

## Extrato Concentrado de Carotenoides Obtido da Fibra do Pedúnculo de Caju

Avaliação da Toxicidade com Uso do Bioensaio  
de *Artemia salina*



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
162**

**Extrato Concentrado de Carotenoides  
Obtido da Fibra do Pedúnculo de Caju  
Avaliação da Toxicidade com Uso do Bioensaio de  
*Artemia salina***

Ana Paula Dionísio  
Fernando Antônio Pinto de Abreu  
Edy Sousa de Brito  
Nedio Jair Wurlitzer  
Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro  
Talita de Souza Goes  
Jessica Maria Silva Sousa  
Mayara Frade Iunes  
Ana Carolina Viana de Lima  
Francisco Oiram Filho

***Embrapa Agroindústria Tropical  
Fortaleza, CE  
2018***

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
[www.embrapa.br/agroindustria-tropical](http://www.embrapa.br/agroindustria-tropical)  
[www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente  
*Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva  
*Celli Rodrigues Muniz*

Secretária-administrativa  
*Eveline de Castro Menezes*

Membros  
*Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra,  
Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner  
Valentim Martins, Kirley Marques Canuto, Rita  
de Cassia Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial  
*Ana Elisa Galvão Sidrim*

Revisão de texto  
*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica  
*Rita de Cassia Costa Cid*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Ariilo Nobre de Oliveira*

Foto da capa  
*Ana Paula Dionísio*

**1ª edição**  
On-line (2018)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Extrato concentrado de carotenoides obtido da fibra do pedúnculo de caju: avaliação da toxicidade com uso do bioensaio de *Artemia salina* / Ana Paula Dionísio... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2018.

23 p. : il. ; 16 cm x 22 cm – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 162).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. *Anacardium occidentale* L. 2. Ácidos anacárdicos. 3. DL<sub>50</sub>. I. Dionísio, Ana Paula. II. Abreu, Fernando Antonio Pinto de. III. Brito, Edy Sousa de. IV. Wurlitzer, Nédio Jair. V. Ribeiro, Paulo Riceli Vasconcelos. VI. Goes, Talita de Souza. VII. Sousa, Jessica Maria Silva. VIII. Iunes, Mayara Frade. IX. Lima, Ana Carolina Viana de. X. Série.

CDD 664.805

# Sumário

---

Resumo .....4

Abstract .....6

Introdução.....7

Material e Métodos .....8

Resultados e Discussão .....13

Conclusões.....19

Agradecimentos.....20

Referências .....20

# Extrato Concentrado de Carotenoides Obtido da Fibra do Pedúnculo de Caju

## Avaliação da Toxicidade com Uso do Bioensaio de *Artemia salina*

Ana Paula Dionisio<sup>1</sup>

Fernando Antônio Pinto de Abreu<sup>2</sup>

Edy Sousa de Brito<sup>3</sup>

Nedio Jair Wurlitzer<sup>4</sup>

Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro<sup>5</sup>

Talita de Souza Goes<sup>6</sup>

Jessica Maria Silva Sousa<sup>7</sup>

Mayara Frade Iunes<sup>8</sup>

Ana Carolina Viana de Lima<sup>9</sup>

Francisco Oiram Filho<sup>10</sup>

**Resumo** - O extrato concentrado de carotenoides (ECC) obtido da fibra do pedúnculo de caju tem sido alvo de estudos nos últimos anos na Embrapa Agroindústria Tropical. Tal fato é atribuído à intensa coloração amarela, o que desperta seu potencial uso como um importante substituto a corantes artificiais pela indústria de alimentos. Porém, para sua aplicação alimentar, há a necessidade de avaliar a toxicidade do material, uma vez que nele

---

<sup>1</sup> Cientista de alimentos, doutora em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

<sup>2</sup> Engenheiro de alimentos, doutor em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

<sup>3</sup> Químico Industrial, doutor em Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

<sup>4</sup> Engenheiro de alimentos, doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical

<sup>5</sup> Químico, doutor em Química, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

<sup>6</sup> Engenheira de Alimentos, mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

<sup>7</sup> Engenheira de Alimentos, doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

<sup>8</sup> Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

<sup>9</sup> Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

<sup>10</sup> Engenheiro de Alimentos, mestrando em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

são encontrados ácidos anacárdicos, que embora sejam relacionados a efeitos biológicos positivos, também têm sido relatados como tóxicos. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar qualitativamente e quantitativamente os ácidos anacárdicos presentes no ECC e avaliar a sua toxicidade utilizando-se o ensaio com *Artemia salina*. Para isso, o ECC foi obtido por meio de etapas que contemplaram o uso de enzimas na fibra do pedúnculo de caju, seguida de prensagens sequenciais, centrifugação, microfiltração e tratamento térmico do extrato. O ECC foi caracterizado e então avaliado quanto à composição de ácidos anacárdicos por cromatógrafo líquido de ultra performace com ionização eletrospray acoplado a um sistema quadrupolo/tempo de voo de espectrometria de massa (UPLC-ESI-QToF-MS<sup>E</sup>) e quantificado por cromatógrafo líquido de alta performace acoplado a um detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD). Para os testes de toxicidade, dez diferentes concentrações do ECC foram utilizadas e inoculadas com *Artemia salina*. Após 24 horas, a dose letal média (DL<sub>50</sub>) foi calculada. Os resultados indicaram que três diferentes ácidos anacárdicos foram encontrados no ECC, nas concentrações de 13,44, 14,92 e 18,72 mg/g, para os ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1), respectivamente. Para os testes com *Artemia salina*, os resultados apontaram que o ECC não apresentou toxicidade, uma vez que a DL<sub>50</sub> foi superior a 1 mg/mL. Porém, outros ensaios *in vivo* são necessários para garantir a segurança do extrato quando incorporado em produtos alimentares para consumo humano.

