



Avaliação de estratégias para separação de carotenóides dos ácidos anacárdicos a partir do extrato do bagaço de caju (*Anacardium occidentale*)

Palavras-Chave: Carotenóides, ácidos anacárdicos, fracionamento

Autores:

RAPHAEL DERVALLE FERRARI, FCF – UNICAMP

AUGUSTO DE SOUZA SILVA, FCF – UNICAMP

Dr^a. ANA LÚCIA TASCA GOIS RUIZ (orientadora), FCF – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A indústria agrônômica gera diversos subprodutos, dentre os quais o bagaço de caju se destaca como um dos principais resíduos (Zié et al., 2023). Esse material tem ganhado relevância na indústria farmacêutica devido à sua riqueza em compostos bioativos, como os ácidos anacárdicos e os carotenóides, que apresentam propriedades terapêuticas promissoras. Estudos indicam que esses compostos possuem efeitos anti-bacterianos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antidiabéticos, anticancerígenos e protetores cardiovasculares e gástricos (Aslam et al., 2024; Chen et al., 2023). No entanto, evidências sugerem que podem atuar de forma antagônica em certos contextos, como no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, em que a baixa concentração de carotenóides e sua interação com os ácidos anacárdicos reduziram a eficácia do extrato (da Silva et al., 2023). Diante disso, torna-se essencial desenvolver métodos eficientes para separar esses compostos e estudá-los isoladamente, permitindo a produção de extratos com concentrações específicas para aplicações terapêuticas mais direcionadas.

Os carotenóides, compostos isoprenóides com estrutura conjugada, atuam como antioxidantes ao neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS), prevenindo danos celulares e reduzindo o risco de doenças como câncer, distúrbios cardiovasculares e degeneração visual (Fiedor, Burna 2014). Seu mecanismo de ação envolve transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio, dependendo das condições do meio. Já os ácidos anacárdicos demonstraram, em estudos *in vitro* e em modelos animais, atividade inibidora da acetilcolinesterase (potencialmente útil no tratamento do Alzheimer), efeitos anticancerígenos por indução de apoptose, proteção gástrica e estímulo à remielinização (Morais et al., 2017; Salehi et al., 2019). No entanto, a maioria desses estudos ainda carece de validação clínica.

Para avaliar a atividade antioxidante desses compostos, métodos como o ensaio de Folin-Ciocalteu (que mede a capacidade redutora) e o teste de captura do radical DPPH (baseado na estabilização de radicais livres) são amplamente utilizados devido à sua praticidade, baixo custo e

robustez. Contudo, a complexidade das interações entre oxidantes e antioxidantes exige a combinação de múltiplas técnicas para uma análise mais abrangente.

Nesse contexto, o presente projeto visou desenvolver metodologias eficazes para a separação dos ácidos anacárdicos e carotenoides presentes no bagaço de caju, além de avaliar seu potencial antioxidante. O objetivo é possibilitar a produção de extratos com concentrações otimizadas desses compostos, considerando seus efeitos individuais e sua possível interação antagônica, abrindo caminho para aplicações farmacêuticas mais específicas e eficientes.

METODOLOGIA:

A. Obtenção do extrato concentrado de carotenoides:

O extrato concentrado de carotenoides e ácidos anacárdicos (CAE) foi obtido a partir do resíduo de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale*) da variedade CCP-76, desenvolvida pela Embrapa, cultivadas no campo experimental da Embrapa Agroindústria Tropical em Pacajus - Ceará. O extrato foi fornecido liofilizado pela Dra. Ana Paula Dionísio, pesquisadora da Embrapa, do Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE). Por se tratar de uma espécie nativa, o projeto foi registrado no SisGen (#A9A0381).

