

## Determinação de ácidos anacárdicos em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.)

Agostini-Costa, T. S.<sup>1\*</sup>; Jales, K. A.<sup>2</sup>; Abreu, L. N.<sup>2</sup>; Rossetti, A. G.<sup>2</sup>; Silveira, E. R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372, 70770-900 - Brasília - DF; <sup>2</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, 60511-110 - Fortaleza - CE; <sup>3</sup>CENAUREM, UFC, 60511-110 - Fortaleza - CE.

**RESUMO:** Os ácidos anacárdicos são compostos fenólicos constituintes do líquido da casca da castanha de caju (LCC), apresentando-se também, em pequenas concentrações, no pedúnculo. Embora seja conhecida a propriedade irritante do ácido anacárdico em concentrações superiores a 5%, artigos recentes vêm apresentando propriedades farmacológicas variadas destes compostos. O objetivo deste trabalho foi a obtenção dos ácidos anacárdicos totais a partir do LCC natural, a padronização de metodologia analítica para determinação desses compostos em pedúnculos de caju e a análise dos mesmos em pedúnculos de 3 diferentes clones de cajueiros anões precoces. Os padrões de ácidos anacárdicos totais foram purificados em colunas cromatográficas contendo sílica gel/ácido cítrico (95:5). A extração analítica desses compostos em pedúnculos de caju foi baseada na extração de Bligh-Dyer, com modificações. O extrato foi purificado em mini coluna de sílica gel e quantificado no ultravioleta. A faixa linear foi entre 20 e 160µg/mL de ácido anacárdico em hexano. A repetibilidade do método foi inferior a 5% e a recuperação entre 94 e 105%. Os teores de ácidos anacárdicos encontrados nos pedúnculos variaram entre 16,5 e 30,4 mg/100g.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos, caju, método analítico

**ABSTRACT: Determination of anacardic acids in cashew apples (*Anacardium occidentale* L.).** Anacardic Acids are the main phenolic compounds of the cashew nut shell liquid (CNSL), being also present, in small amounts in the cashew apples (pseudo-fruits). Although causing human skin irritation in concentrations over 5%, their pharmacological properties have been emphasised in recent papers. The aim of the present work was to obtain the total anacardic acids from natural CNSL, to standardise the analytical methodology for these compounds in cashew apples and to analyse the amount of anacardic acids in apples of 3 dwarf cashew clones. Total anacardic acids were purified in silica gel/citric acid chromatographic column (95:5). Their analytical extractions from cashew apples were based on Bligh-Dyer extraction, with modifications. The extract was purified in silica gel mini-column and quantified in the ultraviolet. The linear range was between 20 and 160µg/mL of total anacardic acid in hexane. Repeatability was less than 5% and recovery was between 94 and 105%. Anacardic acid contents present in cashew apples ranged from 16.5 to 30.4 mg/100g.

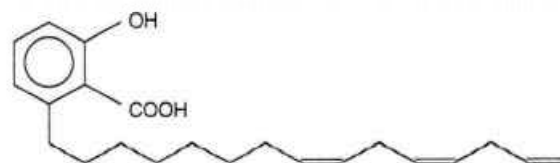
**Key words:** analytical method, phenolic compounds, cashew apple.

### INTRODUÇÃO

Os ácidos anacárdicos, principais constituintes da casca da castanha de caju, são compostos fenólicos derivados do ácido salicílico, contendo uma cadeia lateral de 15 carbonos, que pode conter uma, duas ou três ligações insaturadas (Figura 1). O pedúnculo do caju também apresenta pequenas concentrações de ácidos anacárdicos. Outras plantas, como o Ginkgo biloba, empregado na medicina tradicional chinesa como ativador da circulação sanguínea (Wang et al., 1998), e espécies como as do gênero Knema, empregadas na medicina tailandesa para trata-

mento de câncer (Gonzales et al., 1996), também apresentam ácidos anacárdicos como princípios ativos.