**Termos para indexação:** *Anacardium occidentale*, ácidos anacárdicos, DL<sub>50</sub>.

# Carotenoid Concentrated Extract Obtained from Cashew Peduncle Fiber

## Toxicity Evaluation by *Artemia salina* Bioassay

**Abstract** - The concentrated extract of carotenoids (ECC) obtained from cashew-apple fiber has been the object of studies in recent years in the Embrapa Agroindústria Tropical. This extract has an intense yellow coloration, and can be an important substitute of artificial colorants in the food industry. However, for its use in food, it is necessary to evaluate the toxicity of the material, since it has anacardic acids, which although related to positive biological effects, have also been reported as toxic. In this sense, the objective of this work was to assess qualitatively and quantitatively the anacardic acids present in the ECC, and to evaluate their toxicity using the *Artemia salina* assay. For this, ECC was obtained through steps that included enzymatic treatment of the cashew-apple fiber, followed by sequential pressing, centrifugation, microfiltration and heat treatment of the extract. The ECC was then evaluated for the composition of anacardic acids by UPLC-ESI-QToF-MSE and quantification by HPLC-DAD. For the toxicity tests, ten different concentrations of ECC were used and inoculated with *Artemia salina*. After 24 hours, the LD<sub>50</sub> was calculated. The results indicated that three different anacardic acids were found in ECC, at concentrations of 13.44, 14.92 and 18.72 mg/g, for the anacardic acids with tri, di and mono-unsaturations, respectively. For the tests with *Artemia salina*, the results showed that the ECC showed no toxicity, since the LD<sub>50</sub> was higher than 1 mg/mL. However, other in vivo assays are required to ensure the safety of the extract when incorporated into food products for human consumption.

**Index terms:** *Anacardium occidentale*, anacardic acids, DL<sub>50</sub>.

## Introdução

---

O caju (*Anacardium occidentale*) é uma cultura de grande importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil, onde os estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí destacam-se como seus grandes produtores. A amêndoa é muito apreciada, constituindo, juntamente com o líquido da castanha de caju (LCC), os principais produtos de sua industrialização. O pedúnculo (ou pseudofruto), apresenta elevado teor de vitamina C e grande valor nutricional, sendo rico em compostos bioativos como carotenoides e fenólicos. Embora encontrados em menores concentrações do que no LCC, Trevisan et al. (2006) reportam que o pedúnculo também apresenta ácidos anacárdicos em sua composição, sendo encontrados 6,1 g/kg em suas fibras. Esses ácidos anacárdicos são compostos fenólicos com uma cadeia carbônica lateral, predominantemente composta por 15 carbonos (Česla et al., 2006; Jerz et al., 2013). No entanto, existem variações quanto ao número de insaturações presentes na cadeia lateral, podendo ter três (trieno), duas (dieno), uma (monoeno) ou nenhuma insaturação (Masuoka et al., 2013). Esses compostos são relacionados a inúmeros benefícios, atuando como antioxidante (Kubo et al., 2006), antitumoral (Moraes et al., 2010), antimicrobiano (Achanath et al., 2012; Lima et al., 2000; Parasa et al., 2011), dentre outros (Toyomizu et al., 2003).

No processamento do pedúnculo de caju para extração de seu suco, tem-se a geração de grandes quantidades de fibra residuais. Essas fibras são subutilizadas na alimentação animal ou descartadas, o que gera graves problemas ambientais. Uma alternativa vislumbrada para as fibras de pedúnculo de caju na forma de produtos de valor agregado é a obtenção de um extrato concentrado de carotenoides (ECC), que pode vir a ser aplicado como um corante alimentar natural pela indústria de alimentos. O ECC apresenta uma intensa coloração amarela em virtude da concentração e do perfil de seus carotenoides (Abreu et al., 2013).

Porém, para o uso do ECC como corante alimentar, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas, como uma avaliação da estabilidade do ECC frente ao armazenamento, suas aplicações em alimentos, etc. Dentre estas, destaca-se a avaliação de sua segurança do ponto de vista toxicológico, uma vez que o extrato trata-se da concentração dos componentes presentes na fibra do pedúnculo de caju, e dentre esses estão os ácidos anacárdicos.

Embora inúmeros benefícios associados a esses compostos sejam extensivamente reportados, relatos de toxicidade também têm sido atribuídos a esses compostos e variam de acordo com a dose administrada (Carvalho et al., 2011). Para LCC, indicativos de toxicidade também já foram reportados por Motti et al. (2015) e Leite et al. (2015).

*Artemia* spp. ganhou popularidade como um organismo de ensaio devido à sua facilidade de cultura (crescimento em solução salina, com aeração), disponibilidade comercial e com um tempo de geração curto (24 h a 48 h para eclosão de seus cistos). Além disso, os animais de teste são da mesma idade, genótipo e condição fisiológica, o que torna significativamente reduzida a variabilidade dos resultados (Koutsaftis; Aoyama, 2007). O teste de toxicidade com *Artemia salina* possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo*. O procedimento determina valores de dose letal média ( $DL_{50}$ ), em mg/mL, de compostos e extratos (Arcanjo et al., 2012; Fonseca et al., 2013; Rodriguez et al., 2009; Silva et al., 2013). Uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média ( $DL_{50}$ ) estabelecida por Meyer et al. (1982), apresentada em extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, indica que quando são verificados valores acima 1 mg/mL, estes são considerados atóxicos.

