

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição



**Influência da adição de torta de castanha do Brasil à dieta
AIN-93G sobre o crescimento e composição corpórea de ratos
Wistar**

Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição

Paula Telles Poeta

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre em Alimentos e
Nutrição – Área de Nutrição Básica Experimental
Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

**Campinas
2009**

Ficha catalográfica

P752i Poeta, Paula Telles
Influência da adição de torta de castanha do Brasil à dieta AIN-93G sobre o crescimento e composição corpórea de ratos Wistar: características nutricionais da torta desengordurada de castanha do Brasil / Paula Telles Poeta. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Junior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Castanha - Brasil. 2. Qualidade protéica. 3. Ácidos graxos. 4. Métodos biológicos. 5. Métodos químicos. I. Maróstica Junior, Mário Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Influence of the addition of Brazil nut cake to the AIN-93G diet on growth and body composition of rats: Brazil nut defatted cake nutritional characteristics

Palavras-chave em inglês (Keywords): Brazil nut, Protein quality, Fatty acids, Biological methods, Chemical methods

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Mário Roberto Maróstica Junior

Valdemiro Carlos Sgarbieri

Lília Zago Ferreira dos Santos

Luciano Bruno de Carvalho Silva

Geórgia Álvares de Castro

Área de Concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Data de Defesa: 21/08/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior (DEPAN/FEA/Unicamp) – Orientador

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri (DEPAN/FEA/Unicamp) - Membro

Prof. Dra. Lilia Zago Ferreira dos Santos (PUC-Campinas) –Membro

Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva (Unifal) - Suplente

Dra. Geórgia Álvares de Castro – Suplente

Agradecimentos

Aos meus pais, irmãos e parentes, que mesmo de longe nunca deixaram de me apoiar e confiar em mim.

Ao Daniel que sempre esteve ao meu lado com sua frase “se fosse fácil todo mundo faria”, me ajudando e apoiando para que concluísse da melhor maneira possível.

Ao professor Mário Maróstica, meu orientador, que sempre está disposto a ajudar e ensinar.

A todos os amigos, de perto e de longe que sempre tiveram uma palavra amiga e muitas vezes fizeram brilhar uma grande idéia sem nem perceberem.

Aos membros da banca, pelas correções indispensáveis e sugestões valiosas.

À Susana, companheira e amiga, sempre com uma palavra de ânimo e boas risadas pra descontrair.

À Soely, que sempre se fez presente, me aturou e ensinou coisas muito valiosas.

À Luciane, que desde o início enfrentou essa batalha comigo.

Ao Henrique, estagiário, que foi pessoa essencial no decorrer da pesquisa.

Ao seu Ary, que com muita boa vontade nos doou a castanha do Brasil.

Ao Renato Grimaldi, que com muita boa vontade realizou muitas análises para o trabalho.

A todos os funcionários do Depan, pessoas indispensáveis para a realização deste trabalho.

“Não é amostra de saúde estar bem ajustado a uma sociedade profundamente doente”

Jiddu Krishnamurti

SUMÁRIO

Apresentação	1
Resumo Geral.....	2
Abstract.....	5
Introdução e Justificativa.....	7
Capítulo 1 – Revisão de Literatura.....	10
1. Características da castanha do Brasil.....	10
2. Aspectos relacionados à composição centesimal da castanha do Brasil....	11
2.1 Aspectos relacionados ao aminograma da castanha do Brasil.....	14
2.2 Aspectos relacionados ao teor de ácidos graxos da castanha do Brasil...	20
2.3 Aspectos relacionados à riqueza mineral da castanha do Brasil.....	23
Referências.....	26
Capítulo 2 – Brazil nut protein quality evaluate by the use of HPLC and “in vivo” methods.....	33
Abstract.....	33
1. Introduction.....	34
2. Materials and Methods.....	36
2.1 Protein Sources.....	36
2.2 Amino acids analysis of protein sources.....	36
2.2.1 Reagents and Standards.....	36
2.2.2 Apparatus.....	37
2.2.3 Sample preparation and derivatization.....	37
2.3 Chemical Score of protein sources.....	38
2.4 Biological Evaluation of Brazil nut protein quality	39

2.4.1 “In vivo” assays	39
2.4.2 Diet formulation.....	39
2.4.3 Determination of PER.....	41
2.4.4 Determination of NB.....	41
2.4.5 Determination of AD.....	41
2.4.6 Determination of ABV.....	42
2.5 Statistical analysis.....	42
3. Results and discussion.....	42
4. Concluding remarks.....	52
Acknowledgements.....	53
References.....	54
 Capítulo 3 – Effects of different concentrations of Brazil nut in feed on the body composition of Wistar rats	 58
Resumo.....	58
Abstract.....	58
1. Introduction.....	59
2. Materials and Methods.....	60
2.1 Protein sources.....	60
2.2 Determination of fatty acids composition of Brazil nut oil	61
2.3 Biological assay.....	61
2.3.1 Diet formulation.....	62
2.3.2 Determination of FER.....	64
2.4 Body composition analysis.....	64
2.5 Statistical analysis.....	64

3. Results and discussion	64
3.1 Proximate composition of DC and CAS.....	64
3.2 Biological assay.....	69
4. Conclusions	74
Acknowledgements	74
References	75
Conclusão Geral	81
ANEXO 1 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	82

Apresentação

Este estudo faz parte da dissertação da candidata Paula Telles Poeta para obtenção de título de Mestre em Alimentos e Nutrição. Os experimentos aqui apresentados foram efetuados no laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) entre os meses de agosto de 2008 e fevereiro de 2009, sob orientação do Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior e com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (bolsa de estudos). Parte do trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, entre os meses de agosto e outubro de 2008.

O texto foi estruturado em três capítulos, sendo o primeiro uma Revisão de Literatura e os outros dois, na forma de artigos, nos quais serão abordados (I) uma revisão sobre produção, mercado e utilização da castanha do Brasil; (II) a qualidade protéica da torta desengordurada da castanha do Brasil; (III) as alterações causadas na composição corpórea de ratos Wistar decorrentes da ingestão da torta desengordurada de castanha do Brasil. Os capítulos II e III foram mantidos conforme o original, em inglês, o que facilitará a submissão das manuscritos para publicação em revistas internacionais.

RESUMO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade nutricional da castanha do Brasil, enfatizando sua qualidade protéica e aminoacídica, sua composição em ácidos graxos e as alterações na composição corpórea de ratos Wistar decorrentes de sua ingestão em diferentes proporções na forma de torta desengordurada. Assim o estudo se iniciou com o recebimento das amêndoas da castanha do Brasil, provenientes da indústria Juta e Castanha®, localizada na cidade de São Paulo. Em seguida procedeu-se à sua prensagem, utilizando a prensa ERT -60-II da Scott Tech®, empresa localizada no município de Vinhedo – SP.

A composição centesimal das fontes protéicas utilizadas no estudo, torta desengordurada de castanha do Brasil e caseína, (utilizada como proteína padrão) foi determinada. A partir desses dados, foram confeccionadas as dietas dos animais, com 12% de proteína, com base na dieta AIN-93G para roedores. As dietas continham diferentes teores de torta e caseína como fontes de proteína, resultando em quatro dietas diferentes, sendo elas: G1: 100% caseína; G2: 35% torta/ 65%caseína; G3: 25%torta/ 75%caseína; G4: 12.5%torta/ 87.5% caseína.

O ensaio biológico contou com 32 animais, divididos em quatro grupos de oito animais cada, mantidos em gaiolas separadas, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura e umidade controladas, durante o período de 28 dias. O consumo de dieta e o ganho de peso foram monitorados.

Nos últimos sete dias do período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas coletando-se urina e fezes para a determinação dos índices de digestibilidade e valor biológico das dietas em estudo.

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por decapitação, seu intestino limpo com soro fisiológico e devolvido à carcaça. As carcaças foram congeladas, fatiadas, liofilizadas e trituradas para posterior análise da composição corpórea.

O índice químico utilizado para a avaliação da qualidade protéica foi o escore químico de aminoácidos indispensáveis. Para tal, foi realizada a determinação de aminoácidos nas amostras, através de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) e derivatização com fenilisotiocianato (PITC). O escore químico revelou que a castanha do Brasil utilizada neste estudo é deficiente em lisina e treonina; entretanto esta amêndoa é muito rica em metionina+cisteína.

Os índices nutricionais determinados foram o PER (quociente de eficiência protéica), BN (balanço de nitrogênio), Da (digestibilidade aparente) e VBa (valor biológico aparente). Os resultados encontrados foram valores de PER variando entre 2.1 ± 0.03 e 2.7 ± 0.02 ; os valores de BN variaram de 1.2 ± 0.13 a 3.61 ± 0.04 ; a Da apresentou percentuais que variaram de 90.0 ± 0.78 a 95.1 ± 0.12 ; e os percentuais de VB encontrados variaram de 85.7 ± 3.42 a 92.2 ± 1.13 .

A análise da composição de ácidos graxos presentes no óleo extraído da castanha do Brasil foi realizado por meio de cromatografia gasosa e derivatização com trifluoreto de boro. O resultado revelou 45.3% de ácido graxo oléico e 27.4% de linoléico.

A avaliação da composição corpórea variou entre os grupos alimentados com diferentes proporções das fontes de proteína. Redução de até 36.0% na composição de lipídios da carcaça foi observada no grupo G3 comparado com o grupo padrão; aumento dos conteúdos de proteína, cinza e umidade foram também detectados em todos os grupos alimentados com torta desengordurada de castanha do Brasil.

Para a análise estatística foi utilizado o software The SAS System, BC, 2001. A análise de variância (ANOVA) foi realizada e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey, a 5% de significância.

ABSTRACT

The objective of this work was the evaluation of the nutritional quality of the Brazil nut defatted cake. Emphases were done on the protein quality, fatty acid composition and the impact of different proportions of defatted cake on fed to Wistar rats. Nuts were received from “Juta e Castanha® company”, placed in São Paulo city, and were pressed using ERT-60-II press, to obtain the cake.

The proximate percent composition of the protein sources used in this study (defatted cake and casein) were done. The feeds were formulated with 12% of protein. The casein of AIN rodent diet was partially replaced by defatted cake as follows: G1(100% casein); G2 (35% defatted cake/65% casein); G3 (25% defatted cake/75% casein); G4 (12.5 defatted cake/87.5% casein).

For the biological assay, 32 animals were used. They were divided into 4 groups of 8 animals each housed separately with a regime of 12 h dark/light cycle, under controlled temperature and humidity during 28 days. Diet consumption and weight gain were registered.

During last 7 days of experiment, the animals were housed in metabolic cages for urine and feces collection in order to determine digestibility and biological value of the studied protein diet.

At the end of the experiment, the animals were sacrificed (decapitation), the intestines were removed for cleaning with physiological solution and returned to the respective carcass, which were frozen, sliced, freeze dried and triturated for further analysis.

Chemical Score of indispensable amino acids was used in evaluating protein quality. Amino acids were determined using HPLC and derivatization with phenylisothiocyanate (PITC). The amino acid chemical score revealed that Brazil nut is deficient in lysine and threonine; however, the nut is very rich in methionine+cysteine.

The nutritional indices used in this work were PER (Protein Efficiency ratio), NB (Nitrogen Balance), AD (Apparent digestibility) and ABV (Apparent Biological Value). The results were: PER>2.0; NB positive to all groups; AD > 90.0%; all ABV > 85.0%.

The fatty acids composition of Brazil Nut was determined using gas chromatography and derivatization with boron trifluoride. The extracted oil had 45.3% oleic and 27.4% linoleic acids.

The body composition varied among the groups fed different protein sources. Reduction of 36.0% of carcass lipid composition was achieved in G3 group compared to control group; increasing of protein, ash and moisture contents were also detected in all groups fed with defatted cake.

For statistical analysis, SAS System, BC, 2001 software was used. ANOVA was applied and averages values were compared using Tukey test ($p \leq 5\%$).

Introdução e Justificativa

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) é um produto nativo da Amazônia, de grande importância social, econômica e ambiental. Sua amêndoa também é conhecida como castanha do Pará, e vem ocupando, desde 1911, um lugar de destaque na pauta das exportações de produtos da floresta amazônica (EMBRAPA, 2006).

O Brasil produz quase 30 mil toneladas de castanha por ano, porém, pela ausência do devido apoio e esclarecimento para difundir seu consumo no país, vive na dependência do importador estrangeiro, sendo boa parte exportada, principalmente para os países da Europa (Alemanha e Inglaterra) e da América do Norte (Estados Unidos) e apenas 5% do total produzido anualmente são para consumo interno, principalmente na forma “in natura” (EMBRAPA, 2004; IBGE, 2006).

Dentre as opções de aplicação desta amêndoa, uma muito comum é sua utilização como matéria-prima para extração de óleo por prensagem para a indústria químico-farmacêutica, e o resíduo gerado, denominado torta desengordurada, possui elevado valor nutricional, principalmente por conter elevados teores de proteína (GLÓRIA; REGITANO-d'ARCE, 2000). Desta forma, enquanto a amêndoa contém, em média, 67.3% de lipídios, 14.2% de proteínas e 3.4% de carboidratos (RIBEIRO, 1992; SOUZA; MENEZES, 2004) a torta contém, em média, 25.1% de lipídios, 40.2% de proteínas e 3.4% de carboidratos (SOUZA; MENEZES, 2004).

O aminograma das proteínas da castanha do Brasil e de sua torta desengordurada revela teores apreciáveis de arginina, leucina, fenilalanina, metionina (ROTENBERG, 1975; ANTUNES; MARKAKIS, 1977) e triptofano (CAMARGO, 1968), sendo conhecida como a “carne vegetal” (TEIXEIRA, 1954). Por esse motivo, a castanha pode vir a se tornar uma excelente fonte alternativa de proteína.

O óleo extraído da castanha do Brasil apresenta 13.8% de ácido palmítico, 8.7% de ácido esteárico, 31.4% de ácido oléico e 45.2% de ácido linoléico, além de pequenas quantidades dos ácidos mirístico e palmitoléico. É muito instável devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados e, durante seu refino, perde seus compostos fenólicos, que são antioxidantes naturais (ELIAS; BRESSANI, 1961; GUTIERREZ et al., 1997).

Alguns autores estudaram a complementação de dietas comuns, como arroz e feijão, com farinha de castanha do Brasil, e analisaram seu efeito, observando um aumento no crescimento de animais. Outros estudaram a suplementação de produtos de mandioca com a castanha e farinha de castanha, e revelaram aumento na qualidade nutricional dos produtos, além de ótima aceitação quanto a seus parâmetros sensoriais.

Trabalhos com o óleo da castanha do Brasil também são muito encontrados na literatura, comprovando seu elevado teor em ácidos graxos oléico e linoléico. Vários benefícios à saúde são observados em decorrência da ingestão destes ácidos graxos, como aumento da saciedade, redução da desidratação, redução do teor de massa gorda do organismo, redução dos níveis de VLDL e LDL, entre outros.

Considerando que a torta desengordurada de castanha do Brasil é um subproduto muito produzido e utilizado na região amazônica em decorrência da extração de óleo desta amêndoa, justifica-se o estudo de sua qualidade protéica e perfil de ácidos graxos, bem como seu efeito na composição corpórea em ratos Wistar.

Capítulo 1

Revisão da Literatura

1. Características da Castanha do Brasil

A castanheira *Bertholletia excelsa* H.B.K. foi descrita em 1808 por Humboldt e Bompland. É uma árvore de grande porte, com cerca de 40-50 metros de altura e dois metros de diâmetro, possui caule cilíndrico, liso e desprovido de ramos até a fronde, casca escura e fendida, ramos encurvados nas extremidades, folhas esparsas, flores de seis pétalas brancas, o fruto é uma cápsula quase esférica de 8 a 16 centímetros de diâmetro, a casca é espessa, lenhosa, dura, de cor castanha, repleta de células resinosas, contendo 12 a 25 sementes. Encontra-se em agrupamentos tradicionalmente conhecidos como castanhais, sempre associadas a outras espécies florestais. Floresce de outubro a dezembro, sendo que a safra é de janeiro a março. A coleta pode se estender por até seis meses (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1976; CAVALCANTI, 1991).