**FIGURA 1.** Estrutura química do ácido anacárdico tri insaturado



As propriedades biológicas dos ácidos anacárdicos têm merecido atenção especial nos últimos anos, apresentando-se como inibidores

Recebido para publicação em 06/04/2002 e aceito para publicação em 03/09/2002.

de enzimas medicinalmente importantes (Kubo et al., 1994a e 1987; Shobba et al., 1994), além de compreenderem propriedades antimicrobianas (Himejima & Kubo, 1991, Kubo et al., 1994b) anticoagulante (Wang et al., 1998) e antitumor (Itokawa et al., 1987). Embora seja reconhecida a propriedade irritante do ácido anacárdico em concentrações iguais ou superiores a 5% (Diogenes et al., 1996), esse produto não apresentou potencial mutagênico, carcinogênico ou cocarcinogênico (George & Kuttan, 1997). Ao contrário, Kubo et al. (1993) demonstraram o potencial antitumor dos ácidos anacárdicos presentes no suco de caju comercial, sugerindo que o consumo contínuo do pedúnculo, assim como de seus subprodutos, durante períodos de tempo prolongados pode ser vantajoso no controle de tumores. Entretanto, concentrações elevadas podem provocar irritação na garganta, interferindo na qualidade sensorial do pedúnculo (Agostini-Costa et al., 2000).

A determinação quantitativa de ácidos anacárdicos totais por HPLC vem sendo empregada em pesquisas (Shobba et al., 1994, Lima, 1999). Entretanto, em regiões economicamente menos favorecidas, o custo do equipamento e dos reagentes constitui a principal desvantagem do emprego dessa técnica para análise de rotina de ácidos anacárdicos. Outra dificuldade é a ausência de padrões analíticos disponíveis no mercado.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de padrões de ácidos anacárdicos totais a partir do líquido da casca de castanha de caju (LCC) natural, padronização de metodologia analítica para determinação desses compostos em pedúnculos de caju e análise dos mesmos em pedúnculos provenientes de 3 diferentes clones de cajueiros anões precoces.

## MATERIAL E MÉTODO

### Material

As castanhas de caju (5kg) empregadas para a obtenção do LCC e os pedúnculos utilizados na padronização da metodologia analítica foram provenientes de cajueiros anões precoces, clone CCP 076, safra 1999. Os mesmos foram obtidos no banco de germoplasma da Estação Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical em Pacajus, CE. As castanhas foram imediatamente congeladas, sem nenhum tipo de tratamento térmico prévio.

As determinações finais de ácidos anacárdicos totais (6 repetições/clone) foram feitas em pedúnculos de cajueiros anões precoces, clones CCP 076, CCP 09 e CCP 1001, provenientes da Estação Experimental da Embrapa em Paraipaba, CE, durante a safra 2000-2001. A precipitação local em agosto de 2000 foi de 27mm, atin-

gindo 143mm em janeiro de 2001. Para cada repetição, foram colhidos, aleatoriamente pela manhã, quarenta pedúnculos em estado de maturação apropriado para o consumo in natura. Os pedúnculos danificados no transporte foram eliminados, sendo que vinte foram selecionados, quarterados, homogeneizados em liquidificador e analisados em triplicata.

### Método

#### Obtenção do padrão de ácidos anacárdicos totais

O LCC foi obtido em laboratório a partir de metades de cascas de castanhas congeladas (1,2kg), que foram cortadas em cortador semi-mecanizado. A extração do LCC foi feita com 2L de hexano, contendo 0,1% do antioxidante butilidroxitolueno, por 48 horas a temperatura ambiente, com proteção da luz e injeção de nitrogênio. Após a decantação do extrato, as cascas foram novamente congeladas, trituradas em triturador mecânico semi-industrial e extraídas novamente com 1,8L de hexano por uma semana. Os extratos combinados, filtrados em lâ de vidro, foram concentrados a vácuo para fornecer 180mL de LCC natural (extrato bruto), que foi congelado a -20°C e utilizado de acordo com a necessidade. O LCC apresenta cerca de 70% de ácidos anacárdicos totais, sendo que a composição restante é formada por cardóis (10%), cardanóis e outros fenólicos de menor expressão.

