UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

ESTUDO DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS DO ÓLEO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU (CNSL) (*Anacardium occidentale* L.) DOS CLONES DE CAJUEIRO-ANÃO-PRECOCE CCP-76 E CCP-09 EM CINCO ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO

CARLOS ALBERTO DE ALBUQUERQUE LIMA

Farmacêutico-Bioquímico

Profª. Dra. **GLÁUCIA MARIA PASTORE**

Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Carlos Alberto de Albuquerque Lima aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de março de 1999.

Campinas, 24 de março de 1999

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil
1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA :

V. Ex.
TOMBO BC/ 37614
PROC. 229/99
C [ ] D [x]
PREÇO R$ 11,00
DATA 05/05/99
Nº CPD

CM-00122871-2

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

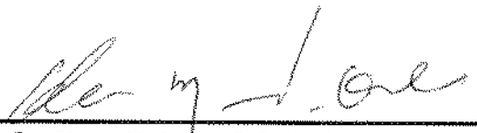
L628e

Lima, Carlos Alberto de Albuquerque
Estudo dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) (*Anacardium occidentale* L.) dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação / Carlos Alberto de Albuquerque Lima - Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Caju. 2. Castanha de caju. 3. Anacardiaceae. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

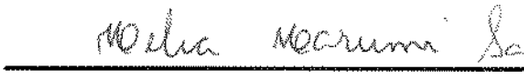
BANCA EXAMINADORA



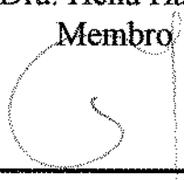
Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Prof. Dr. Yong Kun Park
Membro

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
Membro



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro



Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García
Membro

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong
Membro

Prof. Dr. José Luiz Pereira
Membro

Campinas, de de 1999

Dedico,

A minha esposa **Eliza** com reconhecido amor, aos meus filhos **Thalita, Gustavo** e **Rodrigo**, pois, sem seus apoios este trabalho seria muito mais difícil.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Gláucia Maria Pastore, pela realização da tese, pela dedicação e apoio recebidos durante todo o trabalho e por sua amizade.

À Universidade Federal da Paraíba que possibilitou a nossa participação no Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Ao PIDCT-CAPES, pela concessão da bolsa.

Aos membros da Banca, Prof. Dr. Yong Kun Park, Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes, Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, Prof. Dr. Nelson Horacio Garcia Pezoa, Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong e Prof. Dr. José Luiz Pereira.

À minha esposa e filhos, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao pesquisador Ricardo Elesbão Albes da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical - Fortaleza/Ceará, por ter gentilmente cedido as amostras dos clones de cajueiro-anão-precoce com as respectivas fotografias.

À Joaquim, pelo auxílio na realização da análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Ao Sr. Pedro Jiménez Gómez, fotógrafo do Centro de Comunicação da UNICAMP, pelo valioso auxílio na realização das fotografias e amizade.

Aos amigos, Masaharu, Contado, Júlia, Lilian, Mercedes, Giselle, Vinícius, Heinz, e muitos outros que não mencionei, agradeço pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Dora Bia e Leonor, pelos momentos de convívio e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca da FEA pelo auxílio, atenção e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuiram para a realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADO.**

ÍNDICE GERAL

páginas

ÍNDICE i
ÍNDICE DE FIGURAS vii
ÍNDICE DE TABELAS xiv
RESUMO xv
SUMMARY xvii

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO 1
2 - OBJETIVO 9
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 10
4 - MATERIAIS E MÉTODOS 27
4.1 - MATERIAIS 27
4.1.1 - Reagentes e materiais específicos 27
4.1.2 - Equipamentos 29
4.2 - MÉTODOS 30
4.2.1 - Estudos preliminares para seleção da parte do fruto inteiro com maior teor de ácido anacárdico e escolha dos solventes para eluição 30

páginas

4.2.1.1 - Extração dos compostos fenólicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju adquiridos no Ceasa, Campinas-SP 30

4.2.1.2 - Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos extratos etílicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju, do Ceasa Campinas-SP 32

4.2.1.3 - Obtenção do extrato etílico do óleo da casca, semente, pedúnculo de caju de Valinhos-SP, e sucos industrializados de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2) 33

4.2.1.4 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca, semente, pedúnculo de caju de Valinhos-SP, e suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2) 33

4.2.1.5 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos dos extratos etílicos do suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2) 34

4.2.2 - Coleta das amostras de castanha de caju-anão-precoce *Anacardium occidentale* 35

4.2.3 - Tratamento das amostras de castanha de caju-anão-precoce 38

4.2.4 - Obtenção dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum 38

páginas

4.2.5 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum ... 39

4.2.6 - Análise do peso médio das castanhas de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação 40

4.2.7- Cromatografia em Coluna do óleo da casca da castanha de caju para obtenção do padrão ácido anacárdico 40

4.2.8 - Obtenção dos extratos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação utilizando diferentes solventes 42

4.2.9 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação 45

4.2.10 - Cromatografia Preparativa dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação 45

4.2.11 - Cromatografia em Coluna dos ácidos anacárdicos dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação 46

4.2.12 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa do padrão dos ácidos anacárdicos e dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação 48

páginas

4.2.13 - Identificação dos ácidos anacárdicos 50
4.2.13.1 - Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos para cromatografia gasosa 50
4.2.13.2 - Cromatografia Gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos ... 50
4.2.13.3 - Cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas 51
4.2.13.4 - Identificação dos ácidos anacárdicos 52
4.2.14 - Análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju 52
4.2.15 - Microrganismos e meio 52
4.2.16 - Análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL pelo método espectrofotométrico 53
4.2.17 - Preparo dos discos dos ácidos anacárdicos do CNSL para o teste de antibiograma 54
4.2.18 - Análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos utilizando discos de papel de filtro 55
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 56
5.1 - Resultados dos estudos preliminares para seleção dos clones de cajueiro com maior teor dos ácidos anacárdicos 57
5.1.1 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada dos extratos etílicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju do Ceasa Campinas-SP 57

páginas

5.1.2 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca, semente, pedúnculo e suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2) 60

5.1.3 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2) 63

5.1.4 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum 66

5.2 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance do padrão ácido anacárdico obtido por cromatografia em coluna 69

5.2.1 - Determinação do peso médio das castanhas de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação 71

5.2.2 - Determinação do óleo da casca da castanha de caju dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação utilizando diferentes solventes... 73

5.2.3 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos bruto do CNSL dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação 74

5.2.4 - Análise por Cromatografia em Coluna dos ácidos anacárdicos 78

5.2.5 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Fase Reversa 81

5.2.6 - Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos do CNSL 98

5.2.6.1 - Identificação por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas 98

páginas

5.2.7 - Atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju do clone CCP- 09 no quinto estágio de maturação utilizando teste espectrofotométrico e teste de antibiograma 104
6.0 - Conclusões 120
7.0 - Sugestões para trabalhos futuros 122
8.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 123

ÍNDICE DE FIGURAS

páginas

Figura 1 - Clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 3
Figura 2 - Clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 4
Figura 3 - Configuração geral dos ácidos anacárdicos 6
Figura 4 - Fluxograma de extração e análise qualitativa e quantitativa dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju 31
Figura 5 - Estágios de maturação do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 43
Figura 6 - Estágios de maturação do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 44
Figura 7 - Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos extratos etílicos do óleo da casca (C), semente (S) e pedúnculo (P) de caju do Ceasa Campinas -SP 59
Figura 8 - Estrutura dos principais constituintes do óleo do CNSL 60
Figura 9 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca (C), semente (S) e pedúnculo (P) de caju de Valinhos-SP, e suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1) e (MC_2) 62
Figura 10 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do suco de caju da marca comercial (MC_1) 64

páginas

Figura 11 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do suco de caju da marca comercial (MC_2) 65

Figura 12 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca (C) da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e caju comum, de Mossoró-RN 68

Figura 13 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance do padrão dos ácidos anacárdicos 70

Figura 14 - Peso médio das castanhas de caju dos clones de cajueiro-anão- precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação 72

Figura 15 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5) 76

Figura 16 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5) 77

Figura 17 - Monitoramento das frações separadas pela cromatografia em coluna de silica gel 60 dos ácidos anacárdicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 em cinco estágios de maturação 79

páginas

Figura 18 - Monitoramento das frações separadas pela cromatografia em coluna de silica gel 60 dos ácidos anacárdicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 em cinco estágios de maturação 80

Figura 19 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do padrão dos ácidos anacárdicos 83

Figura 20 - Concentração absoluta dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) dos extratos etílicos do (CNSL) do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5) 84

Figura 21 - Proporção relativa dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) dos extratos etílicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5) 85

Figura 22 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no primeiro estágio de maturação 86

Figura 23 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no segundo estágio de maturação 87

Figura 24 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no terceiro estágio de maturação 88

páginas

Figura 25 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no quarto estágio de maturação 89

Figura 26 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no quinto estágio de maturação 90

Figura 27 - Concentração absoluta dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) dos extratos etílicos do (CNSL) do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5) 91