B. Fracionamento por cromatografia em coluna filtrante

Para o fracionamento por cromatografia em coluna filtrante, alíquotas (1 g) do extrato CAE foram aplicadas sobre uma coluna de sílica-gel (Sílica gel 60 - Merck; 0,0063 - 0,200 mm, 1:100 p/p, extrato:sílica) montada em funil de placa porosa de 7 cm de diâmetro. A eluição da coluna foi feita em gradiente crescente de polaridade com hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) [Hex 100, Hex/AcOEt 9:1, Hex/AcOEt 4:1, Hex/AcOEt 7:3, Hex/AcOEt 1:1, Hex/AcOEt 3:7, AcOEt 100, AcOEt/MeOH 4:1, AcOEt/MeOH 1:1, 100 ml de cada eluente]. Foram coletadas frações, com volume aproximado de 10 ml por fração, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) para agrupamento das frações semelhantes. Foram realizados dois fracionamentos independentes.

C. Análise Qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por CCD realizadas seguindo os protocolos descritos por Wagner e Bradt (1996), com pequenas adaptações. Foram utilizadas cromatoplasmas de silicagel 60 F254 (Merck®1.05554) como fase estacionária. A melhor fase móvel para estas análises foi a mistura Hexano/Acetato de etila 75:25. Para revelação das cromatoplasmas foram utilizados a observação sob luz UV (254 e 366 nm) seguida da aplicação de solução reveladora de vanilina [ácido acético/vanilina/ácido sulfúrico (40:0,8:2, v/p/v)], seguidos de aquecimento em estufa, a 110 °C, por 3 a 5 minutos, ou a aplicação de vapores de iodo. Os resultados foram registrados por fotografia.

E. Análises Espectroscópicas de Caracterização – Captura de radicais DPPH, Teor de Compostos Fenólicos Totais, Teor de Flavonoides Totais e Determinação do Fator de Proteção Solar:

Alíquotas das frações obtidas no fracionamento por coluna filtrante foram diluídas em etanol nas concentrações de 15,625 a 1000 µg/ml, e transferidos em triplicata para quatro microplacas de 96 compartimentos. Cada microplaca foi utilizada para uma avaliação, que compreenderam a capacidade

de sequestrar radicais livres DPPH, quantificação do teor total de compostos fenólicos e de flavonoides totais, seguindo o protocolo descrito por Souza et al. (2022) e, finalmente, a determinação do Fator de Proteção Solar (FSP) seguindo o protocolo descrito por Dutra e colaboradores (2004) e Yang e colaboradores (2018), com pequenas adaptações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O fracionamento em coluna filtrante foi feito duas vezes durante o desenvolvimento do projeto. Desta maneira foi possível obter quantidade suficiente das amostras para as análises seguintes. O primeiro fracionamento a partir de uma alíquota do extrato CAE de 1,0709 g resultou em 65 frações, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada CCD. As frações similares foram então reunidas em seis grupos de frações denominados J1 (1-20; 2,4 mg), J2 (21-27; 3,4 mg), J3 (28-30; não foi possível calcular a massa), J4 (31-41; 65,3 mg), J5 (42-50; 55,3 mg) e J6 (51-65; 124,2 mg) (Figura 1A). Infelizmente, durante a etapa de evaporação do solvente sob vácuo em evaporador rotativo, o balão que continha a fração J3 não foi preso adequadamente e a amostra acabou sendo perdida.

O segundo fracionamento em coluna filtrante foi feito seguindo os mesmos procedimentos da primeira, empregando uma alíquota do extrato CAE de 1,0101 g. Neste experimento, foram coletadas 76 frações que, após análise por CCD, foram reunidas por semelhança no perfil cromatográfico nos grupos de fração denominados M1 (1-16; 310 mg), M2 (17-20; 171 mg), M3 (21-24; 70 mg), M4 (25-27; 134 mg), M5 (28-40; 166 mg) e M6 (41-76; 415 mg) (Figuras 1B e 1C).

