

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**MACADÂMIA NACIONAL: TOCOFERÓIS E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

MARTA GOMES DA SILVA
Bióloga

PROF^A. DR^A. HELENA TEXEIRA GODOY
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciência de
Alimentos

CAMPINAS - SP
2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Silva, Marta Gomes da
Si38m Macadâmia nacional: tocoferóis e caracterização
físico-química / Marta Gomes da Silva. – Campinas,
SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Noç macadâmia. 2.Vitamina E. 3.Ácidos graxos.
4.Valor nutritivo. I.Godoy, Helena Teixeira.
II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

ERRATA

Dissertação de Mestrado:

MACADÂMIA NACIONAL: TOCOFERÓIS E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Página 29, linha 5: alterar a definição a inclinação da curva para a interseção com o eixo y e, b interseção com o eixo y para b inclinação da curva.

Página 30, legenda: alterar b interseção da curva quando $x=0$ b para inclinação da curva.

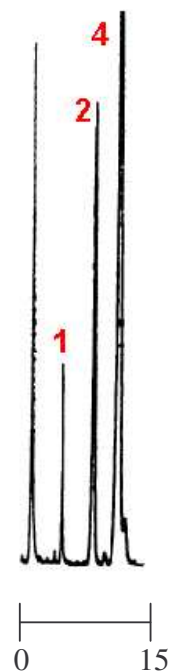
Página 46 e 47, legenda: alterar a inclinação da curva para a interseção com o eixo y , quando $x=0$ e, b = interseção com o eixo y , quando $x=0$ para b inclinação da curva.

Página 48 e 49, legenda: alterar b = interseção com o eixo y , quando $x=0$ para b inclinação da curva.

Página 57

Alterar cromatograma 1
Extrato de pecã

para cromatograma 1
extrato de pecã



BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Helena Texeira Godoy
(Orientadora)

Prof. Dr. Paulo R. N. Carvalho

Prof. Dr. Marcelo Prado

Prof. Dra. Neura Bragagnolo

Dedico,
este trabalho à minha família pelo
incentivo, carinho e amor,
em especial a minha mãe pela paciência.

AGRADECIMENTOS

À professora Helena Texeira Godoy pela orientação, apoio e amizade.

À Queen Nut Nozes Macadamia por fornecer as nozes macadâmia que foram utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL pelo incentivo, colaboração e apoio no desenvolvimento deste trabalho, em especial aos meus companheiros de trabalho na área de Vitaminas.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

A sabedoria não nos é dada,
é preciso descobri-la por nós mesmos
depois de uma viagem que ninguém nos
pode poupar ou fazer por nós.
(Marcel Proust)

ÍNDICE

RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO	02
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
3.1 MACADÂMIA	03
3.2 VITAMINA E	06
3.2.1 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA VITAMINA E	13
3.3 MINERAIS	17
3.4 ÁCIDOS GRAXOS	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 MATERIAIS	20
• Matéria-prima	20
• Reagentes e padrões analíticos	21
4.2 MÉTODOS	23
4.2.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	23
4.2.2 MINERAIS	23
4.2.3 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS	24
4.2.4 TOCOFERÓIS	25
4.2.4.1 AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIA E MÓVEL	25
4.2.4.2 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	26
4.2.4.3 DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	28

4.2.4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	28
• Linearidade	29
• Limites de detecção e quantificação	29
• Exatidão	31
• Repetibilidade	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NOZES QUANTO A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	33
5.2 MINERAIS	35
5.3 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS	37
5.4 VITAMINA E	41
5.4.1 AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIA E MÓVEL	41
5.4.2 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	44
5.4.3 AVALIAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	45
5.4.4 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA	45
• Linearidade	45
• Limites de detecção e quantificação	46
• Exatidão	49
• Repetibilidade	53
5.4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NOZES QUANTO AOS TOCOFERÓIS	54
6 CONCLUSÕES	57
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	59
8 ANEXOS.....	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química do 6-cromanol	07
FIGURA 2: Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis	07
FIGURA 3: Cromatograma do padrão de ácidos graxos (A) e cromatograma de ácidos graxos em extrato de macadâmia (B)	40
FIGURA 4: Cromatograma de isômeros tocol com adição de padrão interno	43
FIGURA 5: Cromatograma do extrato de macadâmia (A), cromatograma do extrato de macadâmia adicionado de padrão interno (B) e cromatograma do extrato de macadâmia adicionado de isômeros de tocoferóis (C)	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Posição do grupo metil em tocóis homólogos	08
TABELA 02: Nomenclatura e propriedade física dos tocoferóis	09
TABELA 03: Atividade biológica dos esteroisômeros de RRR- α -tocoferol acetato	11
TABELA 04: Atividade biológica dos tocoferóis e tocotrienóis	12
TABELA 05: Condições de operação do espectrofotômetro de emissão	24
TABELA 06: Fases estacionária e móvel avaliadas	26
TABELA 07: Avaliação da extração com uso de acetona e desintegração por um minuto	28
TABELA 08: Avaliação do tempo de extração	28
TABELA 09: Composição centesimal* (g/100g) em macadâmia e nozes utilizadas no estudo ...	34
TABELA 10: Comprimento de onda, limites de detecção e parâmetros da curva analítica	35
para os elementos estudados	
TABELA 11: Teores de minerais* (mg/100g) presentes em nozes	36
TABELA 12: Composição de ácidos graxos* (% área) encontrados em nozes	38
TABELA 13: Composição de ácidos graxos ¹ (g/100g ²) encontrados em nozes	39
TABELA 14: Separação dos isômeros de tocoferóis em diferentes condições cromatográficas ..	42
TABELA 15: Avaliação da extração dos lipídeos em macadâmia	44
TABELA 16: Avaliação dos procedimentos de extração	45
TABELA 17: Regressão linear das curvas de padronização interna dos α -, β -, γ - e δ -tocoferol ..	46
TABELA 18: Valores t calculado na avaliação da linearidade da curva de regressão dos tocoferóis	46
TABELA 19: Regressão linear das curvas de calibração para os isômeros α -, β - γ -	

e δ -tocoferol	47
TABELA 20: Concentrações, área do pico cromatográfico, média da área e estimativa de desvio padrão utilizado nos cálculos de limite de detecção e quantificação dos isômeros tocol	48
TABELA 21: Regressão linear da curva padrão da concentração dos isômeros tocol verso área	48
TABELA 22: Regressão linear da curva de concentração dos isômeros tocol verso estimativa de desvio padrão (<i>s</i>)	49
TABELA 23: Limite de detecção e quantificação para tocoferóis	49
TABELA 24: Recuperação analítica dos isômeros tocol adicionado ao branco	50
TABELA 25: Recuperação analítica dos isômeros tocol adicionado a amostra de .macadâmia...	51
TABELA 26: Resultados obtidos na análise em paralelo entre o método desenvolvido e o recomendado pela COST 91	52
TABELA 27: Valores obtidos no teste de repetibilidade	53
TABELA 28: Teores de tocoferóis* encontrados em nozes.....	55

ANEXOS

ANEXO A: Gráfico dos teores de minerais em nozes.....	70
ANEXO B: Cromatogramas de ácidos graxos nos extratos de: pecã (1), pistache (2), avelã (3) noz (4)	71
ANEXO C: Distribuição da porcentagem dos ácidos graxos presentes nas nozes macadâmia, pecã, pistache, avelã e noz	72
ANEXO D: Curva de calibração interna para Alfa-tocoferol	73
ANEXO E: Curva de calibração interna para Beta-tocoferol	73
ANEXO F: Curva de calibração interna para Gama-tocoferol	74
ANEXO G: Curva de calibração interna para Delta-tocoferol	74
ANEXO H: Cromatogramas dos tocoferóis em extratos de pecã (1), pistache (2), avelã (3) e noz (4)	75

RESUMO

A macadâmia foi introduzida no Brasil em 1932 e o estado de São Paulo tornou-se grande produtor nacional, sendo que o consumo interno de nozes torradas e salgadas tem aumentado assim como a exportação do produto apenas descascado. Devido a falta de dados quanto a composição nutricional da macadâmia nacional, este trabalho teve como objetivo avaliar algumas características físico-químicas da noz, assim como a composição de ácidos graxos, minerais e tocoferóis. Em relação à composição físico-química, as macadâmias produzidas no estado de São Paulo apresentaram teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos na faixa de 1,2 a 5,5%; 1,2 a 2,4%; 7,2 a 10,2%; 70 a 78%; e 8,4 a 16,7%, respectivamente, fornecendo em média 746 calorias por 100g. Ainda em termos centesimais a macadâmia apresentou valores muito próximos as outras nozes analisadas neste trabalho, como pecã, pistache, avelã e noz. As amostras de macadâmia apresentaram para os minerais cobre, manganês, zinco, ferro, magnésio, fósforo e potássio, respectivamente, os valores médios em mg/100g de 0,4; 2,8; 1,2; 2,2; 9,1; 183 e 327. Quanto a composição em ácidos graxos, a macadâmia mostrou valores relativos (%) de ácidos graxos na faixa de 0,8–0,3 para C14:0; 1,9-6,7 para C16:0; 9,1-13,9 para C16:1; 1,8-3,3 para C18:0; 40,7-48,5 para C18:1; 0,9-1,4 para C18:2; 0,9-1,3 para C18:3 e 1,1-2,2 para C20:0. Os tocoferóis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A separação dos isômeros foi feita em coluna de sílica, em sistema isocrático de eluição, utilizando como fase móvel n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,08:0,2), com vazão de 1,5mL/min. Os tocoferóis foram detectados pela sua fluorescência natural e quantificados por padronização interna, utilizando o o-hidroxibifenil como padrão interno. Os limites de detecção e recuperação foram, respectivamente, 0,03µg/mL e 95% para α -tocol; 0,07µg/mL e 98% para β -tocol; 0,10µg/mL e 100% para γ -tocol; e 0,04µg/mL e 102% para δ -tocoferol. Entretanto, nas amostras de macadâmia avaliadas não foram detectados tocoferóis, fato que talvez explique a rápida oxidação que ocorre nas nozes.

SUMMARY

The macadamia nut was introduced in Brazil in 1932 and the state of São Paulo became a great national producer, being that the internal consumption of roast and salt nuts has increased as well as the exportation of the product only peeled. Due to the lack of data about the nutritional composition of the national macadâmia, this work had as objectives to evaluate some physico-chemistry characteristics of the nut, as well as the composition of fatty acids, mineral and tocopherols. In relation to the physico-chemistry characteristics, the macadamia produced in São Paulo state had presented contents of humidity, ashes, proteins, lipids and carbohydrates in an interval of: 1.2 to 5.5%; 1.2 to 2.4%; 7.2 to 10.2%; 70 to 78%; and 8.4 to 16.7%, respectively, supplying in average 746 calories by 100g. These values had been very similar to the determined ones for the other nuts analyzed in this work, as pecã, pistachio nut, hazelnut and nut. The macadamia samples had presented for the mineral cupre, manganese, zinc, iron, magnesium, phosphor and potassium, respectively, the average values, in mg/100g, 0.4; 2.8; 1.2; 2.2; 9.1; 183 and 327, respectively. The fatty acids composition in the macadamia showed relative values (%) in an interval of: 0.8 to 0.3 for C14:0; 1.9 to 6.7 for C16:0; 9.1 to 13.9 for C16:1; 1.8 to 3.3 for C18:0; 40.7 to 48.5 for C18:1; 0.9 to 1.4 for C18:2; 0.9 to 1.3 for C18:3; and 1.1 to 2.2 for C20:0. The tocopherols had been determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The separation of isomers was made in silica column, with isocratic system of elution, using as mobile phase n-hexane:ethyl acetate:isopropanol (99.0:0.08:0.2), with flow rate of 1.5mL/min. The tocopherols were detected by its natural fluorescence and quantified by internal standardization, using the o-hidroxybifenil as internal standard. The limites of detection and recovery were, respectively, 0.03 µg/mL and 95% for α -tocol; 0.07 µg/mL and 98% for β -tocol; 10 µg/mL and 100% for γ -tocol; and 0.04 µg/mL and 102% for δ -tocoferol. However in the evaluated samples of macadamia they had not been detected tocopherols, fact that perhaps explains the fast oxidation that occurs in the nuts.

1 INTRODUÇÃO

Informações a respeito da composição de alimentos, especialmente os teores de vitaminas, e minerais tem se tornado cada vez mais importante para avaliar a sua qualidade. No caso da vitamina E, essas informações são de grande valia, uma vez que desempenha funções importantes no organismo humano e animal. Por outro lado, o conhecimento do conteúdo de alguns constituintes, como os minerais, também tem se tornado uma importante preocupação dos profissionais da área de saúde e ciência de alimentos, estendendo-se até o consumidor, que cada vez mais se interessa em consumir alimentos que promovam a melhoria da qualidade de vida.

Muitos alimentos estão sendo introduzidos na dieta, no sentido de melhorar a saúde, entre eles a macadâmia. Esta planta nativa da Austrália, foi introduzida no Brasil em 1932 e o estado de São Paulo tornou-se o grande produtor nacional incentivado, principalmente, pelo clima favorável ao plantio e pelas pesquisas desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas de novas variedades.

As nozes torradas e salgadas apresentam um sabor agradável e o seu consumo interno tem aumentado, assim como a exportação do produto apenas descascado. Da mesma forma que a maioria das nozes, a macadâmia possui grande quantidade de lipídeos, sendo uma excelente fonte de calorias.

A vitamina E (tocoferóis) possui um interesse muito grande na área de alimentos, fármacos e cosméticos, devido as suas propriedades. A identificação de novas fontes desses nutrientes é, além de desejável, de importância fundamental no sentido de termos novas fontes alternativas e que possam incorporar características desejáveis quando utilizadas no preparo de novos produtos, ou mesmo quando consumidas *in natura*.

Mais recentemente, os minerais vem recebendo a atenção dos profissionais de saúde, sendo as nozes apontadas como excelente fonte desses elementos. A macadâmia, em especial, é conhecida pelos seus altos teores de potássio.

Como as tabelas de composição de alimentos, na realidade, apresentam dados a respeito de alimentos não nacionais, torna-se imprescindível avaliar os níveis de tocoferóis, minerais e as características físico-químicas da macadâmia produzida no Brasil, em especial no estado de São Paulo.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) determinar algumas características físico-químicas da macadâmia produzida no estado de São Paulo;
- b) determinar a composição de minerais e ácidos graxos em macadâmia;
- c) determinar quantitativamente os teores de tocoferóis em macadâmia produzida no estado de São Paulo e comparar os dados com outras nozes;
- d) contribuir com a tabela nacional de composição química dos alimentos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MACADÂMIA

A macadâmia pertence à classe *Angiospermae*, subclasse *Dicotyledoneae*, ordem *Proteales*, família *Proteaceae*, com três espécies significativas, duas comestíveis, *Macadamia integrifolia* e *Macadamia tetraphyla*, e uma não comestível, devido ao sabor amargo, *Macadamia ternifolia* (Dierberger & Neto, 1985), sendo a *M. integrifolia* plantada em grande escala devido ao alto conteúdo de óleo e melhor sabor após a torragem (Mason & Mc Conachie, 1994).

A macadâmia é nativa da costa oeste da Austrália, onde a *M. integrifolia* predomina no território de Queensland e a *M. tetraphyla* no território de New South Wales. Foi descoberta em 1843 por Ludwing Leichardt, e em 1857, Walter Hill, diretor do Jardim Botânico de Brisbane, e Ferdinand von Mueller, botânico do governo de Victoria, coletaram espécies que foram nomeadas pelo Dr. John Macadam, secretário do Instituto Filosófico de Victoria, de macadâmia (Cavaletto, 1983).

No Havai, a macadâmia foi introduzida em 1881 por W. H. Purvis, e em 1892 E. W. Jordan e R. A. Jordan começaram a produção comercial. Com o advento da Segunda Guerra Mundial, em 1945, a macadâmia foi levada para a Califórnia, Estados Unidos. No Brasil as primeiras árvores de macadâmia foram plantadas na fazenda Citra, em Limeira, em 1932 (Dierberger & Neto, 1985), tornando-se o Instituto Agrônomo de Campinas responsável pelo grande acervo de geoplasma da noz macadâmia plantada na região do estado de São Paulo.

A *Macadamia integrifolia* também é conhecida como macadamia nut, smooth-shell-macadamia-nut, Queensland nut, bush nut, met cak e bauple nut (Dierberger & Neto, 1985). As árvores são grandes podendo alcançar até 18 metros de altura e 15 metros de copa. As folhas, quando adultas, apresentam 30 cm de comprimento e 8 cm de largura, podendo ser encontradas em verticilos de três ou quatro. As flores são brancas a creme e estão em número de 100 a 300

por rácimo. A colheita ocorre de março a junho no Brasil e na Austrália, de julho a novembro no Havaí e de novembro a março na Califórnia.

A *Macadamia tetraphylla* também pode ser encontrada com o nome de macadamia nut, rough-shell-macadamia, rough-shell-Queensland-nut, Australian-nut e bush-nut (Dierberger & Neto, 1985). As árvores são grandes podendo alcançar uma altura de 15 metros, com copa bem ampla. As folhas maduras têm as margens dentadas, os ramos apresentam flores rosa-claro em número de 100 a 300. A colheita ocorre de março a junho na Austrália, de maio a setembro no Havaí, de setembro a janeiro na Califórnia, e de fevereiro a junho no Brasil.

A *Macadamia ternifolia* é conhecida como Gympie nut, small-fruit-of-Queensland-nut ou maroochy-chic-nut. As árvores são pequenas, raramente ultrapassam 4,5 metros, e apresentam tendência a formarem múltiplos troncos. As folhas são pequenas e encontradas em verticilos de três, as flores são rosadas e raramente excedem a 100 em ramos pequenos, e os frutos são menores e amargos. A colheita ocorre em abril na Austrália e novembro na Califórnia.

O fruto da macadâmia é um folículo quase esférico de 2,5 a 5cm de diâmetro, com ápice duro e curto, o pericarpo é carnoso e extremamente verde. Dentro do pericarpo há só uma noz, raramente são encontradas duas, a noz é esférica e lisa na *M. integrifolia*, e ligeiramente elipsoidal e rugosa na *M. tetraphylla*.

A macadâmia começa a produzir após o terceiro/quinto ano e atinge a maturidade, em geral, após o décimo ano e continua a produzir por muitos anos, com produção média anual de 45 a 50 Kg de nozes sem pericarpo por árvore.

É uma planta que requer solos argilosos férteis com boa drenagem e fácil penetração do sistema radicular, com pH entre 4,5 e 8,0. Desenvolve-se bem a temperaturas entre 10°C – 30°C, podendo tolerar temperaturas acima de 43°C e abaixo de 2°C por pouco tempo e requer umidade entre 40% a 80%, ou mínimo de 250mm de chuva bem distribuída (Jaymes, 1969; Duke, 1989).

A colheita é feita, tradicionalmente, com a coleta manual das nozes que caem naturalmente no solo, necessitando estar debaixo das árvores limpo e livre de ervas e folhas secas para facilitar a coleta. A colheita deve ocorrer com bastante frequência, principalmente durante épocas chuvosas ou muito úmida, para evitar o amolecimento ou apodrecimento da noz, ou mesmo ser atacada por roedores.