Figura 28 - Proporção relativa dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) dos extratos etílicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5) 92

Figura 29 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no primeiro estágio de maturação 93

Figura 30 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no segundo estágio de maturação 94

Figura 31 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no terceiro estágio de maturação 95

páginas

Figura 32 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no quarto estágio de maturação 96

Figura 33 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no quinto estágio de maturação 97

Figura 34 - Cromatograma de ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos 99

Figura 35 - Espectro de massas do éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z)-pentadecenil]ácido salicílico 101

Figura 36 - Espectro de massas do éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z)11(Z)-pentadecadienil]ácido salicílico 102

Figura 37 - Espectro de massas do éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z)11(Z)14-pentadecatrienil]ácido salicílico 103

Figura 38 - Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre a bactéria *Streptococcus mutans* (Sm): 5µl (28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06 µg/ml) 106

Figura 39 - Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos do CNSL sobre a bactéria *Streptococcus mutans* (Sm): 70µl (400,63 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml) 107

Figura 40 - Teste de antibiograma dos ácidos anacárdicos do CNSL sobre a bactéria *Streptococcus mutans*. C (controle); 210µl (1201,90µg/ml); 70µl (400,63µg/ml)..... 109

Figura 41 - Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Staphylococcus aureus* (S.a); 5µl (28,62µg/ml); 10µl (57,23µg/ml);20µl (114,46µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml);70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06µg/ml)..... 111

Figura 42 - Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Candida albicans* (C.a); 5µl (28,62µg/ml);10µl (57,23µg/ml; 20µl (114,46µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20µg/ml;210µl (1201,90 µg/ml; 260µl(1488,06µg/ml) 113

Figura 43 - Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Candida utilis* (C.u); 5µl (28,62µg/ml); 10µl (57,23µg/ml); 20µl (114,46µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl(1488,06µg/ml) 114

Figura 44 - Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Trichodermus sp* (T.sp); 5µl (28,62µg/ml);10µl(57,23µg/ml);20µl(114,46µg/ml); 35µl (200,32µg/ml); 70µl(400,63µg/ml); 140µl(801,27µg/ml);180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06µg/ml) 116

Figura 45 - Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Aspergillus sp* (A sp); 5µl (28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06µg/ml) 117

Figura 46 - Atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL sobre *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* 5µl (28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46µg/ml); (35µl (200,32µg/ml); 70µl (400,63µg/ml); 140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06 µg/ml) 119

ÍNDICE DE TABELAS

páginas

Tabela 1 - Características da coloração do pseudofruto, peso médio da castanha e e produção média de castanha dos clones de cajueiro-anão-precoce provenientes de Mossoró, do Estado do Rio Grande do Norte 36

Tabela 2 - Características do plantio, produção e cultivo dos cajueiro-anão-precoce e cajueiro comum 37

Tabela 3 - Análise dos ácidos anacárdicos das amostras de suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2) por HPLC em Fase Reversa 66

Tabela 4 - Porcentagem relativa da extração do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5) utilizando diferentes solventes 74

Tabela 5 - Porcentagem de matéria seca dos fungos *Trichodermus sp* e *Aspergillus sp* 115

RESUMO

As frutas tropicais sempre despertaram interesse de pesquisadores de diversas áreas devido as várias funções que lhe são atribuídas. Recentemente tem sido relatado a importância de alguns constituintes do caju (*Anacardium occidentale* L) com aplicações industriais e medicinais. Foram coletadas castanhas de caju de dois clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação, sendo o primeiro estágio coletado com doze dias após a fecundação da flor e os estágios seguintes foram coletados com intervalos de doze dias até o sexagésimo dia, quando o fruto, a castanha, completa o amadurecimento, provenientes da cidade de Mossoró do Estado do Rio Grande do Norte, para extração do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) com éter etílico, hexano e pentano. A concentração dos ácidos anacárdicos foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). A análise qualitativa dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju foi realizada em Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). A Cromatografia em coluna de silica gel 60 foi utilizada para separar a fração constituida pelo ácido anacárdico da outra fração que contém o cardol e cardanol. Através da análise por HPTLC dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce, foram visualizadas frações com intensa cor azul fluorescente quando irradiadas com luz ultravioleta U.V. a 254nm, características dos ácidos anacárdicos. Desse modo, foram observadas diferenças visuais das frações de ácidos anacárdicos entre os estágios dos mesmos clones e entre os clones CCP-76 e CCP-09. A análise quantitativa das frações de

ácidos anacárdicos foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Os cromatogramas obtidos por HPLC demonstraram perfis diferentes entre os estágios do mesmo clone, como também quando comparados com os clones entre si, havendo uma correlação com os resultados do HPTLC. O óleo das cascas do quinto estágio de maturação correspondente ao tempo de sessenta dias do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 apresentou maiores teores de ácidos anacárdicos $C_{15:3}$ 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienyl]ácido salicílico: $C_{15:2}$ 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienyl]ácido salicílico e $C_{15:1}$ 6-[8(Z)-pentadecenyl]ácido salicílico, em relação às cascas do CCP-76. Os resultados demonstraram que as concentrações dos ácidos anacárdicos foram variáveis, dependendo dos clones e do estágio de maturação. A atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos foram testadas contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Aspergillus sp* e *Trichodermus sp.* Os ácidos anacárdicos demonstraram potente atividade inibitória contra a bactéria *Streptococcus mutans*, uma das bactérias responsáveis pela cárie dentária, quando comparado com os outros microrganismos.

SUMMARY

Tropical fruits have always been an interesting subject for researchers of various areas, due to the several functions attributed to them. The importance of some constituents of cashew (*Anacardium occidentale* L) for industrial and medicinal applications has recently been reported. Cashew nuts of two clones of cashew-midget-precocious CCP-76 and CCP-09 were collected in five stages of maturation, the first stage being collected twelve days after the flower fecundation and the following stages collected of intervals of twelve days up to the sixtieth day, when the fruit, the cashew nut, completes its maturation. The cashew nuts came from the city of Mossoró in the State of Rio Grande do Norte, for the extraction of the oil from the cashew nut shell (CNSL) with ethyl ether, hexane and pentane. The concentrations of anacardic acids were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). A qualitative analysis of the ethyl extracts of the cashew nut shell oil was accomplished using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) and high- performance liquid chromatography (HPLC). Open column cromatography of silica gel 60 was used to separate the anacardic acids fraction from the other fraction which contained cardol and cardanol. From the HPTLC analysis of the ethyl extracts of the cashew nut shell oil of the clones of cashew-midget-precocious, fractions were visualized with an intense fluorescent blue color when irradiated with ultraviolet light at 254nm, which is characteristic of anacardic acids. Visual differences fractions anacardic acids were observed amongst the different stages of the same clone and between the clones CCP-76 and CCP-09. A quantitative analysis of the fractions of anacardic acids was accomplished by high-

performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC chromatograms also demonstrated differents profiles amongst the stages of the same clone, as well as between the clones, correlating with the HPTLC results. The oil of the shells of the fifth maturation stage, corresponding to sixty days of the clone of cashew-midget-precocious CCP-09, presented greater concentrations of anacardic acids C15:3 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienyl]salicilic acid: C15:2 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienyl] salicilic acid and C15:1 6-[8(Z)-pentadecenyl]salicilic acid, in relation to the shells of CCP-76. The results demonstrated that the concentrations of the anacardic acids were variable, depending on the clones and on the maturation stage. The antimicrobial activity of the anacardic acids was tested against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Aspergillus sp* and *Trichodermus* sp. The anacardic acids demonstrated potent inhibiting activity against the bacteria *Streptococcus mutans*, one of the bacteria responsible for dental decay, when compared with other microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

O cajueiro *(Anacardium occidentale* L.), é uma espécie de planta arbórea nativa da América tropical, e que pode atingir 10-12m de altura. Estas espécies pertencem a classe das dicotiledôneas, ordem terebintales, família Anacardiaceae. Esta família possui cerca de 60 gêneros e 400 espécies (TOSCHI et alii, 1993).

A maioria dos pomares de cajueiro existentes no Brasil, implantados sob regime de sequeiro, usou mudas de pé-franco do tipo comum, com base na falsa premissa de que a planta pode ser cultivada sob condições de extrema adversidade hídrica. Contudo, com a introdução do cajueiro-anão-precoce, o sistema de produção com base no emprego de clones melhorados, cultivos adensados, fertilizantes e controle sanitário está evoluindo, com perspectivas de utilização da irrigação, que certamente promoverá aumento da produtividade, menor risco, ampliação do período de colheita e melhoria da qualidade da castanha e pedúnculo OLIVEIRA et alii (1995).