O território natural das castanheiras abrange a Venezuela, a Colômbia, o Peru, a Bolívia, as Guianas e o Brasil (CAVALCANTI, 1991; LORENZI, 2000), cobrindo uma superfície de aproximadamente 325 milhões de hectares (STOIAN, 2004).

Existem dados sobre o consumo da castanha do Brasil desde 1755, época em que era utilizada para alimentação de animais domésticos. Os primeiros dados sobre o início de sua exploração comercial datam aproximadamente de 1800, passando em 1818 a ser importante produto de exportação do Pará (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1976). Desde 1911, ela vem ocupando um

lugar de destaque na pauta das exportações de produtos da floresta amazônica (EMBRAPA, 2006).

Sua amêndoa tem sabor e aroma agradáveis, comestível crua, salgada ou torrada. Possui uma variedade de aplicações, podendo se incorporar no cotidiano alimentar do brasileiro, elevando seu consumo a níveis consideráveis. Uma alternativa viável é seu aproveitamento industrial, mediante divulgação dos seus reconhecidos méritos, tanto nutricional quanto culinários. (DUKE, 1929; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1976; SOUZA et al., 1986).

Quando as amêndoas se encontram fora do padrão ou quebradas, são usadas para a extração de óleo para a indústria químico-farmacêutica, e o resíduo gerado, chamado de torta desengordurada, é utilizado como alimento para animais (DUKE, 1929; GLÓRIA; REGITANO d'ÁRCE, 2000). Esta torta desengordurada possui inúmeras possibilidades de aplicação, visando o enriquecimento de uma variedade de grupos de alimentos, tais como: produtos para panificação, bebidas, embutidos, farinhas, leites, cereais, *snacks*, salgados, doces, sorvetes, chocolates, biscoitos, bombons, além de muitos outros (SOUZA, 1984; COHEN et al., 2006).

2. Aspectos relacionados à composição centesimal da castanha do Brasil

Há várias décadas a amêndoa de castanha do Brasil vem sendo estudada quanto a seus parâmetros de composição centesimal, por ser um alimento rico tanto em lipídios quanto em proteínas. Na tabela 1 estão dispostos os resultados de composição centesimal desta amêndoa encontrados em estudos anteriores.

Tabela 1. Valores de composição centesimal da amêndoa de castanha do Brasil.

Nutriente	% ¹⁾	% ²⁾	% ³⁾	% ⁴⁾	% ⁵⁾	% ⁶⁾
Proteína	17.4	16.2	16.5	20.7	14.3	13.9
Lipídio	65.0	69.8	66.7	63.9	67.3	66.7
Carboidrato	9.6	Nd	6.0	9.8	3.4	0.7
Cinza	3.3	3.2	3.3	3.7	3.8	3.3
Umidade	4.7	3.5	4.5	1.9	3.1	3.1

1) DUKE, 1929; 2) MITCHELL; BEADLES, 1937; 3)AGUIAR, 1996; 4) SOUZA, 1984; 5) SOUZA; MENEZES, 2004; 6) VENKATACHALAM; SATHE, 2006; Nd indica não determinado.

De uma forma geral, observa-se que a amêndoa de castanha do Brasil é um alimento abundante em lipídios, com aproximadamente 65.0% de sua composição, o que a torna uma fonte de óleo. Este óleo é amarelo claro, translúcido, com odor agradável e quando fresco apresenta gosto doce e tem sido usado como óleo fino de mesa (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1976; CHUNHIENG et al., 2004; FREITAS et al., 2007).

Venkatachalam e Sathe (2006), compararam o teor de lipídio da castanha do Brasil com outras amêndoas (castanha de caju, amendoim, avelã, macadâmia e pistache), e observaram um maior teor deste macronutriente na amêndoa de castanha do Brasil, mostrando que esta se apresenta como a mais rica fonte de óleo, dentre as oleaginosas.

A industrialização de oleaginosas constitui-se em uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro pela utilização de seus produtos na formulação de alimentos, cosméticos e fármacos. O processo mais comum de

extração deste óleo é por meio de prensagem, seguida por extração com hexano (LAGO; FREITAS, 2006; FREITAS et al., 2007).

Como resultado dessa prensagem, obtém-se a torta desengordurada, com composição centesimal apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de composição centesimal da torta desengordurada da amêndoa de castanha do Brasil

Nutriente	% ¹⁾	% ²⁾	% ³⁾
Proteína	54.5	47.6	40.2
Lipídio	1.0	1.2	25.1
Cinzas	7.3	13.1	8.9
Umidade	8.7	4.5	6.7
Carboidrato	5.9	32.7	3.4

1)ANTUNES; MARKAKIS, 1977; 2) GLÓRIA; REGITANO d'ÁRCE, 2000; 3)SOUZA;MENEZES, 2004.

Alguns fatores como: a origem e tipo da castanha utilizada para a obtenção da torta, o método de extração, que se torna mais eficiente com o uso de solventes, podem ser os responsáveis pela grande diferença entre os teores de lipídios encontrados entre as tortas desengorduradas (SOUZA; MENEZES, 2004).

A castanha do Brasil apresenta aproximadamente de 14.0 a 20.0% de proteínas, e sua torta desengordurada, de 40.2 a 54.3%, sendo considerada como fonte de proteínas.

Para a determinação da qualidade protéica de um alimento, existem métodos biológicos, os quais são baseados na ingestão de alimento, ganho de

peso, total de nitrogênio nas fezes e na urina. São alguns dos índices utilizados o PER (quociente de eficiência protéica), que mede o ganho de peso dividido pela proteína ingerida, ambos em gramas; o BN (balanço de nitrogênio), que mede a diferença entre o nitrogênio ingerido e o excretado nas fezes; a D (digestibilidade), percentual de proteínas ingeridas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas como aminoácidos ou qualquer outro composto nitrogenado; e o VB (valor biológico), que mede o percentual de nitrogênio ingerido que foi retido pelo organismo para a síntese de tecidos. (SGARBIERI, 1987; FRIEDMAN,1996).

Alguns estudos foram realizados a fim de analisar a qualidade protéica da castanha do Brasil. Em 1937, Mitchell e Beadles realizaram ensaio de qualidade protéica com a castanha do Brasil, e revelaram que esta proteína possui digestibilidade de 95.7%. Antunes e Markakis (1977) realizaram estudo de suplementação de uma dieta de feijão com castanha do Brasil em ratos e revelou que essa mistura promoveu o crescimento dos animais. Mais tarde, em 2006, Spini et al., em um estudo com suplementação da dieta de arroz e feijão com castanha do Brasil, demonstraram que a qualidade da proteína da castanha, rica em aminoácidos sulfurados, contribuiu para o crescimento dos animais.

2.1 Aspectos relacionados ao aminograma da castanha do Brasil

Os aminoácidos presentes nos alimentos são divididos em 3 categorias, baseadas na síntese protéica *in vivo*. A primeira é representada pelos aminoácidos indispensáveis, que são aminoácidos não sintetizados no organismo ou sintetizados em quantidade insuficiente, devendo ser obtido por meio da alimentação, são eles: lisina, triptofano, histidina, fenilalanina, leucina, isoleucina,

treonina, metionina e valina. A arginina, cisteína e tirosina fazem parte da segunda categoria, a dos aminoácidos condicionalmente indispensáveis. Os aminoácidos dispensáveis, ou seja, aqueles que podem ser sintetizados a partir de produtos comuns do metabolismo intermediário, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutâmico, glicina, prolina e serina, constituem a última categoria (ROSE, 1949; FRIEDMAN, 1996; LAYMAN, 2003; GARLICK, 2005).

O aminograma da castanha do Brasil pode ser encontrado em vários estudos e uma forma de estimar sua qualidade é por meio de métodos químicos, como o escore químico de aminoácidos indispensáveis, o qual determina se a proteína em estudo é deficiente em algum destes aminoácidos (SGARBIERI, 1987; FRIEDMAN, 1996; FAO/WHO/UNU, 2002).

Para a realização do escore químico, é necessária a determinação do conteúdo de aminoácidos da proteína em questão, por meio de um método analítico que seja rápido, confiável e preciso. Muitos métodos têm sido propostos, incluindo cromatografia gasosa, HPLC e eletroforese capilar (JANSEN et al., 1986).

Para que a fonte protéica estudada não seja deficiente em aminoácidos indispensáveis, seu teor deve ser igual ou maior que o preconizado pelo padrão de referência (SGARBIERI, 1987; FRIEDMAN, 1996).

Na tabela 3 estão dispostos os resultados encontrados na literatura para o aminograma da castanha do Brasil e seus respectivos escores químicos, sendo utilizado como proteína padrão a FAO/WHO/UNU (2002).

Tabela 3. Aminograma da castanha do Brasil (mg aa/g ptn) e seus respectivos valores de escore químico.

A.I.*	Padrão	AA 1	EQ	AA 2	EQ	AA 3	EQ
(FAO/WHO/UNU,2002)							
Ileu ¹	31	32.4	1.0	32.1	1.0	37.5	1.2
Leu ²	63	67.8	1.1	78.9	1.3	87.1	1.4
Lis ³	52	29.3	0.6	24.5	0.6	37.1	0.7
Met+Cis ⁴	26	91.6	3.5	97.3	3.7	95.5	3.7
Fen+Tir ⁵	46	59.8	1.3	65.3	1.4	49.2	1.1
Treo ⁶	27	22.7	0.8	22.7	0.8	Nd	Nd
Trip ⁷	7,4	9.0	1.2	7.1	0.9	31.6	1.2
Val ⁸	42	46.3	1.1	47.1	1.1	59.2	1.4

*aminoácidos indispensáveis; ¹Isoleucina; ²Leucina; ³Lisina; ⁴Metionina+Cisteína; ⁵Fenilalanina+Tirosina; ⁶Treonina; ⁷Triptofano; ⁸Valina; AA1) SOUZA;MENEZES, 2004; AA2)VENKATACHALAM;SATHE, 2006; AA3) GLÓRIA; REGITANO d'ARCE, 2000; Nd indica não determinado.

Tendo em vista os dados da tabela 3, pode-se concluir que a castanha do Brasil apresenta deficiência dos aminoácidos lisina e treonina. O aminoácido triptofano mostrou-se deficiente, de acordo com estudos realizados por Glória; Regitano d'Arce (2000). Em contraste, os aminoácidos sulfurados (metionina+cisteína) mostraram-se abundantes nos três aminogramas realizados pelo referido estudo, com quantidades três vezes maiores que o recomendado.

Observando o escore químico de aminoácidos indispensáveis da castanha do Brasil, percebe-se a possibilidade de adição desta amêndoa em várias

preparações com o objetivo de adequar a demanda de aminoácidos às necessidades de acordo com a FAO/WHO/UNU (2002).

Na tabela 4 estão dispostos os escores químicos de alimentos consumidos no Brasil e que apresentam deficiência de algum aminoácido indispensável, podendo ser enriquecido com castanha do Brasil ou sua torta desengordurada.

Tabela 4. Escores químicos de alimentos consumidos no Brasil.

A.I.*	EQ Soja ^{A)}	EQ Feijão ^{A)}	EQ Mandioca ^{B)}
Ileu ¹	1.5	1.0	0.9
Leu ²	1.3	1.2	0.9
Lis ³	1.6	1.8	1.0
Met+Cis ⁴	0.7	0.7	0.8
Fen+Tir ⁵	2.1	2.5	1.5
Treo ⁶	1.9	1.8	1.8
Trip ⁷	Nd	Nd	1.7
Val ⁸	1.2	0.9	1.0

*Aminoácidos Indispensáveis; ND indica não detectado; ¹Isoleucina; ² Leucina; ³ Lisina; ⁴Metionina+Cisteína; ⁵Fenilalanina+Tirosina; ⁶ Treonina; ⁷ Triptofano; ⁸Valina ^{A)} FRIEDMAN, 1996; ^{B)}PIRES et al., 2006; B) YEOH; TRUONG, 1996.

Devido à sua riqueza em aminoácidos sulfurados, geralmente deficientes em fontes vegetais, a castanha do Brasil pode ser incluída na alimentação do dia a dia para adequar os requerimentos destes aminoácidos, principalmente de feijão e soja, que são as maiores fontes de proteína dentre as leguminosas (MIZUBUTI, et al., 2000; COHEN et al., 2006).

A metionina possui grande importância metabólica devido sua função na transmetilação e transulfuração em cisteína, a partir da transferência de 1 enxofre da metionina para a serina. A cisteína possui função na síntese de proteínas, na estrutura protéica, além de ser precursora da glutathione (GSH), taurina e coenzima A, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento de mamíferos (FINKELSTEIN; MARTIN, 1986; BAKER, 2006).

A mandioca é um dos alimentos preferenciais na mesa do brasileiro, principalmente nas regiões sudeste, centro-oeste e norte (BORGES et al., 2002). É cultivada em mais de 90 países tropicais e subtropicais e, apesar de seu baixo valor nutricional, é uma das poucas fontes de proteína em muitas regiões do país, chegando seu consumo médio anual perto de 50.6Kg por habitante (CONCEIÇÃO, 1987; LORENZI, 2003). Sendo assim, contribui com a erradicação da fome na América do Sul (SIVIEIRO, 2006).

Analisando a tabela 4, observa-se que a mandioca possui deficiência de 3 aminoácidos indispensáveis - isoleucina, leucina e metionina+cisteína - presentes na castanha do Brasil, podendo, portanto, viabilizar uma mistura desses dois alimentos.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos para enriquecimento de produtos de mandioca com farinha de castanha do Brasil. Souza e Menezes (2004) processaram amêndoa e torta de amêndoa de castanha do Brasil com farinha de mandioca visando identificar os parâmetros de qualidade que justificassem e incentivassem o aproveitamento destes produtos pela indústria de alimentos, e concluíram que o produto final apresentou elevado teor energético e qualidade protéica, devendo ser aproveitado no enriquecimento de alimentos.

Mais tarde, em 2008, os autores supracitados avaliaram a adição de farinha de castanha do Brasil em produtos extrusados de mandioca e observaram aumento nos percentuais de proteínas, cinzas fibras e lipídios no produto final, contribuindo para o enriquecimento, utilização da castanha e diversificação de produtos.

Estudos foram realizados por Cohen et al. (2005), e verificaram efeitos positivos na produção de farinha mista de mandioca e castanha do Brasil, apresentando menor teor de amido e maiores teores de cinza, lipídios e proteínas, quando comparada a farinha de mandioca tradicional, sendo por isso de melhor qualidade nutricional.

Em estudo realizado por Souza; Menezes (2006), os autores avaliaram a aceitabilidade de cereais matinais de torta de amêndoa de castanha do Brasil com mandioca de sabores doce, natural e salgado e concluíram que não foram detectadas alterações nos atributos sensoriais que comprometessem a aceitabilidade dos produtos, sendo satisfatória a sua aceitação.

Diante destes resultados, conclui-se a possibilidade de desenvolvimento de produtos de mandioca e castanha do Brasil para o enriquecimento da alimentação, não só do brasileiro, mas de todos os países que necessitam de um enriquecimento em sua alimentação. A mandioca é apenas um exemplo do que pode ser feito para fortalecer a alimentação da população. Estudos devem ser desenvolvidos com outros alimentos que são consumidos em larga escala e que podem ser enriquecidos com castanha do Brasil e sua torta desengordurada.

2.2 Aspectos relacionados ao teor de ácidos graxos da castanha do Brasil

Os ácidos graxos são conhecidos como fonte de energia para células musculares, sinalizadores de vários processos celulares, reguladores da expressão de genes, resistência à insulina e estresse oxidativo (SILVEIRA et. al, 2008).