A purificação preliminar dos ácidos anacárdicos, a partir do LCC natural, foi feita em coluna empacotada com 80g de sílica gel homogeneizada com 5% de ácido cítrico anidro, previamente pulverizado em almofariz. A coluna foi condicionada com 200mL de hexano, vigorosamente homogeneizado com 1% de ácido fórmico (AF). Dezoito gramas de LCC natural, acidificadas com 1 mL de AF, foram diluídas em 55 mL de hexano-AF. O LCC diluído foi purificado na coluna de sílica. As frações foram monitoradas através do perfil do espectro em ultravioleta. Impurezas fenólicas de coloração escura foram retidas na coluna e os ácidos anacárdicos totais (amarelo claro), contendo resíduos de cardóis, foram eluídos com 300 mL de éter etílico 13-15% em hexano-AF.

A fração anterior foi submetida a uma purificação final, visando a eliminação dos resíduos de cardóis. A nova coluna foi empacotada com 20g de sílica/ácido cítrico. Os ácidos anacárdicos foram eluídos com éter etílico 5-10% em hexano-AF, sendo que os resíduos de cardóis foram eficientemente retidos na sílica. Após a eluição, o ácido fórmico foi lavado através de partição com água destilada, até pH neutro. O solvente foi evaporado a vácuo, obtendo-se, no fi-

nal do processo, aproximadamente 6 g do padrão de ácidos anacárdicos totais.

A análise por cromatografia em camada delgada foi feita em placas de sílica gel 0,25mm, impregnadas com ácido cítrico 2,5% em metanol. A fase móvel foi composta de éter de petróleo: éter etílico: ácido fórmico 90:10:1. A revelação foi feita com ácido sulfúrico 50%, seguida de aquecimento 150°C. O padrão purificado foi submetido às análises por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

### Determinação analítica

#### · Extração

A extração analítica de ácidos anacárdicos em pedúnculos de caju foi baseada na extração de lipídeos polares segundo Bligh & Dyer (1959), com modificações. Amostras contendo 2g de pedúnculo homogeneizado foram pesadas em tubos de ensaio de 100mL, com tampas de rosca e teflon. Foram adicionados 0,2 mL de ácido fórmico, 20 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol. Os tubos foram agitados em vortex por 3 min e deixados em repouso por 30 min. Foram adicionados 12 mL de KCl 0,72%. Os tubos foram suavemente homogeneizados, através de 5 inversões parciais repetidas (90°) e, então, mantidos em repouso por 2:30h. Após este período, os extratos foram refrigerados (4°C) por 1 noite.

Após permanência à temperatura ambiente por 1h, a fração clorofórmica totalmente límpida, contendo os ácidos anacárdicos totais, foi aspirada e filtrada em mini coluna empacotada com 1g de sulfato de sódio anidro. Uma alíquota de 5 mL foi tomada e o clorofórmio foi evaporado sob nitrogênio em banho maria 60°C, ou em estufa a vácuo a 60°C por 1 h.

#### · Purificação do extrato

A purificação do extrato evaporado foi feita em mini coluna, contendo 500mg de sílica gel condicionada com 1% de ácido fórmico em éter de petróleo (EP-AF), vigorosamente homogeneizado antes de cada transferência. Os extratos, previamente diluídos com 2 mL de EP-AF, foram incorporados à mini coluna, com pipetas de pasteur. O resíduo foi lavado duas vezes com 1 mL do mesmo solvente e incorporado à mini coluna. Os ácidos anacárdicos totais foram eluídos com duas porções sucessivas de 5 mL de éter etílico 13% em EP-AF. O solvente foi evaporado sob nitrogênio ou em estufa a vácuo 60°C 1h. O resíduo (temperatura ambiente) foi diluído para 5 mL com hexano.

#### · Quantificação

O extrato purificado diluído em hexano foi quantificado por espectroscopia no ultravioleta em 320nm. A curva de calibração foi construída após avaliação da faixa linear.