A produtividade média esperada (kg de castanhas/ha), obtida com os principais clones de cajueiro-anão-precoce recomendados pela Embrapa Agroindústria Tropical, quando cultivados sem o uso da irrigação, é a seguinte: CCP-76 - 31 kg/ha no primeiro, 163 kg/ha no segundo, 306 kg/ha no terceiro e 307 kg/ha no quarto Figura 1 ; CCP-09 - 51 kg/ha no primeiro ano, 184 kg/ha no segundo, 367 kg/ha no terceiro e quarto e 712 kg/ha no quinto Figura 2 ; CCP 1001 - 65 kg/ha no primeiro, 367 kg/ha no segundo, 557 no terceiro e 1.187 kg/ha no

quarto ano BARROS et alii (1993). Na região litorânea do Ceará, o período e a distribuição da produção de castanha ocorrem nos meses de agosto (21%), setembro (41%), outubro (14%), novembro (12%), dezembro (10%) e janeiro (2%) (PARENTE & OLIVEIRA, 1995).

As cascas da castanha de caju são ricas fontes de derivados do ácido salicílico e resorcinol, formados pela adição de uma longa cadeia alquil, chamados de ácidos anacárdicos e cardóis. Juntos, eles representam 30% do peso das cascas, sendo os ácidos anacárdicos responsáveis por 70% e os cardóis por 25% do óleo da casca da castanha de caju O restante consiste de pequenas quantidades de 2-metilcardois e cardanois.

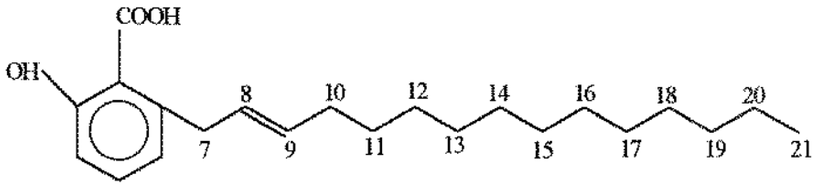
Vários conservantes naturais podem ser encontrados em plantas, como por exemplo, óleo da casca da castanha de caju, óleos essenciais da laranja e do limão, os quais são conhecidos como possuidores de atividade antimicrobiana, podendo em alguns casos considerar-se que a eficiência destes é superior a dos conservantes químicos. Trabalhos têm relatado que desinfetantes a base de óleos essenciais de limão e laranja, em solução aquosa, são capazes de controlar microrganismos formadores de esporos mais eficientemente quando comparado com fenóis SUBBA et alii (1967); KUBO et alii (1993).

Figura 1. Clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76

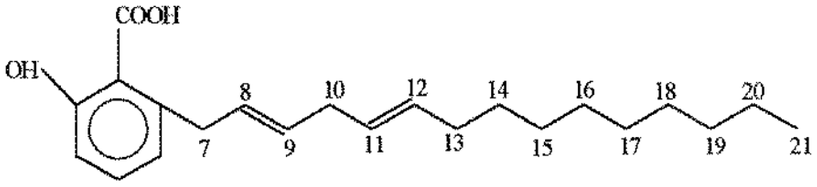
Figura 2. Clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09

Considerando a necessidade por novos agentes antimicrobianos provenientes de fontes vegetais, portanto, naturais, biodegradáveis e renováveis, pesquisas estão sendo desenvolvidas para descobrir substâncias com propriedades preservadoras dos alimentos e produtos cosméticos, e que possam trazer benefícios a saúde humana. Inúmeros trabalhos têm demonstrado a importância destes preservativos naturais, não tóxicos, nas indústrias de alimentos e farmacêutica, que poderiam ser largamente utilizados em alimentos processados e não processados.

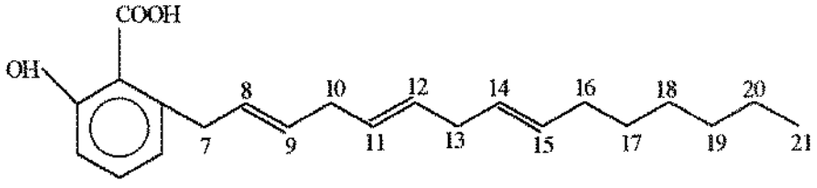
A presença destes diversos compostos fenólicos, e em particular dos ácidos anacárdicos, explicam a grande diversidade de propriedades terapêuticas relatadas na literatura. Os ácidos anacárdicos Figura 3 são formados por 15 átomos de carbonos em uma longa cadeia alquil com diferente grau de insaturação, unidos a um anel aromático apresentando um grupo carboxila e uma hidroxila (SHOBHA et alii, 1994).



1: $C_{15:1}$ 6-[8(Z)-pentadecenyl]ácido salicílico



2: $C_{15:2}$ 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienyl]ácido salicílico



3: $C_{15:3}$ 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienyl]ácido salicílico

FIGURA 3. Configuração geral dos ácidos anacárdicos.

O Brasil é grande produtor de condimentos e ervas aromáticas, empregadas tanto pela indústria de alimentos quanto pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Além destes podemos citar outros produtos como os óleos essenciais e/ou oleoresinas destes e de outros produtos que poderiam vir a ser uma importante fonte de divisas para o país. A extração de óleos vegetais, poderiam também, vir a ser uma promessa de divisas, não só para o Brasil, como para outros países da América do Sul.

Estamos vivendo um momento, no qual o consumidor está, cada vez mais, consciente de seu direito de exigir um produto de qualidade. Este termo qualidade está aqui, sendo empregado para designar um produto final isento de resíduos tóxicos e potencialmente nocivos à saúde individual, bem como à saúde coletiva do nosso planeta. Por este motivo, temos observado a partir das últimas décadas o desenvolvimento de tecnologias que explicitamente se preocupam com a qualidade de vida global. Em relação as indústrias de alimentos, de cosméticos, farmacêutica e correlatas está sendo estimulado o estudo de tecnologias limpas, isto é, tecnologias que forneçam produtos sem resíduos tóxicos e que não produzam resíduos tóxicos. Neste sentido, as tecnologias extrativas têm sido preferidas às tecnologias que empregam síntese.

Segundo, KUBO et alii (1994) o grande número de produtos naturais apresentam relativa atividade antimicrobiana. Por outro lado eles são biodegradáveis e renováveis. A aplicação destas substâncias naturais e renováveis para produtos cosméticos tem aumentado muito o interesse. No entanto, estudos são necessários para aumentar a atividade. As bioatividades destes compostos têm

atraído considerável atenção nos últimos anos. Estas propriedades incluem: antitumor, moluiscicida, antibiótico e antiacne.

O emprego de preservativos químicos é um dos vários métodos utilizados na preservação dos alimentos da deterioração por microrganismos. Com o desenvolvimento da tecnologia de alimentos, novos aditivos alimentares estão sendo pesquisados para uso pelas indústrias de alimentos. Nos últimos anos começou a surgir um interesse no emprego de conservantes naturais não tóxicos que poderiam ser utilizados eficientemente em certos alimentos processados e não processados.

SHOBHA et alii (1992) relataram que a composição do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) varia com o método de produção . Os ácidos anacárdicos sendo termicamente instáveis, são rapidamente descarboxilados durante o processamento, de tal modo que os cardois por esta técnica passa a ser o componente majoritário. Pequenas quantidades de cardois (1%) podem ser encontrados na casca não processada de caju.

Neste trabalho serão estudados os ácidos anacárdicos, cardol, 2-metilcardol e cardanol, dando ênfase principalmente aos ácidos anacárdicos encontrados no óleo da casca da castanha de caju devido as suas amplas propriedades biológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar e caracterizar os compostos fenólicos do óleo da casca da castanha de caju de dois clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação.

2.2. Específico

1. Análise qualitativa dos compostos fenólicos do óleo da casca da castanha de caju por cromatografia em camada delgada (TLC) e cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC).

2. Separação dos ácidos anacárdicos por cromatografia em coluna e análise quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência.

3. Estudar a influência dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 e os seus respectivos estágios de maturação na concentração absoluta e na proporção relativa dos monoenos, dienos e trienos dos ácidos anacárdicos.

4. Estudar a atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Natureza química

Os ácidos anacárdicos são ácidos salicílicos substituidos na posição 6 por longas cadeias de grupos alquil saturados ou insaturados GELLERMAN & SCHLENK (1968), GELLERMAN et alii (1969). A variedade das cadeias alquil nos ácidos anacárdicos encontrado na natureza sugere uma designação semelhante a aquela comumente aceita para os ácidos graxos. São usadas as abreviações An,13:0; An,15:3 e An17:1, etc, para especificar n-tridecil, n-pentadecatrienil, n-heptadecenil, etc, como as cadeias alquil nos ácidos anacárdico individual (IZZO & DAWSON, 1949).

GELLERMAN & SCHLENK (1968) relataram que a principal fonte de ácidos anacárdico são as castanhas do caju, porém, podem também ser encontrados em folhas e castanhas da árvore de ginkgo (*Ginkgo biloba*). *Ginkgo biloba* e *Anacardium occidentale* são conhecidos por serem altamente resistentes a insetos nocivos.

Segundo SONDHI & PRUTIH (1980) a composição físico-química de uma fruta e conseqüentemente do suco extraído varia em função do cultivar, grau de amadurecimento, tamanho da fruta, colheita, sanidade da planta, pomar e localização geográfica. É interessante notar que durante o desenvolvimento do pseudofruto do caju de ambas as variedades (vermelha e amarela), havia um gradual aumento no peso, umidade, °Brix : acidez, ácido ascórbico, açúcares totais e glicose, enquanto

em geral, ocorria uma diminuição na porcentagem da acidez, polifenóis e nitrogênio. Análises quantitativas revelaram que a biossíntese do ácido ascórbico provocava uma simultânea oxidação dos polifenóis.