A castanha do Brasil é muito rica em óleo, chegando a apresentar até 70.0% de lipídios em sua amêndoa. Desta forma, torna-se interessante avaliar sua composição em ácidos graxos.

Em estudos realizados com este óleo, observou-se a prevalência de ácidos graxos insaturados, variando de 72.0 a 75.0%, estando presentes em maiores quantidades os ácidos graxos oléico e linoléico. Os ácidos saturados somam um total de 24.0 a 28.0%, representados prioritariamente pelos ácidos palmítico e esteárico (Tabela 5).

Tabela 5. Composição em ácidos graxos da castanha do Brasil.

Ácidos Graxos		% ¹⁾	% ²⁾	% ³⁾
C 16:0	Palmítico	16.4	13.0	15.1
C 18:0	Esteárico	10.8	11.0	9.5
C18:1	Oléico	27.0	39.3	28.8
C18:2	Linoléico (ω -6)	45.0	36.1	45.4

1) FREITAS et al., 2007; 2) CHUNHIENG et al., 2008; 3) VENKATACHALAM; SATHE, 2006.

Quando comparada com outras amêndoas como castanha de caju, avelã, pistache e amendoim, a castanha do Brasil apresenta o maior teor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (VENKATACHALAM ;SATHE, 2006).

Um fator positivo na qualidade nutricional da castanha do Brasil é o maior percentual de monoinsaturados (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs), quando comparado com o percentual de saturados. MUFAs e PUFAs oferecem benefícios à saúde, especialmente com relação ao perfil lipídico, havendo visível redução de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade). Além disso, conferem sabor agradável à semente e contribuem com sua textura (VENKATACHALAM ;SATHE, 2006).

O ácido graxo encontrado em maior percentual no óleo da castanha do Brasil é o linoléico, um ácidos graxos da família ω -6 (BEARE-ROGERS et al., 2001). Possui 18 carbonos e 2 ligações duplas, a primeira encontra-se a 6 carbonos do grupo metil terminal (MAHAN; SCOTT-STUMP, 2005). Este ácido graxo é convertido em ácido araquidônico, eicosanóides, tromboxanos, prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e lipoxinas (YAMAMOTO; SMITH, 2002). As prostaglandinas e leucotrienos são substâncias envolvidas no sistema imune e redução dos danos trombo-embólicos pela diminuição de agregação plaquetária (CHUNHIENG et al., 2008).

Além disso, o ácido graxo ω -6 é importante para o crescimento e reprodução, além de atenuar as ações da insulina na síntese de ácidos graxos e na síntese de lipídios, assim como a expressão e atividade da FAS (fatty acid synthase), o mecanismo biossintético dos ácidos graxos (HOLMAN, 1968; JONES et al., 1996; WANG et al., 2004).

O ácido graxo oléico, segundo ácido graxo mais abundante no óleo da castanha do Brasil, é metabolizado em oleoetanolamina (OEA), um composto endógeno encontrado no intestino delgado, sua produção é aumentada com a alimentação e diminuída no jejum. OEA é conhecido por induzir a saciedade e foi demonstrado possuir propriedades anorexigênicas e de perda de peso. Pode modular o estoque de lipídios no fígado e lipídios plasmáticos (triglicerídeos e colesterol) (GAETANI et al., 2003; THABUIS et al., 2007; THABUIS et al., 2008).

Além da sua composição em ácidos graxos, a castanha do Brasil é rica também em β -tocoferóis. Segundo estudo realizado por Chunhieng et al., 2008, o óleo da castanha do Brasil apresentou 88.3% de β -tocoferol, e apresentou níveis superiores que os óleos de oliva e noz.

Existem quatro tipos de tocoferóis, segundo a localização dos grupos metila no anel: α , β , γ , δ e sua atividade antioxidante é devida principalmente à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos interrompendo a propagação em cadeia (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os tocoferóis, classe de substâncias bioativas da vitamina E são reconhecidos como antioxidante mais importante na célula. Protegem os fosfolipídios insaturados da membrana celular da degeneração oxidativa pelas espécies reativas de oxigênio e de outros radicais livres. São importantes para o sistema de defesa antioxidante celular, que envolve outras enzimas como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e redutase, a catalase, a tioredoxina redutase. Além dessas funções na célula, os tocoferóis costumam ser adicionados nos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos

graxos insaturados (HENDLER, 1994; MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005; RAMALHO; JORGE, 2006).

2.3 Aspectos relacionados à riqueza mineral da castanha do Brasil

Como os vegetais são as principais fontes de minerais para os seres humanos, o conhecimento de sua constituição é de fundamental importância para a avaliação de sua qualidade. Normalmente, esses minerais estão ligados a proteínas ou enzimas específicas, na forma de metaloproteínas e exercem seus efeitos como centros ativos ou estruturais, comandam processos como catálise, ligação, ativação, transporte e estoque de substratos (KENNEDY; GIBNEY, 2001; TSHUVA; LIPPARD, 2004).

O teor de minerais presentes nos vegetais é dependente das características do solo, da fisiologia da planta, da composição da água utilizada na irrigação, dos fertilizantes, pesticidas, inseticidas e fungicidas utilizados nas plantações (NAOZUKA; OLIVEIRA, 2007).

A castanha do Brasil possui em média 3.2 a 3.8% (Tabela 1) de cinza; e sua torta desengordurada, de 7.0 a 13.0% (Tabela 2), o que reflete sua riqueza mineral e também é um apelo ao seu consumo.

Em estudo realizado por Mitchell e Beadles (1937), encontraram maior percentual de cinza na castanha do Brasil quando a compararam com outras amêndoas como castanha de caju e amendoim. O mesmo ocorreu em estudo realizado por Venkatachalam e Sathe (2006), quando comparou a castanha do

Brasil com outras amêndoas, como castanha de caju, amendoim, avelã, macadâmia e pistache.

Já em 1929, Duke publicou os valores para minerais encontrados na amêndoa de castanha do Brasil, como alumínio, boro, bário, bromo, cálcio, cádmio, cério, cloro, cobalto, cromo, cério, cobre, eustênio, flúor, ferro, mercúrio, iodo, potássio, lantânio, lutênio, magnésio, manganês, sódio, chumbo, antimônio, escândio, selênio, silício, estanho, estrôncio, tálio, titânio, vanádio, tungstênio, zinco.

Em estudo realizado por Naozuka e Oliveira (2007), onde compararam a composição mineral de castanha do Brasil, cupuaçu e côco, descobriram que a castanha possui maior teor de cobre, ferro e manganês e menor teor de zinco dentre as 3 amostras. O maior percentual de zinco foi encontrado no côco, seguido pelo cupuaçu.

A castanha do Brasil é conhecida como a maior fonte natural de selênio; foram encontrados valores que variaram de 0.003 a 51.2 mg/100g em sua amêndoa (PALMER; HERR, 1982; SECOR; LISK, 1989; CHANG et al., 1995) e 0.7 mg/100g na torta desengordurada (SOUZA; MENEZES, 2004). A castanha do Brasil contém a maior quantidade de selênio por grama de parte comestível (BEHR, 2004).

A maior parte do selênio encontrado nos vegetais está sob a forma de selenometionina, a qual é idêntica a metionina, exceto pela substituição do enxofre pelo selênio. É incorporada no lugar da metionina em uma variedade de proteínas (COMBS; COMBS, 1986; BRODY, 1993;).

Quando o fornecimento de selênio dietético é interrompido, a reserva de selenometionina é mobilizada para disponibilizar selênio para o organismo, que pode ser incorporado em macromoléculas, transportado para outros órgãos ou excretado (UNRINE et al., 2007).

Diversas funções essenciais ao bom funcionamento do organismo são atribuídas ao selênio, sendo a mais importante, caracterizada em 1973, a função antioxidante, devido sua associação com a enzima glutathione peroxidase (GSH-Px) (HALLIWELL;GUTTERIDGE, 1999; JUNIOR et al., 2001; FERREIRA et al., 2002; SOUZA; MENEZES, 2004). Nesta enzima o selênio se encontra no centro ativo, ligado covalentemente na forma de selenocisteína, característica fundamental para sua ação na eliminação de peróxidos (ARTEEL; SIES, 2001; YOSHIZAWA et al., 2003).

A riqueza mineral encontrada na castanha do Brasil também é um apelo para o seu consumo, principalmente quanto ao teor de selênio, devido a seu potencial antioxidante, prevenindo danos celulares.

Referências

- AGUIAR, J. P. L. Tabela de Composição de Alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica**, v.26,n. 1/2, p. 121-126, 1996.
- ANTUNES, A. J.; MARKAKIS, P. Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1096-1098, 1977.
- ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 10, n. 4, p. 153-158, 2001.
- BAKER, D.H. Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids. Presented at the conference "The Fifth Workshop on The Assessment of Adequate Intake of Dietary Amino Acids" held October 24-25, 2005 in Los Angeles. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n.6, (supl) p.1670S-1675S, 2006.
- BEARE-ROGERS, J.; DIEFFENBACHER, A.; HOLM, J. V. Lexicon of Lipid Nutrition (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 685-744, 2001.
- BEHR, C. S. **Efeito de uma dieta enriquecida com castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, L.) no estado nutricional relativo ao selênio de idosos não institucionalizados**. 2004. 99 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BORGES, M. F.; FUKUDA, W. M. G.; ROSSETTI, A.G.Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**.v. 37, n. 11, p. 1559-1565, 2002.
- BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1993. 658 p.
- CAMARGO, L. A. A. **Estudo químico-bromatológico das castanhas da *Bertholletia excelsa***, H. B. K., 1968. 43 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 1968.
- CAVALCANTI, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5 ed. Belém: Edições CEJUP, 1991. 279p.
- CHANG, C. C.; GUTENMANN, W. H.; REID, C. M.; LISK, D. J. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**. v. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.

CHUNHIENG, T.; GOLI, T.; PIOMBO, G.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Recent analysis of the composition of Brazil nut *Bertholletia excelsa*. **Bois et Forêts des Tropiques**, v. 280, n. 2, p. 91-98, 2004.

CHUNHIENG, T., HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed Study of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) Oil Micro-Compounds: Phospholipids, Tocopherols and Sterols. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p.1374-1380, 2008.

COHEN, K.O.; CHISTÉ, R.C.; MATHIAS, E.A. **Produção de farinha mista de mandioca e castanha-do-brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2005, 20p.

COHEN, K. O; CHISTE, R. C.; MATHIAS, E. A. Produção de farinha parcialmente desengordurada de castanha-do-Brasil. Circular Técnica, 42. **EMBRAPA**, 2006.

COMBS, G.F.; COMBS, S.B. **The role of selenium in nutrition**. New York: Academic Press, 1986. 532 p.

CONCEIÇÃO, A. J. **A Mandioca**. São Paulo: Livraria Nobel S.A., 1987. 382 p.

DUKE, J. A. **Handbook of Nuts**. Florida: CRC Press, Inc. p.44-46. 1929.

ELIAS, L. G.; BRESSANI, R. The Nutritive Value of the Brazil Nut Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.38, n.8, p. 450-452, 1961.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesquisas com castanha terão apoio do Ministério**. Sessão: Banco de notícias. jul. 2004. Disponível em : http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/julho/bn.2004-11-25.1907245320/mostra_noticia Acesso em: 18.07.2007.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Workshop discute temas relevantes sobre a castanha do Brasil**. Belém: 2006. Seção: Notícias mar.2006. Disponível em: <http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/folder.2006/marco/noticia.2006-03-30.5441113411/mostra_noticia> Acesso em 16.07.2007.

FAO/WHO/UNU. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. Report of a Joint Expert Consultant. Geneva, Switzerland, 2002, 265p.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública / Pan American Journal of Public Health**. v. 11, n.3, p. 172-177, 2002.

FINKELSTEIN, J. D.; MARTIN, J. J. Methionine Metabolism in Mammals-Adaptation to methionine excess. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 261, n. 4. p. 1582-1587, 1986.

FREITAS, S. P.; SILVA, O. F.; MIRANDA, I. C.; COELHO, M. A. Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1 (suppl), pp. 14-17, 2007.

FRIEDMAN, M. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, n.11, p. 6-24, 1996.

GAETANI, S.; OVEISI, F.; PIOMELLI, D. Modulation of meal pattern in the rat by the anorexic lipid mediator oleoylethanolamide. **Neuropsychopharmacology**. v.28, n. 7, p. 1311-1316, 2003.

GARLICK, P.J. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. **Journal of Nutrition**. v.135, suppl. p.1553– 1556, 2005.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p.240-245, 2000.

GUTIERREZ, E. M. R.; REGITANO-D ARCE, M. A. B.; RAUEN-MIGUEL, A. M. O. Estabilidade oxidativa do óleo bruto da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 17, n. 1, p. 22-27, 1997.

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: OXFORD University Press, 1999. 936 p.

HENDLER, S. S. **A Enciclopédia de vitaminas e minerais**. 9.ed. Rio de Janeiro: Campus, 1994. 576p.

HOLMAN, R. T. Biological Activities of and Requirements for Polyunsaturated Fatty Acids. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**, v. 9, p. 611–680, 1968.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Sessão: Comentário, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2006/comentario.pdf>. Acesso em 01.04.2009.

JANSEN, P.S.L.; NISPEN, J. W. V.; MELGERS, P. A. T. A; VAN DEN BOGAART, H.W. M; VAN AALST, G.W. M.; GOVERDE B. C. HPLC Analysis of Phenylthiocarbamyl (PTC) Amino AcidsII. Application in the Analysis of (Poly)peptides. **Chromatographia**. v. 22, n.7-12, p.351-357, 1986.

JONES, B. H.; MAHER, M. A.; BANZ, W. J.; ZEMEL, M. B.; WHELAN, J.; SMITH, P. J.; MOUSTAID, N. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. **American Journal of Physiology**, v. 271, n.1, p.E44–E49, 1996.

JUNIOR L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KENNEDY, M. L.; GIBNEY, B. R. Metalloprotein and redox protein design. **Current Opinion in Structural Biology**. v.11, n.1, p.485–490, 2001.

LAGO, R. C. A.; FREITAS, S. P. Extração dos óleos de café verde e da borra de café com etanol comercial. Comunicado Técnico nº. 92, **Embrapa**, 2006.

LAYMAN, D.K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. **Journal of Nutrition**. v. 133, n.1, suppl.S261–267, 2003

LORENZI, J. O. **Mandioca**. Campinas: CATI. 2003. 116 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**, 4 ed. v.1. São Paulo: Instituto Plantarum, 2000.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição & dietoterapia**. São Paulo: Rocca, 2005. 1242p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, **Castanha do Brasil Levantamento Preliminar**. Belém. 1976. 69 p.

MITCHELL, H.H.; BEADLES, J.R. The nutritive value of the proteins of nuts in comparison with the nutritive value of beef proteins. **Journal of Nutrition**, v.14, n.6, p.597-608, 1937.

MIZUBUTI, I. Y.; SOUZA, L. W. O.; JÚNIOR, O. B.; IDA, E. I.; Propriedades químicas e cômputo químico dos aminoácidos da farinha e concentrado protéico de feijão guandu (*cajanus cajan (l.) millsp*). **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 237-248, 2000.

NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn Distribution in Protein Fractions of Brazil-Nut, Cupuassu Seed and Coconut Pulp by Solid-Liquid Extraction and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. v. 18, n. 8, p. 1547-1553, 2007.

PALMER, I. S.; HERR, A. N. Journal Food Science. **Institute of Food Technologists**. v. 47, p.1595-1597, 1982.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e Escore Químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.179-187, 2006.

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

RIBEIRO, M.A. de A. **Aproveitamento tecnológico de castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa*): estudo da qualidade de conservação**. Piracicaba, 1992. 117p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ROSE W.C., Amino acid requirements of man. **Federation Proceedings**. v.8, n.1, p.546-52, 1949.