A colheita mecânica é feita com uso de equipamentos que combinam aspiração e coletores de nozes caídas no solo (Cavaletto, 1983). São utilizadas também redes dispostas debaixo das árvores para reter as nozes caídas. As nozes que caem no solo, geralmente estão envoltas em fibras, casca verde ou pericarpo. A umidade na casca é relativamente alta, requerendo o descasque em 24 horas após a colheita a fim de diminuir o aquecimento proveniente da respiração dos tecidos, e evitar a contaminação por microorganismos e insetos, e possível rachadura da casca (Mason & Mc Conhie, 1994).

A noz colhida pode conter cerca de 30% de umidade e a semente ocupa o espaço interior da casca. Para facilitar a quebra da casca a semente é seca até 1,5% de umidade. A secagem pode durar três semanas, dependendo da umidade inicial, condições de secagem e umidade relativa do ar. A secagem da noz em casca pelo aumento da temperatura pode causar, em nozes com alta umidade, a formação de cor castanho na parte central da semente devido ao acúmulo de açúcares redutores nesta região (Mason & Mc Conhie, 1994 e Palipane & Driscoll, 1994).

Vários tipos de equipamentos têm sido desenvolvidos visando melhorar a produção e minimizar a quebra da semente. O quebrador normalmente usado é denominado Shaw e apresenta um prato fixo com lâminas cortantes e uma superfície circular adjacente ao prato, com lâminas cortantes dispostas radialmente. A fenda entre o prato fixo e a superfície circular diminui da entrada para o ponto de saída permitindo que a noz de diâmetro maior seja quebrada antes da menor, não sendo necessário pré-seleção das nozes (Cavaletto, 1983; Woodroof, 1967). As sementes podem ser separadas da casca por telas, separadores à ar, classificação eletrônica por cor e manual. O processo de separação por flutuação apresenta a desvantagem de ser necessário ressecar a noz que ficar imersa na solução de flutuação.

A macadâmia comercializada à varejo é torrada em óleo ou a seco em fornos com ou sem adição de sal. São embaladas em vários materiais incluindo saches laminados, potes de vidro, latas e vários filmes plásticos. Quando destinadas à exportação ou mercado atacado são embaladas cru a vácuo ou em fluxo de nitrogênio para reduzir a concentração de oxigênio e prevenir a rancificação oxidativa, em embalagens de 10 e 25Kg.

Os maiores produtores e exportadores mundial de macadâmia são Austrália, África do Sul, Costa Rica, Guatemala e Brasil, segundo o United State Department of Agriculture (USDA, 1999). De acordo com a Associação dos Produtores de Macadâmia do Estado de São Paulo (APROMESP), a macadâmia vem sendo cultivada em vários estados do Brasil, destacando-se o estado de São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Outros estados como o Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Paraná e Santa Catarina possuem uma pequena área cultivada. Os pomares brasileiros são jovens, ainda em início de produção, no biênio 1998/99 tiveram uma produção de 1.760 toneladas de nozes sendo 270 toneladas exportadas segundo USDA, 1999.

3.2 VITAMINA E

O embriologista Herbert Evans e sua assistente Katharine Bishop estudavam reprodução em ratos, em 1922, quando notaram que dietas com gordura rançosa favoreciam a reabsorção fetal. Entretanto, quando adicionavam à dieta alface e óleo de germe de trigo isto não ocorria. Resolveram chamar a substância que prevenia a reabsorção fetal de *tocoferol*, que em grego significa: *tocos*, nascimento e *phera*, que confere, sendo o *ol* resultante da função álcool (Bourgeois, 1992).

Em 1936, Evans e Emersons isolaram do óleo de germe de trigo os homólogos α -, β - e γ -tocoferol e, em 1937-38, Fernholz propôs a fórmula estrutural para o α -tocoferol. Karrer, na Suíça em 1938, promoveu a primeira síntese do α -tocoferol (Machlin, 1991; Bourgeois, 1992).

Green identificou, em 1956, oito substâncias com atividade de vitamina E, os tocoferóis e tocotrienóis (Kutsky, 1973). A vitamina E pertence ao grupo dos vitâmeros lipossolúveis, é constituída por oito componentes básicos existentes na natureza, quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, os quais são identificados pelos prefixos α , β , γ e δ .

Os tocoferóis são constituídos por uma ponta cromanol com dois anéis, um fenólico e um heterocíclico, além de uma cadeia lateral isoprenóide. Os oito compostos tocóis encontrados na natureza são derivados do 6-cromanol (Figura 1).

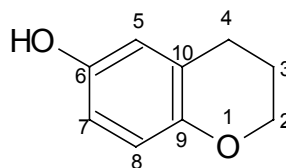


Figura 1: Estrutura química do 6-cromanol

Os tocoferóis possuem a cadeia isoprenóide de 16 carbonos saturada ligada ao C-2, e os tocotrienóis apresentam três insaturações nas posições 3', 7' e 11' (Figura 2). Os tocoferóis diferem em número e posição dos grupos metil no anel cromanol, como apresentado na Tabela 01.

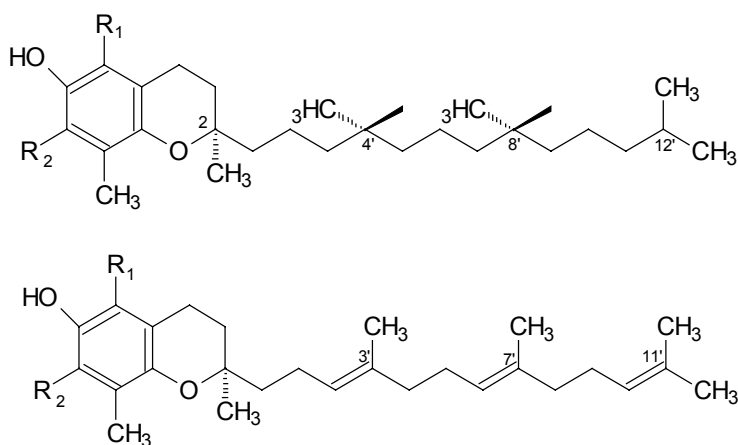


Figura 2: Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis

Tabela 01: Posição do grupo metil em tocóis homólogos.

Homólogos	R ₁	R ₂
α-	Me	Me
β-	Me	H
γ-	H	Me
δ-	H	H

Rupérez et al. (2001).

A molécula de tocoferol apresenta três carbonos assimétricos na cadeia isoprenóide (2', 4' e 8') sendo possível oito formas estereoisoméricas, no entanto na natureza é encontrado apenas a configuração molecular d-tocoferol ou (+)- tocoferol (RRR, 2D, 4'D, 8'D). O α-tocoferol sintético é composto pela mistura dos oito possíveis estereoisômeros em quantidades aproximadamente equimolar. Esta mistura é chamada de all-rac-tocoferol ou [dl]-α-tocoferol caracterizada como 2DL, 4'DL, 8'DL-α-tocoferol (Sebrell & Harris, 1972; Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Uma mistura equimolar de tocoferol natural (RRR) com o 2-epímero (2DL, 4'D, 8'D-tocoferol) é denominada de 2-ambo-tocoferol. Na Tabela 02 estão resumidas algumas propriedades físico-químicas dos homólogos tocoferóis e tocotrienóis.

A distinção entre os diferentes estereoisômeros do tocoferol é de grande importância visto que apresentam diferentes biopotência *in vivo*. Os tocoferóis e tocotrienóis possuem papéis biológicos similares, sendo que o α-tocoferol é a forma biológica ativa mais importante (Tabela 03) (Abidi, 2000; Wang & Quinn, 2000; Pyka & Sliwiok, 2001).

Tabela 02: Nomenclatura e propriedade física dos tocoferóis.

Nome comum	Nome químico ^a	Fórmula empírica	Peso molecular	Absorção máxima	E 1% 1cm Etanol
α -tocoferol	6-cromanol, 2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430 ^b	292	70-73,7 ^b
β -tocoferol	6-cromanol-2,5,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	416 ^b	297 ^b	86-87 ^b
γ -tocoferol	6-cromanol,2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	416 ^b	298 ^b	90-93 ^b
δ -tocoferol	6-cromanol-2,8-dimetil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402 ^b	298 ^b	91,2 ^b
α -tocotrienol	6-cromanol, 2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil)-	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430 ^b	292,5-290 ^c	77,2-91 ^c
β -tocotrienol	6-cromanol-2,5,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil)-	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	416 ^b	294 ^c	85,5-87,3 ^c
γ -tocotrienol	6-cromanol,2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetil-3,7m,11-tridecatrienil)-	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	416 ^b	296 ^c	90,5 ^c
δ -tocotrienol	6-cromanol-2,8-dimetil-2-(4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil)-	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402 ^b	297 ^c	88,1 ^c

^a Gallo-Torres (1980),^b Desai & Machlin (1985),^c Sebrell & Harris (1972).

A atividade vitamínica dos vários homólogos pode ser determinada através de testes biológicos, onde são observados a reabsorção fetal, hemólise heritrocitária, distrofia muscular, encefalomalacia, entre outros. Os valores obtidos variam de acordo com o teste utilizado e, conseqüentemente, de autor para autor, estando a utilização dos tocoferóis e tocotrienóis pelos tecidos dependente, não somente de reações químicas, mas também, da biocinética da distribuição e transporte ou biodisponibilidade.

Estruturalmente, a atividade vitamínica dos tocoferóis e tocotrienóis é dependente da presença da hidroxila e dos grupos metilas no anel aromático e da configuração do C-2 no anel heterocíclico (R e S) (Gallo-Torres, 1980). Estudos recentes demonstram que as isomerizações no carbono 4' e 8' provocam queda na atividade biológica entre 10 – 80%, como visto na Tabela 04.

As diferentes atividades biológicas das diversas formas do α -tocoferol não são devido somente a sua habilidade em sequestrar o radical livre, mas também na específica afinidade do α -tocoferol proteína transferase (α -TTP). A α -TTP é uma proteína que especificamente incorpora o α -tocoferol na partícula lipoprotéica das células do fígado (Rupérez et al., 2001; Birringer et al., 2001; Azzi et al., 2002).

A atividade de vitamina E é normalmente expressa em Unidade Internacional (UI). Uma UI de vitamina E é considerado equivalente a 1mg de dl- α -tocoferol acetato sintético, com o qual a biopotência de todas formas de tocoferóis e tocotrienóis é comparado, como foi proposto pelo Sub-committee of Vitamin E of the Accessory Food Committee, visto que fisiologicamente apresenta uma absorção mais eficiente.

A molécula de vitamina E é essencial para as membranas celulares, que contém uma grande quantidade de ácidos graxos, que são susceptíveis à oxidação. Uma das principais funções da vitamina E é proteger as membranas dos danos oxidativos (Wang & Quinn, 2000; Escrivá et al., 2002). Benefícios à saúde, em conseqüência do papel antioxidante, foram observados,

principalmente em doenças crônicas como as cardiovasculares, câncer e função imune (Kanner, et al., 2001; Azzi et al., 2002; Rejón et al., 2002).

Tabela 03: Atividade biológica dos estereoisômeros de RRR- α -tocoferol acetato.

Configuração	Atividade biológica UI/mg	Comparado ao d- α -tocoferol acetato
d- α -tocoferol (2R 4'R 8'R)	1,49	100%
l- α -tocoferol (2S 4'R 8'R)	0,46	31%
2R 4'R 8'S- α -tocoferol	1,34	90%
2S 4'R 8'S- α -tocoferol	0,55	37%
2R 4'S 8'S- α -tocoferol	1,09	73%
2S 4'S 8'R- α -tocoferol	0,31	21%
2R 4'S 8'R- α -tocoferol	0,85	57%
2S 4'S 8'S- α -tocoferol	1,10	60%

Weiser & Vecchi (1982).

Segundo Sebrell & Harris (1972) a atividade antioxidante dos tocoferóis e tocotrienóis é principalmente devido a habilidade de doar o hidrogênio fenólico ao radical livre. *In vivo* a relativa atividade antioxidante dos tocóis está na ordem : $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, mas a ordem é inversa ($\alpha < \beta < \gamma < \delta$) quando a potência antioxidante é comparada em gorduras, óleos e lipoproteínas *in vitro* (Kama-Elmin & Appelqvist, 1996).

Tocoferóis estão presentes em altas concentrações em óleos de grãos, nozes, germen de trigo, folhas e partes verdes de plantas. O α -tocoferol concentra-se, principalmente, nos cloroplastos de células vegetais, enquanto β - , γ - , δ -homólogos são normalmente encontrados fora dessas organelas. Os tocotrienóis são encontrados nas frações de germe e farelo de sementes e

cereais. Pequenas quantidades de tocoferóis estão presentes em tecido animal, sendo considerado boas fontes o leite, fígado e a gema de ovo.

Tabela 04: Atividade biológica dos tocoferóis e tocotrienóis.

Composto	Atividade UI/mg
d,l- α -tocoferol acetato	1,00 ^{a, e}
d,l- α -tocoferol	1,10 ^{a, e}
d- α -tocoferol acetato	1,40 ^a
d- α -tocoferol	1,50 ^a
l- α -tocoferol acetato	0,40 ^b
l- α -tocoferol	0,50 ^b
d,l- α -tocoferol ácido succinato	0,90 ^a
d- α -tocoferol ácido succinato	1,20 ^a
β -tocoferol	0,30 ^{c, e}
γ -tocoferol	0,15 ^{c, e}
δ -tocoferol	0,01 ^{c, e}
α -tocotrienol	0,30 ^d
β -tocotrienol	0,05 ^d
γ -tocotrienol	0,01 ^d
δ -tocotrienol	negligenciável ^d

^a Machlin (1991).

^b Weiser & Vecchi (1982).

^c Sebrell & Harris (1972).

^d Kamal-Elmin & Appelqvist (1996).

^e TAN (1989).

De acordo com os novos conceitos das tabelas de referência dietética (DRIs – Dietary Reference Intakes), a ingestão adequada (AI) para vitamina E para homens e mulheres adultos fica em 15 mg/dia e o nível de tolerância (UL) em 100 mg/dia (NRC, 2000). Já a Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na portaria nº 33 fixa o valor de ingestão diária em 10 mg.

A deficiência de vitamina E é considerada rara, exceto em casos de mal nutrição, dieta pobre ou mal absorção (Blatt et al., 2001; Kayden, 2001). De acordo com Trakur & Srivastava (1996) a deficiência de vitamina E ocorre em três estágios progressivos, primeiro há uma depressão de vitamina E, seguido de um aumento de hemólise da hemoglobina e excreção de creatina na urina, e por último distrofia muscular. O efeito da ingestão inadequada de vitamina E normalmente requer longo período para se desenvolver, e têm-se relacionado com doenças degenerativas como o câncer, arteriosclerose e outras formas de doenças cardíacas.

3.2.1 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA VITAMINA E

A absorção fetal de ratas é o método biológico mais utilizado, principalmente, no estabelecimento das biopotências dos diferentes vitâmeros E, e para determinar a vitamina E realmente aproveitável de fontes alimentícias. É um teste trabalhoso e demorado, no entanto, tem a vantagem de ser mais específico que outros métodos biológicos (indiretos), como a dosagem da vitamina E no fígado (Augustin et al., 1985).

Pela facilidade e rapidez, os métodos químicos são preferidos em relação aos biológicos. Neles a extração pode ser direta com uso de solvente orgânico com ou sem aquecimento em extrator Soxhlet (Ball, 1988), ou com a saponificação da amostra.

A extração direta normalmente envolve duas etapas. A primeira consiste na dissolução da amostra em um solvente miscível com água como álcool ou acetona, onde pode ser eliminado, por exemplo, proteínas por precipitação. A segunda etapa emprega solvente orgânico na partição, onde é extraído a vitamina E junto com triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides e outras vitaminas lipossolúveis. Os solventes orgânicos mais utilizados são o hexano, éter de petróleo e

éter etílico, sendo que dentre estes o mais empregado é o éter etílico por ser mais polar e menos propenso a formar emulsão, embora apresente a desvantagem de extrair mais interferentes (Bourgeois, 1992; Rupérez et al., 2001).

A saponificação pode ocorrer com o uso de aquecimento da amostra com um álcali forte, normalmente com solução metanólica, ou etanólica, ou mesmo aquosa de hidróxido de potássio entre 50-60%, com a finalidade de hidrolisar triglicerídeos, fosfolipídeos e outros ésteres de lipídeos a ácidos graxos mais hidrofílicos e alcóois que são mantidos na fase aquosa durante a partição. A diminuição de lipídeos na amostra aumenta a eficiência da coluna e a seletividade do detector. Durante a saponificação é recomendado o refluxo de nitrogênio para manter a atmosfera inerte e prevenir a oxidação dos vitâmeros (Parrish, 1980). Diversos antioxidantes são utilizados durante a saponificação para proteger a vitamina como: ácido ascórbico, pirogalol, hidroquinona, BHA e BHT, e misturas de octil galato, ácido ascórbico e ácido cítrico, sendo o ácido cítrico usado como agente quelante para íons metálicos (Bourgeois, 1992). Após a saponificação, a extração pode ocorrer por partição líquido/líquido, com uso de solventes como éter de petróleo, n-hexano ou éter etílico.

Métodos de extração em fase sólida, líquido/sólido, e uso de fluído supercrítico em extração de vitaminas lipossolúveis em diferentes matrizes têm sido discutidos (Bourgeois et al., 1985; Iwase, 2000; Carlucci et al., 2001; Luque-Gardia & de Castro, 2001).

Os métodos espectrofotométricos de determinação direta, dos tocoferóis no UV (297-298nm) apresentam uso limitado em virtude dos baixos valores de absorvidade e da possível presença de substâncias interferentes, sendo, portanto, aplicável em amostras puras e concentradas. Os métodos colorimétricos baseiam-se em reações de oxiredução onde os tocoferóis são oxidados a tocoferol quinona, em meio ácido. O processo mais utilizado é baseado na reação de Emmerie e Engel, onde os tocoferóis reduzem quantitativamente os íons férricos a íons ferrosos, formando um complexo vermelho com máximo de absorção a 520nm. A reação não é específica, podendo ocorrer a redução dos íons férricos com outras substâncias como carotenóides, vitamina A e esteróis.

O método espectrofluorimétrico pode ser utilizado para os tocoferóis livres, visto apresentarem fluorescência com máximo de excitação a 295nm e emissão a 340nm (Bourgeois, 1992), já as formas esterificadas não apresentam essa propriedade, o que torna necessário a etapa de saponificação. No entanto, a vitamina A quando presente pode agir como sequestrador de fluorescência e traços de hidrocarbonetos clorados podem desaparecer com esta por completo.

Técnicas cromatográficas como cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia por adsorção sólido-líquido em coluna empregam aparatos menos caros e instrumentos poucos precisos, e portanto são utilizadas para limpeza de extrato, purificação e testes qualitativos (Ames, 1971; Abidi, 2000).