SHOBHA et alii (1992) verificaram que durante o desenvolvimento da casca, semente e pseudofruto do caju ocorreram mudanças na proporção relativa dos monoenos, dienos e trienos dos fenóis. Os ácidos anacárdicos saturados foram apenas detectados na casca, e o pseudofruto apresentou ao redor de 2 - 5% do total dos lipídios fenólicos, e sua proporção permaneceu constante. A proporção relativa dos ácidos anacárdicos monoenos foi alta durante a primeira semana, diminuindo durante as próximas duas semanas, enquanto que os dienos e trienos aumentaram durante o mesmo período. A proporção relativa dos ácidos anacárdicos insaturados permaneceu inalterada durante as semanas seguintes. A insaturação com a formação de duas e três duplas ligações dos ácidos carboxílicos sugere um caminho semelhante a aqueles dos ácidos graxos nas plantas. Os autores sugeriram a possibilidade de ocorrer dessaturação após formação do anel aromático ao menos no caso dos ácidos anacárdicos. Contudo, cardanol e cardol quase não foram detectados na casca, ao passo que os ácidos anacárdicos foram diferente, a proporção relativa dos dienos e trienos permaneceram constante durante o período total de crescimento. Os mesmos autores relataram que independentemente de sua importância industrial e biológica, a biogênese dos lipídios fenólicos é de grande interesse, especialmente devido ao predomínio de ácidos graxos cíclicos C_{22} e sua insaturação terminal não usual. Enquanto não há um trabalho definitivo sobre o assunto, várias possibilidades devem ser consideradas. Por exemplo, o ácido anacárdico 6-[8(Z)-pentadecenil] ácido salicílico pode ser derivado do ácido

palmitoléico por alongamento da cadeia com três unidades de malonato, seguida pela redução e formação do anel aromático. Os outros ácidos anacárdicos devem também ser derivados dos próprios ácidos graxos C_{16} insaturados, ou a desaturação da cadeia lateral deve ocorrer após a formação do anel aromático. Semelhantemente, os cardois devem originar-se por descarboxilação dos próprios ácidos hidroxianacárdicos ou a descarboxilação deve ocorrer concomitantemente com a formação do anel aromático, semelhante possibilidade existe para a formação de cardanóis. Além disso, enquanto os lipídios fenólicos são principalmente acumulados na casca, êles também tem sido detectado na semente e pedúnculo sendo também interessante determinar se estes compostos são formados em algum outro tecido em particular.

3.2. Extração

De acordo com SENGUPTA et alii (1974) os principais constituintes do óleo da casca da castanha de caju são os ácidos anacárdicos ($C_{22}H_{32}O_2$) (90%) e cardol ($C_{21}H_{32}O_2$) (10%). Durante a torração da castanha, os ácidos anacárdicos se decompõem, seguido de polimerização e condensação; o produto descarboxilado é constituido de três compostos olefínicos; um monofenol- anacardol ou cardanol (uma mistura de 3 pentadecenil e poucos fenóis saturados com C_{15} tais como ($C_6H_4OHC_{15}H_{27}$), um fenol com duas hidroxilas-derivado do resorcinol (cardol) como o constituinte principal, e uma pequena quantidade de ácido anacárdico. O óleo da casca da castanha de caju quando obtido pelo processo de extração com solvente a baixa temperatura, contém apenas ácido anacárdico e cardol.

Estudos conduzidos por TYMAN (1979) , LLOYD et alii (1980) e TYMAN et alii (1981) relataram que os principais constituintes do óleo da casca da castanha de caju são derivados do 6-pentadecil ácido salicílico (ácido anacárdico), 5-pentadecil resorcinol (cardol), 2-metil-5pentadecil resorcinol (2-metilcardol), e 3-pentadecil fenol (cardanol), os quais diferem em seu tipo de cadeias lateral com 15 átomos de carbono: saturada, monoeno, dieno e trieno. Estes constituintes, os ácidos anacárdicos, cardois, 2-metilcardol e cardanol foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Estudos realizados por TYMAN et alii (1980) demonstraram dois tipos comerciais de CNSL: (a) óleo da casca da castanha do caju obtido a quente durante a torração da castanha e (b) óleo da casca da castanha do caju obtido a frio por extração com solventes, clorofórmio, éter etílico, éter de petróleo .

De acordo com TYMAN et alii (1981) os principais componentes fenólicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) obtido por processamento industrial são os cardanois (I; R=H, n= 0, 2, 4 ou 6) e cardol (II; R= H, n=0, 2, 4 ou 6). A análise por HPLC revelou um número de componentes minoritários provavelmente consistindo de isomeros geométrico e estrutural dos principais constituintes insaturados C_{15} junto com os constituintes insaturados do C_{17} homólogo do cardanol, por meio de técnicas de hidrogenação do CNSL os principais materiais fenólicos observados foram somente (15:0)-cardanol, (17:0)-cardanol e (15:0)-cardol.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Segundo TYMAN et alii (1984) os principais componentes fenólicos do óleo da casca da castanha de caju natural são o ácido anacárdico (1; R = CO_2H, n = 0, 2, 4, 6), cardol (2; R = H, n = O, 2, 4, 6), 2-metilcardol (2; R = CH_3, n = O, 2, 4, 6) e cardanol (1; R = H, n = O, 2, 4, 6), os quais tem sido analisado quantitativamente por cromatografia gás líquido (GLC), cromatografia em camada delgada (TLC) e espectrometria de massa-TLC.

TYMAN et alii (1989) relataram que o óleo da casca da castanha de caju (CNSL) é tradicionalmente obtido pelo método a quente. Os ácidos anacárdicos, constituintes naturais do CNSL, sofrem descarboxilação quando pré-aquecidos a 200°C. A pressão obtida pelo calor rompe a parede externa da casca liberando o óleo. Devido ao grande valor comercial da amêndoa da castanha de caju, as pesquisas relacionadas com os produtos naturais do CNSL não têm recebido quase atenção. Estudos recentes demonstrando novas aplicações para o CNSL, principalmente, dos anacárdicos, tem motivado pesquisas objetivando uma forma mais eficiente de obtenção do óleo da casca da castanha de caju.

Para SHOBHA & RAVINDRANATH (1991) os cardanois são normalmente formados pela descarboxilação pelo calor dos ácidos anacárdicos, e quando se deseja apenas ácidos anacárdicos os mesmos são obtidos da casca da castanha do caju por descascamento manual ou mecanico e extração com solvente. Os mesmos autores realizaram a extração dos lipídios fenólicos do CNSL utilizando dióxido de carbono supercrítico e extração com solvente pentano. O rendimento do extrato de CNSL produzido empregando dióxido de carbono supercrítico foi somente de 60% quando comparado com outros métodos (THYMAN et alii, 1989),

porém o extrato foi menos colorido. A extração do CNSL utilizando pentano produziu cerca de 10% a mais de óleo de aproximadamente a mesma composição, embora altamente colorido. Vale salientar que um dos maiores problemas da aplicação do CNSL obtido com solvente na indústria, é a cor escura marrom do produto.

3.3. Separação

KUBO et alii (1986) estudaram a separação dos constituintes do óleo da casca da castanha de caju em uma coluna cromatográfica de silica gel (Merck; 230-400 mesh, 300g) e eluida com quantidades de 1L de n-hexano-acetato de etila-ácido acético nas proporções 90:10:1; 80:20:1 e 50:50:1 (v/v//v) sucessivamente. As frações (20ml) foram coletadas e monitoradas por cromatografia em camada delgada.

NAGABHUSHANA & RAVINDRANATH (1995) realizaram a separação dos ácidos anacárdicos do CNSL em uma coluna de silica gel 500g (100-200 mesh) preparando uma pasta com 1,5 litro de hexano contendo 30 ml de trietilamina. A mistura de 100g de CNSL, 30 ml de trietilamina, e 100ml de hexano foi transferida para a coluna. A coluna foi irrigada com uma mistura de 4 litros de acetato de etila-hexano (25:75 v/v), contendo 0,5% de trietilamina. O efluente da coluna foi concentrado em roto evaporador à vácuo produzindo 27g de fenóis, consistindo essencialmente de cardois e 2-metilcardois. A coluna foi irrigada com uma mistura de 1,5 litros de acetato de etila-hexano (25:75 v/v), contendo 1% de

ácido acético. O efluente foi concentrado como descrito acima e o produto consistiu de 70g de ácidos anacárdicos.