ROTENBERG, B.; IACHAN, A. Estudo da proteína da castanha-do-pará. **Informativo do Instituto Nacional de Tecnologia (INT)**, v. 8, n. 7, p. 22-24, 1975.

SECOR, C. L.; LISK, D. J. Variation in the selenium content in individual Brazil nuts. **Journal of Food Safety**. v. 9, n. 4, p. 279-281, 1989.

SGARBIERI, V.C., **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: Editora da UNICAMP; São Paulo: Almed, 1987. 387 p.

SILVEIRA, L. R.; FIAMONCINI, J.; HIRABARA, S. M.; PIO J. P.; CAMBIAGHI, T. D.; PINHEIRO, C. H. J.; LOPES, L. R.; CURI, R. Updating the Effects of Fatty Acids on Skeletal Muscle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 1, p. 1-12, 2008.

SIVIEIRO, A.; RAIMUNDO, C. F. E.; LESSA, L. S.; DELUNARDO, T. A.; PARDINAS, O. B. Farinha mista de mandioca com castanha-do-brasil: uma alternativa agroecológica para a reserva extrativista cazumbá-iracema. **IBAMA**, 2006.

SOUZA, M. L.; HOLANDA, L. F. F.; MAIA, G. A.; JUNIOR, J. C. G.; FIGUEIREDO, R. W. Estudo do Processamento e estabilidade da farinha de amêndoa da castanha-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa* H.B.K.). Revista Ciência Agronômica. v. 7, n. 1, p. 35-42, 1986.

SOUZA, M. L. **Estudos de processos tecnológicos para a obtenção de produtos derivados de castanha-do- Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.)**. Fortaleza. 1984, 139p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 1, p.120-128, 2004.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Avaliação sensorial de cereais matinais de castanha-do-brasil com mandioca extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n.4, p. 950-955, 2006.

SOUZA, M. L., MENEZES, H. C.; Extrusão de misturas de castanha do Brasil com mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n.2, p. 451-462, 2008.

SPINI, V. B. M. G.; FERREIRA, F. R.; PADUANI, G. F.; SOUZA, C. S.; KERR, W. E. Efeito da adição de Castanha-do-Pará à dieta de arroz e feijão sobre o ganho de peso em camundongos. **Bioscience Journal**. v. 22, n. 3, p. 89-93, 2006.

STOIAN, D. Cosechando lo que cae:la economia de la castaña (*Bertholletia excelsa* H.B.K) em la Amazônia Boliviana. In: ALEXIADES, M.N.; SHANLEY, P. (Eds.) Productos forestales, medios de subsistencia y conservación de productos forestales no maderables. **Center for International Forest Research**. v.3, p.89-116, 2004.

TEIXEIRA, E. **Frutas do Brasil**. Rio de Janeiro: MEC/INL, 1954. 281p.

THABUIS, C.; DESTAILLATS, F.; TISSOT-FAVRE, D.; MARTIN, J-C. Oleoyl-ethanolamide (OEA): A bioactive lipid derived from oleic acid and phosphatidylethanolamine. **Lipid Technology**, v. 19, n. 10, p. 225-227, 2007.

THABUIS, C.; TISSOT-FAVRE, D.; BEZELGUES, J-B.; MARTIN, J-C.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DIONISI, F.; DESTAILLATS, F. Biological Functions and Metabolism of Oleoylethanolamide. **Lipids**, v. 43, n.10, p. 887-894, 2008.

TSHUVA, E. Y.; LIPPARD, S. J. Synthetic Models for Non-Heme Carboxylate-Bridged Diiron Metalloproteins: Strategies and Tactics. **Chemical Reviews**. v.104, n.2, p.987-1012, 2004.

UNRINE, J. M.; JACKSON, B. P.; HOPKINS, W. A. Selenomethionine Biotransformation and Incorporation into Proteins along a Simulated Terrestrial Food. **Chain Environmental Science and Technology**. v. 41, n.10, p. 3601-3606, 2007.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical Composition of Selected Edible Nuts Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.13 p. 4705-47014, 2006.

WANG, Y.; VOY, B. J.; URS, S.; KIM, S.; SOLTANI-BEJNOOD, M.; QUIGLEY, N.; HEO, Y. R.; STANDRIDGE, M.; ANDERSEN, B.; DHAR, M.; JOSHI, R.; WORTMAN, P.; TAYLOR, J.W.; CHUN, J.; LEUZE, M.; CLAYCOMBE, K.; SAXTON, A. M.; MOUSTAID-MOUSSA, N. The Human Fatty Acid Synthase Gene and De Novo Lipogenesis Are Coordinately Regulated in Human Adipose Tissue. **Journal of Nutrition** , v. 134, n.5, p. 1032-1038, 2004.

YAMAMOTO, S.; SMITH, W. L. Molecular Biology of the Arachidonate Cascade (second edition). **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**.v.68–69, n.2, p.1, 2002.

YEOH, H. H.; TRUONG, V-D .Protein contents, Amino Acid compositions and Nitrogen-to-protein conversion factors for cassava roots. **Journal of Science Food Agricultural**. v. 70, n.1, p. 51-54, 1996.

YOSHIZAWA, K.; ASCHIERO, A.; MORRIS, J. S.; SATMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E.; BASKETT, C. K.; WILLET, W. C., RIMM, E. B. Prospective study of selenium levels in toenails and risk of coronary heart disease in men. **American Journal of Epidemiology**. v. 158, n. 9, p. 852-860, 2003.

Capítulo 2

Brazil nut protein quality evaluation by the use of HPLC and “in vivo” methods

(Artigo submetido para a revista Journal of Separation Science, em edição
especial para análise de alimentos)

Abstract

The objective of this investigation was to evaluate the protein quality of the defatted cake of Brazil nut (DC) using chemical and biological methods. An HPLC method was used to analyze the amino acids in DC and casein (CAS) after derivatization with phenylisothiocyanate (PITC). The amino acid analyses were carried on an HPLC equipped with LUNA C8 column with UV detection at 254nm. The amino acids found at deficient concentrations were lysine and threonine; methionine+cysteine was found at the higher concentrations than biologically required. The Biological indices in the diets containing DC showed a PER (Protein Efficiency Ratio) greater than 2.0, a positive NB (Nitrogen Balance), an Apparent Digestibility (AD) higher than 90.0% and Apparent Biological Value (ABV) near 90.0%. HPLC and the biological indices determined revealed to be suitable methods for evaluating DC protein value.

Abbreviations: **DC**, Deffated Cake of Brazil nut; **CAS**, Casein; **PITC**, Phenylisothiocyanate; **AABA**, Alpha Amino Butyric Acid; **CS**, Chemical Score; **PER**, Protein Efficiency Ratio; **NB**, Nitrogen Balance; **AD**, Apparent Digestibility; **ABV**, Apparent Biological Value; **NC**, Nitrogen Consumed; **NF**, Nitrogen in Feces; **NU**, Nitrogen in Urine.

Keywords: HPLC; protein quality; chemical methods; biological methods; Brazil nut; Wistar rats.

1. Introduction

Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is a native Amazon product with social, environmental and economical importance. The nut is referred to as “vegetable meat” and contains 67.3% of lipid, 14.2% of protein and 3.4% of carbohydrates [1,2]. Brazil produces around 30.000 tons of Brazil nut per year and only 5% are used in internal consumption. The nuts are generally consumed “in natura”[3,4].

The pharmaceutical industry have been used the Brazil nut as raw material to produce pressed oil. The residue of the process, the defatted cake, have a high nutritional value [5]: 25.1% lipids, 40.2% protein and 3.4% carbohydrates [2].

The quality of the protein source can be measured by chemical and biological methods. A chemical method is the Chemical Score (CS), that indicates which indispensable amino acid is the most limiting [6,7] and the protein quality is predicted by the adequate concentration of indispensable amino acids [6,7,8].

In order to determine the amino acids profile, a rapid, reliable and precise analytical method is necessary. Many analytical methods have been proposed, including gas chromatography, HPLC and capillary electrophoresis [9].

HPLC is a powerful method to estimate the protein quality as the indispensable amino acids are analyzed and the limiting amino acids can be easily detected. In this way, the most common method to analyze amino acids in food is the reverse-phase HPLC using precolumn derivatization. Typical reagents used for derivatization are phenylisothiocyanate (PITC) [9-14]; orthophthalaldehyde

(OPA)[15]; 9-fluorenylmethyl-chloroformate (FMOC-Cl) [16-18], 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide and dansyl-chloride [9,18].

Derivatization with PITC in protein hydrolysates of different foods results in phenylthiocarbamil amino acids (PTC-amino acids). This method is generally regarded as less sensitive than the ones based on the fluorimetric detection [9]. However the PITC method quantifies secondary amino acids, such as proline and hydroxyproline, and it is not necessary a second detector[11].

Methods based in food intake, weight gain, total nitrogen in feces and urine are used for biological evaluation of protein quality. Some of the well-known biological indices are PER (Protein Efficiency Ratio), that measures the weight gain divided by protein intake mass; NB (Nitrogen Balance) that measures the difference between intake and excreted nitrogen; D (Digestibility), percentage of hydrolyzed protein by digestive enzymes absorbed as amino acids or other nitrogen compounds, and BV (Biological Value), that measures the percentage of nitrogen absorbed that is used at tissue level [6,7].

Many studies are being developed as an attempt to replace animal protein sources for others of lower costs, to supply the increasing population needs and institutional demands [19].

Due to the large production of Brazil nut defatted cake, which has high nutritional quality, the objective of this study was evaluate the Brazil nut's defatted quality by using chemical and rat "in vivo" methods.

2. Materials and Methods

2.1 Protein sources

The protein sources used in this work were casein (Naarde- Agro Product BV- Holland) as standard protein [20] and defatted cake of Brazil nut (DC). The proximate composition (ash, moisture, protein) of samples was analyzed by the methods described in *Association of Official Analytical Chemists* [21], using the conversion factor 6.25 for total nitrogen to CAS and 5.46 for DC[5], and the lipid analysis (ether extract) was performed by the Soxhlet method [22]. The analyses were performed in the Nutrition and Metabolism Laboratory (Lanum), Department of Food and Nutrition (Depan), Faculty of Food Engineering (FEA), State University of Campinas (Unicamp).

The Brazil nuts were donated by “Juta and Castanha Company” (São Paulo – SP). The nuts were defatted by pressing using Scott Tech®’s SMR 600-E press. The raw material was heated to approximately 60°C for 30 min, and then the oil was extracted after grinding by the use of Extractor Scott Tech®’s ERT-60-II.

2.2 Amino acid analysis of protein sources (chemical indices of protein quality)

2.2.1 Reagents and standards

Hydrochloric acid (Merck), phenol (Merck), sodium acetate (Merck), methanol (Merck), triethylamine (Merck), phenylisothiocyanate (PITC - SIGMA), monoacid sodium phosphate, phosphoric acid, acetonitrile (ACN), disodium EDTA, glacial acetic acid, ultrapure water, Pierce Standard (obtained from Pierce), with all

components in the concentration 2.5 $\mu\text{mol/mL}$, except the cystine that have 1.25 $\mu\text{mol/mL}$, in HCl 0.1 M and Alpha Amino Butiric Acid (AABA - Aldrich).

2.2.2. Apparatus

The analytical system was the SPECTRA SYSTEM (Thermo Separation Products). The analytical column, LUNA C8 100 Å 5 μ , 250x4.6mm 00G-4252-EQ (PHENOMENEX - USA Torrance, CA.); quaternary pump SPECTRA SYSTEM P4000 (Thermo Separation Products); injection valve RheodyneForno THERMASPHERE TS-130 HPLC (PHENOMENEX - USA Torrance, CA.); detection module UV SPECTRA SYSTEM UV 2000 (Thermo Separation Products); Degasser SPECTRA SYSTEM (Thermo Separation Products); all thermo modules Thermo Fisher Scientific Inc.

2.2.3 Sample preparation and derivatization

The samples were weighted (0.10 g CAS and 0.15g DC) and placed into hydrolysis tubes with addition of 9 mL of hydrochloric acid 6M containing 1% phenol. The tubes were closed under nitrogen gas and mixed for 30 s in a vortex, heated at 110 °C for 24 h, let them cool to room temperature, added of AABA and mixed for 30 s; transferred to a volumetric flask and diluted with ultrapure water; then filtered with a plastic syringe attached to 0.45 μm Millipore filter Millex; 40 μL of filtered were mixture transferred to a glass tube with 6 X 50 mm, for the derivatization procedures.

The samples were dried under vacuum and added of 20μL of 2:2:1 (sodium acetate 0.2N: methanol: trietilamine [v/v/v]). The solution was transferred to a 100mL recipient, with cover, homogenized and stocked at a temperature lower than 10°C.

The sample was dried again and added approximately 20μL of derivatization solution 7:1:1 (methanol:ultra pure water:trietilamine with PITC [v/v/v]) then homogenized in vortex during 15 s. After 20 min, the sample was dried again, added of about 500μL of monoacid sodium phosfate with ACN, the tube was covered with 3 teflon layers, mixed under ultrasound during 30 s, transferred to HPLC injector and quantified by UV absorption in 254 nm[10,23].

2.3 Chemical Score of protein sources (chemical indice of protein quality)

The CS is one of the methods used to express amino acid adequacy value of proteins. The limiting amino acid is determined by the amount of the indispensable amino acid compared with the amount of the same amino acid recommended by the *Food and Agriculture Organization's* reference protein [24] for children 2-5 years old, applying the Expression (1) [6,7].

$$SC = \frac{mg \text{ of } aa \text{ in } 1g \text{ of a test protein}}{mg \text{ of } aa \text{ in } 1g \text{ of reference protein}} \quad (1)$$

2.4 Biological evaluation of Brazil nut protein quality

2.4.1 “In vivo” assay

The “in vivo” assay was done in the Biological Evaluation Laboratory (LEB), Depan-FEA-Unicamp. Twenty-four male Wistar rats, 21 days old (newly weaned) with initial weight about $52.7 \pm 6.2\text{g}$ were used (the animals were supplied by the Multidisciplinar Center of Biological Investigation – CEMIB, Unicamp). The rats were housed in individual cages, with temperature (20-22°C) and controlled humidity (40-50%), including light/dark cycle of 12 h and access to water and food *ad libitum*. The ingestion of feed was monitored daily and weight gain was measured 3 times per week.

The animals were divided into 4 experimental groups of 6 animals each and submitted to mixed diets, except for G1 group, which received the AIN 93-G diet [20] as a control. The protein source and its proportions were varied among the feeds in order to evaluate DC quality (see Table 1). The animals were sacrificed by decapitation. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Unicamp, under Protocol nº 1680-1.

2.4.2 Diet formulation

Four diets were prepared, as showed in Table 1. All diets showed protein content of 12% [25] and the proximate composition analysis was done according to methods mentioned in section 2.1.

The contents of carbohydrates, lipids and proteins of DC were considered for the diets formulation. However, the ash content was not considered; thus, the diets with DC showed higher ash contents compared to standard diet.

Table 1. Ingredients and quantities used in the formulation of standard and experimental diets and total macronutrients composition.