A cromatografia a gás (CG) na década de 60, começou a ser empregada na análise de tocoferóis e desenvolveu-se rápido nos anos seguintes (Österlof & Nyheim, 1980; Scott et al., 1982; Pyka & Sliwiok, 2001). No entanto, requer derivação a compostos voláteis como os ésteres trimetilsilil acetato, propionato e trifluoroacetato, fazendo com que as amostras passem por etapas pré-cromatográficas muito trabalhosas. Métodos com uso de colunas capilares são capazes de resolver os homólogos β - e γ -tocopherol e tocotrienol, e separam substâncias interferentes como o colesterol (Abidi, 2000), e o detector utilizado é o de ionização de chama (Parrish, 1980; Cuniff, 1998), podendo ser utilizado também o detector espectrômetro de massa para análise quantitativa (Melchert & Pabel, 2000).

Com o surgimento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) esta foi rapidamente substituindo as outras técnicas cromatográficas. A CLAE desempenha um papel muito importante na separação e quantificação dos tocoferóis em uma ampla variedade de produtos. A CLAE tem superado a CG em virtude da grande flexibilidade e aplicabilidade a diferentes matrizes de amostras como produtos farmacêuticos, alimentos, fluídos e tecidos biológicos e tabletes multi-vitamínicos (De Leenheer et al., 1992).

Em relação à coluna cromatográfica, a fase reversa é preferida pela excelente reprodução do tempo de retenção, rápido equilíbrio e robustez da coluna, além de permitir melhores ajustes

para a separação dos interferentes. Na fase reversa os tocotrienóis são eluídos como um grupo antes dos tocoferóis. Quanto aos tocoferóis, o δ -tocopherol é eluído primeiro, sendo seguido pelos dimetil substituídos β - e γ -tocopherol que são muito difíceis de serem separados e por último o α -tocopherol (Lavedrine et al., 1996; Ake et al., 1998; Sobczak et al., 1999; Gimeno et al., 2000). Têm sido reportado a separação dos homólogos β - e γ -tocopherol em coluna de fase reversa C₃₀ (Schieber et al., 2002), pentafluorofenil (PFPS) e octadecil polivinil álcool (ODPVA) (Abidi & Mounts, 1997; Kamal-Eldin et al., 2000).

Para colunas de fase reversa a fase móvel mais empregada é basicamente metanol puro ou misturas de metanol-água contendo até 10% de água (Sánchez-Pérez et al., 2000). Alguns analistas trabalham com misturas de água-acetonitrila-metanol, acetato de etila e clorofórmio em várias proporções (Cohemn & Lapointe, 1978; Garcia-Plazaola & Berril, 1999; Kurrilich & Juvik, 1999; Gimeno et al., 2000; Jung et al., 2001).

As colunas de fase normal são capazes de separar os isômeros β - e γ -tocopherol e tocotrienóis e apresentam como vantagens a habilidade de trabalharem com solventes orgânicos permitindo uma alta solubilidade de lipídeos, suportarem alta concentração de lipídeos, os quais são facilmente eliminados por solventes não polares, e habilidade de prover ampla faixa de seletividade com o uso de diferentes modificadores polares na fase móvel.

Em coluna de fase normal usualmente são utilizados na separação de compostos tocol eluentes compostos por um alcano como hexano, heptano, iso-octano, com uma pequena quantidade de modificador polar que pode ser um álcool como etanol, metanol, butanol, ou um éter como tetrahydrofurano, metil, *t*-butil, isopropil, ou um clorohidrocarbono como diclorometano, clorofórmio (Carpenter, 1979; Speek et al., 1985; Coors, 1991; Balz et al., 1992; Yao et al., 1992; AOCS, 1993; El-Shami & El-Negoumy, 1993; Shin & Godber, 1993; Salo-Vaananom et al., 2000).

O detector mais utilizado nas determinações de tocoferóis e tocotrienóis é o de fluorescência em virtude da sua maior especificidade (Speek et al., 1985; Coors, 1991; Yao et al.,

1992; El-Shami & El-Negoumy, 1993; Shin & Godber, 1993; Kamal-Eldin et al., 2000; Melchert & Pabel, 2000; Bruni et al., 2002), embora existirem autores que utilizam o detector de UV para a detecção de vitamina E em produtos como óleos, leite e produtos lácteos, carnes, noz, ração, sementes e bebidas (Cohen & Lapointe, 1978; Lavedrine et al., 1997; Gimeno et al., 2000; Turner & Mathiasson, 2000; Bruni et al., 2001; Schieber et al., 2001).

A quantificação normalmente é feita por padronização externa com uso de curvas de padronização, independente do tipo de coluna ou detector usado, em vários tipos de matrizes, desde alimentos processados ou não, óleos, sementes ou mesmo tecidos e fluídos biológicos (Cohen & Lapointe, 1978; Carpenter, 1979; Speek et al., 1985; Yao et al., 1992; Chase et al., 1994; Li et al., 1996; Lavedrine et al., 1997; Ake et al., 1998; Chu & Kung, 1998; Osuma-García et al., 1998; Psomiadou & Tsimidou, 1998; Rupérez et al., 1998; Savage et al., 1999; Iwase, 2000; Gimeno et al., 2000; Turner & Mathiasson, 2000; Carlucci et al., 2001; Bruni et al., 2002, Schieber et al., 2002, Escrivã et al., 2002). Segundo Bourgeois (1992) e Rupérez et al. (2001) a quantificação pode ser feita também por padronização interna utilizando como padrão interno o 5,7 dimetiltocol e o tocol (cromanol desmetilado obtido dos tocoferóis) ou o α -tocoferol acetato em cromatografia em coluna de fase reversa e o o-hidroxibifenil em coluna de fase normal.

3.3 MINERAIS

Atualmente a medicina orto-molecular e a bio-molecular vêm demonstrando especial interesse em alimentos com altos teores de minerais que desempenham importantes papéis bioquímicos, e podem, no caso da medicina bio-molecular, substituir a suplementação de sais minerais.

Os minerais apresentam várias funções, desde estrutural, à ação hormonal, atuando como cofatores enzimáticos e estabilizadores de reações bioquímicas. Podem ser abundantes no corpo humano, como é o caso do cálcio que é constituinte dos ossos e dentes, ou podem ser, também,

elementos traços que exercem funções específicas no organismo, como o zinco que apresenta ação reguladora no crescimento (NAS-NEC, 1989, Sepúlveda & Watson, 2002).

Segundo Pedroso (1998), os eletrólitos, como o sódio e potássio, são importantes na movimentação das soluções entre os vários compartimentos corpóreos, devido ao seu efeito osmótico e estimulam impulsos nervosos.

Os minerais estão amplamente distribuídos na natureza. A principal fonte de cálcio são os produtos lácteos; o fósforo é encontrado em alimentos ricos em proteínas como o leite, carne e peixes e grãos de cereais; já o magnésio apresenta alta concentração em sementes inteiras como nozes, legumes e grãos não moídos. Os elementos traços, como o ferro e o zinco, são encontrados em carnes, ovos, fígado, legumes e cereais, já o manganês é encontrado em grãos inteiros e produtos de cereais. O potássio e sódio são eletrólitos encontrados na água, sal mineral, frutas e vários vegetais (NAS-NEC, 1989).

De acordo com as referências consultadas a macadâmia apresenta níveis consideráveis de minerais, com concentrações em mg/100g, variando de 47 a 53 para cálcio; 160 a 240 para fósforo; 260 a 300 para potássio e 0,20 a 2 para ferro (Dierberger & Netto, 1985; Duke, 1989; Souci et al., 1989). Segundo McCance & Widdwon's (1994), a noz macadâmia apresenta valores de 0,43mg/100g para cobre; 100mg/100g para magnésio; 5,5mg/100g para manganês e 1,1mg/100g de produto para zinco. Desta forma a macadâmia se apresenta como uma boa fonte de minerais.

3.4 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos existentes na natureza são principalmente ácidos monocarboxílicos de cadeia linear saturada ou insaturada com um número par de átomos de carbono. Os ácidos graxos C:14, C:16 e C:18 representam mais de 90% dos ácidos graxos dos óleos de sementes e gorduras animais (Robson, 1991). Os ácidos graxos oléico e linoléico são os ácidos graxos predominantes dos lipídeos das plantas.

Alguns ácidos graxos são tidos como essências por não poderem ser sintetizados pelas células dos mamíferos a partir de acetil-coenzima A, devendo ser ingeridos na alimentação. Os mamíferos não apresentam enzimas capazes de inserir dupla ligação nas posições n-6 e n-3 nas cadeias hidrocarbonadas dos ácidos graxos. O ácido graxo linoléico (C18:2 n-6) e o linolênico (C18:3 n-3) são os ácidos graxos alimentares essenciais (Santos, 1998).

Os principais ácidos graxos saturados de óleos e gorduras comestíveis vegetal e animal são: laurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), behênico (C22:0) e lignocérico (C24:0). Os mais importantes monoinsaturados são oléico (C18:1) e erúcico (C22:1), já os poliinsaturados são linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3) (O'Brien, 1998).

Estudos clínicos demonstram evidências de redução de incidência de doenças coronárias em dietas com nozes. As nozes apresentam quantidade relativamente alta de ácidos graxos monoinsaturados que tem sido reportados como responsáveis pela diminuição da concentração do LDL-colesterol (Glade, 2000; Kaijser et al., 2000). Os ácidos graxos normalmente relatados em nozes macadâmia são: mirístico (0,6 – 1,8%), palmítico (7 – 24%), palmitoléico (15 – 30%), esteárico (2 – 5%), oléico (40 – 65%), linoléico (1,5 – 4,5%) e araquídico (1,2 – 4,5%) (Cavaletto, 1983; Dierberger & Netto, 1985; Duke, 1989; Mason & McConachie, 1994; Kaijser et al., 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

- Matéria-prima

As amostras de macadâmia utilizadas neste estudo foram fornecidas pela Queen Nut Nozes Macadâmia. As nozes eram provenientes do estado de São Paulo, região de maior produção de macadâmia, safra de 1998, com exceção de uma amostra de Guaxupé – MG e três amostras adquiridas no mercado local de Campinas. Para efeito de comparação foram utilizadas as nozes avelã (*Corylus sp*), noz (*Prunus sp*), pecã (*Carya sp*) e pistache (*Pistacia sp*), sendo todas adquiridas no mercado local. Foram analisadas 2 marcas diferentes, com exceção da noz (*Prunus sp*). As amostras foram codificadas como segue:

Amostra 01 – macadâmia torrada e salgada A (Campinas)

Amostra 02 – macadâmia torrada e salgada B (Campinas)

Amostra 03 – macadâmia torrada e salgada C (Campinas)

Amostra 04 – macadâmia beneficiada D (sem casca)

Amostra 05 – macadâmia torrada e salgada E

Amostra 06 – macadâmia do Espírito Santo do Pinhal, região sul, *in natura* (com casca)

Amostra 07 – macadâmia do Espírito Santo do Pinhal, região norte, *in natura* (com casca)

Amostra 08 – macadâmia de Araçatuba, *in natura* (com casca)

Amostra 09 – macadâmia de Pirassununga, *in natura* (com casca)

Amostra 10 – macadâmia de Bauru, *in natura* (com casca)

Amostra 11 – macadâmia de Matão, *in natura* (com casca)

Amostra 12 – macadâmia de Dois Córregos, *in natura* (com casca)

Amostra 13 – macadâmia de Marília, *in natura* (com casca)

Amostra 14 – macadâmia de Guaxupé – MG, *in natura* (com casca)

Amostra 15 – pecã A

Amostra 16 – pecã B

Amostra 17 – pistache torrada e salgada A

Amostra 18 – pistache torrada e salgada B

Amostra 19 – avelã A

Amostra 20 – avelã B

Amostra 21 – noz (*Prunus sp*)

As análises foram feitas em duplicata para composição centesimal e ácidos graxos, triplicata para tocoferóis e quintuplicata para os minerais. Para cada amostra foram tomadas 1000g, que após a retirada das cascas quando necessário, foram homogeneizadas em multiprocessador, acondicionadas em frasco âmbar e guardadas em freezer (-10⁰C) até a análise. As determinações de tocoferóis e umidade foram realizadas imediatamente após a trituração das nozes. As demais análises foram realizadas no menor tempo possível.

- Reagentes e padrões analíticos

Os reagentes e solventes utilizados foram grau cromatográfico ou grau analítico de acordo com sua finalidade.

Para a análise de vitamina E o padrão analítico utilizado foi Tocopherol-Isomere, artigo 15496 da Merck (Alemanha), composto por dl- α -tocopherol, 99,9%; dl- β -tocopherol, 99,5%; dl- γ -tocopherol, 99,5%; dl- δ -tocopherol, 99,9%. Para o preparo das soluções estoques o conteúdo de cada ampola (50mg) foi diluído com 50mL de n-hexano e a esta solução foi adicionado pequeno cristal de hidroxí butiltolueno (BHT). A concentração da solução de cada isômero foi calculada espectrofotometricamente, utilizando-se a absorvidade molar de cada composto.

A partir da solução estoque foi preparada a solução de trabalho de mistura de isômeros de tocoferóis. Aliquotas de 0,25mL de α -, 0,50mL de β -, γ - e δ -tocopherol foram diluídas para 25mL em n-hexano. A curva de calibração foi preparada utilizando-se aliquotas de 0,25; 0,40; 0,55;

0,70 e 0,85mL da solução de trabalho de mistura de isômeros de tocoferóis, que foram diluídas para 5mL em n-hexano.

O composto utilizado como padrão interno, neste trabalho, foi o o-hidroxibifenil (HBF), artigo H-7626 da Sigma (USA). A solução estoque foi preparada com 14,3mg de o-hidroxibifenil diluído em 50mL de n-hexano. Para o preparo da solução de trabalho foi diluído 1mL da solução estoque de o-hidroxibifenil para 50mL em n-hexano. Aliquotas de 0,30mL desta solução trabalho, foram adicionadas a cada ponto da curva de calibração interna. No cálculo foi utilizado a área de cada pico, representando o resultado de três injeções.

As soluções estoques de minerais foram preparadas a partir de soluções padrões dos metais (marca J.T. Baker e Merck), com água bidestilada e ácido nítrico grau analítico, em concentrações de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções de trabalho multielementares foram preparadas em diferentes concentrações, dependendo do metal a ser determinado, em solução de ácido nítrico 5% (v/v), a partir das soluções estoque. Os brancos foram preparados com solução de ácido nítrico 5% (v/v) em água bidestilada.

Para a análise de ácidos graxos foi utilizado o Lipid Standards: Fatty Acid Methyl Ester Mixtures, artigo 189-18 da Sigma (USA), composto por metil esterres de ácido caprílico (C8:0) 8%, ácido cáprico (C10:0) 8%, ácido láurico (C12:0) 8%, ácido mirístico (C14:0) 8%, ácido palmítico (C16:0) 11%, ácido palmitoléico (C16:1, cis-9) 5%, ácido esteárico (C18:0) 8%, ácido oléico (C18:1, cis-9) 5%, ácido linoléico (C18:2, cis-9,12) 5%, ácido linolênico (C18:3, cis-9,12,15) 5%, ácido araquidônico (C20:0) 8%, ácido behênico (C22:0) 8%, ácido erúrico (C22:1, cis-13) 5% e ácido lignocérico (C24:0) 8%. Uma ampola de 100mg foi diluída em éter de petróleo para 1mL e injetado.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A umidade e cinzas foram avaliadas segundo os métodos oficiais da AOAC (Cunniff, 1998); os lipídeos por Soxhlet, segundo Hortman & Lago (1973); proteínas por Kjeldahl pelo método 46-12 da American Association of Cereal Chemists (1990); e os carboidratos foram calculados por diferença. Os valores de calorias foram calculados levando em consideração que em média 1g de proteína fornece 4 calorias; 1g de gordura fornece 9 calorias; e 1g de carboidratos fornece 4 calorias, segundo a resolução RDC Nº 40, de 21 de março de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

4.2.2 MINERAIS

Para a análise de minerais foram pesadas 2,50g de amostra em cinco cápsulas de platina, e incineradas em forno mufla à temperatura de 450⁰C por 15 horas. As cinzas foram dissolvidas em 2,5mL de ácido nítrico concentrado e diluídas em balões volumétricos de 50mL com água bidestilada.

A determinação dos minerais foi por Espectrômetro de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado, marca BAIRD, modelo ICP 2000, unido a uma estação de trabalho com programa Plasmacomp V, modelo PST. Na Tabela 05 encontram-se as condições de operação do equipamento, sendo que as condições ótimas para determinação multielementar foram estabelecidas utilizando-se o elemento manganês para o canal de alinhamento do espectrômetro de emissão, conforme recomendação do fabricante. A quantificação foi feita através de curvas de calibração externa.

Tabela 05: Condições de operação do espectrômetro de emissão.

Potência do plasma	1,0 KW
Gás refrigerante (Ar)	6,5 L min ⁻¹
Gás auxiliar (Ar)	6,5 L min ⁻¹
Vazão da amostra	2 mL min ⁻¹
Altura de observação vertical	19 mm ^a
Pressão do nebulizador ^b	3 bar

^aacima da bobina de indução.

^bnebulizador pneumático concêntrico.

4.2.3 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

A transesterificação e metilação dos ácidos graxos das amostras foram realizadas segundo o procedimento descrito por Hortman & Lago (1973). Foram tomadas 0,2g de amostra que foram dissolvidas em solução de hidróxido de sódio metanólica (2% p/p), aquecida em banho-maria 65-70°C por 15 minutos. À solução quente foi adicionado 10mL do reagente de esterificação, composto por 2g de cloreto de amônio, 60mL de metanol e 3g de ácido sulfúrico concentrado, retornando-se a amostra para o banho-maria por 10 minutos. Após o resfriamento adicionou-se 2mL de éter de petróleo e injetou-se cerca de 1µL no cromatógrafo gasoso.

Na determinação da composição de ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo a gás Philips, modelo 4550, equipado com injetor split (1:100), detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88, com fase estacionária de propilenoglicol (50mx0,25mmx0,20µm) (Chrompack, Alemanha). Os seguintes parâmetros de operação foram utilizados: temperatura do injetor 270°C, temperatura do detector 300°C; temperatura da coluna 180°C (isotérmica). Foi usado o hidrogênio como gás de arraste a 30mL/min, velocidade linear de 42 cm/s com filtro de oxigênio acoplado à linha de gás; nitrogênio como gás de *make up* a 30mL/min; e ar sintético 300mL/min. Para registro e melhor tratamento dos dados foi utilizado uma estação de trabalho com programa Borwin (França).

Para identificação dos ácidos graxos foram comparados os tempos de retenção dos picos nos cromatogramas das amostras, aos tempos de retenção de padrões de ésteres metílicos.

A quantificação foi realizada por normalização (% relativa de área) e as porcentagens de área transformadas em concentrações de mg/100g de nozes, usando o fator de conversão de Holland et al. (1994).

4.2.4 TOCOFERÓIS

4.2.4.1 AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIA E MÓVEL

A eficiência de algumas colunas (C_{18} , sílica) foi avaliada utilizando-se diferentes fases móveis, adequadas para cada tipo de coluna, como pode ser visualizado na Tabela 06. A composição da fase móvel foi avaliada verificando-se a influência da presença de cada reagente, ou de variações nas concentrações dos mesmos, sobre a resolução dos padrões de tocoferóis. Os modificadores orgânicos metanol, acetonitrila, acetato de etila e isopropanol, foram testados em concentrações variadas. Foi também observado o efeito do ácido acético em substituição à água. Todos os sistemas foram testados com eluição isocrática, com vazão de 0,5 a 1,0 mL/min.