SHOBHA et alii (1992) realizaram a quantificação dos lipídios fenólicos nas cascas, sementes e pedúnculo utilizando HPLC, detetor UV a 280, coluna Novapak C18 (4,6x150nm) e uma fase móvel constituída de MeCN-H_2O-HOAc (80:20:1) e a velocidade de fluxo 1,8ml/minuto, e NAGABHUSHANA & RAVINDRANATH (1995) determinaram o teor dos anacárdicos na CNSL utilizando HPLC acoplado com uma coluna Novapak C18 (4mmx150mm); fase móvel acetonitrila:água 80:20 (v/v), contendo 1% de ácido acético, fluxo da fase móvel 1,8ml/minuto, detetor UV 280.

3.4. Aplicações

TANIGUCHI & SATOMURA (1972) estudaram o relacionamento entre a estrutura e a atividade fisiológica de alguns compostos carbostyril e revelaram que os derivados 3-hydroxycarbostyril apresentam atividade antimicrobiana, e a metilação ou carboximetilação dos grupos hidroxilas ocasionam perda da atividade antimicrobiana. Enquanto que os grupos fenóis substituidos na posição-4 aumentam tais atividades.

De acordo com HAMADA & SLADE (1980) cáries dentárias são uma das mais freqüentes doenças infecciosas nos países em desenvolvimento. Os elementos que influenciam a cárie dentária incluem o estado nutricional, a ingestão de açúcar e a presença da microflora cariogênica, são fatores que contribuem para

esta doença. Recentes estudos têm concluído que o *Streptococcus mutans* é o microrganismo responsável pela cárie dentária. Esta bactéria adere firmemente a superfície lisa do esmalte do dente facilitando o acúmulo de outros microrganismos orais. O *Streptococcus mutans* é a bactéria predominante na placa dentária, associada ao acúmulo de outros microrganismos acarreta a formação de ácidos orgânicos, tais como ácido lático, que gradualmente destrói o esmalte do dente, levando a uma abertura susceptível a degradação por bactérias, formando então um orifício. Teoricamente a cárie dentária pode ser prevenida eliminando o *Streptococcus mutans.*

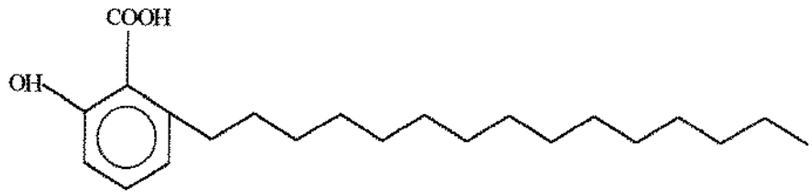
ASHOOR & KNOX (1982), AYAZ & KADROGLU (1997) relataram que fenóis não voláteis e ácidos orgânicos têm sido largamente estudados em frutas. Os ácidos fenólicos e seus derivados são amplamente distribuídos em plantas. A concentração destes compostos nas plantas varia acentuadamente, principalmente devido a fatores tais como: germinação, período do ano, secagem e processamento. Estes compostos têm apresentado um papel muito importante no escurecimento do tecido das plantas, flavor e cor característica dos frutos e produtos derivados, e possivelmente influenciam as propriedades toxicológicas, nutricionais, sensoriais e antioxidante.

De acordo com JOHSON & CORT (1985) e WURTZEN et alii (1986), os antioxidantes mais comumente utilizados BHA e BHT previnem a rancidez de produtos contendo lipídios e também apresentam atividade antimicrobiana. Estas substâncias químicas sintéticas convertem alguns materiais ingeridos em substâncias tóxicas ou carcinógenos pelo aumento das enzimas microssomais. Portanto,

conservantes alternativos naturais que apresentam atividade antimicrobiana são necessários, tendo em vista não estarem associados a problemas de saúde durante o manuseio e ao consumidor.

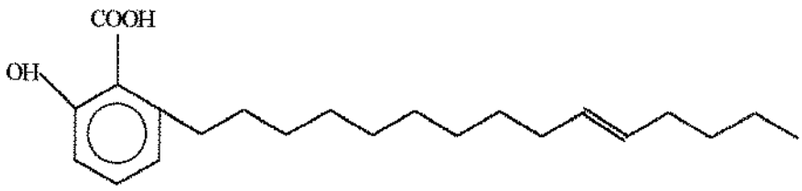
Segundo DZIEZAK (1986) o problema da conservação de alimentos é muito complexo tendo em vista que freqüentemente estão sendo lançado no mercado novos produtos alimentícios, necessitando para isso um aumento na vida-de-prateleira desses produtos e uma segurança quanto a deterioração microbiana. Diferentes substâncias químicas podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos. Por exemplo, ácido acético e dióxido de enxofre são largamente empregadas na preservação dos alimentos. Contudo, essas substâncias requerem muito cuidado no manuseio desde que êles são corrosivos e seus vapores podem irritar os olhos e o trato respiratório.

YAMAGIWA et alii (1987) relataram que o extrato aquoso da raiz de *Ozoroa mucronata* (Anacardiaceae) é utilizado na medicina caseira como agente abortivo espontâneo. Esses pesquisadores informaram que essa planta também pode ser utilizada para cura de gonorréia, diarréia, parasitas intestinais e problemas estomacais. Foi também relatado que a porção solúvel em cloreto de metileno do extrato metanólico da raiz inibe a síntese de prostaglandina. As estruturas dos compostos bioativos foram demonstradas ser os ácidos anacárdicos 1 e 2, ilustrados abaixo. O ácido anacárdico 1 é também encontrado no óleo da casca da castanha de caju.



1

(6-pentadecil) ácido salicílico



2

6-(10-pentadecenil) ácido salicílico

Segundo SAKANAKA et alii (1989) o chá é uma das bebidas mais consumidas em todo mundo, e isto é atribuido ao seu sabor agradável, combinado com seus efeitos estimulantes. Existem muitos tipos de chá, incluindo chá verde, chá preto. Todos eles são preparados basicamente da mesma planta, *Camellia sinensis* L, (Theaceae) e suas variedades, por diferentes processos de manufatura. Tem sido dito que aquelas pessoas que continuamente bebem grande quantidade de chá verde não têm problema de cárie dentária. Os princípios ativos não foram ainda totalmente definidos, embora que vários compostos polifenólicos polares encontrados no chá verde tenham sido relatados a princípios antibacterianos moderados contra *Streptococcus mutans*, esta que é uma das bactérias responsáveis pela cárie dentária.

BEAN et alii (1990) relataram que por vários anos os alimentos contaminados com bactérias patogênicas e suas toxinas ocasionaram enfermidades, sendo este fato um assunto de vital importância para a saúde pública. Portanto, controlando os patógenos seria possível reduzir a contaminação dos alimentos e proporcionar ao consumidor um alimento mais saudável, e o abastecimento de produtos alimentícios mais nutritivos.

De acordo com GRAZZINI et alii (1991) o gerânio (*Pelargonium xhortorum*) é naturalmente resistente a muitos artropodes e pragas. O mecanismo de resistência envolve a produção de ácidos anacárdicos pelas glândulas presentes sobre a epiderme do gerânio. O ácido anacárdico C22:1 ϖ5 foi encontrado ser um bom inibidor de lipoxigenase e da síntese de prostaglandina em ovino. A prostaglandinas têm um papel importante na reprodução dos insetos (KUBO et alii, 1987).

KUO et alii (1991) relataram que a raiz de *Rhus semialata* variedade roxburghii encontrada em Taiwan foi utilizada para o tratamento de convulsão, reumatismo e úlcera peptica. O extrato etílico da planta foi relatado possuir atividade antiúlcera. Mais recentemente, foi isolado da porção da folha o ácido anacárdico 6-pentadecil ácido salicílico o qual apresentou atividade antitrombina.

De acordo com HIMEJIMA & KUBO (1992) na grande maioria dos casos pode-se controlar muitos microrganismos patogênicos para os seres humanos e animais através da utilização de antibióticos que se encontram disponíveis. Contudo, a necessidade por novos antibióticos já existe. Um número elevado de

fitoterápicos tem sido isolados e demonstrado apresentar princípios antifúngicos. Por outro lado a atividade antimicrobiana destes fitoterápicos não é potente o bastante para usos práticos. Necessário se faz que seja realizado a combinação de dois ou mais fitoterápicos para aumentar a atividade biológica total, portanto, este procedimento parece ser a mais promissora estratégia para resolver este problema. Recentemente, um bicíclico dialdeido sesquiterpeno, poligodial, isolado de fontes como de plantas aumentou a atividade de vários antibióticos tais como actinomicina D e rifampicina, contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*.

KUBO et alii (1992) relataram que seis diterpenóides isolados da casca de *Podocarpus nagi* (Thunberg) Pilger (Podocarpaceae) tem sido testado contra vários microrganismos. O totarol o mais abundante composto entre os seis diterpenóides exibiu potente atividade bactericida apenas contra bactéria Gram-positiva, entre as quais o *Propionibacterium acnes* foi a bactéria mais sensível. O totarol também mostrou atividade antimicrobiana em estudos preliminares contra *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Embora um grande número de fitoquímicos tem demonstrado apresentar atividade bactericida contra bactérias Gram-positiva, somente poucos apresentam atividade contra *Staphylococcus aureus*.