Ingredients g/100g	G1 ^{a)}	G2 ^{b)}	G3 ^{c)}	G4 ^{d)}
Cornstarch	41.75	39.60	40.52	40.10
Dextrinized cornstarch	15.20	13.17	13.46	13.32
Sucrose	14.00	9.98	10.20	10.10
Casein	15.42	10.03	11.57	13.50
DC	---	15.11	10.79	5.39
Soybean oil	7.00	2.00	3.40	5.20
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00
Mineral Mix	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamin Mix	1.00	1.00	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Total protein (g/100g)	12.00	12.00	12.00	12.00
Total lipid* (g/100g)	7.00	6.97	6.95	6.97
Total Ash (g/100g)	2.50	3.09	2.84	2.70
Energy (Kcal/100g)	244.09	230.26	229.26	224.56

*Ether Extract

^{a)}G1(standard): diet with CAS as unique protein source

^{b)}G2:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 65%CAS and 35%DC

^{c)}G3:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 75%CAS and 25%DC

^{d)}G4:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 87.55%CAS and 12.5%DC

2.4.3 Determination of PER (Protein Efficiency Ratio)

Individual rat body weight, feed intake and wasted diet were measured and recorded daily and used to calculate the average 28 days weight gain and protein intake per rat for each group. Protein Efficiency Ratio (PER) was calculated using de the Equation (2).

$$PER = \frac{\text{weight gain of animal } X \text{ (g)}}{\text{total protein consumed by animal } X \text{ (g)}} \quad (2)$$

2.4.4 Determination of NB (Nitrogen Balance)

The rats were housed in metabolic cages for 7 days and collect urine and feces. The concentration of nitrogen in urine and feces was estimated by the Kjeldahl method [21] and the data obtained from this experiment were used to calculate AD and ABV. The NB was calculated according to Equation (3).

$$NB = \text{nitrogen consumed} - (\text{nitrogen in feces} + \text{nitrogen in urine}) \quad (3)$$

2.4.5 Determination of AD (Apparent Digestibility)

AD is called ‘apparent digestibility’ as the animal endogenous nitrogen [6] is disregarded. It is calculated by the Equation (4).

$$AD = \frac{\text{Nitrogen consumed} - \text{Nitrogen in feces}}{\text{Nitrogen consumed}} \times 100 \quad (4)$$

2.4.6 Determination of ABV (Apparent Biological Value)

ABV is called 'apparent biological value' as the animal endogenous nitrogen [6] is disregarded. It is calculated by the Equation (5).

$$ABV = \frac{\text{retained nitrogen (RN)}}{\text{absorbed nitrogen (AN)}} \times 100 \quad (5)$$

Retained nitrogen (RN) is the difference between nitrogen consumed (NC) and excreted in urine and feces [NC-(NF+NU)] and the nitrogen absorbed is the difference between the nitrogen consumed and excreted by feces (NC-NF).

2.5 Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) was calculated. Averages were compared by Tukey test, with 5% of significance, values lower than 5% indicated significant differences. The SAS System software was used, BC, 2001.

3. Results and Discussion

The proximate composition of protein sources (CAS and DC) is shown in Table 2. The protein content found in DC (27.8%) was lower than the ones showed in previous studies, which were 47.6%[5]; 46.7%[26]; 40.2%[2] protein. This could be explained by differences among the methods of lipid extraction in the considered studies considered. The above cited authors used pressing and extraction with hexane[5], Soxhlet[26] and hydraulic squeezer[2] and these

methods showed to be more effective to remove the oil from Brazil nuts. In the present work we have done only pressing, because the use of solvent to maximize the extraction would leave chemical traces, thus turning the defatted cake improper for consumption for the animals used in the biological assay [27].

As consequence of the lower efficiency in the lipid extraction of Brazil nut in this study, we found a high content of ether extract (32.9%) in our DC; while other investigators report lower contents of oil in DC (1.2% [5] and 25.13% [2]).

Table 2. Proximate composition of protein sources (casein and defatted cake of Brazil nut) used.

Protein source	% Moisture	% Ash	% Protein	% Ether Extract	% Carbohydrate
CAS	10.0	3.1	77.8	0.3	8.8
DC	3.8	14.3	27.8	32.9	21.2

The aminograms of DC and CAS samples were compared with some others available in literature. Tables 3 and 4 compare our results with data from the literature.

Table 3. Values of indispensable amino acids (mg aa/g ptn) found on casein aminogram using derivatization with PITC compared with data from literature.

Indispensable Amino acid	CAS	*Literature value[26]
	(mg aa/g ptn)	(mg aa/g ptn)
Ileu ¹	43.2	46.9
Leu ²	81.5	93.1
Lys ³	64.0	78.7
Met+Cys ⁴	39.6	30.1
Phe+Tyr ⁵	111.8	109.7
Trh ⁶	40.3	43.2
Try ⁷	ND	ND
Val ⁸	48.1	54.9

ND indicates not detected; *derivatization with PITC; ¹ Isoleucine; ² Leucine; ³ Lysine; ⁴ Methionine+Cysteine; ⁵ Phenylalanine+Tyrosine; ⁶ Threonine; ⁷ Tryptophan; ⁸ Valine

Table 4. Values of indispensable amino acids (mg aa/g ptn) found in defatted cake of Brazil nut aminogram using derivatization with PITC and comparison with other methods of amino acids estimative found in the literature.

Indispensable Amino acid	DC	Literature Value[4]*	Literature Value[27]**
	(mg aa/g ptn)	(mg aa/g ptn)	(mg aa/g ptn)
Ileu	32.2	37.5	36.6
Leu	76.5	87.1	72.3
Lys	29	37.1	33
Met+Cys	93.4	95.5	61.8
Phe+Tyr	68.6	49.2	45.4
Trh	24.5	31.6	28
Try	Nd	ND	ND
Val	55.5	59.2	55.5

ND indicates not detected; *ionic change chromatography; ** amino acid analyzer

The results of CAS aminogram (Table 3) have confirmed that the casein used in this investigation is a good indispensable amino acid source, showing no limiting indispensable amino acid when compared with FAO/WHO/UNU standard [24] (Table 5). This result is in accordance with the literature [28], that shows no deficiency in indispensable aminoacids and CS higher than 1.0 for casein.

The result of DC aminogram (Table 4) was very similar to the those described by other authors [5], except for the contents of Lys and Thr showing values approximately 28.0% higher and Phe+Tyr, which was 28.0% lower

compared to values reported by other investigations. Comparing our results with the ones from other reports [29], which analyzed DC by amino acid analyzer, the greatest differences were in Phe+Tyr and Met+Cys contents. These variations could be attributed to the Brazil nuts differences in composition along the year and differences in analytical methods.

The DC Chemical Score (Table 5) revealed deficiency in 2 indispensable aminoacids, being lysine the first limiting and threonine the second one, with CS values of 0.6 and 0.9 respectively. This values are coherent with the previous studies [2], which described CS of 0.5 to lysine and 0.7 to threonine, with a third limiting amino acid (tryptophan). These results also agrees with other study [5] that found CS 0.6 to lysine and 0.9 to threonine.

Table 5. Chemical Score of the protein sources used in this investigation (CAS and DC) in according with FAO/WHO/UNU [24] references of indispensable amino acids to 2-5 years old child.

Indispensable aminoacid	CAS	DC
Ileu	1.5	1.2
Leu	1.2	1.2
Lys	1.1	0.6*
Met+Cys	1.6	3.7
Phe+Tyr	1.8	1.1
Trh	1.2	0.9**
Try	nd	nd
Val	1.4	1.6

* 1st limiting aminoacid;**2nd limiting aminoacid

Despite of deficiency of some indispensable amino acids, the Brazil nut showed a high methionine+cysteine concentration, and can be regarded as an excellent source of these amino acids, showing a total of 7.5% methionine and 1.9% cysteine, result that is also in accordance to literature [30]. When compared with other vegetable sources, as bean [31] and soybean [28], it can be observed that the DC is poor in Lys, amino acids largely found in bean (CS 1.3) and soybean (CS 1.4). The same occurs with Thr, that shows for DC CS=0,9; CS=1.3 for bean and CS=1.5 for soybean. On the other hand, DC is rich in Met+Cys, while the CS of these amino acids is 0.9 and 0.8 to bean and soybean, respectively. Therefore,

DC can easily be added in everyday meals as an additional protein source, considering that its limiting amino acids can be easily balanced by other food protein sources.

A higher feed consumption was observed in G4 group (Table 6), followed by G1, G2 and G3, all statistically different among them. The average daily feed consumption was also different among the groups, ranging from 11.4 to 18.6g /day. This range is in accordance with the literature, with reports to average consumption ranging from 12.0 to 15.0 g/day/animal [32]; in this way, only G2 showed consumption values in accordance with the literature. G1 and G4 showed superior feed consumption compared to reference, while G3 showed a slight lower feed consumption. In summary, the groups that ate more DC showed less feed consumption. These differences could be due to the feed palatability and nutrient composition of the diets with high DC concentration. The animal feed intake is controlled by many factors, as for example glucose, lipids and amino acid sensitive effects, anorexigenic peptides and hormonal effects that can play a role on the regulation of ingestion of the two principle components of food: nutrients and energy [33].

Table 6. Results found on the studies of growth (feed consumption, daily feed consume, weight gain and PER) and nitrogen metabolism (NB, AD and ABV)

Assay	G1 ^{a)}	G2 ^{b)}	G3 ^{c)}	G4 ^{d)}
Growth				
Feed Consumed (g)	451.1 ± 3.37 ^b	407.2 ± 6.16 ^c	320.2 ± 5.29 ^d	519.5 ± 2.66 ^a
Feed/day Consume	16.1	14.5	11.4	18.6
Weight Gain	163.5 ± 0.89 ^a	120.1 ± 2.26 ^c	119.4±0.8 ^c	151.9 ± 1.46 ^b
PER	2.7 ± 0.02 ^a	2.3 ± 0.01 ^b	2.7 ± 0.04 ^a	2.1 ± 0.03 ^b
Nitrogen Metabolism				
N B	3.6 ± 0.04 ^a	1.6 ± 0.06 ^c	1.2 ± 0.13 ^d	2.1 ± 0.09 ^b
AD	95.1 ± 0.12 ^a	94.2± 0.41 ^a	90.0 ± 0.78 ^b	93.5±0.54 ^a
ABV	91.5 ± 0.20 ^a	91.7 ± 0.29 ^a	85.7 ± 3.42 ^a	92.2 ± 1.13 ^a

Different letters indicate statistic differences ($p < 0.05$); Table 6 show average feed consumption (feed consumed per rat during all the biological assay), daily feed consumption (feed consumed per rat per day), total protein consumption (protein consumed per rat during all the biological assay), weight gain (average weight gain per rat during the entire biological assay), PER, BN, AD and ABV of the animals used in the biological assay.

^{a)}G1 (standard): diet with CAS as unique protein source

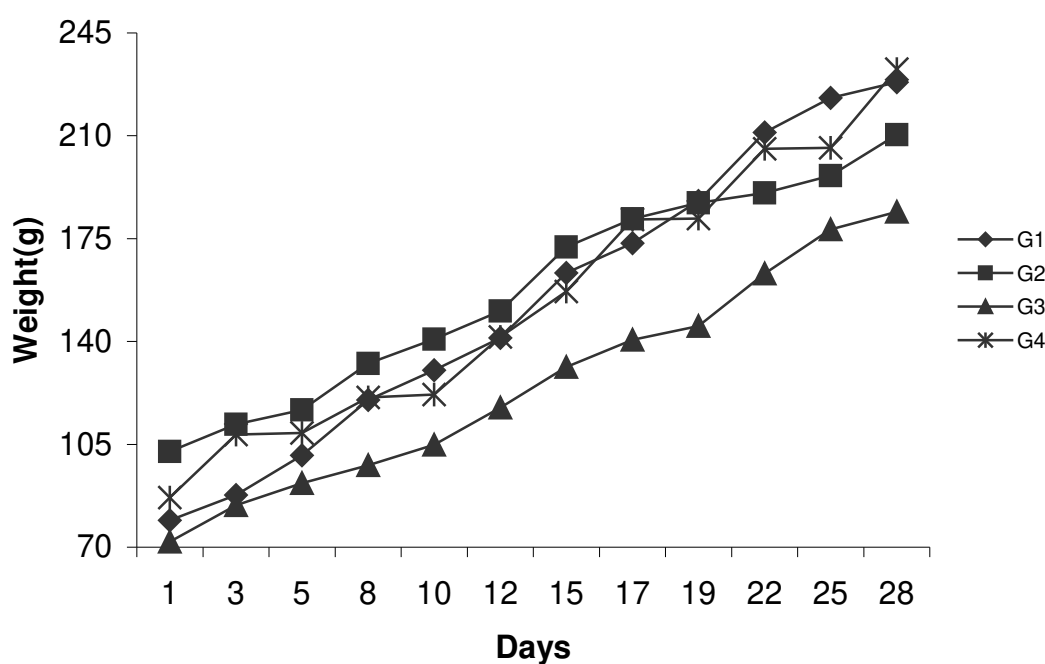
^{b)}G2: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 65% CAS and 35% DC

^{c)}G3: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 75% CAS and 25% DC

^{d)}G4: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 87.55% CAS and 12.5% DC

The weight gain (Table 6) values revealed that G1 promoted higher weight gain, followed by G4, G2 and G3. Figure 2 shows the weight variation curve for animals submitted to CAS and DC diet. It can be observed in Figure 2 that G3 presents the lower weight body values, but the weight gain was statically equal to G2. Thus, the groups that ate the feeds with higher DC contents showed lower weight gains. The same result is reported in another investigation [34], which

reports the effects of different proportions of Brazil nuts in a diet based on rice and beans. The authors concluded that the animals that ate higher amounts of nuts had lower weight gain and the animals that ate the ideal amount of DC had optimal growth. This result could be explained by the effects caused by an excess of methionine in the diet as it can be converted to homocystein, a toxic metabolite [35,36].



G1 (standard): diet with CAS as unique protein source

G2: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 65% CAS and 35% DC

G3: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 75% CAS and 25% DC

G4: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 87.5% CAS and 12.5% DC

Figure 2 Body weight of rats fed with different diets for 28 days.

According to the literature, PER values below 1.5 indicate low quality protein; PER values between 1.5 and 2.0 indicate intermediate quality protein and over 2.0 high quality protein [7]. According to this classification, it can be concluded

that the DC is a high quality protein food (Table 6). The higher PER value was found in G1 (PER=2.7), which is in accordance to literature [37], which describes PER value of CAS of 2.4 ± 0.09 . There was no statistic difference between G1 and G3 (PER=2.7), that ingested diet 25% DC. The groups G2 and G4 presented PERs, 2.3 and 2.1, respectively, which were statistically equal ($p=0.05$) among themselves. In an study done with defatted flour of Bocaiúva nuts [38], $PER=2.3 \pm 0.25$. In this way, Bocaiúva nuts can be regarded as good protein sources. Despite the lower feed consumption and weight gain, the groups G2 and G3 showed that DC have a protein efficiency as good as CAS, which is generally regarded as a high quality protein.

All experimental groups showed positive Nitrogen Balance (NB) (Table 6), which is generally recognized as a prerequisite for the animals in there growing phase [6]. G1 and G4 showed higher values of NB, 3.6 and 2.1 respectively. The groups G2 and G3 showed lower values of NB compared to the others (1.6 and 1.2, respectively). This result is in accordance to the one found [38] on bocaiúva nut defatted flour (2.0 ± 0.36).

The results found for Apparent Digestibility (Table 6) revealed that CAS (G1) showed higher digestibility ($95.1 \pm 0.12\%$) when compared to the other samples. This is because it is an animal protein, being easily digested and absorbed. This result was higher than the one found in a previous investigation [39], when the authors found $AD = 86.6 \pm 0.63\%$ and higher than digestibility for CAS, that generally ranges from 90.8% to 95.4% [40,37,28].

According to apparent digestibility results, the groups G2 and G4 did not differ statistically from G1, which confirms that the Brazil nuts addition to feed did not reduce the digestibility of standard protein. The group G3, despite showing a lower AD value (90.0%) and statistically different from the others, also is close to the values of AD found in casein sample. In a study in Brazil nut as unique protein source [41], the value of AD was $95.7 \pm 0.22\%$ using rats as assay animal.

