cargas reduzidas, afetando a EE (LATORRES et al., 2018).

Santos, 2012, ao realizar a análise de estabilidade de formação de espuma da torta desengordurada de castanha-do-Brasil, obteve resultados satisfatórios (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados de Estabilidade de espuma da torta desengordurada de castanha-do-Brasil

Tempo	Estabilidade média de espuma (%)
1 min	116,5 \pm 0,05
5 min	113,5 \pm 0,11
10 min	112,5 \pm 0,09
30 min	111 \pm 0,10

Fonte: Santos, (2012).

As características apresentadas, como resultados, indicam possibilidades de aplicação do isolado proteico de castanha-do-Brasil, pelo método de US (110,5%), em alimentos que requeiram uma condição de estabilidade de espuma por mais tempo, pois mostrou-se mais estáveis que os demais métodos (106,5% e 102,75%) Combinado e Convencional, respectivamente. E todos os métodos mostraram-se pouco com poucas alterações entre si referente a estabilidade de espuma.

5.3 Atividade antioxidante

Atualmente existe um grande interesse no estudo das substâncias com propriedades antioxidantes, devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da capacidade antioxidante dos isolados proteicos extraídos de diversos métodos realizados por dois métodos: DPPH e ABTS, que são amplamente utilizados devido à simplicidade, rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade.

Tabela 5 – Efeito antioxidantes nas amostras de isolado proteico de Castanha-do-Brasil

<i>Amostras</i>	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>
<i>Convencional</i>	779,00 ± 23,33	258,53 ± 12,86
<i>Ultrassom</i>	1395,67 ± 14,53	395,87 ± 6,43
<i>Combinado</i>	816,78 ± 36,72	263,87 ± 11,55

Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão das triplicatas.

Fonte: o autor, (2023).

Comparando-se os métodos ABTS e DPPH para a determinação da atividade antioxidante de diferentes extrações de isolado proteico da castanha-do-Brasil observou que dentre os tratamentos estudados, o que apresentou expressiva atividade antioxidante, pelo método ABTS, foi o tratamento com o Ultrassom (método 2), com média de 1395,97 μ mol ET. A mesma

amostra também apresentou maior atividade antioxidante total pelo método DPPH (395,87 $\mu\text{mol ET}$).

A técnica de ultrassom é utilizada para auxiliar na extração de ingredientes ativos de recursos naturais como os compostos bioativos e fitoquímicos que são substâncias derivadas do metabolismo secundário de vegetais e são benéficos para a saúde humana (MEREGALLI et al., 2020).

A maior eficiência observada pelo método ultrassônico pode ser explicada pelo processo de cavitação, que leva à ruptura da parede celular, redução do tamanho dos poros dos materiais sólidos, aumento da área de superfície de contato e liberação de compostos ricos em polifenóis por transferência de massa e devido a mudanças de pressão (MEREGALLI et al., 2020).

Analisando a amostra extraída com ultrassom mais o tratamento convencional (816,78 $\mu\text{mol ET}$ pelo método ABTS e 263,87 $\mu\text{mol ET}$ no método DPPH), reparou-se uma maior atividade antioxidante frente a amostra apenas tratada pelo método convencional (779,00 $\mu\text{mol ET}$ pelo método ABTS e 258,53 $\mu\text{mol ET}$ no método DPPH).

Boy et al. (2021) observaram que quando as duas metodologias foram utilizadas na obtenção de compostos fenólicos totais, verificou-se maior conteúdo destes constituintes na extração por ultrassom, além da maior atividade antioxidante nos extratos obtidos.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que é possível obtenção de isolado proteico de castanha-do-Brasil por técnicas tradicionais e não tradicionais (ultrassom de alta intensidade).

A caracterização das proteínas e das partículas mostrou o potencial que esses isolados proteicos vegetais possuem para se tornar alternativas ao uso de proteínas animais. O isolado proteico de castanha-do-Brasil é potencialmente capaz de ser inserido em vários processos alimentícios, inclusive aqueles que atendam aos consumidores de dietas restritivas.

Os produtos gerados neste estudo podem ser utilizados como ingredientes em formulações de alimentos e/ou suplementos em dietas específicas. Este estudo é de suma importância para a região amazônica, pois agrega valor a produção de uma semente regional. Além de colaborar com a diminuição da produção de resíduos, já que a torta desengordura é um subproduto da extração de óleo de castanha-do-Brasil

Dados os bons resultados em relação as propriedades físicas dos isolados proteicos de castanha-do-Brasil, como estabilidade da emulsão, solubilidade, hidrofobicidade e formação de espuma, esses concentrados vegetais também podem estimular a economia Amazônica, com a geração de um produto alternativo de qualidade e com características funcionais ao organismo.