#### · Validação intralaboratorial

O estudo da faixa de linearidade do ácido anacárdico purificado foi baseado nos resíduos de interpolação e nas razões absorvância/concentração, calculados a partir dos pontos experimentais disponíveis para a construção da curva: 15 valores entre 0,028 e 3,196 unidades de absorvância associados a uma faixa de 2 a 240 mg/mL. Foram considerados na faixa linear os pontos cujas razões absorvância/concentração não tenham apresentado diferença superior a 5% do coeficiente angular da reta.

A repetibilidade do método foi avaliada em 6 repetições e em 2 matrizes diferentes por laboratorista experiente. A recuperação de padrões foi realizada com 3 diferentes concentrações de solução estoque medidas e tratadas com reagentes para simular, isoladamente, as etapas de extração e purificação, conforme recomendações da Association of Official of Analytical Chemists (Wernimont, 1985). Posteriormente, os pedúnculos homogeneizados também foram adicionados de padrão e submetidos à avaliação.

#### Equipamentos

Para confirmação da identidade dos padrões, foram executadas análises de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ , 500 MHz e de  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz (Brucker, Avance DRX 500). O solvente empregado foi  $\text{CDCl}_3$ . A quantificação das análises foi feita em espectrofotômetro de varredura espectral ultravioleta-visível (Varian, modelo Cary 50).

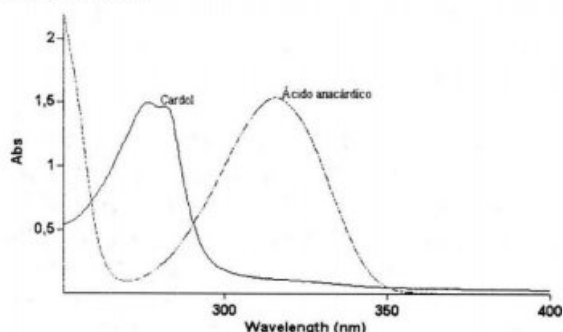
### RESULTADO E DISCUSSÃO

Visando a purificação dos ácidos anacárdicos, colunas de alumina (Symes & Dawson, 1953) e sílica (Kubo et al, 1986) foram empregadas com eficiência reduzida. Compostos com características ácidas exibem caudas quando eluídos em sílica não tratada. Em nossos estudos, essas caudas foram evitadas através da incorporação de ácidos orgânicos nas fases móvel (ácido fórmico) e estacionária (ácido cítrico).

O padrão de ácidos anacárdicos totais apresentou-se puro quando identificado por cromatografia em camada delgada, por varredura espectral no ultravioleta (Figura 2) e pelo perfil do espectro de ressonância magnética nuclear.

O valor da absorvidade molar ( $\epsilon$ ), obtido em hexano a 320 nm, foi 4278. Considerando-se o teor médio de ácidos anacárdicos totais em LCC natural de 70%, o rendimento do processo de purificação foi de, aproximadamente, 50%. O processo de obtenção do LCC natural, sem o tratamento térmico convencional que é aplicado nas indústrias beneficiadoras, foi importante para garantir a qualidade do produto com alto teor de ácidos anacárdicos naturais (ou seja, livres de resíduos de cardanóis, oriundos da descarboxilação oxidativa dos ácidos anacárdicos).

**FIGURA 2.** Perfil espectral ultravioleta dos lipídeos fenólicos cardol e ácido anacárdico purificados em coluna de sílica-ácido cítrico a partir do LCC natural



A extração analítica dos ácidos anacárdicos em pedúnculos foi baseada no método de Bligh & Dyer (1959) para determinação de lipídeos em amostras com alto teor aquoso (aproximadamente 80%). Entretanto, nesse método é importante que os volumes clorofórmio: metanol: água, antes e após a diluição, preservem as proporções 1:2:0,8 e 2:2:1,8, respectivamente. Para a extração dos ácidos anacárdicos, a equivalência empregada foi 2:1:0,16 e 2:1:1,4. Estas razões representaram o volume total do sistema ternário, incluindo a água presente na amostra. A inclusão do ácido fórmico no sistema foi fundamental para garantir a eficiência do processo de extração dos ácidos anacárdicos.