The measure of nitrogen retention in animals organism were evaluated through Apparent Biological Value (ABV), showing values from 85.7% to 92.2% (Table 6), with highest ABV result of group G4 and lowest G3. The results indicated that ABV did not show statistic differences among the 4 groups, revealing that all groups of this experiment showed equal nitrogen retention, even with consumption and weight gain differences. In this way it is confirmed that Brazil nuts is an excellent protein source.

The ABV values were higher than the ones found [37,38] in casein and Bocaiúva nuts (from 81.7 ± 1.27 to 88.9 ± 0.33 and 81.1 ± 3.25 , respectively).

4. Concluding Remarks

The HPLC method showed to be an efficient tool for protein quality evaluation of Brazil nut, which was confirmed by “in vivo” assays.

The Biological indices proved that Brazil Nut can be used as an alternative protein source, once consumed in adequate quantities, showing values of chemical

and “in vivo” parameters near to the ones found in casein, which is regarded as an high quality protein.

Acknowledgements

PT Poeta acknowledges CNPq for the scholarship (process number 134457/2007-2).

We acknowledge Ms. Maria Susana Corrêa Alves da Cunha and Ms. Soely Maria Pissini Machado Reis for the assistance during the biological assays. We acknowledge Mr. Ary Dias for the nuts supply.

References

- [1]RIBEIRO, M.A.A. *Aproveitamento tecnológico de castanhas-do-brasil (Bertholletia excelsa): estudo da qualidade de conservação*. Piracicaba, 1992. 117p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- [2]SOUZA, M.L.; MENEZES, H.C. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2004, 24,120-128.
- [3]EMBRAPA. *Boas práticas da castanha-do-brasil é tema de curso*. Sessão: Banco de notícias. jul. 2008. Disponível em : [http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/julho/3a-semana/boas-praticas-da-castanha-do-brasil-e-tema-de-curso/?searchterm=castanha do Pará](http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/julho/3a-semana/boas-praticas-da-castanha-do-brasil-e-tema-de-curso/?searchterm=castanha%20do%20par%C3%A1). Acesso em: 23.03.2009.
- [4] IBGE. *Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura*. Sessão: Comentário, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2006/comentario.pdf> . Acesso em 01.04.2009.
- [5]GLÓRIA, M..M.;REGITANO-d'ARCE, M.A.B.*Obtenção and caracterização de concentrado and isolado protéico de torta de castanha do Pará*. 1997, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência and Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- [6]SGARBIERI, V.C. *Alimentação and Nutrição*. Editora UNICAMP, São Paulo1987.
- [7]FRIEDMAN, M. *J. Agric. Food Chem.* 1996,44, 6-24.
- [8]MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S. *Krause Alimentos, nutrição & dietoterapia*. Rocca, São Paulo 2005.
- [9]SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.;LÓPEZ-CERVANTES, J.; LÓPEZ-HERNANDEZ, J.; PASEIRO-LOSADA, P.; SIMAL-LOZANO, *J.Chromatographia*,2003, 58, 159-163.
- [10]JANSSEN, P.S.L.; NISPEN, J. W. V.; MELGERS, P. A. T. A; VAN DEN BOGAART, H.W. M; VAN AALST, G.W. M.; GOVERDE B. C. *Chromatographia*, 1986, 22, 7-12.

- [11]WHITE, J.A.; HART, R.J.; FRY, C. *J. Autom. Chem.*, 1986, 8,170-177.
- [12]MORA, R.; BERNDT, K. D. B.; TSAI, H.; MEREDITH, S.C. *Anal. Biochem.*, 1988, 172, 368-376.
- [13]VENTA, R., *Clin. Chem.*, 2001, 47, 575–583.
- [14]VILASSOA-MARTÍNEZ, M., LÓPEZ-HERNANDEZ, J., LAGE-YUSTY, M.A., *Food Chem.*, 2007, 103,1330-1336.
- [15]HERBERT, P.;BARROS, P.;RATOLA N.;ALVES, A., *J. Food Sci.* , 2000, 65, 1130-1133.
- [16]BETNÉR I.; FÖLDI, I.P., *Chromatographia*, 1986, 22, 381-387.
- [17]FABIANI, A.;VERSARI, A.;PARPINELLO, G.P.;CASTELLARI, M.;GALASSI, S., *J. Chromatogr. Sci.* , 2002, 40, 14-18.
- [18]LÓPEZ-CERVANTES, J.;SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.;ROSAS-RODRIGUES, J.A., *J. Chromat. A*, 2006, 1105, 106-110.
- [19]CASTRO, I.A. *Modelagem and otimização de propriedades nutricionais and sensoriais de misturas protéicas através da metodologia estatística de superfície de resposta*. 1999. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de ciências Farmacêuticas/ Faculdade de Engenharia de Alimentos/ Faculdade de saúde pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- [20]REEVES, P.G.;NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. J.R., *J. Nutr.*, 1993, 123, 1939-51.
- [21]AOAC. *Official methods of analysis of AOAC*. AOAC International,Virginia 1995.
- [22] LESS, R. *Manual de análisis de alimentos. Laboratory handbook of methods of food analysis*. Zaragoza, Acibia 1979.

[23]HAGEN SR, FROST B, AUGUSTIN J., *J. Assoc. Off. Analyt. Chem.*, 1989, 72, 912-916.

[24]FAO/WHO/UNU. *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. Report of a Joint Expert Consultant. Geneva, Switzerland, 2002, 265p.

[25]GOENA, M.; MARZO, F.; FAERNÀNDEZ-GONZÀLEZ, L.; TOSAR, A.; FRÜHBECK, G.; SANTIDRIÁN, S. *Rev. Esp. Fisiol.*, 1989, 45, 55-60.

[26] RAMOS, C.M.P.;BORA,P.S., *Food Sci. Technol. Int.* , 2003, 9, 265-269.

[27] EMBRAPA, *Extração de óleo de girassol utilizando miniprensa*. Sessão: Página Inicial. Mar. 2009. Disponível em : http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=73&cod_pai=159. Acesso em: 25.03.2009.

[28]PIRES,C.V.;OLIVEIRA,M.G.A.;ROSA, J. C.;COSTA, N. M. B., *Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2006, 26,179-187.

[29] ANTUNES,A.J.;MARKAKIS, P., *J. Agric. Food Chem.*, 1977, 25, 1096-1098.

[30]CHUENHIENG, T.; PTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI T.; MONTET, D., *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 52, 4318 – 4322.

[31]ANTUNES, P.;BILHALVA, A.;ELIAS, M.C.;SOARES, G.J.D., *Rev. Bras. de Agroc.*, 1995, 1, 12-18.

[32]DE LUCA, R.R., ALEXANDRE, S.R., MARQUES, T. *Manual para Técnico em bioterismo*. Winner Graph, São Paulo 1996.

[33]DEWYS, W. D., *Cancer Res.* 1977, 37, 2354-2358.

[34]SPINI, V.B.M.G.; FERREIRA, F.R.; PADUANI, G.F.; SOUZA, C.S.; KERR, W.E. *Biosci. J.*, 2006, 22,89-93.

[35] HARPER, A.E.; BENEVENGA, N. J.; WOHLHUETER, R.M., *Physiol. Rev.* 1970, 50, 428-558.

[36] TOUE, S.; KODAMA, R.; AMAO, M.; KAWAMATA, Y.; KIMURA, T.; SAKAI, R. Screening of Toxicity Biomarkers for Methionine Excess in Rats. Presented at the conference "The Fifth Workshop on The Assessment of Adequate Intake of Dietary Amino Acids" held October 24-25, 2005 in Los Angeles. Published as a supplement to *J. Nutr.*, 2006.

[37]SEENA, S.; SRIDHAR, K.R.; RAMESH S.R., *Nutr. Res.*, 2005, 25, 587-596.

[38]HIANE, P.A.; MACEDO, M.L.R.; SILVA, G.M.; NETO, J.A.B., *B. CEPPA*, 2006, 24, 191-206.

[39]GIAMI, S.Y., *Food Chem.*, 2004, 88,397-404.

[40] RANGEL, A.;SARAIVA, K.;SCHWENGBER, P.;NARCISO, M.S.;DOMONT, G.B.; FERREIRA, S.T.; PEDROSA, C., *Food Chem.*, 2004, 87, 491-499.

[41]MITCHELL, H.H.;BEADLES, J.R., *J. Nutr.* , 1953,14, 597-608.

Capítulo 3

Effect of different concentrations of Brazil nuts in feed on the body composition of Wistar rat

(Artigo em fase de preparação para envio à revista Ciência e Tecnologia de Alimentos)

Resumo:

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de torta desengordurada de castanha do Brasil (DC) na dieta de ratos Wistar sobre sua composição corpórea. O óleo da castanha foi analisado segundo seu teor de ácidos graxos, apresentando maior teor de ácidos graxos insaturados. As dietas foram preparadas tendo como referência a AIN 93G, e os animais divididos em 4 grupos: G1 (caseína), G2 (35% DC/ 65% caseína), G3 (25% DC/ 75% caseína) e G4 (12.5% DC/ 87.5% caseína). Observou-se redução no teor de gordura e aumento de proteína, cinza e umidade na carcaça dos animais que ingeriram dieta contendo DC.

ABSTRACT:

This work aimed at evaluation of the effects of addition of different proportions of Brazil nut defatted cake to Wistar rats standard diet (AIN) on body composition proportions. The Brazil nut oil was extracted and fatty acids were analyzed. The diets were prepared according to AIN 93G and the animals were divided in 4 groups: G1 (casein); G2 (35% DC/ 65% casein), G3 (25% DC/ 75% casein) and

G4 (12.5% DC/ 87.5% casein). Body composition analysis revealed that the animals treated with Brazil nut showed reduction in total fats, increase in total protein, ash and moisture.

1. Introduction

Brazil nut (*Berholletia excelsa*) presents pleasant flavor, is edible “in natura”, it has many applications and its proximate composition has been studied for many decades, being composed of about 13.9 to 20.7% protein, 65.0 to 69.7% lipids, 9.6% carbohydrate, 3.3% ash. It is known as one of the richest sources of lipids (MITCHELL; BEADLES, 1937; AGUIAR, 1996; VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

Normally defective and undersized nut kernel, which do not satisfy export standards are sold at very cheap prices to oil expelling industries. The defatted cake (DC), in spite of containing about 46.0% protein (RAMOS; BORA, 2003), rich in sulfur containing amino acids and high content of ash, ranging from 7.0% to 13.0%, is used to a limited extent as an ingredient in animal rations (ANTUNES; MARKAKIS, 1977; ZUO; SUN, 1996; SOUZA; MENEZES, 2004).

Many studies showed the abundance of minerals in Brazil nut, which revealed, for example, a fairly high content of Mg, Fe, Co, Zn, P, Ca, K, Na, and high amounts of Se. In this way, Brazil nut is regarded as the richest known food sources of selenium (HOLBEN, 1999; VONDERHEIDE et al., 2002; GONÇALVES et al., 2002; KANNAKUMARATH et al., 2002; CHUNHIENG et al., 2004b; KANNAMKUMARATH, 2004; DUMONT et. al., 2006; PACHECO; SCUSSEL, 2007

NAOZUKA; OLIVEIRA, 2007; PAREKH et al., 2008; THOMSON et al., 2008; CHUNHIENG et al., 2008).

The oil of Brazil nut contains 76.0% of unsaturated fatty acids. The most representative is the linoleic acid (C_{18:2}), a compound of ω -6 family, ranging from 37.0% to 45.0% and oleic acid (C_{18:1}), ranging from 26.0% to 39.0%. Saturated fatty acids are also present in Brazil nut oil, mainly palmitic acid (concentrations from 13.0% to 16.0%) (GONÇALVES et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005; VENKATACHALAM; SATHE, 2006; FREITAS et al., 2007; CHUNHIENG et al., 2008).

Due to a large production of defatted cake of Brazil nut, which has high nutritional quality, the objective of this study was to evaluate the consequences of adding of defatted cake of Brazil nut in Wistar rats diet on body composition.

2. Materials and Methods

2.1 Protein sources

The protein sources used in this work were casein (CAS) (Naarde- Agro Product BV- Holland) as standard protein (REEVES et al., 1993) and Brazil nut defatted cake (DC). The proximate composition (ash, moisture, protein) was determined by the method described in the *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995), using the conversion factor 6.25 for total nitrogen to protein for CAS and 5.46 for DC protein (GLÓRIA; REGITANO-d'ARCE, 2000), and the lipid quantification (ether extract) were made by the method of Soxhlet (LESS, 1979). The analyses were performed in the Nutrition and Metabolism

Laboratory, (Lanum), Departament of Food and Nutrition (Depan), Faculty of Food Engineering (FEA), State University of Campinas (Unicamp).

The Brazil nuts have been donated by “Juta and Castanha Company” (São Paulo – SP). The nuts were defatted by pressing using Scott Tech®’s SMR 600-E (Vinhedo – SP). The raw material was heated to approximately 60°C during 30 min, and then the oil was extracted by the Scott Tech®’s ERT-60-II Extractor (Vinhedo – SP) after grinding of the raw material.

2.2 Determination of fatty acids composition of Brazil nut oil

The determination of fatty acids composition of Brazil nut oil was done according to AOCS (2001) at the Oil and Fat Laboratory of FEA-UNICAMP. This method consists of use of gas-liquid chromatography (GLC) to identify and quantify fatty acids in vegetable oils and fats after fatty acids derivatization with boron trifluoride. A CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM chromatograph equipped with capillary column, DB-23 AGILENT (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane, 60 m, Ø int 0.25 mm, 0.25 µm film thickness was used. Gas flow rate was 1.00 mL/min.; linear velocity = 24 cm/seg; detector temperature: 280°C; injector temperature: 250°C; oven temperature: 110°C for 5 min, from 110°C to 215°C (5°C/min), 215°C during 24 min; carrier gas: Helium ; volume injection: 1,0 µL.

2.3 Biological assay

The biological assay was done in the Biological Evaluation Laboratory (LEB), Depan-FEA-Unicamp. Thirty-two male Wistar rats, 21 days old (newly

weaned) with initial weight about $52.7 \pm 6.2\text{g}$ were used (the animals were obtained from Multidisciplinary Center of Biological Investigation – CEMIB, Unicamp). The rats were housed in individual cages, with temperature (20-22°C) and humidity (40-50%) controlled, including light/dark cycle of 12 h and access to water and food *ad libitum*. The ingested amount of feed was monitored daily and weight gain was measured 3 times per week.

The animals were divided into 4 experimental groups of 8 animals each and received AIN-93G (REEVES, et al., 1993) diet as reference (control). The protein source and its proportions were varied among the feeds in order to evaluate DC quality (see Table 1). The animals were sacrificed by decapitation. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at Unicamp, under Protocol nº 1680-1.

2.3.1 Diet formulation

Four diets were prepared, as showed in Table 1. All diets showed protein content of 12% (GOENA et al., 1989) and the proximate composition analysis was done according to methods mentioned in section 2.1.

The contents of carbohydrates, lipids and proteins of DC were considered for the diets formulation. However, the ash content was not considered; thus, the diets with DC showed higher ash contents compared to standard diet.

Table 1. Ingredients and quantities used in the formulation of standard and experimental diets and total macronutrients composition.