Os efeitos antioxidantes dos isolados proteicos não demonstraram atividade antioxidante considerável. Logo, outros estudos futuros para se verificar outras atividades químicas, tais como toxicidade e citotoxicidade, podem gerar resultados mais satisfatórios em relação à proteína vegetal de castanha-do-Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, H. V.; PACHECO, F. L.; REIS, N. C. Análise físico-química e antioxidante de manjeriço (*ocimum basilicum* l.) Orgânico. **Revista Interdisciplinar Pensamento Científico**, v. 3, n. 2, 22 dez. 2017.

AMIRI, A.; SHARIFIAN, P.; SOLTANIZADEH, N. Application of ultrasound treatment for improving the physicochemical, functional and rheological properties of myofibrillar proteins, **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 111, 2018, Pages 139-147, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.167>.

BERNARDI, S.; LUPATINI-MENEGOTTO, A. L.; KALSCHNE, D. L. Ultrasound: a suitable technology to improve the extraction and techno-functional properties of vegetable food proteins. **Plant Foods Hum Nutr** 76, 1–11 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00884-w>.

BICALHO, A. S. M. **Composição centesimal da farinha de grilo preto (*Gryllus assimilis*) e extração e caracterização de proteínas para a alimentação humana**. 2022. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

BOY, F. R. *et al.* Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 5, p. 2475, 3 mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052475>.

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

CARMO, E. U. F. **Extração da fração proteica do farelo de arroz por tratamento ultrassônico e enzimático e caracterização das propriedades funcionais**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2019.

CHEMAT, F.; *et al.* Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**. Volume 34, (2017), Pages 540-560, ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.

CUPPARI, L. **Guia de nutrição: clínica no adulto**. 3a ed. Barueri, SP: Nestor Schor, 2014.

EMERICK, T. **Processo Eletroquímico Combinado com Ultrassom: um tratamento alternativo para efluentes agroindustriais**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Universidade do Sul de Santa Catarina. Palhoça (2019). <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/2498>.

ETXABIDE, A.; *et al.* Extraction and incorporation of bioactives into protein formulations for food and biomedical applications, **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 120, Part B, 2018, Pages 2094-2105, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.030>.

FELIX, U.; *et al.* Modification of plant proteins for improved functionality: A review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. Volume 20, Issue1, January 2021, Pages 198-224. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12688>.

FERREIRA, I.; *et al* **Congresso Nacional de Meio Ambiente**, 15., 2018, Poços de Caldas. Anais eletrônicos. Muzambinho: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul

de Minas Gerais, 2018. Disponível em: 392. Crescimento de castanheiras-do-brasil em condições de cultivo (embrapa.br).

FONTELES, T. V. *et al.* Ultrasound processing to enhance drying of cashew apple bagasse puree: Influence on antioxidant properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 237–249, jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.003>.

GARCÍA, R. L., RAGHAVAN, V. (2022) Green extraction techniques from fruit and vegetable waste to obtain bioactive compounds—A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 62:23, pages 6446-6466. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1411978>.

GLÓRIA, M. M. **Obtenção e caracterização de concentrado e Isolado protéico de torta de castanha-do-pará**. Universidade de São Paulo. Dissertação para Mestrado em Ciências (Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos). Piracicaba, SP, Novembro de 1996.

GONÇALVES, M. B. **Investigação da atividade antioxidante e de inibidores de tirosinase em extratos etanólicos da torta de castanha (*Bertholletia excelsa*)**. Orientador: Antônio Sérgio Costa Carvalho. 2019. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Faculdade de Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019. Disponível em: <https://bdm.ufpa.br:8443/jspui/handle/prefix/2610>. Acesso em: 31 Mar 23.

HOU F.; *et al.* Solution extraction of rice residue protein isolates: Influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation. **Food Chem.** 2017 Mar 1;218:207-215. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.064. Epub 2016 Sep 10. PMID: 27719899.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos/coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008 p. 1020.

IKRAM, S.; *et al.* Composition and Nutrient Value Proposition of Brewer's Spent Grain. **Journal of Food Science**, China, v. 82, n. 10, p. 2232–2242, 2017.

ISMAIL, B. B. *et al.* Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 52, p. 257–267, abr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.023>.

JIANG, L., WANG, J., LI, Y. Efeitos do ultrassom on the estrutura e propriedades físicas de isolados protéicos de feijão preto. **Food Res Int** 62: 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.022> 63.

KUMAR, M.; *et al.* (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. **Food Hydrocolloids**, 115, 106595. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106595>.

LATORRES, J. M.; *et al.* Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science and Technology**, Brasil, v. 55, n. 2, p. 721–729, 2018.