KUBO et alii (1993) compararam os ácidos anacárdicos 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienil]ácido salicílico, 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienil]ácido salicílico, 6-[8(Z)-pentadecenil]ácido salicílico e 6-n- pentadecil ácido salicílico com o ácido salicílico, e verificaram que a adição de uma cadeia lateral não isoprenóide com 15 átomos de carbono proporcionou uma dramática mudança na atividade

antimicrobiana dos ácidos anacárdicos. Assim, o ácido salicílico o qual não possui uma cadeia lateral alquil exibiu fraca, porém ampla atividade antimicrobiana. Em outras palavras, a atividade antimicrobiana do ácido salicílico não é potente para ser utilizada exclusivamente para controlar microganismos específicos (tais como aqueles que causam cárie dentária ou acne), porém, é ampla para ser empregada na preservação dos cosméticos. Ao contrário, os ácidos anacárdicos exibiram geralmente um espectro de atividade contra principalmente bactérias Gram positivas, de maneira que esta atividade foi dramaticamente superior quando comparada com ácido salicílico. Por exemplo, as atividades dos ácido anacárdico 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienil]ácido salicílico contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* foram 2048 e 64 vezes, respectivamente, mais efetiva do que o ácido salicílico. Portanto, parece que a cadeia lateral alquil desempenha um papel importante em aumentar a atividade antimicrobiana.

KUBO et alii (1993) relataram que muitos tumores podem ser controlados através dos agentes antitumor existentes, contudo, exixte a necessidade de novos agentes antitumorais, especialmente, contra tumores sólidos. Os efeitos colaterais de muitos agentes antitumor são os maiores problemas que necessitam ser minimizados. Portanto, as plantas comestíveis podem ser uma boa fonte de novos agentes antitumor. Testes preliminares realizados demonstraram que o suco de caju mostrou (ED_{50} <20 μg/ml) in vitro contra BT-20 células cancerosas na mama. Os princípios ativos das bebidas tais como suco de caju podem ser superiores aos agentes antitumor quando comparado a muitos produtos naturais. Os compostos ativos foram identificados como ácidos anacárdicos, mais especificamente, 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienyl]ácido salicílico, 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienyl]ácido salicílico, 6-

[8(Z)-pentadecenyl]ácido salicílico. Estes compostos fenólicos com cadeia lateral alquil não isoprenóide foram isolados do óleo da casca da castanha de caju juntamente com outros compostos fenólicos semelhantes, tais como: cardol, 2-metilcardol e cardanol, que apresentam propriedade moluscicida, inibidores da sintese de prostaglandina e atividade antimicrobiana.

MUROI & KUBO (1993) revelaram em sua contínua procura por agentes microbianos de plantas comestíveis, condimentos alimentares e bebidas, relataram a atividade antibacteriana de 16 compostos fenólicos, os quais têm uma cadeia lateral alquil com 15 átomos de carbono não isoprenóide com zero a três duplas ligações, isolados do óleo da casca da castanha de caju *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). A maioria deles exibiram potente atividade antibacteriana contra principalmente bactérias Gram-positiva, entre as quais o *Streptococcus mutans* foi a bactéria mais sensível. Curiosamente, foi verificado que os compostos fenólicos 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienil]ácido salicílico, 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienil]ácido salicílico e 6-[8(Z)-pentadecenil]ácido salicílico, isolados do óleo da casca da castanha de caju conhecidos como ácidos anacárdico, foram também encontrados no pedúnculo do caju, os quais têm sido continuamente consumidos por muitas pessoas. Os princípios ativos destes compostos isolados do suco de caju devem ser superiores aos agentes anticáries provenientes de produtos não naturais, além de que produtos sintéticos possuem um risco potencial de efeitos colaterais indesejáveis.

De acordo com KUBO et alii (1994) os ácidos anacárdicos isolados do caju, pseudofruto, semente e óleo da casca; β-cariofileno, δ-cadineno identificado no

chá verde, e totarol isolado da casca do *Podocarpus nagi,* mostraram potente atividade contra *Propionibacterium acnes*. Além disso, eles são todos biodegradáveis e renováveis. A aplicação destas substancias naturais renováveis para produtos cosméticos tem apresentado um grande interesse, e estudo para aumentar a atividade é necessário. Portanto, combinando dois ou mais compostos parece ser uma boa estratégia para tornar a atividade destes compostos mais elevada.

SHOBHA et alii (1994) verificaram que entre vários compostos testados o ácido anacárdico 8'Z-pentadecenil foi o mais potente, apresentando um valor de IC_{50} de 50 μM. O cardol pentadecil e o cardanol pentadecil saturados foram inefetivos, enquanto que os outros foram de potência intermediária. No caso dos cardois e cardanóis, a potência de inibição aumentou com a insaturação na cadeia lateral alquil.

Para KUBO et alii (1994) a tirosinase é uma das mais importantes classes de enzimas no processo de metamorfose dos insetos e investigar seus inibidores deve ser importante para descobrir agentes alternativos que controlem o metabolismo nos insetos. Os inibidores de tirosinase são também importantes para produtos cosméticos em relação a hiperpigmentação. Portanto, os inibidores de tirosinase também controlam a produção do pigmento melanina na pele, uma vez que a tirosinase tem um papel importante no processo de biossíntese de melanina. Além disso, distúrbios na quantidade e distribuição da formação de melanina podem ser um indício de doenças sistêmicas. Estudos preliminares com o óleo da casca da castanha de caju obtido pela extração com metanol, foi demonstrado ter uma potente

atividade inibitória da tirosinase com um ID_{50} de 180 μg/ml. Entre os compostos testados, o cardol 5-[8(Z), 11(Z), 14-pentadecatrienil]resorcinol exibiu a mais potente atividade inibitória de tirosinase, com um ID_{50} de 0,04mM, enquanto o ácido anacárdico 6-[8(Z)-pentadecenil] ácido salicílico, apresentou a menor potência, com um ID_{50} de 7,5 mM. No caso dos inibidores da atividade de tirosinase a modificação no número de duplas ligação na cadeia lateral do ácido anacárdico como por exemplo 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienyl]ácido salicílico parece não afetar a atividade biológica. Como foi mencionado acima os cardois exibem potente atividade inibitória de tirosinase, contudo êles ainda não podem ser considerados para aplicação prática tendo em vista ocasionarem irritação na pele.

Para KIM et alii (1995) e SIVROPOULOU et alii (1995) agentes antimicrobianos, incluindo conservantes de alimentos e ácidos orgânicos, têm sido utilizados para inibir as bactérias que contaminam os alimentos de recém-nascidos e estender a vida-de-prateleira dos alimentos processados. Muitos dos compostos são encontrados naturalmente em plantas comestíveis e plantas com propriedades medicinais, ervas, e muitas espécies têm demonstrado possuir funções antimicrobiana, podendo serem empregadas como fontes de agentes antimicrobianos contra patógenos contaminantes dos alimentos. Vários compostos fenólicos e suas sub-classes, tais como cumarinas, flavonóides, e óleos essenciais, têm função antimicrobiana. Óleos essenciais e seus constituintes são utilizados largamente como flavorizantes em um grande número de alimentos, bebidas, produtos de confeitaria, possuindo numerosas aplicações, incluindo em pastas dentárias.

Segundo EJECHI (1996) *Mansonia altisima* Timber Sawdust é resistente ao ataque de insetos e fungos devido a presença de materiais não estruturais que são solúveis em água e solventes neutros conhecidos como extratos. Esses extratos contêm compostos fenólicos (resinas, taninos, alcalóides e terpenos) e os fenóis têm demonstrado grande importância na resistência das plantas a doenças. Os extratos obtidos das serragens dessas madeiras podem ser usualmente aproveitados como fonte de materiais renováveis para formulação de desinfetantes. As pesquisas demonstraram que podem ser utilizados como agentes antibacterianos.

LI et alii (1997), CAI, & WU (1996) demonstraram que vários compostos que apresentam atividade antimicrobiana contra patógenos oral foram isolados e identificados de plantas tradicionalmente usadas como medicamento oral. A planta nativa da América *Ceanothus americanus* Linn., comumente conhecida como "red root" ou "New Jersey tea", tem atraído muita atenção. Estudos químicos do *C. americanus* tem conduzido ao isolamento de alcaloides, três triterpenos (ácido ceanotico, 27-hidroxi ácido ceanótico e ácido ceanotétrico) e dois flavonoides (maesopsin e measopsin-6-0-glucoside) foram identificados. Ácido ceanótico e ácido ceanotétrico demonstraram efeito inibitório contra *Streptococcus mutans.*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - MATERIAIS

4.1.1 - Reagentes e materiais específicos

- Reagentes químicos

* Acetato de etila, clorofórmio, éter etílico, hexano, álcool etílico, acetonitrila, tetrahidrofurano, trietilamina, ácido fórmico, ácido acético, sulfato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido cítrico, diazometano (Reagen, Merk ou Ecibra).