Nesse sentido, o presente trabalho apresenta como objetivos principais a identificação e a quantificação dos ácidos anacárdicos presentes no ECC e a avaliação da toxicidade do ECC obtido da fibra do pedúnculo do caju por meio de bioensaio com *Artemia salina*.

## Material e Métodos

---

### Matéria-prima

Pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.) da variedade CCP 76 foram obtidos no campo experimental da Embrapa Agroindústria Tropical em Pacajus, Ceará. Após a coleta do material, os pedúnculos foram transportados para o Laboratório de Processos Agroindustriais para remoção da castanha, processamento do pedúnculo para extração do suco e, conseqüentemente, obtenção das fibras. As fibras residuais do processo foram utilizadas como matéria-prima do presente trabalho e armazenadas sob congelamento (-18 °C) até o momento do uso (Figura 1).

Foto: Ana Paula Dionísio



**Figura 1.** Fibras residuais do processamento do pedúnculo de caju, utilizada como matéria-prima para obtenção do extrato.

### **Obtenção do extrato concentrado de carotenoides (ECC) obtido a partir da fibra do pedúnculo de caju**

Para obtenção do ECC, seguiu-se o protocolo realizado por Abreu et al. (2013), com modificações relativas às etapas de centrifugação do material e tratamento térmico. As etapas principais são descritas a seguir:

- **Tratamento enzimático**

As fibras foram misturadas com água na proporção 1:1 e 500 ppm de enzima Pectinex Ultra SP-L. O tratamento enzimático ocorreu por 1 hora a 50 °C.

- **Prensagem**

A mistura foi prensada em uma prensa do tipo helicoidal contínua (Incomap 300), com uma capacidade nominal de 300 kg/h, para a liberação do extrato aquoso. A operação de prensagem foi realizada em seis ciclos consecutivos com a incorporação do extrato às fibras, em que no sexto ciclo as fibras residuais foram separadas do extrato

e submetidas a mais uma prensagem. Após os sete passos de prensagem, uma suspensão de cor amarela foi obtida. Em seguida, essa suspensão foi pré-filtrada através de uma malha de aço inoxidável de 0,3 mm para remoção de grandes partículas em suspensão. Terminada a pré-filtragem, a suspensão foi centrifugada (4.500 rpm por 5 minutos), utilizando-se uma centrífuga da marca Thermo Fisher Scientific modelo MegaFuge 40, e embalada em sacos de polietileno, que foram congelados (-18 °C) e estocados até que fosse realizada a etapa de concentração por microfiltração.

- **Microfiltração**

Nesta etapa, o extrato bruto foi submetido a um sistema de microfiltração equipado com membranas de cerâmica em óxido de alumínio. A microfiltração foi realizada em escala de laboratório usando-se um equipamento piloto de bancada, com um conjunto de 4 membranas monotubulares em série (Membralox Pall-Exekia), com área total de filtração de 0,022 m<sup>2</sup> e diâmetro médio de poro de 0,2 µm. A pressão transmembrana média foi de 2,75 bar, com temperatura controlada a 40 °C (± 2 °C). O processo foi conduzido com a utilização de um fator de redução volumétrica de 14 (FRV), e a diafiltração foi realizada para eliminação das impurezas hidrossolúveis.

- **Tratamento térmico**

O ECC foi pasteurizado com o uso de um trocador tubular Armfield FT74. A temperatura de pasteurização foi de 85 °C, utilizando-se vazão e tubo de retenção para 30 segundos. Seguiu-se o enchimento a quente (*hot fill*) em garrafas de vidro de 200 mL, previamente higienizadas com cloro (100 mg/L), e fechamento com tampa plástica rosqueável. As garrafas foram deitadas para pasteurização da tampa por 3 minutos, resfriadas em banho de água e estocadas sob refrigeração (5 ± 2 °C) até o momento das análises.

## **Caracterização química, física e físico-química do ECC**

As análises realizadas no ECC são descritas a seguir. São elas:

**Umidade:** determinada em estufa a 105 °C até peso constante, de acordo com o método nº 934.01 da AOAC (2005).

**Sólidos solúveis (SS):** determinados de acordo com o método nº 932.12 da AOAC (2005), por leitura direta da amostra a 20 °C em refratômetro digital de bancada (marca Atago Pal-3).

**pH:** determinado por meio de leitura direta das amostras em potenciômetro (marca Mettler DL 12) com membrana de vidro e aferido com tampões de pH 7 e 4, conforme AOAC (2005).

**Cor:** realizada por meio da média de três leituras, utilizando-se colorímetro de marca Minolta modelo CR 300 (parâmetros L\*, a\* e b\*).

**Atividade de água:** realizada a determinação da atividade de água por meio da média de três leituras efetuadas com o uso do equipamento Aqualab (marca Decagon CX-2), variando de 0 a 1.

**Carotenoides totais:** a análise dos carotenoides foi realizada seguindo-se as recomendações de Rodriguez-Amaya (2001), após extração com acetona e hiflosupercel (celite), e partição com éter de petróleo.