Ingredients g/100g	G1 ^{a)}	G2 ^{b)}	G3 ^{c)}	G4 ^{d)}
Cornstarch	41.75	39.60	40.52	40.10
Dextrinized cornstarch	15.20	13.17	13.46	13.32
Sucrose	14.00	9.98	10.20	10.10
Casein	15.42	10.03	11.57	13.50
DC	---	15.11	10.79	5.39
Soybean oil	7.00	2.00	3.40	5.20
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00
Mineral Mix	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamin Mix	1.00	1.00	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Total protein (g/100g)	12.00	12.00	12.00	12.00
Total lipid* (g/100g)	7.00	6.97	6.95	6.97
Total Ash (g/100g)	2.50	3.09	2.84	2.70
Energy (Kcal/100g)	244.09	230.26	229.26	224.56

*ether extract

^{a)}G1(standard): diet with CAS as unique protein source

^{b)}G2:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 65%CAS and 35%DC

^{c)}G3:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 75%CAS and 25%DC

^{d)}G4:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 87.5%CAS and 12.5%DC

2.3.2 Determination of FER (Food Efficiency Ratio)

The food efficiency ratio was determined after 28 days of experiment according to equation (1).

$$FER = \frac{\text{body weight gain (g)}}{\text{food intake (g)}} \quad (1)$$

2.4 Body composition analysis

The gastrointestinal tract of the animals was cleaned and returned to the carcasses, which were frozen at -20°C. Thus the carcasses were sliced, lyophilized, ground and stored at -20 ° C until the determinations, according to item 2.1 above, except the body fat, that was determined by the method described by Bligh and Dyer (1989), which uses chloroform-methanol-water extraction.

2.5 Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) was applied. Mean values were compared by Tukey test, at 5% of significance, values lower than 5% indicated significant differences. The SAS System software was used, BC, 2001.

3. Results and Discussion

3.1 Proximate composition of DC and CAS

The ash content found in DC (14.3%) was more than 4-times higher than the CAS (3.1%) (Table 2). DC ash content was higher in comparison to the results described by other authors (ANTUNES; MARKAKIS 1977; GLÓRIA; REGITANO

D'ARCE, 2000; SOUZA; MENEZES, 2004; CHUNHIENG et al, 2004a; CHUNHIENG et al., 2008), which reported ash content in DC between 7.3% and 13.1%.

Table 2. Proximate composition of protein sources

Protein source	% Moisture	% Ash	% Protein	% Ether Extract	% Carbohydrate
CAS	10.0	3.1	77.8	0.3	8.8
DC	3.8	14.3	27.8	32.9	21.2

The metal ions have high affinity for sulfur amino acids such as methionine and cysteine which are present in large amounts in the Brazil nut (NAOZUKA; OLIVEIRA, 2007). Brazil nut is very rich in several minerals. In studies with Brazil nut, Mg, Fe, Co, Mo, Ag, Hg, Pb, Cu, Mn, Zn, P, Ca, K, Na, Se, Ba and Ra were already detected. (GONÇALVES et al., 2002; KANNAMKUMARATH, 2004; CHUNHIENG et al., 2004b; NAOZUKA; OLIVEIRA, 2007; PAREKH et al., 2008; THOMSON et al., 2008; CHUENIENG et al., 2008). Brazil nut is the richest known food source of selenium (Se). However, Se concentration in Brazil nut shows large variability and is likely to reflect the amounts of the mineral composition of regional soils (HOLBEN, 1999; VONDERHEIDE et al., 2002; KANNAKUMARATH et al., 2002; DUMONT et al., 2006; PACHECO; SCUSSEL, 2007; PAREKH et al., 2008). The concentrations of Se in Brazil nuts range from 1.6µg/g to 126.0µg/g (CHUNHIENG et al, 2004 b) and the recommended daily intake of selenium, in according with Standing Committee on the Evaluation of Dietary Reference Intakes

(2000) for adults is 55µg/day and the maximum tolerable limit of intake of 400 µg/day. Selenium plays an important role in glutathione peroxidase (GSH-Px) cycle, which is responsible for the reduction of a variety of hydroxiperoxides and is related to antioxidant processes in human metabolism (CHOW; TAPPEL, 1974; LANE et al., 1991; VADHANAVIKIT; GANTHER, 1993; ALLAN et al., 1999; FERREIRA et al., 2002; SOUZA; MENEZES, 2004).

Lipids found in the ether extract content of DC (32.9%) (Table 2) was higher than CAS (0.3%). However the extracted oil is composed of 73.96% of unsaturated fatty acids (Table 3) and 26.04% of saturated fatty acids (Table 3). This result is in agreement with Chunhieng et al. (2008) which found 75.6% of unsaturated fatty acids in Brazil nut oil. Oleic (C_{18:1}) and linoleic (C_{18:2}) were the most representative unsaturated fatty acids, whereas palmitic acid (C_{16:0}) was the main saturated fatty acid identified (15,27%) and this result of palmitic acid agrees with previous studies (GONÇALVES et al., 2002; VANKATACHALAM ; SATHE, 2006).

Table 3 - Fatty acids (% , g of fatty acids/100g of lipids) of Brazil nut oil.

Fatty Acid		(%)
C12:0	Láurico	0.04
C14:0	Mirístico	0.11
C16:0	Palmitic (satured)	15.27
C16:1	Palmitoleic	0.39
C17:0	Margaric	0.08
C17:1	Margaroléico	0.03
C18:0	Stearic	10.13
C18:1 Trans	Elaídico	0.46
C18:1	Oleic	45.30
C18:2 Trans	Linoelaídico	0.14
C18:2	Linoleic (ω -6)	27.40
C18:3	Linolenic (ω -3)	0.17
C20:0	Arachidic	0.28
C20:1	Gadoléico	0.07
C22:0	Behenic	0.08
C24:0	Lignoceric	0.05
Total saturated		26.04
Total unsaturated		73.96

All values are expressed as grams per 100g of lipid.

The oleic (45.30%) and linoleic (27.40%) acids concentrations were different from the ones found in other studies, which showed ranges from 26.90% to 37.42% of oleic and from 37.75% to 45.43% of linoleic acids in Brazil nut oil. However, the contents of palmitic acid concentrations in Brazil nut (15.27%) in our investigation is in agreement with another recent research, which reported palmitic acid concentrations ranging from 13.15% to 16.38% in Brazil nut oil (GONÇALVES

et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005; VENKATACHALAM; SATHE, 2006; FREITAS et al., 2007).

The predominant polyunsaturated fatty acid (PUFA) found in Brazil nut oil (Table 3) was linoleic acid, a compound of the ω -6 family, that includes linolenic and arachidonic acids. It is widely found in seed oils such as safflower, sunflower, and cottonseed oils. (BEARE-ROGERS et al., 2001; HOLMAN, 1968).

Linoleic acid is described to be important for growth, reproduction, skin function; (HOLMAN, 1968), showed to attenuate the actions of insulin on fatty acid and lipid synthesis as well as fatty acid synthase activity and expression (JONES et al., 1996; WANG et al., 2004), and produce eicosanoids, such as thromboxane, prostaglandins, prostacyclins, leukotrienes and lipoxins (YAMAMOTO; SMITH, 2002), which have physiological effects as stimulate or inhibit smooth-muscle contraction, they affect also blood pressure, respiration, and intestinal and uterine activity. Prostaglandins promote mucus secretion, which protects the chloridric gastric mucosa against the acid and attract leukocytes to the site of infection. Eicosanoids are also involved in the development of pain and fever. The thromboxanes promote thrombocyte aggregation and other processes involved in hemeostasis (KOOLMAN; KLAUS-HENRICH, 2005).

The DC showed very low concentrations of linolenic acid (ω -3). It is known that the balance between linoleic and linolenic fatty acids is very important for human homeostasis and normal development. The optimal dose or ratio of ω -6/ ω -3 varies from 1/1 to 4/1. The DC oil presents ratio of ω -6/ ω -3 equal 161/1 (other ω -3 food sources like fish oil and linseed should be ingested together with DC). The unbalanced diet shifts the physiological state to one that is prothrombotic

and proaggregatory, with increases in blood viscosity, vasospasm, and vasoconstriction (SIMOPOULOS, 2002).

The different additions of defatted cake (Table 1) resulted also on different additions of oleic and linoleic acids. In the control diet (G1), soy oil were the unique source of fatty acids. The additions of DC on G2, G3 and G4 diets resulted also on different concentrations of oleic and linoleic acids. The contents of oleic and linoleic acids added through the incorporation of DC on the experimental diets are showing on Table 4 below.

Table 4. Content of oleic and linoleic acids added through the incorporation of the DC in the experimental diets (mg of acid per g of experimental diet).

Group	Oleic acid	Linoleic acid
G1	NA*	NA*
G2	6.3	3.8
G3	4.5	2.7
G4	2.2	1.4

*NA = not added DC

a) G1 (standard): diet with CAS as unique protein source

b) G2: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 65% CAS and 35% DC

c) G3: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 75% CAS and 25% DC

d) G4: diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 87.5% CAS and 12.5% DC

3.2 Biological assay

The estimated average daily feed consumption for the rats during growth was between 12 and 15g/day/animal (DE LUCA, 1996). In the present study, the

average daily feed consumed ranged from 11.4 to 18.6g/day. The higher feed consumption was for the G4 group (Table 5), followed by G1, G2 and G3, all statistically different among them, revealing that the groups that received more DC in the diet consumed less feed.

Table 5. Measurements for growth evaluation

Assay	G1^{a)}	G2^{b)}	G3^{c)}	G4^{d)}
Feed Consumption (g)	451.10 ± 3.37 ^b	407.20 ± 6.16 ^c	320.20 ± 5.29 ^d	519.50 ± 2.66 ^a
Feed consumption/day	16.10	14.50	11.40	18.60
Weight Gain	163.50 ± 0.89 ^a	120.10 ± 2.26 ^c	119.40 ± 0.81 ^c	151.90 ± 1.46 ^b
FER ^{A)}	0.34 ± 0.005 ^b	0.30 ± 0.003 ^c	0.39 ± 0.009 ^a	0.29 ± 0.005 ^c

Different letters indicates statistic difference to $p < 0.05$; A) Food Efficiency Ratio (body weight gain [g] / food intake [g])

^{a)}G1(standard): diet with CAS as unique protein source

^{b)}G2:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 65%CAS and 35%DC

^{c)}G3:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 75%CAS and 25%DC

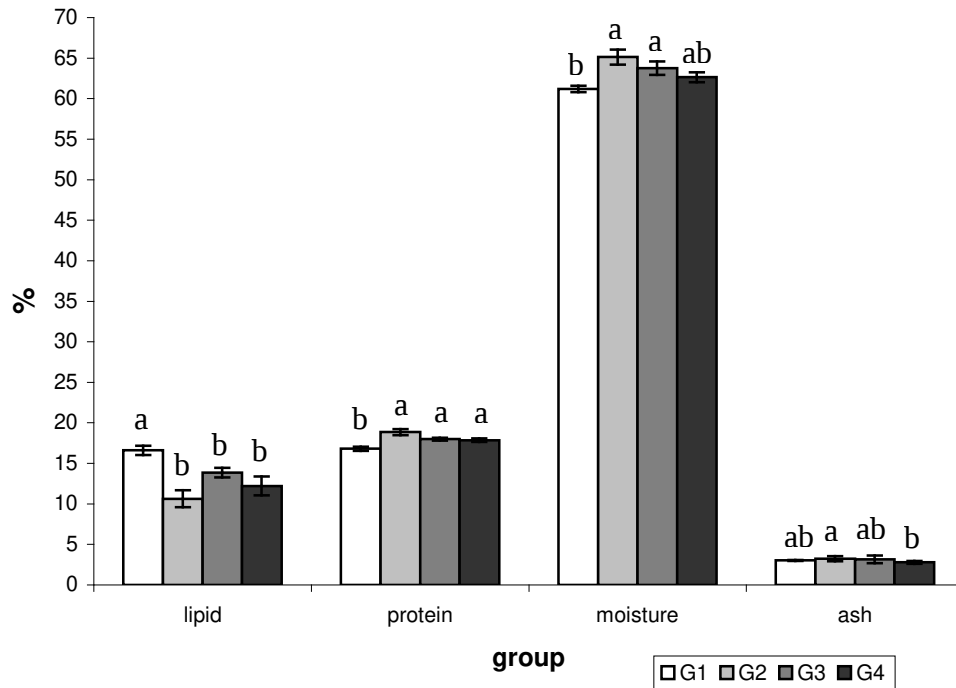
^{d)}G4:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 87.55%CAS and 12.5%DC

The body weight (Table 5) revealed that G1 have superior weight gain, followed by G4, G2 and G3. G3 presented the lowest body weight gain, wich did not differ form G2. Thus, the groups that ate the feeds with higher DC and consequently higher contents of oleic acid (Table 4) showed lower weight gains. Nevertheless, higher FER values were found for G3 followed by G1. G2 and G4 showed statically equal FER values (Table 5). Despite the staticall differences, all groups showed similar FER values compared to other studies, which ranged from 0.103 to 0.34 for casein (SHIBATA; MATSUO, 1989; YUAN; KITTIS, 1994; MEZEI et al., 2003).

DC showed a high content of oleic acid. This fatty acid is metabolized in oleoylethanolamide (OEA), an endogenous compound found in rat small intestine and is increased by feeding and reduced by fasting state. OEA is known to induce satiety and has demonstrated anorexigenic and body fat loss properties; it can also modulate lipid storage in liver and circulating plasma lipids (triglycerides and cholesterol) (GAETANI et al., 2003; THABUIS et al., 2007; THABUIS et al., 2008).

The effect of OEA on body weight is not only due to the decrease of food intake, but also to a direct effect on lipid metabolism (FONSECA et al., 2001). The major action of OEA on lipid metabolism would be essentially an increased lipid beta-oxidation in muscle and a better fat utilization through a higher lipolysis in mature adipocytes (THABUIS et al., 2008) through activation of the nuclear receptor PPAR- α , a member of the nuclear hormone receptor family, widely expressed in liver, muscle, kidney, and intestine, which mediates expression of genes promoting fatty acid β -oxidation and lowers circulating lipids (TABHUIS et al., 2008; THABUIS et al., 2007; GUZMÁN et al., 2004).

The higher percentage of body fat was observed in the group G1 (16.6%) (Figure 1). The groups G2, G3 and G4, which ate DC, showed percentage of body lipid 36.0%, 16.4% e 26.5% lower than G1, respectively.



Different letters indicates statistic difference to $p < 0.05$

^a)G1(standard): diet with CAS as unique protein source

^b)G2:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 65%CAS and 35%DC

^c)G3:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 75%CAS and 25%DC

^d)G4:diet with CAS and DC as protein source, in a proportion of 87.55%CAS and 12.5%DC

Figure 1. Body composition of the animals feed with different proportions of defatted cake of Brazil nut.

Fatty acids are well known by several effects on skeletal muscle cells, like energy source; signaling of several processes; regulation of gene expression, insulin resistance and oxidative stress. Some fatty acids seem to up-regulate the expression of genes involved in oxidation of fatty acid (SILVEIRA et. al, 2008). The treatment of adipocytes with arachidonic acid, produced by the linoleic acid, elicited significant reductions in fatty acid synthase mRNA; which is the central enzyme in de novo lipogenesis primarily from carbohydrate sources. (WANG et. al, 2004).

The Brazil nut is rich in proteins with high nutritional value (SOUZA; MENEZES, 2004; COHEN et al., 2006), with high content of essential amino acids, in particular methionine (AMPE et al., 1986; MORENO et al., 2004). The body protein (Figure 1) content was higher in groups which ate DC in comparison to G1; and the results showed that protein percentages in the animals from G2 (18.9%), G3 (18.0%) and G4 (17.9%) were statistically equal. The group G1, fed with CAS as unique protein source showed the lower percentage of body protein content (16.8%).

Antunes e Markakis (1977) conducted a study with Brazil nuts and beans. They reported that this mixture is a good source of protein, promoting animal growth. Other study using Brazil nut as a supplement for a diet composed exclusively by rice and beans in rats, showed the protein quality of Brazil nut, which is rich in sulfur amino acids, contributed for growth of the animals (SPINI et al., 2006).

The groups which ate higher percentage of DC (G2 and G3) showed the highest content of moisture in carcass (Figure 1). Specific functions have been described for linoleic acid in skin, where this compound is required to control water permeability and prevention of abnormal water loss. Linoleate-rich derivatives play a role on the physical structure of the epidermal water barrier as lipid bilayer is responsible for fill intercellular spaces of the uppermost layer of the epidermis (BURR, 1942; HANSEN; JENSEN, 1985; ELIAS et al., 1979; HARPTOP; PROTTEY, 1976; CHO; ZIBOH, 1994).