Na avaliação do sistema cromatográfico foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian, modelo 5000, com bomba binária para gradiente de solventes, sistema de injeção tipo Rheodyne, modelo 7125, com alça de amostragem de 100 μ L de capacidade. Acoplado a este, um detector de fluorescência, marca Spectra System, modelo FL 2000, versão 3.09 com comprimento de onda de excitação de 292nm e emissão de 326nm. Para registro dos dados foi empregado um integrador, marca Varian, modelo 4290. A separação dos compostos foi feita em coluna LiChrospher de Si-60, 5 μ m, 125x4,0mm d.i. (Merck, Alemanha).

Tabela 06: Fases estacionária e móvel avaliadas

Fase estacionária	Fase móvel	Referência
LiChrospher 100 C18, 250x4mm, 5µm, Merck	metanol:água (90:10) a (99:1)	Ball, 1988
Supelcosil C18, 150x4,6mm, 3µm, Supelco	metanol:água (95:5) a (99:1) metanol:ácido acético (99,5:0,5)	Gimeno et al., 2000 Delgado-Zamarreno et al., 2001
Econosphere C18, 150x4,6mm, 3µm, Alltech	metanol:água (95:5) metanol:acetonitrila:acetato de etila (80:15:05) metanol:água:n-hexano (98,5:1,0:0,5)	Bonvehi et al., 2000 Abidi, 2000
Chrospher Si60, 250x4mm, 5µm, Merck	n-hexano:isopropanol (98:02) n-hexano:dioxano (98:02) n-hexano:acetato de etila (97:03) n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2)	Carpenter, 1979 Ulberth et al., 1992 Shin & Godber, 1993 fase móvel desenvolvida neste trabalho
LiChrospher Si60, 125x4mm, 5µm, Merck	n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2)	fase móvel desenvolvida neste trabalho

4.2.4.2 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Para a avaliação dos procedimentos de extração de lipídeos cerca de 2,00g de amostra de macadâmia, previamente homogeneizada, foram utilizados, e os ensaios realizados em duplicata. Todos os procedimentos foram feitos a temperatura ambiente, exceto para a extração por Soxhlet. Inicialmente foi avaliado a extração de lipídeos pelo método de Soxhlet, Bligh-Dyer, e extração com solventes orgânicos com e sem desintegração. Na segunda etapa foi avaliado a extração dos tocoferóis com acetona e desintegração, saponificação a quente em amostra enriquecida. A seguir estão listados os procedimentos utilizados.

1. amostra + 10mL de n-hexano + ultra som, por 15 minutos;
2. amostra + éter de petróleo em extrator Soxhlet, por 1 hora;
3. amostra + extração por Bligh-Dyer com uso de clorofórmio, metanol, água e sulfato de sódio (Undeland, 1998);
4. amostra + acetona + ultra som por 15 minutos;
5. amostra + acetona + desintegração.

Para os testes com acetona, após a desintegração da amostra com uso de desintegrador tipo Turatec a solução foi filtrada em funil de Büchner e o resíduo retomado para nova extração. Este processo foi repetido conforme descrito nas Tabelas 07 e 08.

O filtrado foi transferido, em pequenas alíquotas para um funil de separação contendo 50mL de éter etílico. Após cada alíquota de amostra foi adicionado água para remover a acetona. Ao término da transferência da amostra, foram realizadas ainda duas lavagens com água para garantir a eliminação total da acetona. Para a eliminação da água residual, à solução etérea adicionou-se sulfato de sódio anidro.

Todos os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à vácuo (40⁰C), transferido para um tubo concentrador e após total evaporação do éter etílico com nitrogênio, adicionou-se 0,24mL da solução trabalho do padrão interno e o volume foi elevado a 4mL com n-hexano.

As soluções foram filtradas através de membrana de celulose regenerada (marca SS, código RC055), com poros de 0,45µm, antes de serem injetadas no CLAE. No sistema cromatográfico foi utilizado coluna de sílica, fase móvel composta por n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2) com vazão de 1,5mL/min e detector de fluorescência com comprimento de onda para excitação de 292nm e emissão de 326nm. Todas as etapas foram devidamente protegidas da luz e executadas no menor tempo possível.

Tabela 07: Avaliação da extração com uso de acetona e desintegração por um minuto.

1° extração	2° extração	3° extração
50mL	30mL	30mL
30mL	30mL	30mL
50mL	30mL	
30mL	30mL	

Tabela 08: Avaliação do tempo de extração

Volume de acetona e número de extração	Tempo
50mL + 2x30mL	30 segundos
50mL + 2x30mL	60 segundos
50mL + 2x30mL	90 segundos

4.2.4.3 DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os picos dos isômeros de tocoferóis foram detectados utilizando o detector de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 292nm e emissão de 326nm. A identificação dos isômeros de tocoferóis foi feita por comparação dos tempos de retenção pelos padrões analisados nas mesmas condições, e por co-cromatografia. A quantificação foi feita através de curvas de padronização interna, utilizando o o-hidroxibifenil (o-HBF).

4.2.4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Após o estabelecimento da metodologia analítica para a determinação dos tocoferóis, passou-se a etapa de validação da mesma.

- Linearidade

A linearidade é usada para descrever a relação entre o sinal e a concentração do analito em uma dada faixa de concentração. A faixa de concentração contempla o intervalo entre a mínima e máxima concentração do analito em uma curva de calibração, onde a curva de regressão é dada por $y=a+bx$, sendo que x representa a concentração; y a resposta medida, área do pico cromatográfico; a inclinação da curva e b interseção com o eixo y , quando $x=0$. A adequação da curva de regressão pode ser avaliada pelo teste Student's t -distribuição aplicado no coeficiente de correlação linear (r) com $n-2$ graus de liberdade, sendo o valor t obtido maior que o tabelado a correlação é significativa para a probabilidade calculada (Massart et al., 1988; Costa Neto, 2002). O teste é aplicado segundo a fórmula abaixo:

$$t = \frac{\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

onde:

t = Student's t -distribuição;

n = número de medidas;

r = coeficiente de correlação linear.

- Limites de detecção e quantificação

Limite de detecção é normalmente aceito como sendo a menor quantidade ou concentração de uma determinada substância que pode ser detectada com certa confiança em um certo tipo de amostra ou meio por um processo de medição específico. A diferença entre as definições da International Organization for Standardization (ISO) e a International Union of

Pure and Applied Chemistry (IUPAC) é que a ISO trata capacidade de detecção somente para a resposta variável, ou seja, concentração no contexto químico. Por outro lado, a IUPAC refere-se ao sinal de detecção, resposta variável, bem como capacidade de quantificação, sinal e concentração (Currie, 1997). O limite de detecção é considerado como sendo 3 vezes o desvio padrão do branco e o limite de quantificação 10 (Quattrocchi et al., 1992).

Para a avaliação do limite de detecção e quantificação foram usados três pontos com concentrações inferiores ao menor ponto da curva de calibração, 0,10; 0,15 e 0,20mL da solução trabalho de mistura de tocoferóis diluídas para 5mL com n-hexano injetados em triplicata. Foi determinado a equação de regressão para estas concentrações e assim obtido a estimativa da resposta do branco (Y_{bl}). Para cada uma das concentrações foi determinado a estimativa de desvio padrão, e calculado outra curva de regressão correspondente a concentração verso estimativa de desvio padrão, obtendo-se o desvio padrão do branco (S_{bl}). Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo as fórmulas abaixo (Quattrocchi et al., 1992):

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

onde:

Y_{bl} = estimativa da resposta do branco;

S_{bl} = estimativa de desvio padrão do branco;

b = interseção da curva quando $x=0$;

n = número de medidas

- Exatidão

Para avaliação da exatidão do método proposto neste trabalho foi estabelecido a recuperação, em triplicata, dos padrões adicionados ao branco (sem a presença da matriz) e amostra de macadâmia, em três diferentes níveis de concentração, 0,40; 0,55 e 0,70mL da solução trabalho de mistura de isômeros de tocoferóis. Para a avaliação estatística entre as recuperações procedidas no branco e amostra foi utilizado as fórmulas descritas abaixo, segundo Massart et al. (1988).

$$t = \frac{\left| \bar{X}_1 - \bar{X}_2 \right|}{\sqrt{s^2 (1/n_1) + (1/n_2)}}$$

Onde a distribuição Student's t com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Onde:

$\bar{X}$ = média da medida ;

n = número de medidas;

s = estimativa de desvio padrão.

Determinações em paralelo, realizadas em triplicatas, utilizando a metodologia desenvolvida neste trabalho e o método recomendado pela Coopération Européenne dans l'étude

Domaine de la Recherche Scientifique et Technique (COST 91) (Brubacker et al., 1985), também foram feitos para avaliar a exatidão da metodologia.

- Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão e está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do valor médio ou central e é expressa como estimativa de desvio padrão (s) ou coeficiente de variação (CV) (Quattrocchi et al., 1992). A avaliação do coeficiente de variação (CV) máximo para repetições analíticas é obtido pelo uso da fórmula descrita por Horwitz (Wood, 1999):

$$CV(\%) = 2^{(1 - 0,5\log C)}$$

Onde:

CV = coeficiente de variação;

C = concentração do analito expressa como potência de 10.

Para a avaliação da repetibilidade do método foi utilizada a mistura das amostras de avelã (19 e 20) por apresentarem níveis consideráveis de tocoferóis, sendo procedidas dez repetições analíticas utilizando o método proposto neste estudo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NOZES QUANTO A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Na Tabela 09 está apresentado a composição centesimal das amostras aqui analisadas.

As amostras 4 e 5 apresentaram umidade menor em relação as demais amostras de macadâmia, talvez pelo fato de serem recém processadas e embaladas à vácuo. O teor de cinzas na amostra 5 ficou acima das demais amostras de macadâmia, cerca de 40%, provavelmente devido a salga ter sido recente no produto.

Os valores médios encontrados para as amostras de macadâmia de umidade (3%), cinzas (1,5%), proteína (9,2%) e lipídeos (73%) são comparáveis aos de outras nozes.

Tabela 09: Composição centesimal* (g/100g) em macadâmia e nozes.

Amostras	Umidade	Cinzas	Proteína ¹	Lipídeos	Carboidratos totais ²	Calorias ³ (Kcal/g)
01	3,41±0,01	1,36±0,01	8,1±0,1	74,6±0,2	12,5	754
02	5,55±0,02	1,39±0,01	9,92±0,12	71±1	12,1	727
03	3,1±0,1	1,42±0,01	9,9±0,2	72±1	13,6	742
04	1,28±0,02	1,33±0,01	9,70±0,14	72±2	15,7	750
05	1,16±0,03	2,40±0,01	9,5±0,1	75,0±0,3	11,9	761
06	2,34±0,01	1,52±0,04	9,4±0,3	70±2	16,7	734
07	3,6±0,1	1,40±0,02	9,61±0,05	75±1	10,4	755
08	3,61±0,04	1,27±0,01	8,9±0,2	71±2	15,2	735
09	1,96±0,01	1,25±0,01	7,19±0,04	70±1	19,6	737
10	3,27±0,03	1,64±0,04	10,4±0,1	73±2	11,7	745
11	3,9±0,1	1,24±0,03	8,47±0,04	78±2	8,4	769
12	2,26±0,03	1,31±0,03	10,2±0,2	72±3	14,2	746
13	2,29±0,02	1,48±0,04	9,12±0,03	73±3	14,1	750
14	4,7±0,3	1,37±0,02	8,56±0,04	76±1	9,4	756
15	4,07±0,03	2,0±0,1	11,0±0,2	70,95±0,21	12,0	731
16	3,6±0,1	1,9±0,1	11,0±0,1	69,95±0,92	13,6	728
17	4,9±0,1	4,3±0,1	8,28±0,02	51,9±0,1	30,6	623
18	2,6±0,1	4,10±0,02	19,8±0,6	56,6±1,0	17	657
19	2,9±0,1	2,8±0,1	16,1±0,1	63,4±0,4	15,2	696
20	5,43±0,1	2,7±0,1	16,4±0,6	65,8±2,2	9,7	696
21	4,1±0,1	1,81±0,01	15,21±1,15	68,3±0,6	9,7	714

* Média e estimativa de desvio padrão de duplicatas.

¹. N x 6,25.

². Calculado por diferença: 100 – (%umidade + %cinzas + %proteína bruta + %lipídeos totais).

³. O valor calórico da amostra foi calculado pela soma das porcentagens de proteína bruta e carboidratos totais multiplicados pelo fator 4 (Kcal/g) somado ao teor de lipídeos totais multiplicado pelo fator 9 (Kcal/g).

5.2 MINERAIS

Os comprimentos de onda utilizados para as determinações dos minerais, os limites de detecção das curvas analíticas e os coeficientes angulares e lineares dessas mesmas curvas encontram-se na Tabela 10, sendo que o coeficiente de correlação para todos os elementos foi igual ou maior que 0,999. Na Tabela 11 encontram-se os valores de minerais das amostras analisadas.

Tabela 10: Comprimento de onda, limites de detecção e parâmetros da curva analítica para os elementos estudados.

Elementos	λ (nm)	Limite de detecção ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) ^a	Coeficientes da Regressão ^b	
			Angular	Linear
Cálcio	317,93	10	17272,8	-1191,2
Cobre	324,75	7	191144,0	6,1
Ferro	259,94	2	56976,0	14,4
Fósforo	178,28	57	841,0	-32,3
Potássio	766,49	398	199,8	5,0
Magnésio	279,08	27	2609,9	59,8
Manganês	257,67	1	49136,0	8,64
Zinco	213,86	1	272456,0	1,2

^a limite de detecção = 3 vezes o desvio-padrão de 10 leituras do branco.

^b número de pontos da curva analítica igual a 5.

Tabela 11: Teores de minerais* (mg/100g) presentes em nozes.

Amostras	Cobre	Manganês	Zinco	Sódio	Ferro	Cálcio	Magnésio	Fósforo	Potássio
01	0,57±0,01	1,41±0,04	1,73±0,04	2,9±0,7	2,94±0,03	77±1	100,4±1,8	189,8±3,3	456±6
02	0,45±0,01	1,1±0,1	1,49±0,01	-	2,32±0,02	69,7±0,5	88,5±0,5	156±2	410±4
03	0,50±0,01	1,20±0,02	1,55±0,01	5,2±0,4	2,52±0,02	68,5±0,2	89,4±0,4	163,1±1,3	411±4
04	0,41±0,01	4,5±0,1	0,86±0,01	1,37±0,13	1,83±0,04	44,8±1,1	87,0±1,2	175±10	274±5
05	0,12±0,02	3,6±0,1	0,84±0,11	-	1,75±0,05	33,9±0,3	83,84±2,44	158,1±4,8	215,2±3,4
06	0,37±0,01	3,0±0,1	1,16±0,04	1,41±0,03	2,35±0,03	44,3±1,3	76,6±2,2	175±3	315,2±7,2
07	0,20±0,01	1,17±0,01	0,94±0,02	0,91±0,03	1,93±0,02	49,3±0,6	80,7±0,4	190,4±0,9	307±2
08	0,31±0,01	4,7±0,1	0,70±0,02	2,8±0,2	1,50±0,04	43,5±0,5	95,6±2,6	152±5	228,1±5,6
09	0,47±0,01	3,8±0,1	1,08±0,02	1,90±0,03	2,55±0,05	33,8±0,7	99,14±2,34	180,5±3,3	317,7±6,8
10	0,40±0,01	6,1±0,1	1,45±0,02	2,6±0,2	2,01±0,03	36,2±0,7	103,1±1,7	237±4	422,6±7,5
11	0,35±0,01	2,14±0,01	1,07±0,01	0,41±0,01	2,21±0,03	33,5±0,3	95,0±0,8	179,6±1,6	287±3
12	0,34±0,01	1,59±0,07	1,41±0,02	2,0±0,2	2,03±0,03	43,8±0,4	90,7±0,4	176,3±1,2	303,9±3,4
13	0,36±0,01	3,5±0,1	1,12±0,01	0,60±0,04	1,88±0,01	43,4±0,3	88,1±1,4	220±2	324,3±5,5
14	0,49±0,01	2,00±0,04	1,04±0,01	1,4±0,1	2,48±0,02	36,8±0,5	98,1±0,9	208±5	300,2±2,5
15	1,07±0,01	5,80±0,01	4,75±0,02	1,5±0,4	2,07±0,03	40,0±0,4	142±2	351,4±0,6	554,4±4,2
16	1,52±0,03	5,7±0,2	3,2±0,1	4,4±1,4	1,72±0,04	43,7±0,4	125,1±2,3	289±6	433,4±7,5
17	1,04±0,03	0,87±0,02	1,61±0,04	559,8±0,7	3,07±0,01	115,1±2,5	97±2	530,5±3,4	910±9
18	0,8±0,1	0,8±0,1	1,6±0,1	700±12	2,55±0,21	103,4±0,1	104±2	425±12	1148±16
19	1,59±0,03	7,6±0,1	2,07±0,04	9,2±0,2	3,01±0,04	145±2	161,3±2,6	418,5±5,2	705±11
20	1,35±0,01	3,8±0,1	1,79±0,03	5,6±0,3	2,72±0,01	155,5±2,1	147±2	377±5	682±7
21	1,16±0,01	2,46±0,01	1,80±0,01	1,5±0,1	2,40±0,01	73,0±0,3	107,7±0,2	285,7±2,1	291,6±3,1

* Média e estimativa de desvio padrão de 5 determinações.

Os valores de sódio na amostra 5 não foram tabelados pois a amostra era torrada e salgada e os valores encontrados ficaram fora da curva de calibração, já a amostra 2 foi perdida. Os valores médios para minerais em macadâmia encontrados neste trabalho mostraram-se bem próximos aos da literatura (Cavaletto, 1983; Duke, 1989; Souci et al., 1989). Destacam-se os valores de potássio que se apresentaram, em comparação aos obtidos por Duke (1989) e Cavaletto (1983), 23% superiores. Os valores para cálcio nas amostras 1, 2 e 3 adquiridas no mercado local ficaram cerca de 75% acima da média encontrada para as macadâmias fornecidas pela Queen Nut Nozes Macadâmia. As nozes macadâmias plantadas no estado de São Paulo apresentaram valor médio de 300mg/100g de potássio estando bem próximo ao valor fornecido por Souci et al. (1989).

A macadâmia apresentou níveis semelhantes às outras nozes avaliadas para os minerais zinco, ferro e magnésio e, para os elementos manganês, fósforo e potássio, apresentou cerca de 40 a 50% do valor médio dessas nozes. Assim sendo, a macadâmia pode ser considerada uma boa fonte de fósforo e potássio.

No Anexo A estão os gráficos com os teores médios de minerais em nozes aqui avaliadas, sendo que o valor médio para sódio na amostra de pistache não foi colocado devido ao alto teor, 630mg/100g.

5.3 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

Nas Tabelas 12 e 13 foram relacionados os ácidos graxos presentes nas amostras de macadâmia e nas demais nozes analisadas neste trabalho. As Figuras 3A e 3B apresentam os cromatogramas dos padrões de ácidos graxos e do extrato de macadâmia, respectivamente. No anexo B estão os cromatogramas dos ácidos graxos de pecã, pistache, avelã e noz, e no Anexo C os gráficos com a distribuição das porcentagens de área dos ácidos graxos nas amostras de pecã, pistache, avelã e macadâmia.