**Polifenóis totais:** determinados por meio do reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico como referência, conforme metodologia descrita por Larrauri et al. (1997).

Todas as análises químicas, físicas e físico-químicas foram realizadas em triplicata.

## **Identificação e quantificação de ácidos anacárdicos por UPLC-ESI-QToF-MS<sup>E</sup> e HPLC-DAD**

Para a identificação e quantificação dos ácidos anacárdicos presentes no ECC, o material foi congelado em *ultra freezeer* (- 80 °C) e liofilizado durante 72 horas. A partir de 1 mg deste material, foram identificados os ácidos anacárdicos, utilizando-se um sistema Acquity UPLC (Waters®) acoplado a um sistema de quadrupolo/tempo de voo (XEVO-QToF Waters®). As fases móveis foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente utilizado consistiu: 0-15 min, 2-95% de B; 15,1-17 min, 100% de B; 17,1-19,1 min, 2% de B. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) com fluxo de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, temperatura fixa de 40 °C e volume de injeção de 5 µL. As condições de MS foram as seguintes: modo de ionização

negativo; faixa de aquisição: 110-1180 Da; temperatura da fonte: 120 °C; temperatura de dessolvatação do gás: 350 °C; fluxo de dessolvatação do gás: 500 L/h; voltagem do cone de extração: 0,5 V; voltagem do capilar: 2,6 kV. O modo de aquisição foi MS<sup>E</sup>. Leucina encefalina foi utilizada como bloqueador de massa. O equipamento foi controlado pelo programa Masslynx 4.1 (Waters® Corporation).

Para a quantificação, a amostra de ECC foi solubilizada em metanol a uma concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, filtrada em filtro de teflon (PTFE) 0,22 µm, injetada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-20AB Prominence, acoplado a um detector de arranjo de diodo Shimadzu SPD-M20A e equipado com uma coluna cromatográfica de fase reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS(M) C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm x 5 µm).

A fase móvel utilizada foi acetonitrila (solvente B), água (solvente A) e ácido acético, de modo isocrático numa proporção (80:20:1) para solvente B, solvente A e ácido acético, respectivamente. O tempo de corrida foi de 30 min, com fluxo de 1,5 mL/min, sob temperatura de 30 °C e com volume de injeção da amostra de 20 µL. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm. As condições cromatográficas usadas para quantificação foram conduzidas utilizando-se um método otimizado e validado previamente (Oiram Filho, 2017).

## Toxicidade por meio do bioensaio com *Artemia salina*

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados em solução salina 3%, em temperatura ambiente (25 °C), com aeração por 24 horas para a eclosão dos ovos, conforme indicado na Figura 2, até a obtenção de larvas para uso nos testes.

Para avaliação da toxicidade do ECC, foram preparadas 10 concentrações distintas do ECC, variando de 0,1 a 10,0 mg/mL. De cada concentração foi retirada uma alíquota de 30 mL e em seguida adicionadas 10 larvas de *Artemia salina*. Após 24 horas, verificou-se quantas larvas permaneciam vivas. Os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism (versão 6.0) e expressos como DL<sub>50</sub> (dose letal média). O teste foi acompanhado de um controle negativo, somente com água salina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

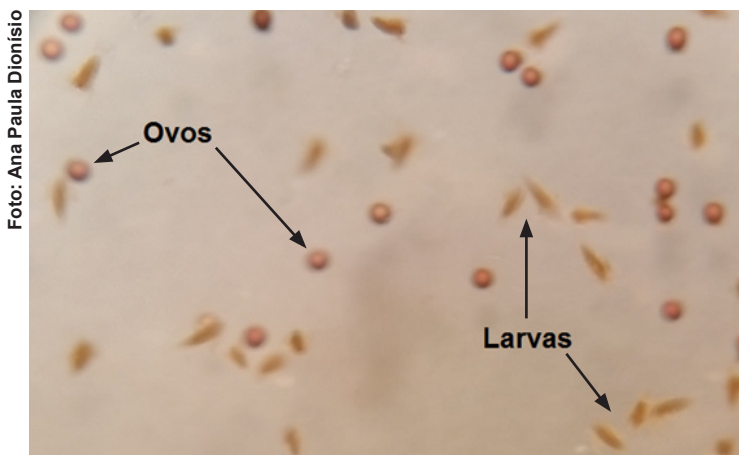


Foto: Ana Paula Dionísio

**Figura 2.** Imagem em microscópio com aumento de 10x, mostrando os ovos e as larvas de *Artemia salina* após a eclosão.

## Resultados e Discussão

### Caracterização química, física e físico-química do extrato concentrado de carotenoides (ECC)

A caracterização química, física e físico-química do ECC pode ser visualizada na Tabela 1.

O ECC apresenta elevada umidade e atividade de água (veja Tabela 1). O valor absoluto da atividade de água fornece uma indicação segura do conteúdo de água livre do alimento, sendo esta a única forma de água utilizada por parte dos microrganismos (Hoffman, 2001). É importante ressaltar que, no processo de microfiltração, o extrato concentrado de carotenoides encontra-se na fase retida pela membrana, sendo o material clarificado descartado. Nesta fase, além dos compostos de interesse, também encontra-se uma elevada carga microbiana. Considerando as características do extrato (elevada umidade e atividade de água), associadas a uma carga microbiana naturalmente elevada, tem-se uma situação favorável ao crescimento de microrganismos patogênicos ou deterioradores do produto. Nesse sentido, o tratamento térmico do material é uma etapa necessária, visando à manutenção de sua qualidade e segurança microbiológica, para uma possível incorporação desse extrato em alimentos.