LI, H.; *et al.* Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from perilla seeds and determination of its physicochemical properties, fatty acid composition and antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 37, n. suppl 1, p. 71–77, 20 jul. 2017. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.29116>.

LIMA, A. L. S., LOBATO, B., LEITE, D. Q. Elaboração de hambúrguer de castanha-do-brasil (*Bertholletia Excelsa*). **Braz. J. of Develop**, Curitiba, v. 6, n.4,p.19189-19199apr.2020. ISSN 2525-8761, DOI:10.34117/bjdv6n4-184.

LIN, D.; *et al.* (2020). Efeitos de ultra-som nas propriedades funcionais, estrutura e propriedades de glicação de proteínas: uma revisão. **Food Chemistry**, 1 - 11 <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1778632>.

LOPES, B. O. **Castanhas da Amazônia: composição nutricional e benefícios para a saúde**. 2021. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

MEHMOOD, A. *et al.* Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on bioactive compounds and biological activities of blue butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 51, p. 12–19, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.013>.

MEREGALLI, M. M. *et al.* Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 5800–5809, jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.04.017>.

MOLYNEUX, P. (2004). The use of the stable free radical diphencylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant activity. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, 26(2), 211-219.

MORALES, R.; *et al.* Modificação das propriedades de formação de espuma de isolado de proteína de soja por alta intensidade de ultra-som: efeito de tamanho de partícula. **Ultrason Sonochem** 26: 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.01>.

MOREIRA, D. Determinação do teor de cinzas em alimentos e sua relação com a saúde. **Revista Ibero- Americana de Humanidades, Ciências e Educação- REASE**. São Paulo, v.7, n.10. Outubro de 2021.

MONROY, Y., RIVERO, S., & GARCÍA, M. A. (2018). Microstructural and techno-functional properties of cassava starch modified by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, 42, 795–804. doi:10.1016/j.ultsonch.2017.12.048 10.1016/j.ultsonch.2017.12.048.

OLIVEIRA, A. P. H. Efeitos de processamento por ultrassom sobre técnico- funcionalidades de concentrados proteicos de ervilha. 2020. 88 f. **Dissertação para Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2020.

OLIVEIRA, T. S. **Microencapsulação e estabilidade oxidativa do óleo de Castanha-do-Brasil (*bertholletia excelsa*) com concentrados proteicos vegetais**. Universidade Federal do Amazonas, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Manaus, 2019.

O’SULLIVAN, J, PARK, M., BEEVERS, J. The effect of ultrasound upon the physicochemical and emulsifying properties of wheat and soy protein isolates, **J. Cereal Sci.** 69 (2016) 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.02.013>.

RE, R.; *et al.* (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation delorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

SANTOS. O. V. **Estudos das potencialidades da castanha-do-Brasil: produtos e subprodutos**. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (2012).

SHA, L.; *et al.* Interfacial dilatational and emulsifying properties of ultrasound-treated pea protein, **Food Chemistry**, Volume 350, 2021, 129271, ISSN0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021>.

SCHONS, J. I.; *et al.* Extração assistida por ultrassom e caracterização do óleo da castanha-do-brasil (*bertholletia excelsa* h.b.k.) **Interciencia**, vol. 42, núm. 9, septiembre, 2017, pp. 586-590 Asociación Interciencia Caracas, Venezuela. ISSN: 0378-1844.

SHOKRI S.; *et al.* Effects of ultrasound on the techno-functional properties of milk proteins: A systematic review. **Ultrasonics Sonochemistry**. 2022 Feb;83:105938. doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.105938. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35124340; PMCID: PMC8819381.

TÉLLEZ-MORALES, J. A.; HERNÁNDEZ-SANTO, B.; RODRÍGUEZ-MIRANDA, J. (2019). Effect of ultrasound on the techno-functional properties of food components/ingredients: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, 104787. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104787

YE, Z.; *et al.* Design for extraction optimization, characterization and in vitro antioxidant activity of *Cicer arietinum* L. hull polysaccharides, **Carbohydrate Polymers**, Volume 147, 2016, Pages 354-364, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.092>.

YIHE, L.; *et al.* Modification of rapeseed protein by ultrasound-assisted pH shift treatment: Ultrasonic mode and frequency screening, changes in protein solubility and structural characteristics. **Ultrasonics Sonochemistry**, Volume 69, (2020) 105240. ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105240>.

XIONG, T.; *et al.* Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate, **Food Research International**, Volume 109 (2018) Pages 260-267, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.044>.

ZHIFENG, Z.; YOULING, L. X. Thermosonication-induced structural changes and solution properties of mung bean protein. **Ultrasonics Sonochemistry**, Volume 62, (2020), 104908, ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104908>.