Tabela 12: Composição de ácidos graxos* (% área) encontrados em nozes.

Amostras	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
01	0,58±0,02	7,76±0,02	16,0±0,1	3,14±0,13	65,1±0,2	1,58±0,01	2,67±0,02	2,49±0,01
02	0,79±0,01	9,72±0,13	20,2±0,6	2,6±0,1	61,01±0,42	1,92±0,04	1,81±0,14	1,54±0,02
03	1,14±0,04	9,8±0,3	19,8±0,7	3,26±0,05	60,4±0,6	1,7±0,01	1,9±0,2	1,91±0,13
04	0,49±0,01	5,7±0,1	10,4±0,1	2,61±0,04	44,38±0,03	1,23±0,04	1,87±0,03	2,02±0,05
05	0,54±0,03	5,48±0,12	10,65±0,03	2,65±0,04	43,9±0,3	1,0±0,1	1,7±0,1	2,0±0,1
06	0,70±0,02	6,9±0,1	13,7±0,1	3,8±0,1	68,1±0,3	1,19±0,03	2,69±0,5	2,7±0,1
07	0,71±0,01	7,50±0,04	13,76±0,12	3,95±0,03	67,0±0,3	1,42±0,02	2,6±0,1	3,0±0,1
08	0,44±0,01	8,22±0,02	12,8±0,1	3,5±0,1	67,8±0,2	1,93±0,04	2,64±0,15	2,7±0,2
09	0,56±0,01	7,74±0,02	15,54±0,03	4,58±0,02	64,9±0,1	1,22±0,01	2,33±0,03	3,10±0,02
10	0,62±0,01	8,1±0,1	15,8±0,1	3,77±0,03	64,7±0,1	1,52±0,01	2,61±0,03	2,96±0,04
11	0,83±0,01	7,4±0,1	14,0±0,1	3,78±0,04	67,0±0,1	1,55±0,03	2,7±0,1	2,8±0,1
12	0,62±0,02	7,8±0,1	15,63±0,15	3,85±0,03	65,2±0,1	1,60±0,01	2,5±0,1	2,9±0,1
13	0,68±0,01	7,79±0,03	16,2±0,1	3,7±0,1	65,1±0,2	1,40±0,01	2,33±0,03	2,78±0,12
14	0,91±0,02	8,0±0,1	17,5±0,2	4,02±0,03	62,6±0,2	1,63±0,02	2,6±0,1	2,78±0,03
15	ND	7,0±0,3	0,12±0,03	2,36±0,04	61,13±0,25	28,22±0,06	1,09±0,04	ND
16	ND	7,64±0,23	0,44±0,06	2,27±0,13	63,3±0,1	25,30±0,06	0,91±0,01	ND
17	ND	9,5±0,2	0,84±0,05	1,83±0,01	67,1±0,3	20,27±0,01	0,24±0,04	ND
18	ND	9,87±0,25	0,94±0,02	1,1±0,1	57,6±0,3	30,02±0,06	0,28±0,01	ND
19	ND	4,75±0,03	0,16±0,01	2,06±0,01	79,45±0,06	13,8±0,04	0,10±0,01	ND
20	ND	5,4±0,3	0,22±0,01	2,07±0,01	78,6±0,2	13,6±0,1	0,11±0,01	ND
21	ND	9,12±0,04	0,19±0,01	2,31±0,02	18,00±0,02	58,41±0,24	13,4±0,1	ND

* Média e estimativa de desvio padrão de 2 determinações.

ND – Não detectado.

Tabela 13: Composição de ácidos graxos¹ (g/100g²) encontrados em nozes.

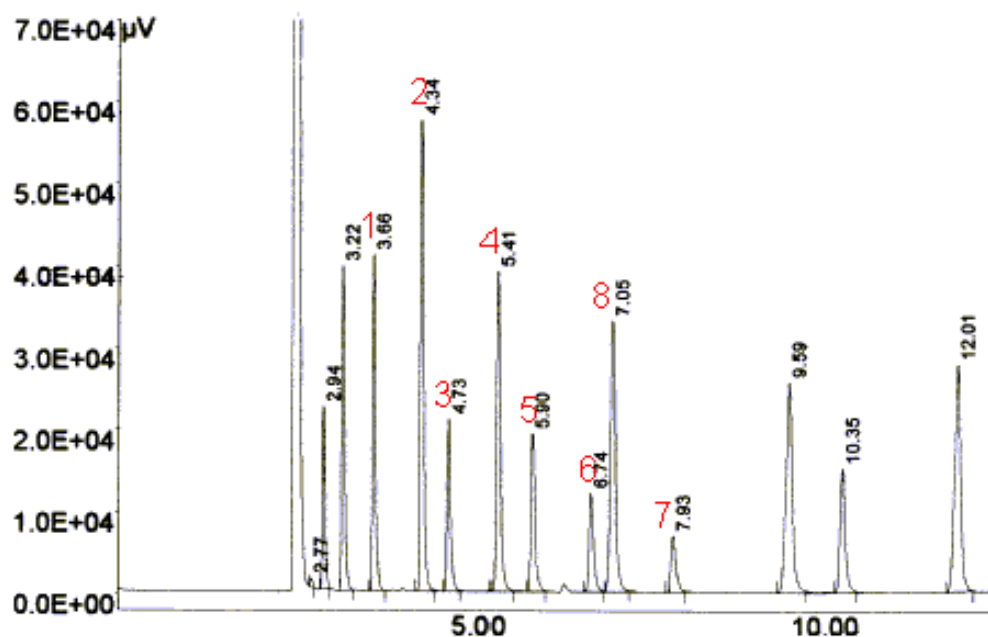
Amostras	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
01	0,41±0,02	5,52±0,02	11,4±0,1	2,2±0,1	46,4±0,2	1,12±0,01	1,90±0,02	1,77±0,01
02	0,54±0,01	6,7±0,1	13,9±0,4	1,8±0,1	42,1±0,3	1,32±0,03	1,3±0,1	1,06±0,02
03	0,77±0,02	6,6±0,2	13,2±0,4	2,20±0,03	40,7±0,4	1,14±0,01	1,3±0,1	1,3±0,1
04	0,49±0,01	5,7±0,1	10,4±0,1	2,61±0,04	44,38±0,03	1,23±0,04	1,87±0,03	2,02±0,05
05	0,54±0,03	5,48±0,12	10,65±0,03	2,65±0,04	43,9±0,3	1,0±0,1	1,7±0,1	2,0±0,1
06	0,5±0,01	4,94±0,02	9,7±0,1	2,7±0,1	48,52±0,02	0,9±0,3	1,92±0,01	2,1±0,1
07	0,50±0,01	5,34±0,04	9,81±0,12	2,81±0,03	47,7±0,3	1,02±0,02	1,90±0,05	2,2±0,1
08	0,31±0,01	5,85±0,02	9,1±0,1	2,50±0,04	48,3±0,2	1,39±0,02	1,9±0,2	1,9±0,2
09	0,40±0,01	5,5±0,1	11,1±0,1	3,26±0,01	46,22±0,02	0,87±0,01	1,67±0,02	2,20±0,01
10	0,44±0,01	5,77±0,04	11,3±0,1	2,6±0,1	46,0±0,1	1,08±0,01	1,87±0,03	2,09±0,02
11	0,59±0,01	5,21±0,05	10±0,1	2,7±0,04	47,68±0,01	1,11±0,01	1,93±0,04	2,0±0,1
12	0,43±0,01	5,5±0,1	11,12±0,15	2,75±0,02	46,42±0,05	1,14±0,01	1,8±0,1	2,0±0,1
13	0,48±0,01	5,54±0,01	11,6±0,1	2,59±0,03	46,47±0,01	1,0±0,1	1,65±0,01	1,93±0,03
14	0,65±0,02	5,7±0,1	12,5±0,2	2,87±0,01	44,53±0,12	1,16±0,02	1,8±0,1	1,99±0,02
15	ND	5,3±0,2	0,09±0,02	1,81±0,03	46,8±0,2	21,58±0,04	0,83±0,03	ND
16	ND	5,1±0,2	0,29±0,04	1,5±0,1	42,4±0,1	16,93±0,04	0,61±0,01	ND
17	ND	4,7±0,1	0,41±0,03	0,91±0,01	33,27±,13	10,06±0,01	0,12±0,02	ND
18	ND	5,34±0,13	0,51±0,01	0,57±0,04	31,16±0,13	16,24±0,03	0,15±0,01	ND
19	ND	2,88±0,02	0,10±0,01	1,25±0,04	48,16±0,03	8,17±0,02	0,06±0,01	ND
20	ND	3,4±0,2	0,14±0,01	1,3±0,04	49,45±,12	8,6±0,4	0,06±0,01	ND
21	ND	5,03±0,23	0,12±0,01	1,50±0,01	11,7±0,2	38,1±0,2	8,7±0,1	ND

¹ Média e estimativa de desvio padrão de 2 determinações.

² g/100g = % área x % lipídeos/100 x F de conversão (F = 0,956 para nozes de acordo com Holland et al (1994).

ND – Não detectado.

A



B

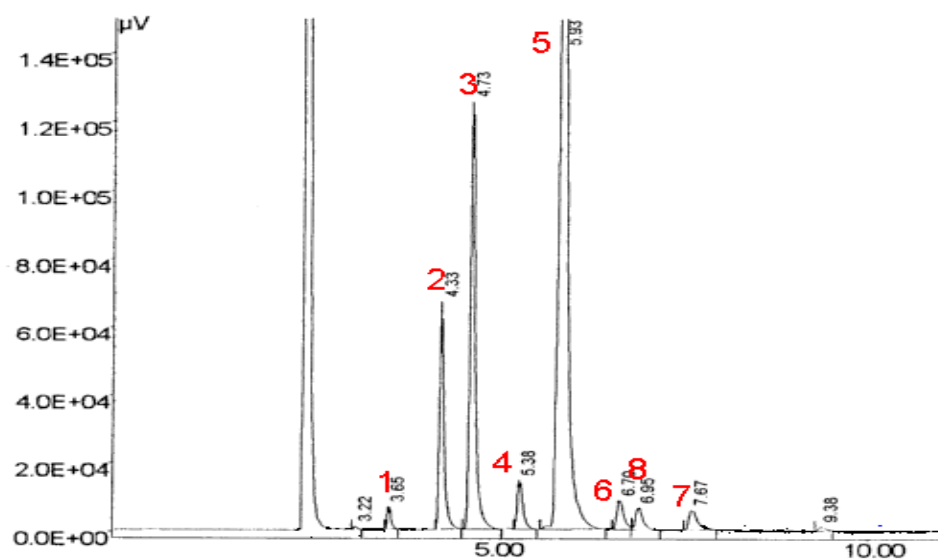


Figura 3: Cromatograma do padrão de ácidos graxos (A) e cromatograma de ácidos graxos em extrato de macadâmia (B). Condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88, com fase estacionária de propilenoglicol com temperatura de 180⁰C e hidrogênio como gás de arraste a 30mL/min, injetor split (1:100) com temperatura de 270⁰C e detector a 300⁰C. Picos: 1 – C14:0; 2 – C16:0; 3 – C16:1; 4 – C18:0; 5 – C18:1; 6 – C18:2; 7 – C18:3 e 8 – C20:0.

Os ácidos graxos encontrados nas amostras de macadâmia avaliadas apresentaram valores médios próximos aos de Cavaletto (1983) e Duke (1989), sendo que o C18:3 foi encontrado e o C22:0 não, diferindo dos dados dos autores.

As macadâmias apresentaram valores médios para os ácidos graxos C16:0 e C18:1 bem próximos aos valores médios das outras nozes avaliadas. O ácido graxo C16:1 presente nas nozes analisadas representou cerca de 2% do valor médio encontrado em macadâmia, já o C18:2 ficou 15 vezes menor nas macadâmias.

5.4 VITAMINA E

5.4.1 AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIA E MÓVEL

As colunas C₁₈ testadas neste trabalho não apresentaram resolução dos isômeros β- e γ-tocoferol em nenhuma das fases móveis testadas, já as colunas de sílica apresentaram um desempenho melhor como pode ser observado na Tabela 14. As colunas de sílica, tanto de 250 como 125mm de comprimento, apresentaram boa resolução dos quatros isômeros tocol e padrão interno com o uso da fase móvel composta por n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2) e vazão de 1,5mL/min, como pode ser observado na Figura 3. A coluna de Si-60 com dimensões de 125x4mm, 5μm da Merck, foi preferida por apresentar tempo total de corrida em torno de 18 minutos com completa eluição dos analitos, além de menor pressão.

Tabela 14: Separação dos isômeros de tocoferóis em diferentes condições cromatográficas.

Fase estacionária	Fase móvel	Resultado
LiChrospher 100 C18, 250x4mm, 5µm, Merck	metanol:água (90:10) a (99:1)	β- e γ-tocol coeluíram
Supelcosil C18, 150x4,6mm, 3µm, Supelco	metanol:água de 1 a 5% de água em metanol metanol:ácido acético (99,5:0,5)	β- e γ-tocol coeluíram
Econosphere C18, 150x4,6mm, 3µm, Alltech	metanol:água (95:5) metanol:acetonitrila:acetato de etila (80:15:05) metanol:água:n-hexano (98,5:1,0:0,5)	β- e γ-tocol coeluíram
Chrospher Si60, 250x4mm, 5µm, Merck	n-hexano:isopropanol (98:02) n-hexano:dioxano (98:02) n-hexano:acetato de etila (97:03) n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2)	β- e γ-tocol coeluíram boa separação dos isômeros
LiChrospher Si60, 125x4mm, 5µm, Merck	n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2)	boa separação dos isômeros

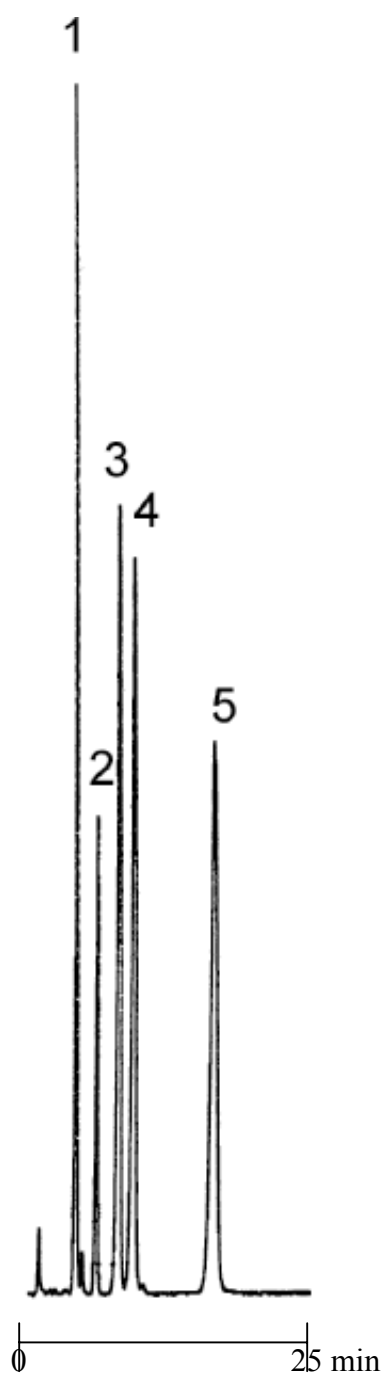


Figura 4: Cromatograma de isômeros tocol e padrão interno. Condições cromatográficas: coluna de sílica, fase móvel composta por n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2), vazão de 1,5mL/min e detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 292nm e emissão de 326nm. Picos: 1 - α -tocoferol; 2 - o-hidroxibifenil (padrão interno); 3 - β -tocoferol; 4 - γ -tocoferol e 5 - δ -tocoferol.

5.4.2 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Em se tratando de uma vitamina lipossolúvel, avaliou-se primeiramente os procedimentos de extração em relação aos lipídeos totais, sendo que os testes 3 e 5, extração por Bligh-Dyer e extração com acetona, respectivamente, foram os ensaios que apresentaram os melhores resultados. No estudo a extração por Bligh-Dyer (teste 3) formou muita emulsão, o que não foi notado no teste 5, sendo este escolhido para a extração da vitamina E.

Tabela 15: Avaliação da extração dos lipídeos em macadâmia

Teste	% lipídeos*
1	30 ± 1
2	58 ± 5
3	68 ± 1
4	32 ± 1
5	67 ± 3

* Média e estimativa de desvio padrão de determinações em duplicatas.

Numa segunda etapa foi avaliado a extração de tocoferóis em macadâmia, após adição de isômeros tocol, com acetona, sob diferentes condições. A Tabela 16 mostra a recuperação dos isômeros, sendo que o melhor resultado foi obtido com o tempo de um minuto e extrações de 50mL + 2x30mL de acetona, onde os tocoferóis obtiveram maiores recuperações e a amostra apresentou partículas de tamanho menor e mais homogênea.

Tabela 16: Avaliação dos procedimentos de extração

Volume de acetona (mL)	Tempo (segundos)	Recuperação dos padrões adicionados (%)*			
		α -tocol	β -tocol	γ -tocol	δ -tocol
50+2x30	30	81 $\pm$ 3	93 $\pm$ 0	110 $\pm$ 2	86 $\pm$ 4
50+2x30	60	85 $\pm$ 2	96 $\pm$ 3	112 $\pm$ 5	92 $\pm$ 0
50+2x30	90	36 $\pm$ 4	41 $\pm$ 5	47 $\pm$ 8	32 $\pm$ 4
50+30	60	61 $\pm$ 7	76 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	73 $\pm$ 2
30+30	60	53 $\pm$ 4	79 $\pm$ 7	92 $\pm$ 4	86 $\pm$ 6

* Média e estimativa de desvio padrão de determinações em duplicatas.

5.4.3 AVALIAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Não foi encontrado nenhum dos isômeros de tocoferóis nas amostras de macadâmia utilizadas neste estudo como pode ser observado na Figura 5 (página 56), que corresponde aos cromatogramas de extrato de macadâmia (A), cromatograma de extrato de macadâmia adicionado de padrão interno (B) e cromatograma de extrato de macadâmia adicionado de padrão interno e isômeros de tocoferóis (C).

5.4.4 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA

- Linearidade

As linearidades das curvas de calibração interna foram calculadas segundo Massart et al. (1988). A Tabela 17 mostra a regressão linear das curvas de padronização interna e a Tabela 18 os valores t calculado para avaliação da linearidade da curvas de regressão dos tocoferóis.

Nos Anexos D, E, F e G podem ser observados exemplos de curvas de calibração interna para os isômeros tocol.

Tabela 17: Regressão linear das curvas de padronização interna dos α -, β -, γ - e δ -tocoferol.

Tocoferol	a^1	b^2	r^3
α -tocol	0,00634	0,47829	0,999
β -tocol	0,00498	0,30353	0,999
γ -tocol	0,01576	0,32589	0,999
δ -tocol	0,02196	0,39983	0,999

¹ a = inclinação da curva.

² b = interseção com o eixo y, quando $x=0$.

³ r = coeficiente de correlação linear.

Tabela 18: Valores t calculado na avaliação da linearidade da curva de regressão dos tocoferóis.