- Materiais específicos

* Silicagel G 60 (Merck) para cromatografia em camada delgada (TLC).
* Silicagel 60 partícula de 0,2 a 0,5MM (Merck) para cromatografia em coluna aberta.
* Silicagel 60 F254 (Merck) cromatoplacas HPTLC para nanocromatografia, de 10 x 10 cm.
* Coluna Nova-Pak C18 (4mm x 300mm) para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
* Cilindro de nitrogênio.

- Outros materiais

* Papel Whatman n° 5 (5 x 1 mm)
* Filtros Millipore 0,45 mm
* Membrana de filtração
* Cuba de vidro
* Dessecador
* Secador de cabelo
* Placa de Petri
* Tubos de ensaio com rosca

- Meios de Cultura

* Brain Heart Infusion
* Brain Heart Infusion Agar
* YMA (Yeast-Malt Extract Agar): Extrato de levedura 3,0 g; Extrato de malte 3,0 g; Bacto peptona 5,0g; Dextrose 10,0g; Ágar 20,0g, para 1L
* Extrato de malte
* Ágar

4.1.2 - EQUIPAMENTOS

* Balança analítica Mettler, modelo H-10
* Balança eletrônica digital ACATEC BEC 1000
* Medidor de pH Digimed DMPH-2
* Evaporador rotativo, Tecnal, TE 130
* Espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70
* Estufa bacteriológica Fanem
* Jarra microaerofilia
* Estufa de esterilização Fanem
* Sonicador (Labsonic Systems)
* Cromatógrafo Waters 600-E Power Line com detector Waters 484 ultravioleta e integrador ao processador Data Modulo Waters, mod. 746.
* Agitador de tubos, mod. AT 56 - Phoenix
* Espectrofotômetro de massa marca HP modelo HP 5890 com detector de massa MSD 5979
* Bomba à vácuo
* Capela
* Autoclave Fanem

4.2 - MÉTODOS

4.2.1. Estudos preliminares para seleção da parte do fruto inteiro com maior teor de ácido anacárdico e escolha dos solventes para eluição.

4.2.1.1. Extração dos compostos fenólicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju adquiridos no Ceasa, Campinas-SP.

Analisou-se uma amostra de caju maduro inteiro constituída de casca, semente e pedúnculo, provenientes da Ceasa Campinas-SP. Amostras de 100g de casca, de semente e de pedúnculo de caju foram pesados em balança semi-amalítica, triturados manualmente com auxílio de faca e um grau e, em seguida, transferidas separadamente para frascos de Erlenmeyer de 500 ml. Adicionou-se 200 ml de éter etílico o suficiente para cobrir as amostras de casca, sementes e pedúnculo e a extração foi realizada durante (4 x 5 horas), de acordo com (SHOBHA et alii, 1992); (SHOBHA & RAVINDRANATH, 1991), com algumas modificações. As amostras foram filtradas em papel de filtro, adicionou-se sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo à temperatura de 23-24°C para concentração das amostras do óleo da casca, semente e pedúnculo do caju. O extrato lipídico obtido denominou-se extrato etílico do óleo da casca, semente e pedúnculo do caju, em seguida, esses extratos foram acondicionados em vidros âmbar com tampa de rosca e envoltos em parafilme e papel alumínio e armazenados em freezer.

A Figura 4 ilustra o fluxograma de extração, purificação, análise qualitativa, quantitativa, cromatografia gasosa, espectrometria de massas e análise da atividade antimicrobiana.

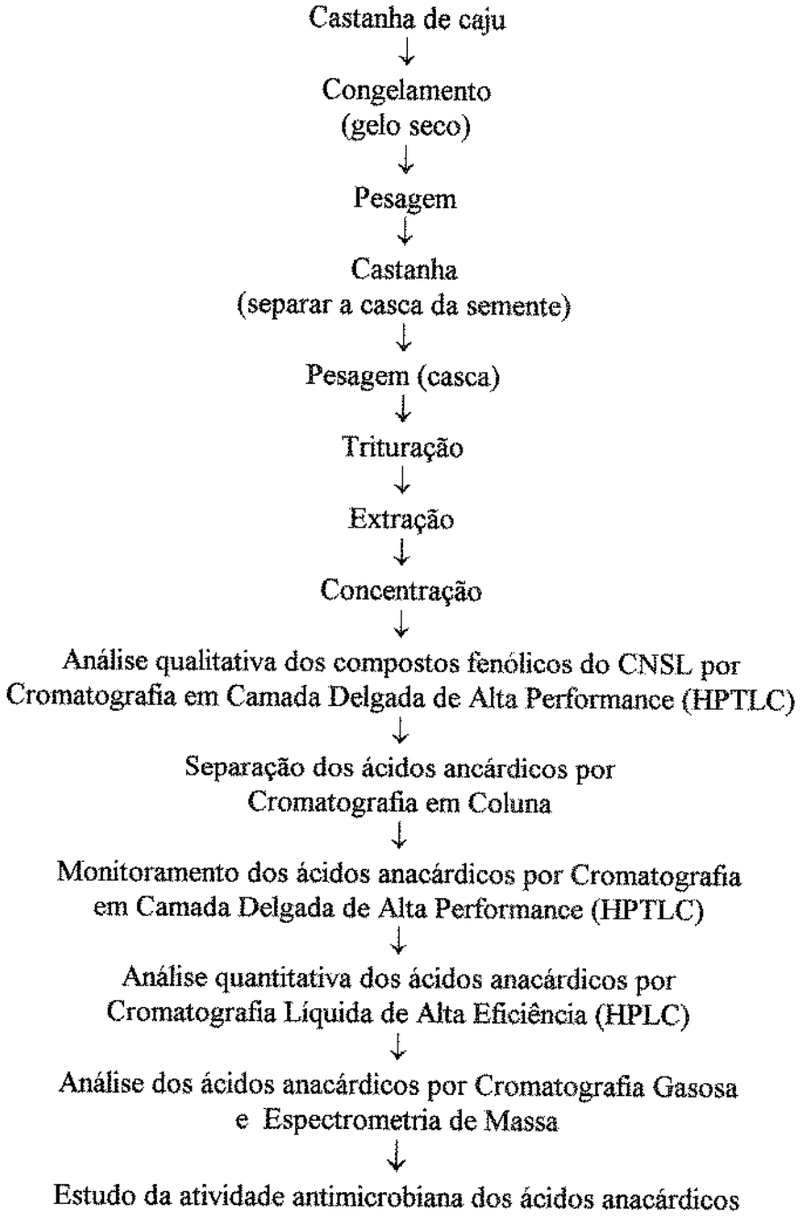


Figura 4. Fluxograma de extração e análise qualitativa e quantitativa dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL).

4.2.1.2. Cromatografia em camada delgada (TLC) dos extratos etílicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju, da Ceasa Campinas-SP

A cromatografia em camada delgada dos extratos etílicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju foi realizada preparando-se placas de sílica gel G-60 . A mistura de 90 ml de água destilada e 45g de silica gel foi aplicada em placas de vidro 20 x 20 cm com aplicador Desaga, de acordo com especificações de TYMAN et alii (1989). As placas foram aquecidas a 120°C por 1 - 2 horas para ativação antes de serem utilizadas.

Foram aplicadas alíquotas de 4µl dos extratos etílicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju, obtidos de acordo com o ítem 4.2.1.1. O sistema de solventes (fase móvel) utilizado para a cromatografia foi constituído de: clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (95:5:2, v/v/v). O tempo de desenvolvimento da cromatografia foi de aproximadamente 1 hora e 10 minutos e realizado à temperatura de 25°C.

A revelação do cromatograma foi realizada incubando-se a placa de cromatografia em câmara de iodo sublimado, a 110°C por 1 hora ALEJANDRO (1975).

4.2.1.3. Obtenção do extrato etílico do óleo da casca, semente, pedúnculo de caju de Valinhos-SP, e sucos industrializados de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2)

Amostras de 100 gramas de casca, semente, pedúnculo e sucos de caju industrializados de duas marcas comerciais foram pesados em balança semi-analítica, e depois transferidas para Erlenmeyers de 500ml. Em seguida, as cascas, sementes e pedúnculo foram manualmente trituradas a temperatura ambiente, adicionou-se alíquotas de 200 ml de éter etílico (Merck), e foram feitas 4 extrações com intervalos de 5 horas, de acordo com SHOBHA et alii (1992) e SHOBHA & RAVINDRANATH (1991) com algumas modificações no intervalo de tempo de extração e solvente utilizado. As etapas seguintes foram idênticas as descritas no ítem 4.2.1.2.

4.2.1.4. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca, semente, pedúnculo de caju de Valinhos-SP e suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2)

A cromatografia em camada delgada de alta performance dos extratos etílicos dos óleos da casca, semente, pedúnculo de caju e sucos de caju de duas marcas comerciais foi realizada de acordo com especificações de TYMAN et alii

(1989) . Alíquotas de 4 microlitros dos extratos etílicos, obtidas de acordo com o ítem 4.2.1.3. foram aplicadas em placas de 10 x 10cm de silica gel 60 F_{254} (Merck-Art. 1.05628). O sistema de solventes (fase móvel) utilizado para eluição foi clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (95:5:2, v/v/v) à temperatura de 25°C. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi aproximadamente 40 minutos. As placas desenvolvidas foram observadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda 254 nm, utilizando-se iluminador U.V. Cole Parmer, modelo UVP UVGL-58.