**Tabela 1.** Caracterização química, física e físico-química do extrato concentrado de carotenoides (média  $\pm$  desvio padrão).

| Análise                                        | Extrato concentrado de carotenoides (ECC) |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Umidade (%)                                    | 92,83 $\pm$ 0,04                          |
| Atividade de água                              | 0,99 $\pm$ 0,00                           |
| pH                                             | 4,24 $\pm$ 0,01                           |
| Sólidos solúveis (°Brix)                       | 2,70 $\pm$ 0,00                           |
| L*                                             | 93,38 $\pm$ 0,01                          |
| a*                                             | -10,04 $\pm$ 0,01                         |
| b*                                             | 22,72 $\pm$ 0,02                          |
| Carotenoides totais ( $\mu\text{g/g}$ )        | 49,57 $\pm$ 1,89                          |
| Polifenóis totais (mg AGE/100g) <sup>(1)</sup> | 37,49 $\pm$ 0,64                          |

<sup>(1)</sup> mg ácido gálico equivalente/100g.

Os valores de cor, mensurados pelos parâmetros L\*, a\* e b\*, podem ser visualizados na Tabela 1. O valor elevado de b\* (que varia do azul ao amarelo) mostra que o material apresenta uma intensa tonalidade amarela (Figura 3), que é atribuída aos carotenoides presentes no extrato, os quais são encontrados na concentração de 49,57  $\mu\text{g/g}$  no ECC.

Foto: Ana Paula Dionísio

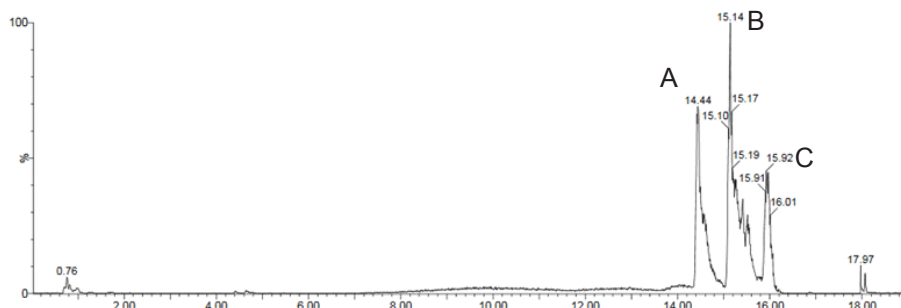


**Figura 3.** Extrato concentrado de carotenoides (ECC) após o tratamento térmico.

Os carotenoides são um grande grupo de pigmentos presentes nos produtos naturais, responsáveis pelas cores que variam do amarelo ao vermelho de frutas, vegetais, fungos e flores (Rodríguez-Amaya, 2016). São tetraterpenos, com cadeia poliênica que pode ter de 3 a 15 duplas ligações conjugadas e o comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção e a cor da molécula (Rodríguez-Amaya, 2016). Para o ECC obtido do pedúnculo de caju, vislumbra-se o seu uso em alimentos como um possível corante amarelo, podendo vir a ser utilizado pela indústria como um substituto da tartrazina. Em termos de toxicidade, os carotenoides são geralmente atóxicos mesmo quando utilizados como suplementos alimentares (Hammond; Renzi, 2013). Porém, indicações de toxicidade dependentes de dose são observadas nos ácidos anárdicos (Carvalho et al., 2011), que são compostos característicos das espécies de *Anacardiceae* (Correia et al., 2006).

### Identificação e quantificação dos ácidos anacárdicos do extrato concentrado de carotenoides (ECC)

O ECC apresentou três tipos de ácidos anacárdicos e somente traços de outros componentes fenólicos, como pode ser observado no cromatograma abaixo (Figura 4). Os picos correspondentes às letras A, B e C referem-se, respectivamente, aos ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1).



**Figura 4.** Identificação de ácidos anacárdicos por análise de UPLC-ESI-QToF-MS<sup>E</sup>, em modo de ionização negativo, sendo (A) trieno (15:3); (B) dieno (15:2); e (C) monoeno (15:1).

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos dos espectros de massa de alta resolução e suas respectivas fragmentações. O ácido anacárdico trieno (15:3) foi identificado no tempo de retenção de 14,44 min, a partir de sua massa  $[M-H]^-$  341,2094 Da, e um íon fragmento de  $m/z$  297,2222 Da; o ácido anacárdico dieno (15:2) foi identificado no tempo de retenção de 15,14 min, com  $[M-H]^-$  343,2245 Da e um íon fragmento de  $m/z$  299,2355 Da; o ácido anacárdico monoeno (15:1) foi identificado no tempo de retenção de 15,90 min, mediante uma massa  $[M-H]^-$  345,2409 Da, juntamente com um íon de fragmentação de  $m/z$  301,2534 Da. Os espectros de massa de alta resolução apresentaram uma fragmentação de  $[M-H-44]^-$  em todos os três ácidos anacárdicos identificados. Essa massa é derivada da perda de uma molécula de  $CO_2$  proveniente da clivagem do grupo carboxílico (Jerz et al., 2013; Erşan et al., 2016).