Tocoferóis	t calculado
α -tocol	40,5
β -tocol	86,1
γ -tocol	74,5
δ -tocol	32,0

Considerando t tabelado igual a 2,776, com $n - 2$ graus de liberdade, podemos considerar a correlação linear com 95% de confiança (Massart et al., 1988).

- Limites de detecção e quantificação

Para a determinação do limite de detecção e quantificação foi determinado a regressão linear dos isômeros tocol em três concentrações inferiores ao ponto inicial da curva de calibração, injetados em triplicata, para a determinação da estimativa de resposta do branco (Y_{bl}). Para cada uma das concentrações foi determinado a estimativa de desvio padrão e calculado outra curva de regressão correspondente a concentração verso estimativa de desvio padrão, obtendo-se o desvio padrão do branco (S_{bl}). Com os valores Y_{bl} e S_{bl} calculados foram determinados os limites de detecção e quantificação com uso das fórmulas já descritas.

Na Tabela 19 estão as regressões lineares das curvas de calibração para os isômeros tocol e na Tabela 20 estão relacionados as medidas obtidas pela injeção em triplicata das concentrações dos isômeros tocol utilizados na determinação dos limites de detecção e quantificação. A Tabela 21 relaciona os valores da resposta do branco (Y_{bl}) e a Tabela 22 a estimativa de desvio padrão do branco (S_{bl}) obtidos para os isômeros tocol. A Tabela 23 apresenta os valores determinados para os limites de detecção e quantificação para cada isômero tocol.

Tabela 19: Regressão linear das curvas de calibração para os isômeros α -, β -, γ - e δ -tocoferol.

Tocoferol	a^1	b^2	r^3
α -tocol	67096	2076195	0,999
β -tocol	18125	1360213	0,999
γ -tocol	42661	1457037	0,999
δ -tocol	75572	1787620	0,999

¹ a = inclinação da curva.

² b = interseção com o eixo y, quando $x=0$.

³ r = coeficiente de correlação linear.

Tabela 20: Concentrações, área do pico cromatográfico, média da área e estimativa de desvio padrão utilizados nos cálculos de limite de detecção e quantificação dos isômeros tocol.

Isômero tocol	Concentração (µg/mL)	Área do pico cromatográfico			Média	s*
		1	2	3		
α -tocol	0,2	47255	442306	454128	454128	16718
	0,3	673701	657132	655396	655396	19231
	0,4	862163	866116	871163	871163	12324
β -tocol	0,5	697157	699345	696863	697788	1356
	0,8	1058761	1050793	1013229	1040928	24316
	1,0	1373131	1385245	1460810	1406395	47512
γ -tocol	0,5	804507	813117	811616	809747	4599
	0,8	1200364	1195316	1183897	1193192	8436
	1,1	1572357	1543353	1613159	1576290	35069
δ -tocol	0,4	686313	684840	659271	676808	15205
	0,6	1039227	982342	978127	999899	34124
	0,8	1355209	1285647	1259046	1299967	49655

* s = estimativa de desvio padrão.

Tabela 21: Regressão linear da curva padrão da concentração dos isômeros tocol verso área.

Isômero tocol	$Y_{bl}(a)$ ¹	b^2	r^3
α -tocol	34676,5	2085175	0,999
β -tocol	-21612	1395629	0,991
γ -tocol	171019	1277572	1
δ -tocol	57486	1557897	0,999

¹ $Y_{bl}(a)$ = estimativa da resposta do branco.

² b = interseção com o eixo y, quando x=0.

³ r = coeficiente de correlação linear.

Tabela 22: Regressão linear da curva de concentração dos isômeros tocol verso estimativa de desvio padrão (s)

Isômero tocol	$S_{bl}(a)^1$	b^2	r^3
α -tocol	22682	-21970	-0,628
β -tocol	-45423	91066	0,993
γ -tocol	-24592	50783	0,918
δ -tocol	-18680	86125	0,998

¹ $S_{bl}(a)$ = desvio padrão do branco.

² b = interseção com o eixo y, quando $x=0$.

³ r = coeficiente de correlação linear.

Tabela 23: Limite de detecção e quantificação para tocoferóis.

Tocoferóis	Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)
α -tocol	0,03	0,07
β -tocol	0,07	0,20
γ -tocol	0,10	0,17
δ -tocol	0,04	0,08

- Exatidão

Na avaliação da exatidão do método foi utilizado a recuperação dos isômeros tocol adicionados ao branco e amostra de macadâmia e a fórmula proposta por Massart et al. (1988) para avaliar estatisticamente a diferença, utilizando a distribuição Student's t .

Na Tabela 24 estão relacionados as recuperações obtidas no branco (análise sem a presença da matriz) e na Tabela 25 as recuperações na amostra de macadâmia.

Tabela 24: Recuperação analítica dos isômeros tocol adicionado ao branco.

Isômero	Adicionado (µg/mL)	Recuperado (µg/mL)	Recuperação (%)	Média	s^1	CV ² (%)
α -tocol	0,6	0,59-0,60-0,58	99,0-100,4-97,4			
	1,1	1,07-1,1-1,08	97,0-100,0-98,0	97	2	2
	1,5	1,43-1,43-1,45	95,0-95,0-96,5			
β -tocol	1,6	1,54-1,60-1,59	96,0-100,3-99,5			
	2,6	2,56-2,56-2,55	98,5-98,5-98,0	99	1	1
	3,6	3,59-3,57-3,51	99,8-99,1-97,5			
γ -tocol	1,6	1,61-1,72-1,70	100,7-107,4-106,4			
	2,7	2,82-2,75-2,82	104,6-102,0-104,6	103	2	2
	3,7	3,80-3,77-3,76	102,7-102,0-101,6			
δ -tocol	1,1	0,95-0,99-0,96	86,1-90,0-87,2			
	1,9	1,64-1,66-1,68	86,2-87,6-88,7	89	2	3
	2,6	2,38-2,37-2,39	91,4-91,0-92,0			

¹ s = estimativa de desvio padrão.

² CV = Coeficiente de variação.

Tabela 25: Recuperação analítica dos isômeros tocol adicionado a amostra de macadâmia.

Isômero	Adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperado ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Média	s^1	CV ² (%)
α -tocol	0,6	0,56-0,55-0,56	93,5-91,3-93,9	95	2	2
	1,1	1,08-1,05-1,04	98,0-95,8-94,9			
	1,5	1,44-1,41-1,44	96,1-94,0-96,0			
β -tocol	1,6	1,54-1,57-1,52	96,1-98,2-94,7	98	2	2
	2,6	2,54-2,53-2,58	97,7-97,4-99,4			
	3,6	3,61-3,67-3,59	100,2-101,9-99,7			
γ -tocol	1,6	1,52-1,52-1,55	95,1-95,1-96,6	100	3	3
	2,7	2,71-2,69-2,75	100,4-99,5-101,8			
	3,7	3,73-3,77-3,75	100,9-101,9-101,3			
δ -tocol	1,1	1,09-1,07-1,1	99,4-97,7-100	102	2	2
	1,9	1,97-1,96-1,93	103,6-103,2-101,5			
	2,6	2,68-2,67-2,65	103-102,5-102,1			

¹ s = estimativa de desvio padrão.² CV = Coeficiente de variação.

Segundo as referências consultadas, os valores reportados para recuperação de tocol homólogos ficam entre 93 – 103% para α -tocol, 88 – 103% para β -tocol, 93 – 100% para γ -tocol e 93 - 101% para δ -tocol (Carpenter, 1979; Speek et al., 1985; Yao et al., 1992; Ulberth et al., 1992; Lavedrine et al., 1997; Gimeno et al., 2000; Schieber et al., 2002). Os valores encontrados nas recuperações procedidas em amostra de macadâmia adicionada de isômeros tocol apresentaram níveis próximos aos referendados.

Na avaliação estatística entre as recuperações procedidas no branco e amostra nos três níveis de adição dos isômeros tocol para $n = 9$, o t tabelado para $n_1 + n_2 - 2$ ao nível de confiança de 95% é $t_{95;16} = 2,120$ (Massart et al., 1988). Os valores t obtidos foram: α -tocol $t_{ob} = 2,733$; β -tocol $t_{ob} = 0,354$; γ -tocol $t_{ob} = 1,92$ e δ -tocol $t_{ob} = 13,26$, onde observamos diferença significativa nas recuperações dos isômeros α - e δ -tocol ao nível de confiança de 95% nas recuperações entre branco e amostra. Esta diferença sugere que a matriz interfere na recuperação do α - e δ -tocol presentes na amostra de macadâmia, provavelmente pela grande quantidade de óleo presente na amostra que deforma o pico cromatográfico e dificulta a triangulação.

Para a determinação em paralelo utilizando-se a metodologia desenvolvida neste trabalho e a recomendada pela COST 91, já que em amostras de macadâmia não foram detectados tocoferóis, foi utilizada a mistura das nozes avelã 19 e 20 por apresentarem níveis consideráveis da vitamina. Os resultados estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Resultados obtidos na análise em paralelo entre o método desenvolvido e o recomendado pela COST 91.

Isômeros	Método desenvolvido			COST 91		
	M ¹	s ²	CV ³ (%)	M ¹	s ²	CV ³ (%)
α -tocol	20 ^a	2	10	22 ^a	1	5
β -tocol	0,11 ^a	0,01	9	0,12 ^a	0,02	17
γ -tocol	3,9 ^a	0,2	5	4,0 ^a	0,3	8
δ -tocol	nd			nd		

¹ M = Média de quatro determinações.

² s = estimativa de desvio padrão.

³ CV = coeficiente de variação.

^a Médias na mesma linha com letras iguais não apresentam diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Na avaliação estatística entre os valores obtidos na utilização do método desenvolvido e o recomendado pela COST 91, para $n = 4$, o t tabelado para $n_1 + n_2 - 2$ ao nível de confiança de 95% é $T_{95, 6} = 2,447$ (Massart et al., 1988). Os valores t obtidos foram: α -tocol $t_{ob} = 1,155$, β -tocol $t_{ob} = 0,901$ e γ -tocol $t_{ob} = 0,555$, onde não foi observado diferença significativa ao nível de confiança estabelecido.

- Repetibilidade

Na avaliação da repetibilidade foi utilizada a mistura das amostras de avelã 19 e 20, sendo procedido dez repetições analíticas. Os valores obtidos estão na Tabela 27.

Tabela 27: Valores obtidos no teste de repetibilidade.

Isômero tocol	Média da concentração ¹ (mg/100g)	s^2	CV ³ (%)
α -tocol	22,6	2,2	10
β -tocol	0,09	0,02	19
γ -tocol	3,9	0,3	8
δ -tocol	nd		

¹ Média de 10 determinações analíticas.

² s = estimativa de desvio padrão.

³ CV = coeficiente de variação.

Os coeficientes de variação obtidos pela fórmula de Horwitz foram: 10% para α -tocoferol, 23% para β -tocoferol e 13% para γ -tocoferol. Estando os valores obtidos na análise inferiores aos calculados pela fórmula de Horwitz, a variação é tida como aceitável.

5.4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NOZES QUANTO AOS TOCOFERÓIS

Na Tabela 28 estão relacionados os teores de tocoferóis encontrados em macadâmia e outras nozes utilizadas no estudo.

Nas amostras de macadâmia utilizadas neste trabalho não foram encontrados tocoferóis, apesar da macadâmia ser uma noz com alto teor de lipídeos. Embora Kaijser et al. (2000) mencionar a presença de α - e δ -tocoferol em macadâmia nos níveis de 0,8 a 1,1 e 3,5 a 4,7 respectivamente, e Cavaletto (1893) apenas mencionar a presença, neste estudo foi utilizado co-cromatografia para verificar que os compostos da amostra não eram os analitos como pode ser visto na Figura 5.

Tabela 28: Teores de tocoferóis* encontrados em nozes

Amostras	α -tocoferol (mg/100g)	β -tocoferol (mg/100g)	γ -tocoferol (mg/100g)	δ -tocoferol (mg/100g)	Vitamina E (UI/100g)
1-14	ND	ND	ND	ND	ND
15	0,6 $\pm$ 0,1	ND	15,0 $\pm$ 0,3	ND	3
16	0,54 $\pm$ 0,04	ND	15 $\pm$ 1	ND	3
17	2,37 $\pm$ 0,03	ND	46,0 $\pm$ 0,6	ND	10
18	0,49 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,01	28 $\pm$ 2	ND	5
19	25,8 $\pm$ 1,4	ND	13,9 $\pm$ 0,5	ND	30
20	16 $\pm$ 1	0,35 $\pm$ 0,03	3,0 $\pm$ 0,3	ND	18
21	0,29 $\pm$ 0,02	ND	17 $\pm$ 1	ND	3

* Média e estimativa de desvio padrão de três determinações.

ND = não detectado.

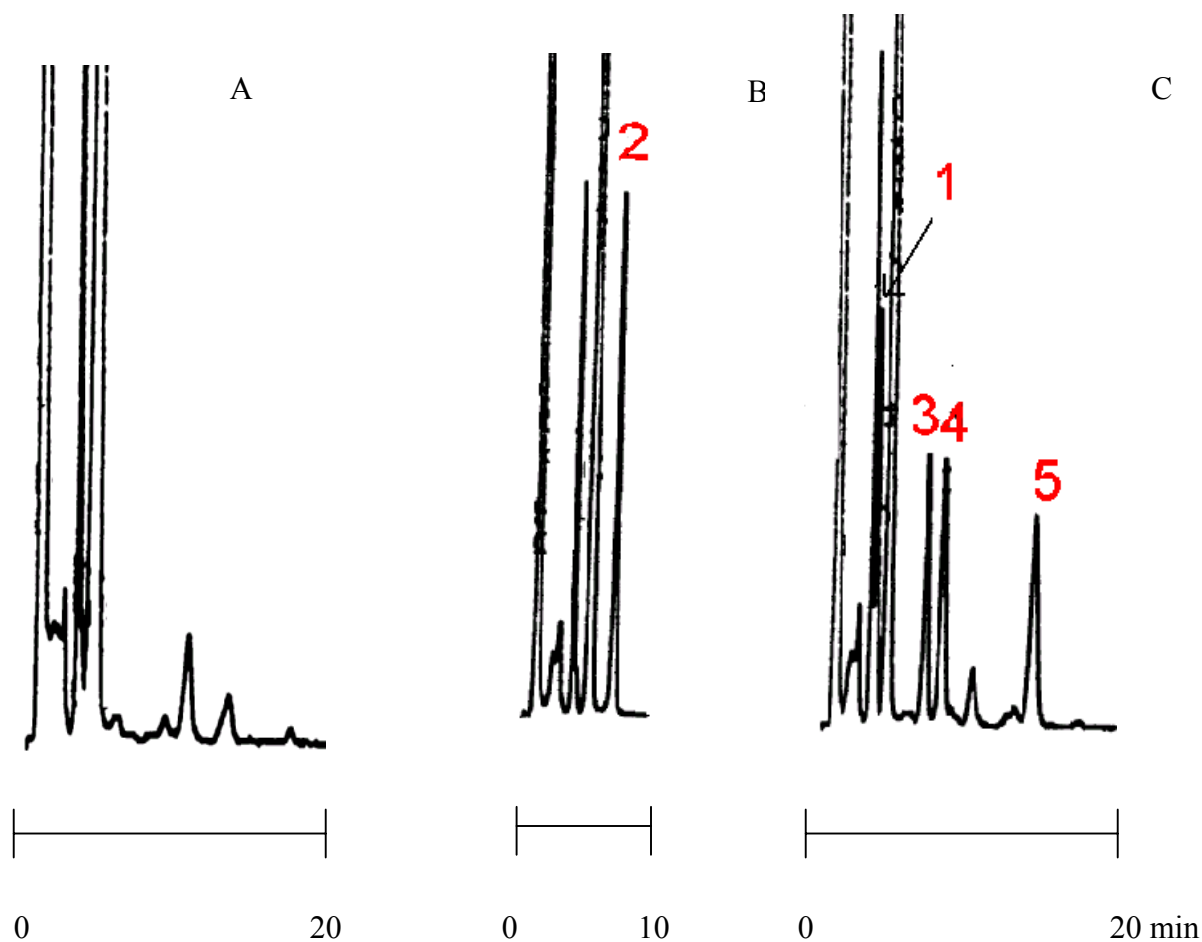


Figura 5: Cromatograma do extrato de macadâmia (A), cromatograma de extrato de macadâmia adicionado de padrão interno (B) e cromatograma do extrato de macadâmia adicionado de isômeros de tocoferóis (C). Condições cromatográficas: coluna de sílica, fase móvel composta por n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2), vazão de 1,5mL/min e detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 292nm e emissão de 326nm. Picos: 1 - α -tocopherol; 2 - o-hidroxibifenil (padrão interno); 3 - β -tocopherol; 4 - γ -tocopherol e 5 - δ -tocopherol.

No anexo H estão os cromatogramas dos tocoferóis em extratos de pecã, pistache, avelã e noz.

As demais nozes estudadas apresentaram grandes variações entre o valor tabelado e o encontrado, esta diferença pode ser devido ao tipo de processamento recebido pela amostra, tempo e forma de estoque no mercado. O β -tocoferol não tem valor tabelado por Souci et al. (1989) e Duke (1989) para as nozes utilizadas neste trabalho. Somente para noz os dois autores apresentam valores para α - e γ -tocoferol, sendo que o α -tocol varia de 1,9 a 15mg/100g e o γ -tocol de 0,5 a 41,4mg/100g segundo Souci et al. (1989) e Duke (1989), esta grande variação pode ser ocasionado pela variabilidade da amostra e pelo método de análise utilizado.

6 CONCLUSÕES

- Os valores médios encontrados para as amostras de macadâmia quanto a umidade, cinzas e carboidratos são comparáveis aos das outras nozes avaliadas neste estudo, exceto para os valores de proteína que foram menores e lipídeos maiores em comparação à pecã, pistache, avelã e nozes (*Prunus sp*).
- Os teores de ferro e manganês ficaram próximos entre as amostras de macadâmia e demais nozes e os demais minerais apresentaram teores menores nas amostras de macadâmia. O teor de cálcio e potássio nas macadâmias ficaram próximos as amostras de pecã, e a noz (*Prunus sp*) apresentou valores para potássio próximos a macadâmia.
- Ácido graxo encontrado em maior concentração foi o C18:1 em todas as amostras exceto na noz (*Prunus sp*). O ácido graxo C16:1 foi maior e C18:2 menor na macadâmia do que nas outras nozes. O ácido graxo C18:3 apresentou maior teor na noz (*Prunus sp*) seguido das amostras de macadâmia e menor teor nas demais amostras.
- A coluna de sílica e a fase móvel composta por n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2), com vazão de 1,5mL/min e eluição isocrática, permitiram a resolução dos

isômeros α -, β -, γ - e δ -tocoferol e do padrão interno o-hidroxibifenil, num tempo total de 18 minutos com completa eluição dos analitos.