G2 presented higher percentage of body ash (3.24%), followed by G3 (3.17%). G1 and G4 showed lower contents of body ash (the ash contents of the groups

were not statistically different, $p=0.05$). It is showed that the ash content of the DC did not affect the ash content of the carcass of animals. The results of body composition of animal are shown in Figure 1.

4. Conclusions

The defatted cake of the Brazil nut (DC) of this study, with 32.9% lipids and 27.8% protein was shown to be an important source for both, proteins and lipids for animal growth.

The animals that consuming DC showed higher content of proteins in the carcass and lower lipids content, with reduction of up to 36% of body lipids compared with the group that ate CAS as unique protein source. Moreover, these animals showed higher content of ash and moisture in the carcasses.

These results suggest that the use of DC should be encouraged, as it has high nutritional quality, is easy to handle and can be added to consumed foods daily.

Acknowledgements

PT Poeta acknowledges CNPq for the scholarship (process number 134457/2007-2).

We acknowledge Ms. Maria Susana Corrêa Alves da Cunha and Ms. Soely Maria Pissini Machado Reis for the assistance during the biological assays. We acknowledge Mr. Ary Dias for the nuts supply.

References

- AGUIAR, J. P. L. Tabela de Composição de Alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica**, v.26,n. 1/2, p. 121-126, 1996.
- ALLAN, B. C.; LACOUCIERE, G. M.; STADTMAN, T. C. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, p. 1-16, 1999.
- AMPE, C.; VAN DAMME, J.; CASTRO, L. A. B.; SAMPAIO, M. J. A. M.; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCKHOVE, J. The amino-acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **European Journal of Biochemistry**, v. 159, p. 597-604, 1986.
- ANTUNES, A. J.; MARKAKIS, P. Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1096-1098, 1977.
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC**. 16 ed. International CUNNIF, P. ed., Virginia: AOAC International, v.1, 1995.1018p.
- AOCS, Official Method. Ce 1f-96 Determination of *cis*- and *trans*- Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC. **SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS AND OILS**, Reapproved 1997, Revised 2001. p. 1-6.
- BEARE-ROGERS, J.; DIEFFENBACHER, A.; HOLM, J. V. Lexicon of Lipid Nutrition (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 685-744, 2001.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipide extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-17, 1959.
- BURR, G. O. Significance of the Essential Fatty Acids. **Federation Proceedings**, v.1, p. 224-233, 1942.
- CHO, Y.; ZIBOH, V. A. Incorporation of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) into epidermal ceramides and phospholipids: phospholipase C-catalyzed release of novel 13-HODE-containing diacylglycerol. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n.201, p. 255-26, 1994.
- CHOW, C. K.; TAPPEL, A. L. Response of Glutathione Peroxidase to Dietary Selenium in Rats. **Journal of Nutrition**, v. 104, p. 444-451, 1974.
- CHUNHIENG, T.; GOLI, T.; PIOMBO, G.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Recent analysis of the composition of Brazil nut *Bertholletia excelsa*. **BOIS ET FORÊTS DES TROPIQUES**, v. 280, n. 2, p. 91-98, 2004(a).

CHUENHIENG, T.; PTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI T.; MONTET, D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52,n.26, p. 4318 – 4322, 2004(b).

CHUNHIENG, T., HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed Study of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) Oil Micro-Compounds: Phospholipids, Tocopherols and Sterols. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p.1374-1380, 2008.

COHEN, K.O. Produção de farinha parcialmente desengordurada de castanha do Brasil. Circular Técnica 42 – **EMBRAPA**, 2006

DE LUCA, R.R., ALEXANDRE, S.R., MARQUES, T. **Manual para Técnico em bioterismo**. São Paulo: Winner Graph, 1996. 259p.

DUMONT, E.; PAUW L. D.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food Chemistry**, v. 95, p. 684–692, 2006.

ELIAS, P. M.; BROWN, B. E.; FRITSCH, P.; GOERKE, J.; GRAY, G. M.; WHITE, R. J. Localization and composition of lipids in neonatal mouse stratum granulosum and stratum corneum. **Journal of Investigative Dermatology**,v. 73, p. 339-348, 1979.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**. v. 11, n.3, p. 172-177, 2002.

FONSECA F. R.; NAVARRO, M.; GOMEZ, R.; ESCUREDO L.; NAVA, F.; FU, J.; MURILLO-RODRIGUEZ, E.; GIUFFRIDA, A.; LOVERME, J.; GAETANI, S.; KATHURIA, S.; GALL, C.; PIOMELLI, D.; An anorexic lipid mediator regulated by feeding. **Nature**, v. 414, p. 209–212, 2001.

FREITAS, S. P.; SILVA, O. F.; MIRANDA, I. C.; COELHO, M. A. Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, (supl) p. 14-17, 2007.

GAETANI, S.; OVEISI, F.; PIOMELLI, D. Modulation of meal pattern in the rat by the anorexic lipid mediator oleoylethanolamide. **Neuropsychopharmacology**, v.28, n. 7, p. 1311-1316, 2003.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p.240-245, 2000.

- GOENA, M.; MARZO, F.; FAERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, L.; TOSAR, A.; FRÜHBECK, G.; SANTIDRIÁN, S. Effect of the raw legume Vicia Ervilha on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Espanola de Fisiologia**, v.45, n.1, p.55-60,1989.
- GONÇALVES, J. F. C.; FERNANDES, A.V.; OLIVEIRA, A. F. M.; RODRIGUES, L. F.; MARENCO, R. A. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 2, n. 2, p.139-142, 2002.
- GUZMÁN, M.; VERME, J. L.; FU, J.; OVEISI, F.; BLÁZQUEZ, C.; PIOMELLI, D. Oleoylethanolamide Stimulates Lipolysis by Activating the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR- α). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 27849-27854, 2004.
- HANSEN, H. S.; JENSEN, B. Essential Function of Linoleic Acid Esterified in Acylglucosylceramide and Acylceramide in Maintaining the Epidermal Water Permeability Barrier. Evidence from Feeding Studies with Oleate, Linoleate, Arachidonate, Columbinic acid and α -linolenate, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 834,n.3, p. 357–363, 1985.
- HARTOP, P. J.; PROTTEY, C. Changes in Transepidermal Water Loss and the Composition of Epidermal Lecithin After Applications of Pure Fatty Acid Triglycerides to the Skin of Essential Fatty Acid Deficient Rats. **Journal of Dermatology** .v. 95, n.3, p. 255–264, 1976.
- HOLBEN, D. H.; SMITH, A. M. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n.7, p. 836-843, 1999.
- HOLMAN, R. T. Biological Activities of and Requirements for Polyunsaturated Fatty Acids. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**, v. 9, p. 611–680, 1968.
- JONES, B. H., MAHER, M. A., BANZ, W. J., ZEMEL, M. B., WHELAN, J., SMITH, P. J.; MOUSTAID, N. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. **American Journal of Physiology**, v. 271, n.1, p.E44–E49, 1996.
- KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A.; CARUSO, J. A. HPLC–ICP–MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 454–460, 2002.

KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD, R. G.; CARUSE, J. A. Studies of Various Elements of Nutritional and Toxicological Interest Associated with Different Molecular Weight Fractions in Brazil Nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.19, n.52, p. 5773-5780, 2004.

KOOLMAN; KLAUS-HENRICH. Color Atlas of Biochemistry. New York: Thieme, 2005. 467p.

LANE, H. W.; STRENGTH, R.; JOHNSON, J.; WHITE, M. Effect of Chemical Form of Selenium on Tissue Glutathione Peroxidase Activity in Developing Rats. **Journal of Nutrition**, n. 121, p.81-86, 1991.

LESS, R. **Manual de análisis de alimentos. Laboratory handbook of methods of food analysis**. Zaragoza, Acribia 1979.

MEZEI, O.; BANZ, W. J.; STEGER, R.W; PELUSO, M. R.; WINTERS, T. A.; SHAY, N. Soy Isoflavones Exert Antidiabetic and Hypolipidemic Effects through the PPAR Pathways in Obese Zucker Rats and Murine RAW 264.7 Cells¹. **Journal of Nutrition**, v. 133, n.5, p.1238–1243, 2003.

MITCHELL, H. H.; BEADLES, J. R. The nutritive value of the proteins of nuts in comparison with the nutritive value of beef proteins. **Journal of Nutrition**, v.14, n.6, p. 597-608, 1937.

MORENO, F. J.; JENKINS, J. A.; MELLON, F. A.; RIGBY, N. M.; ROBERTSON, J. A.; WELLNER, N.; CLARE, M. E. N. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1698, p. 175 – 186, 2004.

NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn Distribution in Protein Fractions of Brazil-Nut, Cupuassu Seed and Coconut Pulp by Solid-Liquid Extraction and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 18, n. 8, p. 1547-1553, 2007.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and Aflatoxin Levels in Raw Brazil Nuts from Amazon Basis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.26, p. 11087-11092, 2007.

PAREKH P. P.; KHAN, A. R.; TORRES, M. A.; KITTO, M. E. Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n.4, p.332-335, 2008.

RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S. Extraction and Functional Characteristics of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, HBK) Globulin. **Food Science and Technology International**, v. 9, n. 4, p. 265-269, 2003.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. J. R. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RODRIGUES, C. E. C.; SILVA, F. A.; MARSAIOLI J. R. A.; MEIRELLES, A. J. A. Deacidification of Brazil Nut and Macadamia Nut Oils by Solvent Extraction: Liquid-Liquid Equilibrium Data at 298.2 K. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 50, p. 517-523, 2005.

SHIBATA, M.; MATSUO, H. Effect of the Addition of Free Tryptophan to a 20% Casein Diet on the Ratio of N¹-Methyl-l-pyridone-S-carboxamide plus N¹-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide to N1- Methylnicotinamide Excretion. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 53, n.9, p. 2399-2402, 1989.

SILVEIRA, L. R.; FIAMONCINI, J.; HIRABARA, S. M.; PIO J. P.; CAMBIAGHI, T. D.; PINHEIRO, C. H. J.; LOPES, L. R.; CURI, R. Updating the Effects of Fatty Acids on Skeletal Muscle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n.1, p.1–12, 2008.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, n. 8, p.365-379, 2002.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p.120-128, 2004.

SPINI, V. B. M. G.; FERREIRA, F. R.; PADUANI, G. F.; SOUZA, C. S.; KERR, W. E. Efeito da adição de Castanha-do-Pará à dieta de arroz e feijão sobre o ganho de peso em camundongos. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 3, p. 89-93, 2006.

STANDING COMMITTEE ON THE EVALUATION OF DIETARY REFERENCE INTAKES OF THE FOOD AND NUTRITION BOARD, INSTITUTE OF MEDICINE, THE NATIONAL ACADEMIES AND HEALTH CANADA: Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids, Washington, DC: National Academy Press, 2000.

THABUIS, C.; DESTAILLATS, F.; TISSOT-FAVRE, D.; MARTIN, J-C. Oleoyl-ethanolamide (OEA): A bioactive lipid derived from oleic acid and phosphatidylethanolamine. **Lipid Technology**, v. 19, n. 10, p. 225-227, 2007.

THABUIS, C.; TISSOT-FAVRE, D.; BEZELGUES, J-B.; MARTIN, J-C.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DIONISI, F.; DESTAILLATS, F. Biological Functions and Metabolism of Oleoylethanolamide. **Lipids**, v. 43, n.10, p. 887 – 894, 2008.

THOMSON, C. D.; CHISHOLM, A.; MCLAHLAN, S.; CAMPBELL, J. M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 87, n.2, p. 379-384, 2008.

VADHANAVIKIT, S.; GANTHER, H. E. Selenium Requirements of Rats for Normal Hepatic and Thyroidal 5'-Deiodinase (Type I) Activities. **Journal of Nutrition**, v.123, n.6, p. 1124-1128, 1993.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical Composition of Selected Edible Nuts Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.13, p. 4705-47014, 2006.

VONDERHEIDE A. P; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. S; CLAYTON BHYMER, C.; MONTES-BAYN, M.; LEN, C. P. Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5722-5728, 2002.

WANG, Y.; VOY, B. J.; URS, S.; KIM, S.; SOLTANI-BEJNOOD, M.; QUIGLEY, N.; HEO, Y. R.; STANDRIDGE, M.; ANDERSEN, B.; DHAR, M.; JOSHI, R.; WORTMAN, P.; TAYLOR, J.W.; CHUN, J.; LEUZE, M.; CLAYCOMBE, K.; SAXTON, A. M.; MOUSTAID-MOUSSA, N. The Human Fatty Acid Synthase Gene and De Novo Lipogenesis Are Coordinately Regulated in Human Adipose Tissue. **Journal of Nutrition** , v. 134, n.5, p. 1032-1038, 2004.

YAMAMOTO, S.; SMITH, W. L. Preface: Molecular Biology of the Arachidonate Cascade (second edition). **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**.v.68-69, n.2 p.1, 2002.

YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Calcium absorption and bone utilization in spontaneously hypertensive rats fed on native and heat-damaged casein and soya-bean protein. **British Journal of Nutrition**, v. 71, n.4, p. 583-603, 1994.

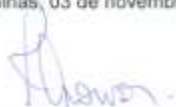
ZUO, W. N.; SUN, S. S. M. Purification and Characterization of Methionine-Rich 2S Seed Proteins from the Brazil Nut Family (Lecythidaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n.5, p.1206-1210, 1996.

Conclusão Geral

Diante de todos os resultados expostos, conclui-se que a torta desengordurada de castanha do Brasil é uma excelente fonte de proteínas, uma vez que, adicionada à dieta padrão (proteína de fonte animal – caseína), manteve seu percentual de digestibilidade e valor biológico, além de valores mais elevados de proteína corpórea, mesmo sendo uma proteína de fonte vegetal. Apresentou ainda, valores de PER e BN próximos a valores encontrados para proteínas de origem animal. Desta forma, a torta de castanha do Brasil, apesar de ser um resíduo industrial, pode ser incluída no cardápio do brasileiro, de forma a enriquecer a dieta, seja ela de indivíduos de baixa renda, de instituições carentes, de correntes vegetarianas ou mesmo para complementar o requerimento de aminoácidos indispensáveis.

A torta utilizada neste trabalho, apesar de receber o nome 'desengordurada', apresentava ainda conteúdo de lipídeo (32.9%) em sua composição. Isso muito provavelmente interferiu na composição corpórea dos animais uma vez que o óleo continha altos teores dos ácidos oléico e linoléico; os quais, de acordo com a literatura consultada, possuem ação hipolipidêmica, fato corroborado no presente estudo, uma vez que os animais alimentados com diferentes proporções de torta de castanha apresentaram significativa redução de gordura corpórea.

ANEXO 1 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

 UNICAMP	 CEEAA/Unicamp
Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEAA/Unicamp	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Protocolo nº <u>1680-1</u>, sobre "<u>Avaliação de diferentes proporções de torta de castanha do Brasil sobre teores de glutathione reduzida, crescimento e composição corpórea de ratos Wistar</u>", sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior / Paula Telles Poeta</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em <u>03 de novembro de 2008</u>.	
CERTIFICATE	
We certify that the protocol nº <u>1680-1</u>, entitled "<u>Evaluation of different proportions of Brazil nuts pie on levels of reduced glutathione, growth and body composition of Wistar rats</u>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on <u>November 3, 2008</u>.	
Campinas, 03 de novembro de 2008.	
 Prof. Dra. Ana Maria A. Guarnido Presidente	 Fátima Alonso Secretária Executiva
CEEAA - Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP - Brasil	Telefone: (19) 3521-6369 E-mail: comite@unicamp.br http://www.fz.unicamp.br/coeba/