**Tabela 2.** Identificação dos diferentes ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1), presentes no ECC, via UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.

| Nº | Nome do Composto | $[M-H]^-$<br>Experimental | $[M-H]^-$<br>Teórica | Erro<br>(ppm) | Fragmento<br>( $m/z$ ) | Fórmula<br>Molecular |
|----|------------------|---------------------------|----------------------|---------------|------------------------|----------------------|
| 1  | AcAn<br>(15:3)   | 341,2094                  | 341,2117             | 2,3           | 297,2222               | $C_{22}H_{30}O_3$    |
| 2  | AcAn<br>(15:2)   | 343,2245                  | 343,2273             | 8,2           | 299,2355               | $C_{22}H_{32}O_3$    |
| 3  | AcAn<br>(15:1)   | 345,2409                  | 345,2430             | 6,1           | 301,2534               | $C_{22}H_{34}O_3$    |

Os ácidos anacárdicos são uma mistura de ácidos 6-alkil-salicílico, os quais são biosintetizados a partir de ácidos graxos. Esses lipídeos fenólicos apresentam um núcleo do ácido salicílico e uma cadeia lateral de 15 carbonos, que possui diferentes graus de insaturações, sendo as mais frequentes a mono, di ou tri-insaturado (Agostini-Costa et al., 2006). São encontrados em todas as frações do cajueiro, porém as maiores concentrações são observadas no líquido da casca da castanha de caju (LCC).

A concentração dos ácidos anacárdicos no ECC foi de 13,44, 14,92 e 18,72 mg/g em base seca, para ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno

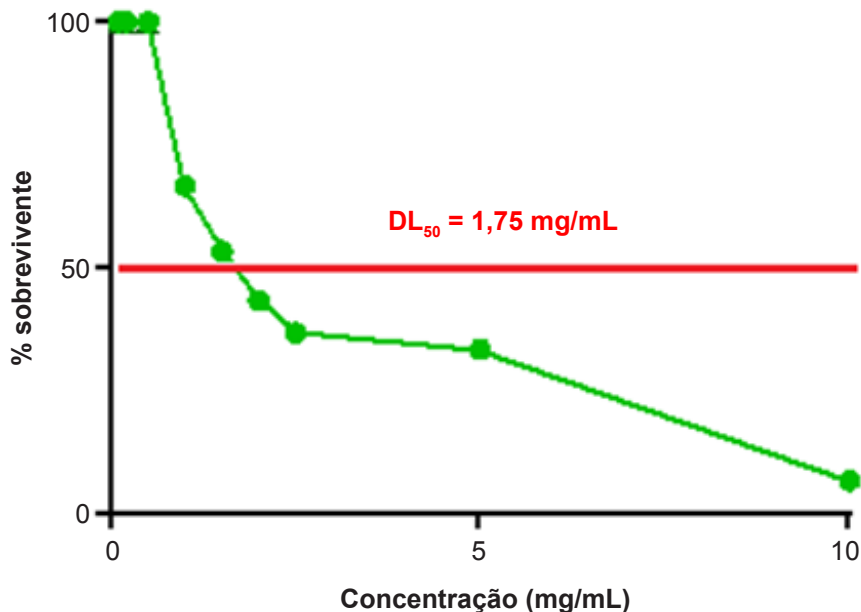
(15:2) e monoeno (15:1), respectivamente. Esses valores são inferiores aos encontrados no LCC (356,6 mg/g), uma vez que 60 a 70% do LCC é constituído de ácidos anacárdicos. No entanto, esse valores são muito superiores aos encontrados por Trevisan et al. (2006) e Agostini-Costa et al. (2006) para a amêndoa de castanha de caju torrada (0,65 mg/kg), pedúnculo de caju (de 0,016 a 0,030 mg/g, de acordo com o clone de caju utilizado) e nas fibras do pedúnculo (6,1 mg/g). Os valores superiores dos ácidos anacárdicos encontrados no ECC, em comparação ao pedúnculo e das fibras, pode ser justificado pela concentração destes compostos durante o processo de microfiltração.

Os ácidos anacárdicos possuem uma vasta atividade biológica, como: atividade antitumoral, antioxidante (Toyomizu et al., 2003; Kubo et al., 2006; Achanath et al., 2012), agindo também como antimicrobiano (Lima et al., 2000; Parasa et al., 2011). Entretanto, tem-se relatos a respeito de sua toxicidade. De uma forma geral, Carvalho et al. (2011) mencionam que o efeito biológico, nocivo ou benéfico, destes lipídeos fenólicos varia de acordo com o teor e a forma como estes são consumidos.

Embora os ácidos anacárdicos presentes no ECC estejam em menores concentrações do que no LCC, o estudo de sua toxicidade faz-se necessário, uma vez que existem relatos na literatura a respeito de sua toxicidade quando estes compostos foram testados em modelos in vivo (Carvalho et al., 2011). Embora o pedúnculo de caju seja um alimento seguro e amplamente consumido, o extrato trata-se da concentração de seus componentes e, dessa forma, os ácidos anacárdicos estão presentes em maiores concentrações do que na matéria-prima inicial. Considerando-se que vislumbra-se a aplicação do ECC em alimentos, a comprovação de sua segurança para consumo humano faz-se necessária.

### **Avaliação da toxicidade do extrato concentrado de carotenoides (ECC) por meio do bioensaio com *Artemia salina***

Os dados do número de larvas de *Artemia salina* sobreviventes após contato de 24 horas com cada concentração de extrato em teste, relacionando a concentração do extrato e o número de sobreviventes, são apresentados na Figura 5.