- Os limites de detecção e recuperação do método proposto para a análise dos tocoferóis foram respectivamente 0,03 μ g/mL e 95% para α -tocol, 0,07 μ g/mL e 98% para β -tocol, 0,10 μ g/mL e 100% para γ -tocol e 0,04 μ g/mL e 102% para δ -tocoferol.
- Não foi encontrado nenhum dos tocoferóis nas amostras de macadâmia. O α -tocoferol e o γ -tocoferol foram encontrados nas outras nozes, o β -tocoferol apenas em uma amostra de pistache e uma de avelã e o δ -tocoferol não foi encontrado em nenhuma amostra. Os valores encontrados variaram grandemente entre as amostras de pistache e avelã.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *Journal of Chromatography A*, vol. 881, p. 197-216, 2000.

ABIDI, S.L. & MOUNTS, T.L. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, vol. 782, p. 25-32, 1997.

AKE, M.; FABRE, H.; MALAN, A.K.; MANDROU, B. Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powdered milk and local flour: a validation procedure. *Journal of Chromatography A*, vol. 826, p. 183-189, 1998.

AMES, S.R. Determination of Vitamin E in Foods and Feeds – A Collaborative Study. *Journal Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 54, nº 1, p. 1-12, 1971.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – Approved Methods, 8th ed., vol. II, AACC, St. Paul, 1990 (Método 46-12).

APROMESP – ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE MACADÂMIA DO ESTADO DE SÃO PAULO [S.L., 1998?]. Disponível em: <http://www.proservi.com/apromesp/macnut.htm>. Acesso em 29/01/2003.

AUGUSTIN, J.; KLEIN, B. P.; BECKER, D.; VENUGOPAL, P. B. *Methods of Vitamin Assay*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1985. 590 p.

AZZI, A.; RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. Non-antioxidant molecular functions of α -tocopherol (vitamin E). *FEBS Letters*, vol. 519, p. 8-10, 2002.

BALL, G. F. M. Applications of HPLC to the Determination of Fat-Soluble Vitamins in Foods and Animal Feeds – A Review 1977-87, *Journal Micron. Anal.*, vol. 4, p. 255-283, 1988.

BIRINGER, M.; DROGAN, D.; BRIGELIUS-FLOHE, R. Tocopherols are metabolized in HepG2 cells by side chain ω -oxidation and consecutive β -oxidation. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 31, n° 2, p. 226-232, 2001.

BONVEHI, J.S.; COLL, F.V.; RIUS, I.A. . Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils, formulated preparations, and biscuits. *Journal of A .O.A .C. International*, vol. 83, n° 3, p. 627-634, 2000.

BOURGEOIS, C. Determination of Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols. London: Elsevier Science Publishers Ltd, 1992. 162 p.

BOURGEOIS, C.F.; HEL, S.H.; BELLLOT, J-P.; GEORGE, P.R.; SLOMIANNY, C.A. . Disposable Cartridge Extration of Retinol and α -Tocopherol from Feedstuffs. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 68, n° 6, p. 1121-1125, 1985.

BLATT, D.H.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Vitamin E Kinetics and the Function of Tocopherol Regulatory Proteins. *Nutrition*, vol. 17, p. 799-805, 2001.

BRUBACHER, G.; MÜLLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. Methods for the Determination of Vitamins in Food. Recommended by COST 91., New York: Elsevier Applied Science Publishers Co., Inc., 1985. 166 p.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; GUERRINI, A.; SCALIA, S.; POLI, F.; ROMAGNOLI, C.; MUZZOLI, M.; SACCHETTI, G. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild

Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. Food Chemistry, vol. 77, p. 337-341, 2002.

CARLUCCI, G.; MAZZEO. P.; Del GOVERNATORE, S.; Di GIACOMO,G.; Del RE, G. Liquid chromatographic method for the analysis of tocopherols in malt sprouts with supercritical fluid extration. Journal of Chromatography A, vol. 935, nº 1-2, p. 87-91, 2001.

CARPENTER, A .P.Determination of Tocopherols in Vegetable Oils. Journal of the Amer. Oil Chem. Society, vol. 56, p. 668-671, 1979.

CAVALETTO, C. G. Macadamia Nut. In CHAN, H. Jr (Ed.). Hanbook of Tropical Foods. New York: Marcel Dekker, Inc., 1983. p.361-397.

CHU, Y.H. & KUNG, Y.L. A study on vegetable oil blends.Food Chemistry, vol.62, nº 2, p. 191-195, 1998.

COORS, Von U. Anwendung des Tocopherolmusters zur Erkennung von Fett – und Övermischungen. Fat Sci. Technol., vol. 93, nº 4, p. 519-526, 1991.

COSTA NETO, P.L.O. Estatística. 2ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2002. p. 177-228.

CUNNIFF, P. Official Methods of Analysis of AOAC internacional, 6th ed, vol. II, Maryland, 1998.

CURRIE, L.A. Detection: International update, and some emerging di-lemmas involving calibration, the blank, and multiple detection decisions. Chemometrics and Intelligent Systems, vol. 37, p. 151-181, 1997.

DE LEENHEER, A P.; LAMBERT, W. E.; NETIS, H.J. Modern Chromatographic Analysis of Vitamins. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992. 575 p.

De LORGERIL, M. & SALEN P. Fish and N-3 fatty Acids for the Prevention and Treatment of Coronary Heart Disease: Nutrition Is Not Pharmacology. The American Journal of Medicine, vol. 112, p. 326-319, 2002.

DELGADO-ZAMARRENO, M.M.; BUSTAMANTE-RANGEL, M.; SANCHEZ-PEREZ, A.; HERNANDEZ-MENDEZ, J. Analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts and without coupled hydrolysis by liquid chromatography and coulometric detection. Journal of chromatography A, vol. 935, nº 1-2, p. 77-86, 2001.

DESAI, I.D.; MACHLIN, L.J. Vitamin E. In: Augustin, J; Klein, B.P.; Becker, D. (Ed.). Methods of Vitamin. New York: Assay. John Wiley & Sons, Inc, 1985. p. 255-283.

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

DUKE, J. A . Handbook of Nuts. New York: CRC Press, Inc., 1989. p. 343.

EL-SHAMI, S.M.; EL-NEGOUMY, S.I. Tocopherols and flavonoids of SOS-7 halophyte. Grasas y Aceites, vol. 44, Fase 4-5, p. 249-252, 1993.

ESCRIVÁ, A.; ESTEVE, M.J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. Journal of Chromatography A, vol. 947, p. 313-318, 2002.

GALLO-TORRES, H. E. Absortion: transport and Metabolism. In: MACHLIN, L. J. (Ed). Vitamin E: A Comprehensive Treatise Marcel. New York: Dekker, Inc., 1980. p. 170-267.

GIMENO, E.; CASTOLLOTE, A . I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; de la TORRE, M. C. Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 881, p. 251-254, 2000.

GLADE, M.J. Annual Symposium, American College of Nutrition, Washington, DC, October 1-4, 1999. *Nutrition*, vol.16, p. 1119-1121, 2000.

HOLLAND,B.; WELCH, A .A .; UNWIN, I.D; BUSS, D.H.; PAUL, A .A .; SOUTHGATE, D.A The Composition of Foods. In: McCANCE, R.A .& WIDDSON, E..M. (ED.) *The Composition of Foods*, 5 ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1994. p. 9.

HORTMAN, L.; LAGO, R.C.A Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab.Practics*, vol. 22, p. 475-481, 1973.

IWASE, H. Determination of tocopherol acetate in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, vol. 881, nº1-2, p. 243-249, 2000.

JAYMES. R.A. *Handbook of North American Nut Trees*. New York: The W. F. Humphrey Press, Inc., 1969. 421 p.

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

KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, vol. 31, nº 7, p. 671-701, 1996.

KAMAL-ELDIN, A.; GÖRGEN, S.; PETTERSON, J.; LAMPI, A. Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols – Composition of different chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, vol. 881, p. 217-227, 2000.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, n° 11, p. 5178-5185, 2001.

KAYDEN, H. J. The Genetic Basis of Vitamin E Deficiency in Humans. *Nutrition*, vol. 17, p. 797-798, 2001.

KUTSKY, R. J. *Handbook of Vitamins and Hormones*. New York: Von Nostrand Reinhold Company, 1973. 278 p.

LAVEDRINE, F.; RAVEL, A.; POUPARD, A.; ALARY, J. Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC. *Food Chemistry*, vol. 58 n° 1-2, p. 135-140, 1997.

LI, S.X.; CHERIAN, G.; AHN, D.U.; HARDIN, R.T.; SIM, J.S. *Journal Agric. Food Chem.*, vol. 44, p. 3830-3834, 1996.

LUQUE-GARCIA, J. L.; de CASTRO, M. D. L. Extration of fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*, vol. 935, n° 1-2, p. 3-11, 2001.

McCANCE, RA & WIDDSON, E.M. *The Composition of Foods*, 5 ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1994. 462 p.

MACHLIN, L. J. Vitamin E. In L. J. MACHLIN, L. J. (Ed). *Handbook of Vitamins*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p.99-144.

MASON, R. L.; Mc CONACHIE, I. A hard nut to crack. A review of the Australian macadamia nut industry. Food Australia, vol. 46, n° 10, p. 466-471, 1994.

MASSART, D.L.; VANDEGINSTE, B.G.M.; DEMING, S.N.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. Chemometrics: a textbook. New York: Elsevier Science Publishers Company Inc., 1988. 488 p.

MELCHERT, H.-U. & PABEL, E. Quantitative determination of α -, β -, γ - and δ -tocopherols in human serum by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives with a two-step sample preparation. Journal of Chromatography A, vol. 896, p. 209-215, 2000.

NAS-NEC. Recommended Dietary Allowances. Washington, DC: National Academy of Sciences – national Research Council., 10 ed., 1989. 285 p.

NRC (National Research Council) – Dietary Reference Intakes: for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. Washington, D.C.: National Academic Press, 2000. 506 p.

O'BRIEN, R.D. Fats and Oils: Formulating and Proteins for Applications. Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc., 1998. 667 p.

OSTERLÖF, G.; NYHEIM, A. The estimation of α -tocopherol in biological material by gas chromatography. Journal of Chromatography, vol. 183, n° 4, p. 487-491, 1980.

OSUMA-GARCÍA, J.A.; WALL, M.M.; WADDELL, C.A. Endogenous Levels of Tocopherols and Ascorbic Acid during Fruit Ripening of New Mexican-Type Chile (*Capsicum annuum* L.) Cultivars. Journal Agric. Food Chem., vol. 46, p. 5093-5096, 1998.

PALIPANE, K. B.; DRISCOLL, R. H. The Thin-Layer Drying Characteristics of Macadamia In-shell Nuts and Kernels. *Journal of Food Engineering*, vol. 23, nº 2, p. 129-144, 1994.

PARRISH, D.B. Determination of vitamin E in Food s – A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 10, nº 10, p. 161-187, 1980.

PEDROSO, E.R.P. Água e eletrólitos,. In: OLIVEIRA, J.E.D.; MARCHINE, J.S. (Ed.). *Ciências Nutricionais*, São Paulo: Savier, 1998. p. 107-163.

PSOMIADOU, E. & TSIMIDOU, M. Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls for Monitoring Their Effects on Virgin Olive oil Oxidation. *Journal Agric. Food Chem.*, vol. 46, p. 5132-5138, 1998.

PYKA, A. & SLIWIOK, J. Chromatographic separation of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, vol. 935, p. 71-76, 2001.

QUATTROCCHI, O.A., ANDRIZZI, S.A., LABA, R.F. Introducción a la HPLC – Aplicación y Práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S A, 1992. p. 301-328.

REJÓN, F.R.; MARTIN-PENÁ, G.; GRANADO, F.; RUIZ-GALIANA, J.; BLANCO, I.; OLMEDILLA, B. Palma Status of Retinol, α - and γ -Tocopherols, and Main Carotenoids to First Myocardial Infarction: Case Control and Follow-up Study. *Nutrition*, vol. 18, p. 26-31, 2002.

ROBINSON, D.S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A ., 1991. 516 p.

RUPÉREZ, F.J.; BARBAS, C.; CASTRO, M.; MARTINEZ, S.; HERERA, E. Simplified method for vitamin E determination in rat adipose tissue and mammary glands by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 823, p. 483-487, 1998.

RUPÉREZ, F.J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices.

SANTOS, T.M. Lipídeos . In: OLIVEIRA, J.R.; MARCHIN, J.S. Ciências Nutricionais. São Paulo: Sarvier Editora d Livros Médicos Ltda, 1998, p. 87-98.

SCHIEBER, A.; MARX, M.; CARLE, R. Simultaneous determination of carotenes and tocopherols in ATBC drinks by high-performance liquid chromatography. Food Chemistry, vol. 76, p. 357-362, 2002.

SCOTT, C. G.; COHEN, N.; RIGGIO, P. P. Gas Chromatographic Assay of the Diasteriomic Composition of *all-rac*- α -tocopheril acetato, Lipids, vol. 17, n° 2, p. 97-101, 1982.

SEBRELL, W. H. Jr; HARRIS, R. S. The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology, Methods. New York: Academic Press, Inc., 1972. 422 p.

SEPULVEDA, R.T. & WATSON, R.R. Treatment of antioxidant deficiencies in AIDS patients. Nutrition Research, vol. 22, p. 27-37, 2002.

SHIN, T-S.; GODBER, J. S Improved High – Performance Liquid Chromatography of Vitamin E Vitamers on Normal-Phase Columns. Journal Am. Oil Chem. Soc., vol. 70, n° 12, p. 1289-1291, 1993.

SOBCZAK, A.; SKOP, B.; KULA, B. Simultaneous determination of serum retinol and α - and γ -tocopherol levels in type II diabetic using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography B, vol. 730, p. 265-271, 1999.

SOUCL, S.W.; FACHMANN, W.; KRAUT, H. Food Composition and Nutrition Tables 1989/90, 4th ed, Wissenschaftliche Verlags gesellschaft melt Stuttgart, 1028 p., 1989.

SCOTT, C.G.; COHEN, N.; RIGGIO, P.P. Gas Chromatographic Assay of the Diastereomeric Composition of all-rac- α -tocopheril acetato. Lipids, vol. 17, p. 97-101, 1982.

SPEEK, A.J.; SCHRIJVER, J.; SCHREURS, W.H.P. Vitamin E Composition of Some Seed Oils as Determination by High - Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. Journal of Food Sci., vol. 50, p. 121-124, 1985.

TAN, B. Palm Carotenoids, Tocopherols and Tocotrienols,. Journal Am. Oil Chem. Soc., vol. 66, n° 6, p. 770-776, 1989.

TRAKUR, M.L. & SRIVASTAVA, U.S. Vitamin-E metabolism and its application. Nutrition Research, vol. 16, n° 10, p. 1767-1809, 1996.

TURNER, C. & MATHIASSEN, L. Determination of vitamin A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up. Journal of Chromatography A, vol. 874, p. 275-283, 2000.

ULBERTH, Von F.; REICH, H.; KNEIFEL, W. Zur Analytik von Tocopherolen – Ein Methodenvergleich zwischen HPLC und GC. Fat Sci. technol., vol. 94, n° 2, p. 51-54, 1992.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE / FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. [S.I.], c2001. Situação e perspectiva da macadâmia no mundo. Disponível em: <http://www.faz.usda.gov/htp2/circular/1999/99-03/macadamia.htm-18k>. Acesso em 29/01/2003.

YAO, F.; DULL,G.; EITENMILLER, R. Tocopherol Quatification by HPLC in Pecans and Relationship to kernel Quality during Stocage. Journal of Food Sci., vol. 57, n° 5, p. 1194-1197, 1992.

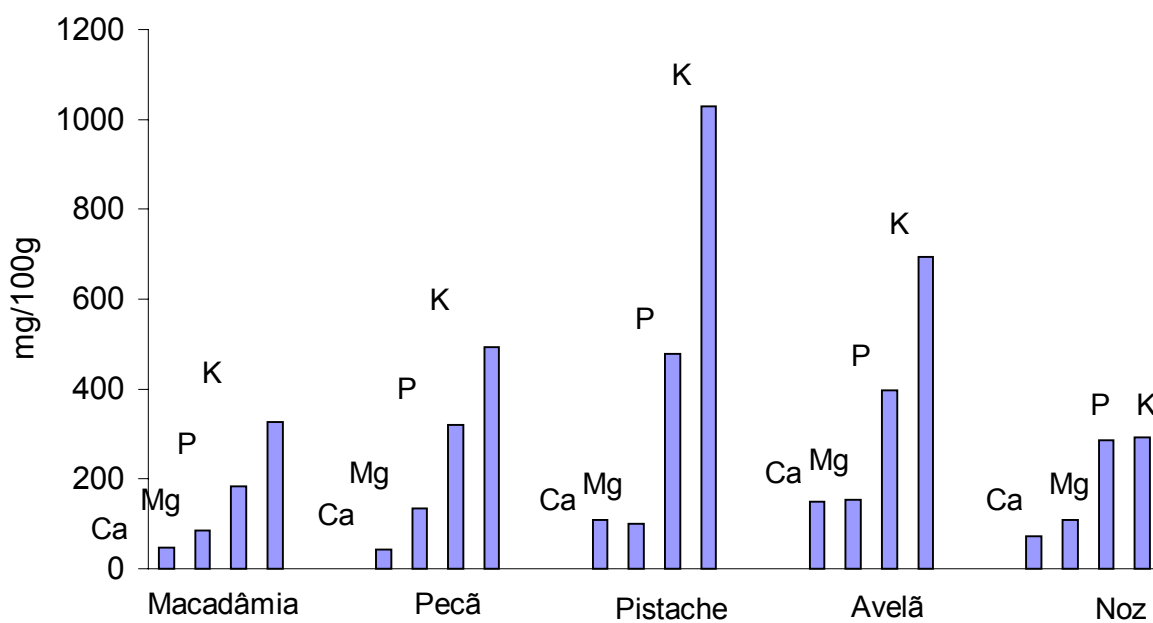
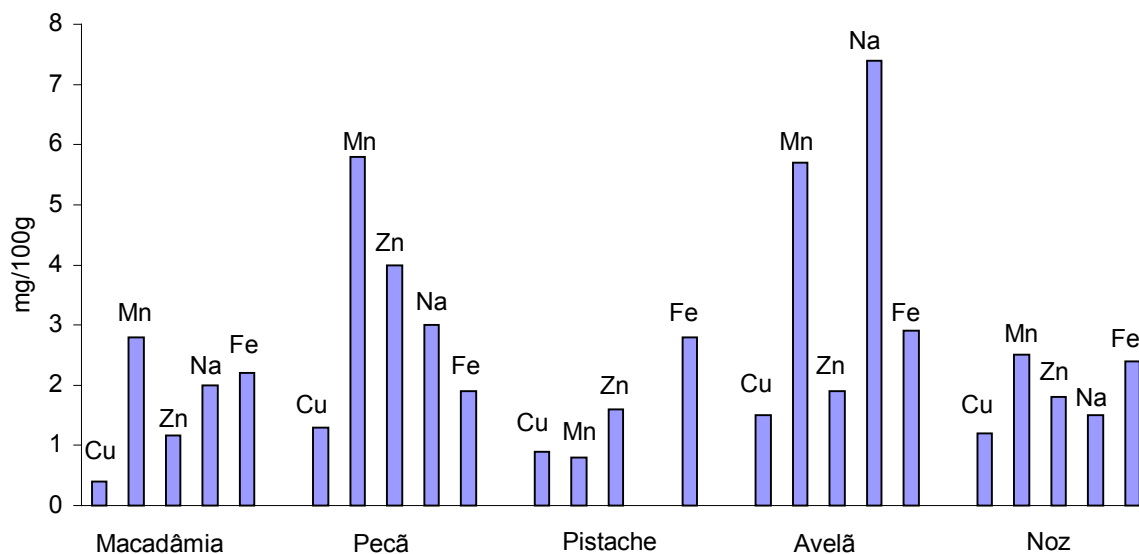
WANG, X. Y.; QUINN, P. J. The location and function of vitamin E in membranes (review). Molecular Membrane Biology, vol. 17, n° 3, p. 143-156, 2000.