A etapa de purificação do extrato bruto em mini coluna de sílica foi fundamental para a eliminação de interferentes lipídicos que também absorvem na região do ultravioleta. Nesta etapa, apenas o ácido fórmico foi adicionado na fase móvel, sendo que a incorporação de ácido cítrico na sílica dificultou a retenção de interferentes. Entretanto, o ácido fórmico absorve na região ultravioleta, interferindo na identificação dos ácidos anacárdicos. Assim, esse solvente foi evaporado. Resultados obtidos por evaporação em estufa a vácuo ( $73,0 \pm 0,3$  mg/100g) e em nitrogênio ( $72,8 \pm 1,7$  mg/100g) não apresentaram diferença significativa, até o nível de 5% pelo teste de Tukey.

A faixa linear para quantificação do ácido anacárdico no ultravioleta permaneceu entre

20 e 160  $\mu\text{g/mL}$  de hexano. A curva de calibração construída nesta faixa de concentração forneceu um coeficiente de correlação igual a 0,99903. O desvio padrão relativo do teste de repetibilidade foi inferior a 5% e taxa de recuperação de padrões ficou entre 95 e 104%. Estes resultados encontram-se dentro da faixa recomendada pela AOAC (Wernimont, 1985) para validação intralaboratorial de metodologias analíticas.

Os teores de ácidos anacárdicos encontrados nos pedúnculos do clone CCP 1001 diferiram significativamente, até o nível de 5% de erro pelo teste de Tukey, dos valores encontrados para os clones CCP 076 e CCP 09 (Tabela 1). Shobha et al. (1994) verificaram, durante o período de desenvolvimento do pedúnculo de caju, que a proporção de ácidos anacárdicos aumenta rapidamente (cerca de 1,5% do peso do pedúnculo) na terceira semana após a polinização, reduzindo drasticamente durante as duas semanas subsequentes. Nenhuma referência sobre o teor de ácidos anacárdicos determinados em pedúnculos in natura foi encontrada, sendo que o suco de caju comercial apresentou 0,98-1,5 mg/100mL (Lima, 1999) e o suco liofilizado apresentou 50mg/100g (Kubo et al., 1986).

O padrão de ácidos anacárdicos totais apresentou-se puro e o método analítico desenvolvido mostrou-se simples e eficiente para determinação destes compostos, visando o monitoramento da qualidade sensorial de pedúnculos de cajus e o aprimoramento de estudos recentes envolvendo atividades biológicas desses compostos. Embora os pedúnculos do clone CCP 1001 tenham apresentado o menor valor de ácidos anacárdicos totais, eles possuem um brix reduzido em relação ao CCP 076, não sendo apropriados para o consumo de mesa. Estudos futuros envolvendo melhoramento genético e análise química e sensorial serão importantes na busca de clones que ofereçam pedúnculos de boa palatabilidade e elevado valor nutricional para consumo de mesa.

**TABELA 1.** Teor de ácidos anacárdicos totais (mg/100g) em pedúnculos de caju anões precoces procedentes de Paraipaba, CE.

|            | Clone CCP 076 | Clone CCP 09 | Clone CCP 1001 |
|------------|---------------|--------------|----------------|
|            | *Média (DP)   | *Média (DP)  | *Média (DP)    |
| Lote 1     | 27,2 (0,8)    | 27,0 (0,7)   | 20,8 (0,8)     |
| Lote 2     | 27,0 (1,0)    | 24,4 (0,6)   | 16,5 (0,8)     |
| Lote 3     | 31,8 (0,1)    | 22,8 (0,9)   | 17,3 (0,5)     |
| Lote 4     | 30,2 (0,5)    | 27,1 (1,3)   | 20,9 (0,5)     |
| Lote 5     | 29,5 (0,4)    | 29,2 (1,1)   | 20,2 (0,3)     |
| Lote 6     | 23,8 (0,3)    | 31,9 (0,5)   | 19,3 (0,2)     |
| Média (DP) | 28,3 (2,8)    | 27,1 (3,3)   | 19,2 (1,9)     |

\*Cada valor é média de 3 repetições. DP: desvio padrão.