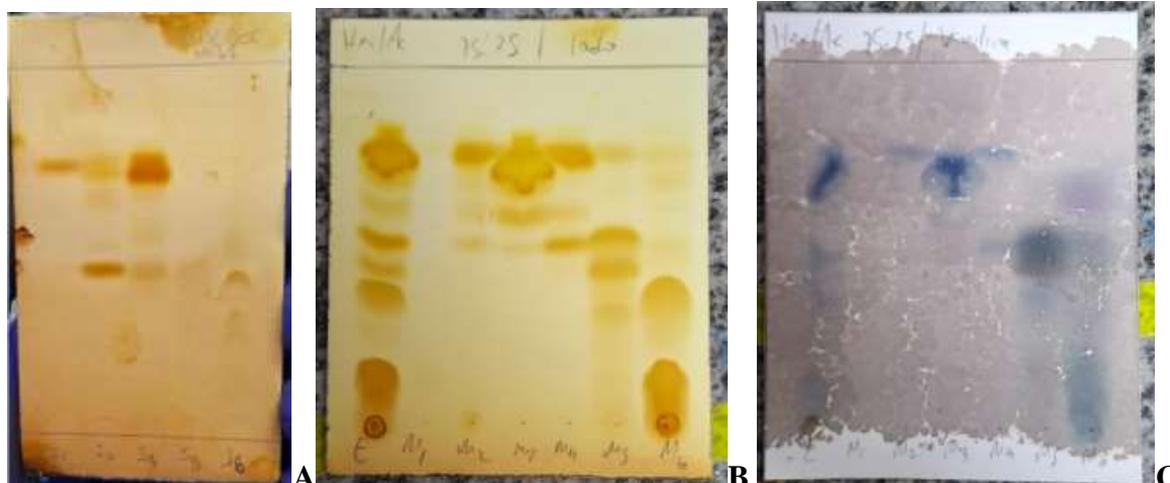


Figura 1. Análise por CCD das frações "J" (A) e "M" (B e C) obtidas após reunião das frações obtidas no fracionamento por coluna filtrante do extrato do bagaço de caju.

Fase estacionária: sílica-gel GF254; Fase móvel: Hexano/Acetato de etila 75:25, revelador: vapores de iodo (A e B), solução de vanilina (C).
Fonte: Autoria própria

Nas duas vezes foi possível separar as substâncias presentes no extrato CAE em frações com diferentes polaridades, tendo em vista a presença de bandas de diferentes Rf nas amostras. Ainda, para a revelação das placas de CCD foram testados dois reagentes amplamente utilizados na detecção de metabólitos secundários, a saber, vapores de iodo e a solução ácida de vanilina (Wagner e Bradt, 1996). Como apresentado na Figura 1, a revelação com vapores de iodo permitiu a visualização de um maior

número de manchas em todas as frações obtidas, sendo um método mais adequado para análise do fracionamento do extrato CAE.

Quanto às análises de caracterização por técnicas de espectroscopia UV-Vis, os resultados obtidos para as frações “J” e “M” obtidas a partir do extrato CAE indicaram um baixo potencial para sequestrar radicais livres. Nas condições experimentais empregadas, nenhuma das amostras conseguiu reduzir em 50% a concentração de DPPH. Os melhores resultados de inibição foram obtidos para fração J2, que reduziu entre 10,5 % (62,5 µg/ml) e 36,1% (250 µg/ml). As demais frações foram inativas (redução < 10% independente da concentração avaliada).

Em função da quantidade de amostra, os demais testes de caracterização foram realizados apenas com as frações obtidas do segundo fracionamento (frações M) e estão resumidas na Tabela 1. Os melhores resultados de proteção solar foram observados para as frações M4 (6,7) e M6 (10,1). Considerando-se a fração M6, esse melhor efeito de proteção coincidiu com maiores valores tanto no teor de compostos fenólicos totais quanto no teor de flavonoides totais. Essas duas classes de produtos naturais apresentam sistemas de duplas ligações conjugadas que podem explicar a melhor capacidade de absorver a radiação ultravioleta.