**Figura 5.** Efeito tóxico do extrato concentrado de carotenoides (ECC) em culturas de *Artemia salina*.

O ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *A. salina* é utilizado como método alternativo para a determinação da toxicidade, pois demonstra a sensibilidade da *A. salina* a substâncias tóxicas (Utyama et al., 2007). Segundo Lima et al. (2011), vem sendo utilizado tanto para o monitoramento de efluentes como para a determinação da toxicidade aguda. Com relação ao ECC, a dose letal média ( $DL_{50}$ ) - que é a dose necessária para o extrato matar 50% da população em teste - foi de 1,75 mg/mL. Segundo Meyer et al. (1982), valores superiores a 1,0 mg/mL indicam que o material testado é atóxico, o que é um importante resultado quando vislumbra-se uma aplicação alimentar do material.

Diversos trabalhos podem ser encontrados sobre o uso de *Artemia salina* em testes de toxicidade de materiais vegetais. Especificamente para caju, os trabalhos encontrados tratam da avaliação da toxicidade das folhas de cajueiro ou, em grande parte, do LCC. É importante ressaltar que os constituintes majoritários do LCC são ácidos anacárdicos, cardóis e cardanóis. Porém, a sua composição varia de acordo com sua origem e

também com o processo de extração (Moraes et al., 2017). Se a extração é realizada sob temperaturas entre 180-200 °C, como adotada no processo industrial, ocorre a descarboxilação do ácido anacárdico, conduzindo ao cardanol (Tychopoulos; Tyman, 1990).

Leite et al. (2015) observaram toxicidade do LCC utilizando *A. salina*. Os autores sugerem que esta toxicidade estaria relacionada à presença de ácidos anacárdicos, que já foram reportados anteriormente por apresentar citotoxicidade (em linfócitos periféricos) em ratos tratados com doses menores do que 10 mg/kg de peso corpóreo (Acevedo et al., 2006). Motti et al. (2015) avaliaram a toxicidade do LCC após secagem por *spray-dryer*. Os autores concluíram que todas as concentrações testadas apresentaram toxicidade, sendo necessários outros testes para a comprovação de sua segurança.

Silva et al. (2013), avaliando a toxicidade do extrato hidroalcóolico da folha do cajueiro submetido a distintas doses de irradiação, demonstraram que todos os materiais apresentaram toxicidade utilizando-se *A. salina*, sendo que esta toxicidade variou de acordo com o processo aplicado. Os autores sugerem que a irradiação pode vir a alterar a composição dos componentes químicos do material e, conseqüentemente, alterar a sua toxicidade.

Além de testes utilizando-se *A. salina*, ensaios de toxicidade aguda e subaguda utilizando-se ratos também foram realizados com caju, assim como também para os seus compostos isolados, como os ácidos anacárdicos. Konan (2006), por exemplo, realizou testes do extrato das folhas de cajueiro, demonstrando que é bem tolerado quando administrado em ratos e em longo prazo. Especificamente para os ácidos anacárdicos, Carvalho et al. (2011) mostraram que doses inferiores a 300 mg/kg não causaram efeitos adversos quando administrados aos animais. Além disso, não foi observado aumento na frequência de micronúcleos, quando comparado ao controle, sugerindo que nas concentrações testadas os ácidos anacárdicos não apresentaram mutagenicidade.

## Conclusões

---

O extrato concentrado de carotenoides (ECC) obtido da fibra do pedúnculo de caju apresentou três ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1) na sua composição, e apenas traços de outros componentes

fenólicos. Nos testes de toxicidade utilizando-se *Artemia salina*, a  $DL_{50}$  foi superior a 1 mg/mL, mostrando que o extrato pode ser considerado atóxico por meio deste teste. Porém, outros ensaios *in vivo* são necessários para garantir a segurança do extrato quando incorporado em produtos alimentares para consumo humano.

## Agradecimentos

---

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro.

## Referências

---

- ABREU, F. A. P.; DONIER, M.; DIONISIO, A. P.; CARAIL, M.; CARIS-VEYRAT, C.; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: a focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 25-31, 2013.
- ACEVEDO, H. R.; ROJAS, M. D.; ARCEO, S. D. B.; HERNÁNDEZ, M. S.; VÁZQUEZ, M. M.; TERRAZAS, T.; DEL TORO, G.V. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 609, n. 1, p. 43-46, 2006.
- ACHANATH, R.; SRINIVAS, M.; RAMADOS, C. S.; CANDADAL, S. **Antimicrobial derivatives of anacardic acid and process for preparing the same**. U.S. Patente n. 8, v. 338, p. 638, 2012.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A.; ABREU, L. N.; ROSSETTI, A. G.; SILVEIRA, E. R. Determinação de ácido anacárdicos em pedúnculos de caju. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 5, n. 2, p. 77-81, 2006.
- ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 18 ed. Gaithersburg, M.D, 2005.
- CARVALHO, A. L.; ANNONI, R.; SILVA, P. R.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; TREVISAN, M. T.; MAUAD, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.

ČESLA, P.; BLOMBERG, L.; HAMBERG, M.; JANDERA, P. Characterization of anacardic acids by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, n. 1, p. 253-259, 2006.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1287-1300, 2006.

ERŞAN, S.; GÜÇLÜ ÜSTÜNDAĞ, O.; CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. M. Identification of Phenolic Compounds in Red and Green Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hulls (Exo-and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS n. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 26, p. 5334-5344, 2016.