WEISER, G. ;VECCHI, M. Stereoisomers of alpha - Tocopheryl Acetate. II Biopotencies of All Eight Stereoisomers, Individually or in Mistures, as Determinaded by Rat Resorption – Gestation Tests. Int. Journal Vit. Nutr. Res., vol. 52, p. 351-370, 1982.

WOOD, R. How to validate analytical methods. Trends in analytical chemistry, vol. 18, n° 9+10, p. 624-632, 1999.

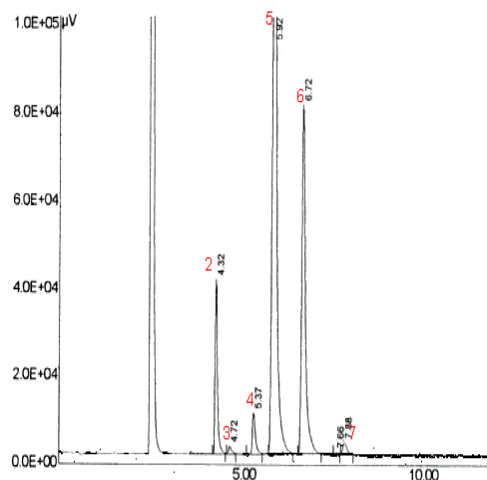
WOODROOF, J. G. Tree Nuts: Prodution, processing, products. Georgia: AVI Publishing Company, Inc., 1967. 373 p.

8 ANEXOS

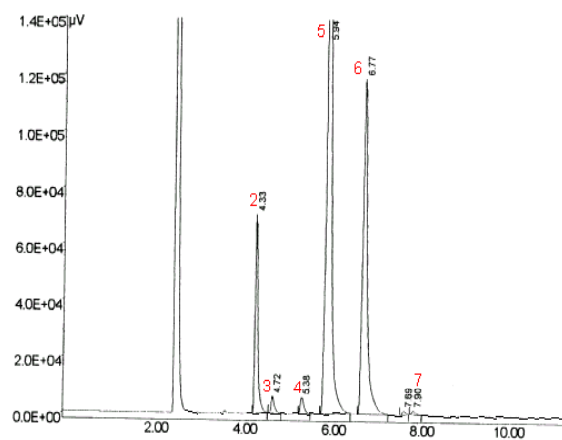


Anexo A: Gráfico dos teores de minerais em nozes.

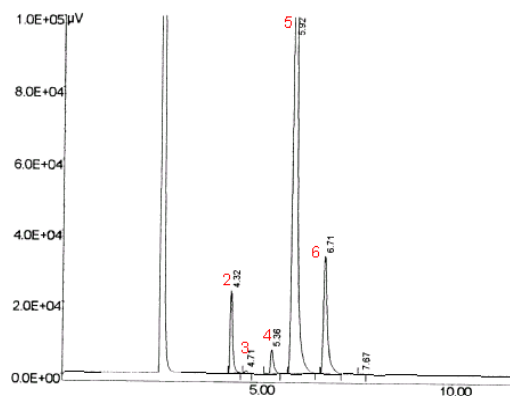
1



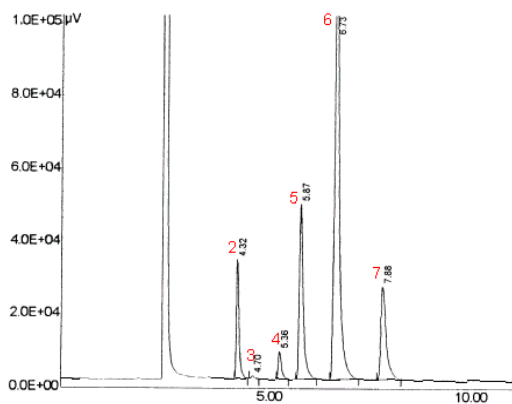
2



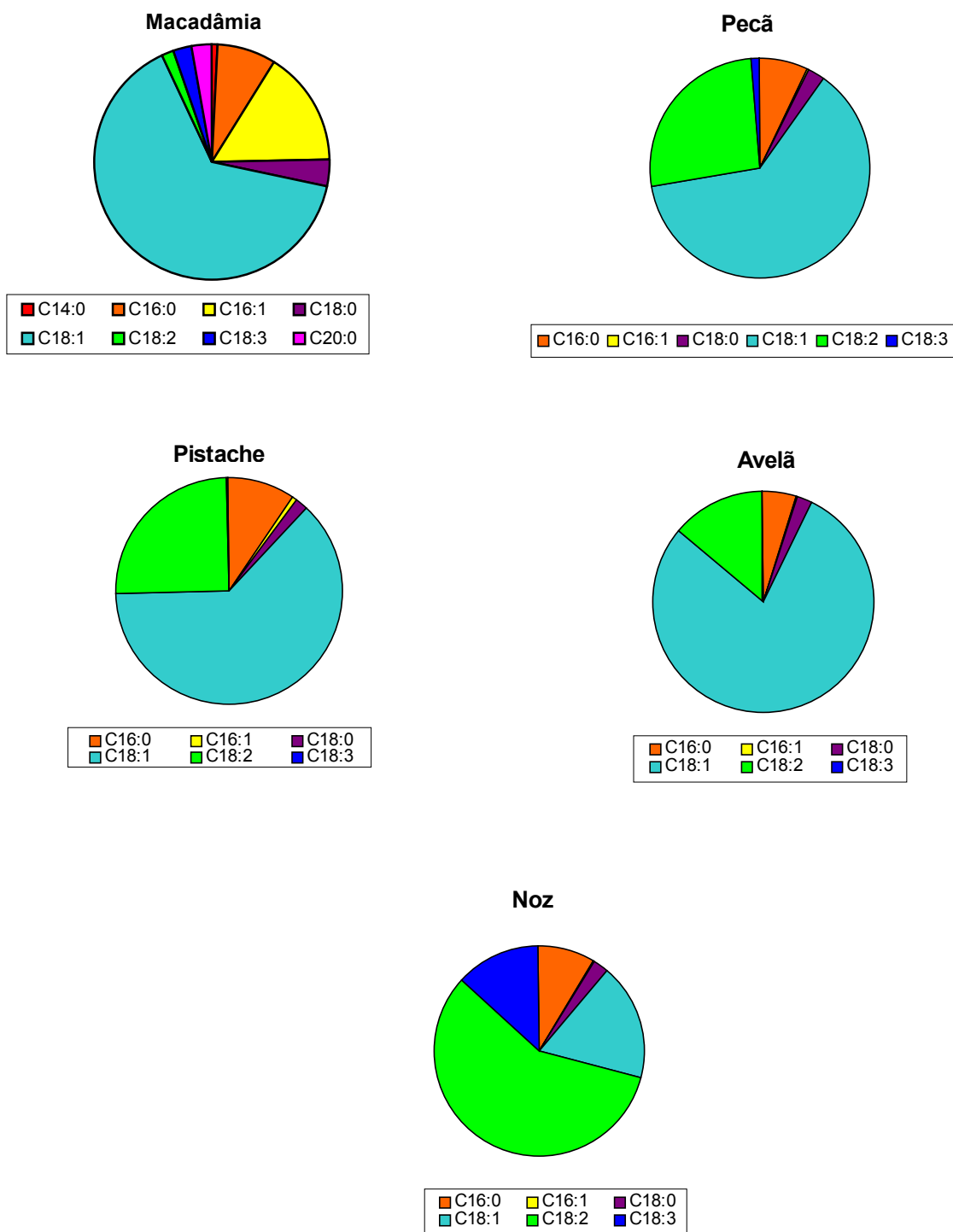
3



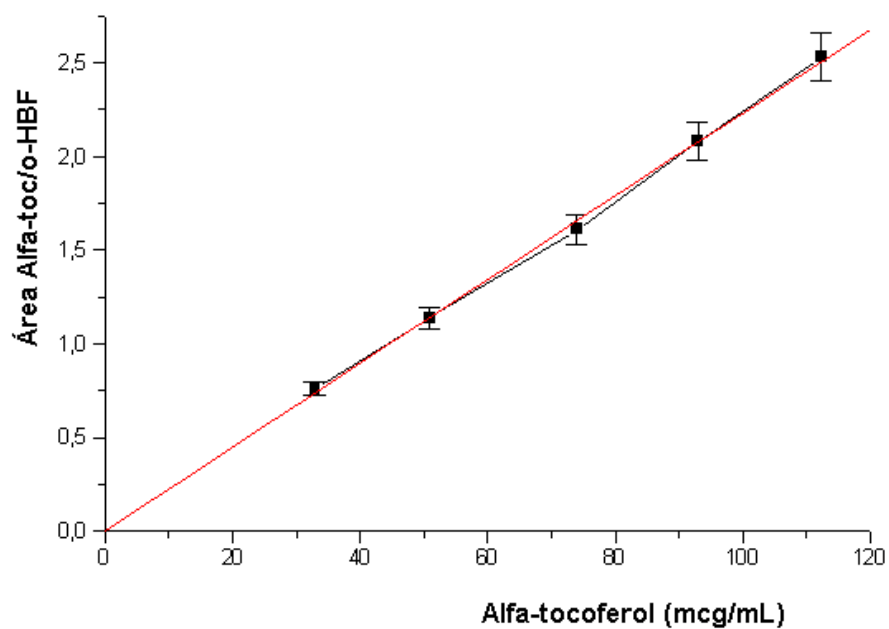
4



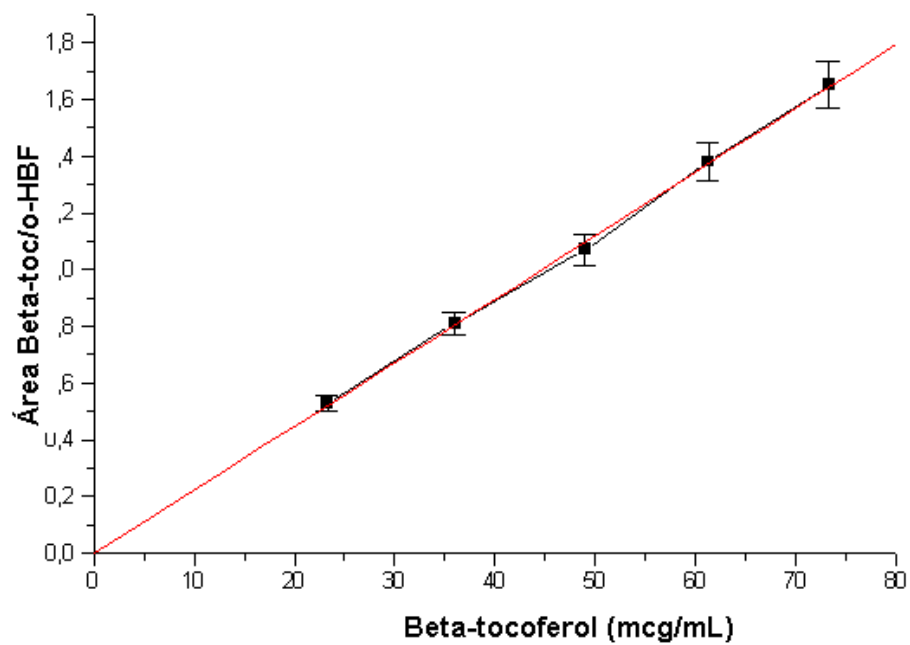
Anexo B: Cromatogramas de ácidos graxos nos extratos de: pecã (1), pistache (2), avelã (3) e noz (4). Condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88, com fase estacionária de propilenoglicol com temperatura de 180°C e hidrogênio como gás de arraste a 30mL/min, injetor split (1:100) com temperatura de 270°C e detector a 300°C. Picos: 2 – C16:0; 3 – C16:1; 4 – C18:0; 5 – C18:1; 6 – C18:2 e 7 – C18:3.



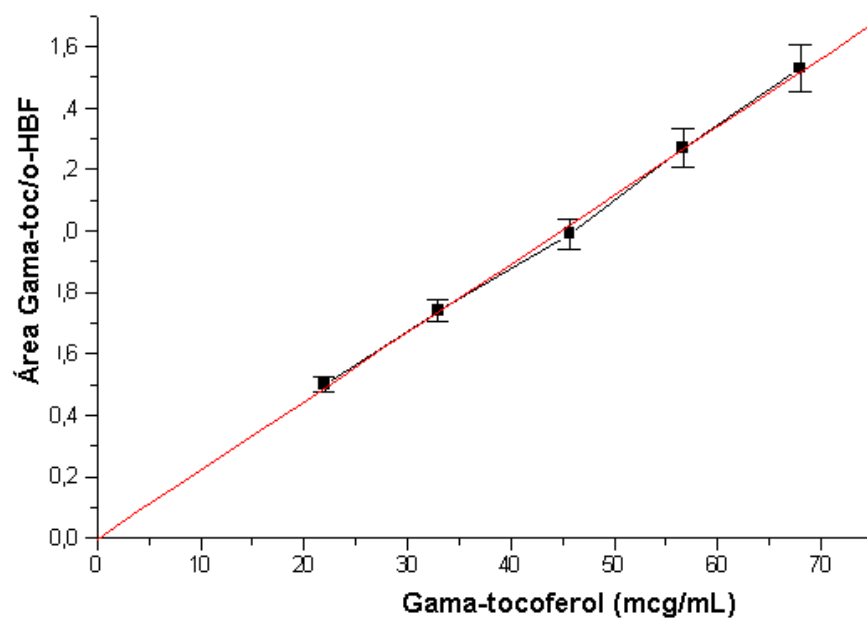
Anexo C: Distribuição da porcentagem de ácidos graxos presentes nas nozes macadâmia, pecã, pistache, avelã e noz.



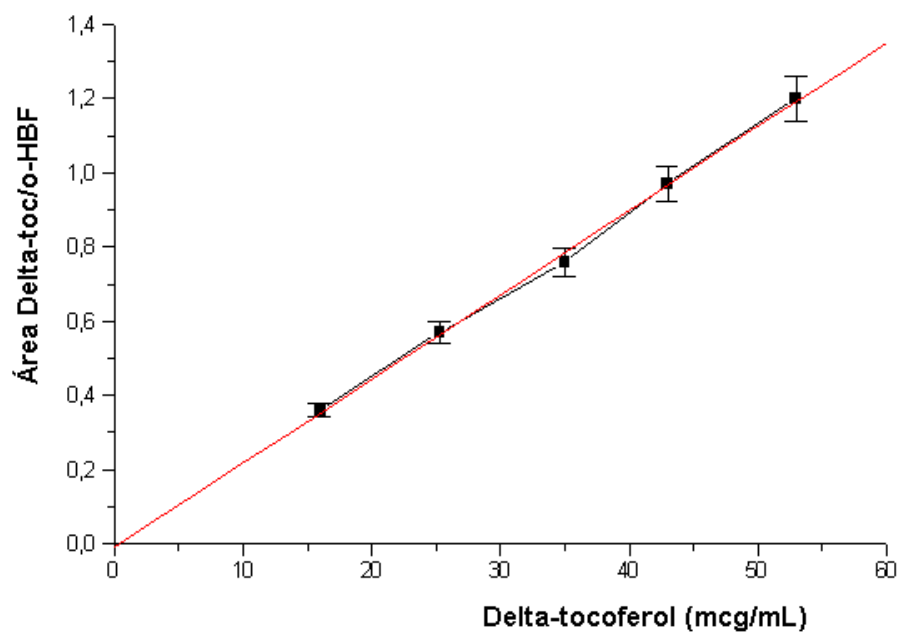
Anexo D: Curva de padronização interna para Alfa-tocoferol



Anexo E: Curva de padronização interna para Beta-tocoferol

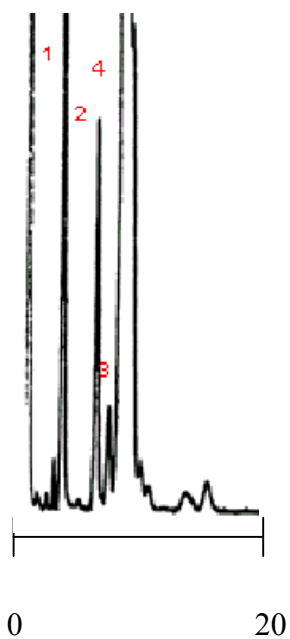


Anexo F: Curva de padronização interna para Gama-tocoferol

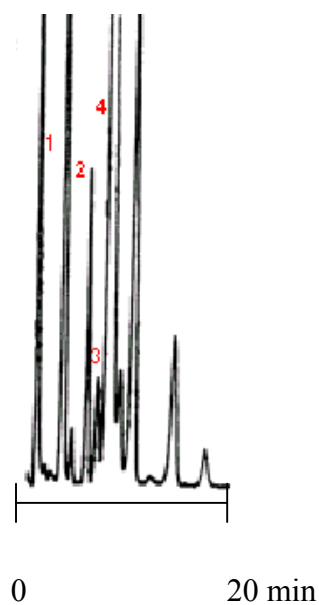


Anexo G: Curva de padronização interna para Delta-tocoferol

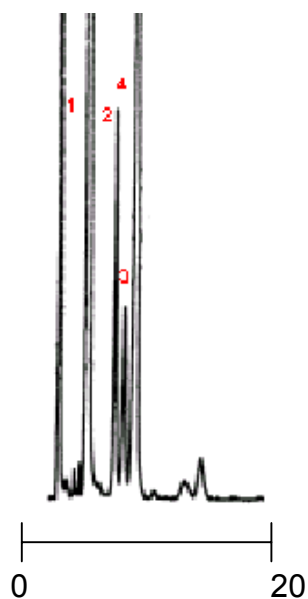
1



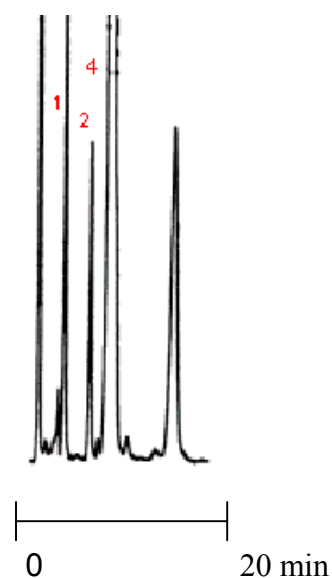
2



3



4



Anexo H: Cromatograma dos tocoferóis nos extratos de pecã (1), pistache (2), avelã (3) e noz (4). Condições cromatográficas: colunade sílica, fase móvel composta por n-hexano:acetato de etila:isopropanol (99,0:0,8:0,2), vazão de 1,5mL/min e detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 292nm e emissão de 326nm. Picos: 1 – alfa-tocoferol; 2 – o-hidroxibifenil (padrão interno); 3 – beta-tocoferol e 4 – gama-tocoferol.