## AGRADECIMENTO

Ao Banco do Nordeste do Brasil pelo suporte financeiro e ao CENAUREM pelas análises de ressonância magnética nuclear.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGOSTINI-COSTA, T.S., SANTOS, J.A., GARRUTI, D.S., FEITOSA, T. Caracterização dos compostos fenólicos presentes em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L). Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), v.18, n.1, p.129-137, 2000.
- BLIGH E.G, DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry Physiology, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- DIOGENES, M.J.N., MARAIS, S.M., CARVALHO, F.F. Contact dermatitis among cashew nut workers. Contact Dermatitis, v.35, p.114-115, 1996.
- GEORGE J., KUTTAN, R. Mutagenic carcinogenic activity of cashew nut shell liquid. Cancer Letters v.112, p.11-16, 1997.
- GONZALES, M.J.T.G., OLIVEIRA, C.J.C., FERNANDES, J., KIJJOA, A., HERZ, W. Further alkyl and alkenylphenols of *Knema Laurina* and *Knema austrosiamensis*: location of the double bond in the alkenyl side chains. Phytochemistry, v.43, n.6, p.1333-1337, 1996.
- HIMEJIMA, M, KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.39, p.418-421, 1991.
- ITOKAWA, Y., TOTSUKA, J., NAKAHARA, K., TAKEYA, K., LEPOITTEVIN, J., ASAKAWA, Y. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. Chemical Pharmaceutical Bulletin, v.35, n.30, p.16-20, 1987.
- KUBO, I., KIM, M., NAYA, K., KOMATSU, S., YAMAGIWA, Y., OHASHI, K., SAKAMOTO, Y. HIRAKAMA, S., KAMIKAWA, T. Prostaglandin synthetase inhibitors from the African medicinal plant *Ozoroa mucronata*. Chemistry Letters, v. 63, p.1101-1104, 1987.
- KUBO, I., KINST-HORI, I., YOKOKAWA, Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. Journal of Natural Products, v.57, n.4, p.545-551, 1994a.
- KUBO, I., MUROI, H., KUBO, A. Naturally occurring antiacne agents. Journal of Natural Products v.57, n.1, p.9-17, 1994b.
- KUBO I, KOMATSU S, OCHI M. Mulluscocicides from the cashew (*Anacardium occidentale*) and their large-scale isolation. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.34, p.970-973, 1986.
- KUBO, I., OCHI, M., VIEIRA, P.C., KOMATSU, S. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.4, p.1012-1015, 1993.
- LIMA, C.A. Estudo dos ácidos anacárdicos do óleo da casca de castanha de caju (CNSL) (*Anacardium occidentale* L) dos clones de cajueiro anão precoce CCP 076 e CCP 09 em cinco estágios de maturação. 1999. 184f. Tese (doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- SHOBHA, S.V., RAMADOSS, C.S., RAVINDRANATH, B. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by anacardic acids cardols and cardanols. Journal of Natural Products, v.57, n.12, p.1755-1757, 1994.
- SYMES WF, DAWSON CR. Cashew nut shell liquid IX: the chromatographic separation and structural investigation of the olefinic components of methylcardanol. The Journal of the American Chemical Society, v.75, p.4952-4956, 1953.
- WANG, D., GIRARD, T.J., KASTEN, T.P., LACHANCE, R.M., MILLER-WIDEMAN, M.A., DURLEY, R.C. Inhibitory activity of unsaturated fatty acids and anacardic acids toward soluble tissue factor-factor VIIa complex. Journal of Natural Products, v.62, p.1352-1355, 1998.
- WERNIMONT, G.T. Intralaboratory development of an analytical process. In: Spendeley, W. (ed.) Use of Statistical to develop and evaluate analytical methods. Arlington: AOAC, 1985. p.11-86.