FONSECA, R. C.; SOUZA, N. A. D.; CORREA, T. C. L.; GARCIA, L. F.; REIS, L. G. V. D.; RODRIGUEZ, A. G. Assessment of toxic potential of Cerrado fruit seeds using *Artemia salina* bioassay. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 251-256, 2013.

HAMMOND, B. R.; RENZI, L. M. Carotenoids. **Advances in Nutrition**. v. 4, p. 474-476, 2013.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, n. 9, p. 23-30, 2001.

JERZ, G.; MURILLO-VELÁSQUEZ, J. A.; SKRJABIN, I.; GOK, R.; WINTERHALTER, P. Anacardic acid profiling in cashew nuts by direct coupling of preparative High-Speed Countercurrent Chromatography and Mass Spectrometry (prep HSCCC-ESI/APCI-MS/MS). In: TOTH, S.; MUSSINAN, C. (Ed.). Recent advances in the analysis of food and flavors. **American Chemical Society**, 2013. Cap. 11, p. 145-165.

KONAN, N. A. **Estudo farmacognóstico e toxicológico de *Anacardium occidentale* Linn. (*Anacardiaceae*) Clone CCP-76. 2006.** Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo.

KOUTSAFTIS, A.; AOYAMA I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **Science of the Total Environment**. v. 387, n. 1, p.166-174, 2007.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T. J.; TSUJIMOTO, K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 555-562, 2006.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390-1393, 1997.

LEITE, S. A.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L.; GOMES JÚNIOR, A. L.; LIMA, S. G.; CITÓ, A. M.; FREITAS, R. M.; MELO-CAVALCANTE, A. A.; DANTAS LOPES, J. A. Evaluation of toxic,

cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/626835/>>. Acesso em: 03 ago. 2017.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; TREVISAN, R. R.; PHILIPPSEN, A. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botânica Brasileira**, v. 25, n. 2 p. 331-336, 2011.

LIMA, C. A. D. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, E. D. P. D. A. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 3, p. 358-362, 2000.

MASUOKA, N.; SHIMIZU, K.; KUBO, I. Antioxidant activity of anacardic acids. In: CÉSPEDES, C. L.; SAMPIETRO, D. A.; SEIGLER, D. S.; RAI, M. (Ed.). **Natural antioxidants and biocides from wild medicinal plants**. Wallingford: Cabi, 2013. Cap. 9, p. 137-147.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.

MORAIS, S. M.; SILVA, K. A.; ARAUJO, H.; VIEIRA, I. G. P. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, v. 10, p. 31, 2017.

MORAIS, T. C.; PINTO, N. B.; CARVALHO, K. M. M.; RIOS, J. B.; RICARDO, N. M. P.; TREVISAN, M. T. S.; SANTOS, F. A. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n.1, p. 264-269, 2010.

MOTTI, P. R.; PORTO, K. R. A.; ROEL, A. R. Toxicidade da formulação obtida a partir do líquido da castanha de caju *Anacardium occidentale* L. em *Artemia salina* Leach. **Multitemas**, n. 47, p. 9-19, 2015.

OIRAM FILHO, F. **Isolamento em escala preparativa de ácidos anacárdicos provenientes do líquido da casca da castanha de caju (LCC)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Disponível em: <[http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/27145/3/2017\\_dis\\_foiramfilho.pdf](http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/27145/3/2017_dis_foiramfilho.pdf)>. Acesso em: 02 set. 2017.

PARASA, L. S.; SUNITA, T.; RAO, K. B.; RAO, A. H.; RAO, J. S.; KUMAR, L. C. A. Acetone extract of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts shell liquid against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by minimum inhibitory concentration (MIC). **Journal Chemical**

**and Pharmaceutical Research**. v. 3, n. 5, p. 736-742, 2011.

RODRIGUEZ, A. G.; TEIXEIRA, O. M.; SALLES, F. G.; VITAL, J. P.; PEIXOTO, D. S. Bioensaio com *Artemia salina* para detecção de toxinas em alimentos vegetais. **Estudos**, v. 36, n. 4, p. 795-808, 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, DC: ILSI Press, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 20-26, 2016.

SILVA, H. A.; SÁ, J. L.; RIBEIRO, L. R.; MELO, A. Analysis of toxicity of *Anacardium occidentale* L. extract submitted to ionizing radiation on embryos of *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **International Nuclear Atlantic Conference - INAC**, v. 45, p. 24-29, 2013.

TOYOMIZU, M.; OKAYMOTO, M. K.; ISHIBASHI, T.; NAKATSU, T.; AKIBA, Y. Reducing effect of dietary anacardic acid on body fat pads in rats. **Animal Science Journal**, v.74, n.6, p. 449-504, 2003.

TREVISAN, M. T. S., PFUNDSTEIN, B., HAUBNER, R., WÜRTELE, G., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H., OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n.2, p. 188-197, 2006.

TYCHOPOULOS, V.; TYMAN, J. H. P. Long-chain phenol - The thermal and oxidative deterioration of phenolic lipids from the cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell. **Journal of Science of Food Agricultural**, v. 52, n. 1, p. 71-83, 1990.

UTYAMA, I. K. A.; ANDRADE, D.; WATANABE, E.; PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia IV**, v. 4, n. 2, p. 202-207, 2007.



---

*Agroindústria Tropical*

MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