Fração	Fenólicos totais (µg GAE/mg)	Flavonoides totais (µg CE/mg)	FPS
M1	34 ± 6	12 ± 3	4,4
M2	39 ± 7	15 ± 1	4,7
M3	52 ± 5	54 ± 2	4,9
M4	72 ± 5	38 ± 15	6,7
M5	41 ± 1	70 ± 30	4,9
M6	61 ± 4	63 ± 43	10,1

Tabela 1. Teor de fenólicos totais, de flavonoides totais e Fator de Proteção Solar (FPS) das frações “M” obtidas no fracionamento por coluna filtrante do extrato do bagaço de caju.

Resultados expressos como média ± desvio padrão para amostras diluídas na concentração de 500 µg/ml. Unidades: µg GAE/mg = massa (µg) equivalente de ácido gálico por massa (mg) de amostra; µg CE/mg = massa (µg) equivalente de catequina por massa (mg) de amostra. GAE = *gallic acid equivalent* (equivalentes de ácido gálico); CE = *catechin equivalent* (equivalentes de catequina); FPS = fator de proteção solar.

CONCLUSÕES:

O fracionamento por coluna filtrante demonstrou ser um método eficaz para separação de compostos conforme suas polaridades e com boa recuperação e rendimento. Não foi observada capacidade de sequestrar radicais livres para as frações obtidas, mas apenas essa evidência não é suficiente para afirmar que as amostras não apresentem atividade antioxidante. Isso porque, em sistemas biológicos, a atividade antioxidante envolve outros eventos, como inibição de enzimas oxidantes por exemplo. Ainda, o potencial efeito de proteção solar mostrou-se correlacionado ao maior teor de compostos fenólicos e de flavonoides. Este estudo permitiu evidenciar mais alguns potenciais

efeitos biológicos para o extrato obtido a partir do bagaço de caju assim como foi possível estabelecer uma estratégia eficiente para fracionamento.

BIBLIOGRAFIA

ASLAM, Nabila et al. **Exploring the potential of cashew waste for food and health applications: A review.** *Future Foods*, v. 9, 2024.

CHEN, Ying-Ying et al. **The nutritional and bio-active constituents, functional activities, and industrial applications of cashew (*Anacardium occidentale*): A review.** *Food Frontiers*, v. 4, n. 4, p. 1606-1621, 2023.

FIEDOR, Joanna; BURDA, Květoslava. **Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease.** *Nutrients*, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

MORAIS, Selene M. et al. **Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities.** *Pharmaceuticals*, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.

OIRAM FILHO, Francisco et al. **Development and validation of a reversed phase HPLC method for determination of anacardic acids in cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell liquid.** *Journal of Chromatographic Science*, v. 56, n. 4, p. 300-306, 2018.

ZIÉ, Madinatou et al. **Valorization of cashew apple bagasse in food application: Focus on the use and extraction of nutritional or bioactive compounds.** *Food and Humanity*, v. 1, p. 848–863, 2023.

DA SILVA, Gisele G. et al. **Evaluation of a standardized extract obtained from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) bagasse in DSS-induced mouse colitis.** *Foods*, v. 12, p. 3318, 2023.

SALEHI, Bahare et al. ***Anacardium* Plants: Chemical, Nutritional Composition and Biotechnological Applications.** *Biomolecules* v. 9, n. 9, p. 465, 2019.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas.** 2nd Ed. Berlin, Springer-Verlag. 1996.

SOUSA, Ilza M. O. et al. **The role of spray-drying atmosphere on *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann standardized extract production for wound healing activity.** *Natural Products Research*, v. 36, n. 18, p. 4799-4803, 2022.

DUTRA Elizângela A. et al. **Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 3, p. 381-385, 2004.

YANG, Soo In et al. **Reliable and simple spectrophotometric determination of sun protection factor: A case study using organic UV filter-based sunscreen products.** *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 17, n. 3, p. 518-522, 2018.