4.2.1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos dos extratos etílicos do suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2)

A análise quantitativa dos ácidos anacárdicos foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de acordo com SHOBHA & RAVINDRANATH (1991) e NAGABHUSHANNA & RAVINDRANATH (1995), em cromatógrafo líquido Waters 600-E acoplado com um detector U.V. 484 operando a 280 nm, equipado com coluna Nova-Pak C18 (3,9 x 300mm), Fase Reversa, nas seguintes condições: fluxo de 1,3 ml/min; pressão 1200 a 1300 psi, temperatura de 35°C, utilizando-se como eluente acetonitrila:água (80:20 v/v/) e 1% de ácido acético. As amostras e padrões antes de serem injetados no cromatógrafo foram filtrados em membrana millipore, com porosidade de 0,45µm.

4.2.2. Coleta das amostras de castanhas de cajueiro-anão-precoce *Anacardium occidentale*

As amostras de castanha de cajueiro-anão-precoce foram obtidas da EMBRAPA/CNPAT, Fortaleza-Ceará, através de experimentos conduzidos na Fazenda Maisa localizada em Mossoró, no Estado do Rio Grande do Norte, em pomares comerciais de cajueiro-anão-precoce, plantados em agosto de 1991. O solo da área classifica-se como Latossolo Vermelho-amarelo, textura arenosa. Os clones de cajueiro-anão-precoce de Pacajus (CCP) selecionados foram (CCP-76 e CCP-09). Foram coletadas amostras de castanha de caju inteiras em cinco estágios de maturação, da mesma planta, de acordo com o número de dias após a fecundação da flor, o primeiro estágio foi coletado com doze dias e os estágios seguintes foram coletados com intervalos de doze dias até o sexagésimo dia, quando o fruto, a castanha, completa o amadurecimento (E_1=12; E_2=24; E_3=36; E_4=48 e E_5=60) ALMEIDA et alii (1987).

Dados sobre as características dos clones de cajueiro-anão-precoce como coloração do pseudofruto, peso médio da castanha e produção média de castanha (kg/ha/ano) estão apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 apresenta algumas características de plantio, produção do cajueiro-anão-precoce e do cajueiro comum.

Tabela 1. Características da coloração do pseudofruto, peso médio da castanha e produção média de castanha dos clones de cajueiro-anão-precoce provenientes de Mossoró, do Estado do Rio Grande do Norte.

Clones	Coloração do pseudofruto	Peso médio da castanha (g)	Produção média de castanha (kg/ha/ano)				
			1°	2°	3°	4°	5°
CCP-76	Avermelhada	9,0	31	163	306	307	571
CCP-09	Amarelada	8,5	51	184	367	367	712

Fonte: EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical -CNPAT

Tabela 2. Características do plantio, cultivo e produção do cajueiro-anão-precoce e do cajueiro comum.

Características	cajueiro-anão-precoce	cajueiro-comum
Início da produção	1° ano	3° ano
Produção econômica	3° ano em diante	8° ano em diante
Período de floração	10 meses (maio a fev)	6 meses (julho a dez)
Período de frutificação	7 meses (julho a janeiro)	5 meses (setembro a jan)
Altura da planta	até 6 metros	até 14 metros
Envergadura da planta	8 a 10 metros	13 a 16 metros
Estabilidade da produção	7 anos	12 anos
Produtividade de castanha na estabilização	1300kg/ha	250kg/ha
Densidade de árvores por hectare	178 a 416	44 a 178
Potencialidade de uso	fruticultura	reflorestamento
Colheita e tratos culturais	fácil	difícil

Dados referentes à planta matriz do cajueiro-anão-precoce de pé franco com trinta anos de idade.
Fonte: EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical - CNPAT

4.2.3 Tratamento das amostras de castanha de cajueiro-anão-precoce

As amostras de castanha de caju inteiras foram limpas, retirando-se qualquer tipo de material estranho. Posteriormente, foram pesados aproximadamente 2,0 kg dos clones de castanha de caju CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação. As amostras de castanha de caju foram acondicionadas em sacos plásticos limpos, inertes e imediatamente congeladas em gelo seco. As amostras após congelamento foram armazenadas em freezer.

4.2.4. Obtenção dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum

Para cada amostra, constituída de cascas da castanha de caju, sem semente, e pedúnculo, escolhidas aleatoriamente, foram pesados em balança semi-analítica, 100g de casca dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum. Em seguida, foram transferidas para Erlenmeyers de 500 ml e exaustivamente extraídas com éter etílico (Merck) (4 x 5 horas), com intervalos de 5 horas, pelo método de SHOBHA et alii (1992) com algumas modificações, não suspensão do resíduo em pentano e adição de sulfato de sódio anidro para retirada de água residual. Após extração foi realizada a filtração do extrato lipídico em papel de filtro. Posteriormente, as amostras de óleo da casca

da castanha de caju, foram concentradas em roto-evaporador à temperatura de 23-24°C. O extrato lipídico obtido do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) foi armazenado em frasco de vidro âmbar, com tampa de rosca, vedados com filme impermeável e enrolados em papel alumínio para ser utilizado em diferentes análises.

4.2.5. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca das castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum

Quatro microlitros dos extratos etílicos obtidos de acordo com o ítem 4.2.4 foram aplicados em cromatoplacas de silica gel 60 F_{254} 10 x 10 cm. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 40 minutos, foi utilizado como sistema de solvente clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (95:5:2 v/v/v). Após desenvolvimento as placas foram observadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm, utilizando-se iluminador U.V. Cole Parmer, modelo UVP UVGL-58.

Após análise dos resultados obtidos quanto aos ácidos anacárdicos totais por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance, foram selecionadas

as amostras de castanhas de caju com maiores teores de ácidos anacárdicos para serem analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

4.2.6. Análise do peso médio das castanhas de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação

Amostras dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação coletados na fazenda Maísa na Cidade de Mossoró do Estado do Rio Grande do Norte, previamente selecionadas foram analisadas com relação ao comprimento, largura e altura com auxílio de um paquímetro, em seguida, foram separados aleatoriamente dez castanhas de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em seus respectivos estágios de maturação e pesados em balança semi-analítica.

4.2.7. Cromatografia em Coluna de sílica gel 60 do óleo da casca da castanha de caju para obtenção do padrão ácido anacárdico

Amostras de 5,0g de óleo da casca da castanha de caju bruta foram pesadas em balança semi-analítica e transferidas para uma coluna cromatográfica de 40cm de comprimento por 3,0cm de diâmetro interno contendo 50g de sílica gel 60 (0,2 a 0,5mm, Merck) como adsorvente. Inicialmente, o adsorvente foi submetido a

um pré-tratamento com hexano e trietilamina. Utilizou-se a seguinte sequência de eluição para separação dos compostos fenólicos na coluna cromatográfica: Fração 1 (F_1): cardol - eluída com acetato de etila e hexano (25:75 v/v). Fração 2 (F_2): ácido anacárdico - eluída com acetato de etila e hexano (25:75 v/v) e 1% de ácido acético de acordo com especificações de NAGABHUSHANA & RAVINDRANATH (1995). Este procedimento foi realizado por três vêzes a fim de obter-se o máximo de pureza. Posteriormente, a fração (F_2), foi concentrada em roto-evaporador à temperatura de 23-24°C. Em seguida, com auxílio de um pequeno volume de hexano, a fração (F_2), concentrada foi transferida para um frasco âmbar. O solvente foi parcialmente evaporado pela passagem de nitrogênio a um mínimo volume possível (mais ou menos 6,0ml). O extrato obtido, denominado padrão ácido anacárdico foi armazenado em frasco de vidro âmbar, vedado com filme impermeável e enrolado com papel alumínio.

O monitoramento da fração (F_2) foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance de sílica gel 60 F_{254} ativada a 120°C por 60 minutos. Alíquotas de 4µl (F_{2a}) e 8µl da (F_{2b}) foram aplicados em placas de sílica gel 60 F_{254}. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 50 minutos, utilizando-se como sistema solvente clorofórmio:acetato de etila: ácido fórmico (95:5:2 v\v\v). As placas desenvolvidas foram observadas na luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm, utilizando-se iluminador U.V.

Após análise dos resultados por HPTLC, a fração (F_2), correspondente aos ácidos anacárdicos, foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

4.2.8. Obtenção dos extratos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação utilizando diferentes solventes

Amostras de 100 gramas de cascas de castanha de caju dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação de acordo com as Figuras 5 e 6 foram pesadas em balança semi analítica, e transferidas para Erlenmeyers de 500 ml. Em seguida, foram adicionados 200 ml dos solventes (éter etílico, pentano e hexano) (Merck), e realizada a extração das amostras com cada um desses solventes durante (4 x 5 horas), com intervalos de 5 horas, pelo método de SHOBHA et alii (1992). Os passos a seguir foram os mesmos daqueles descritos no ítem 4.2.4.

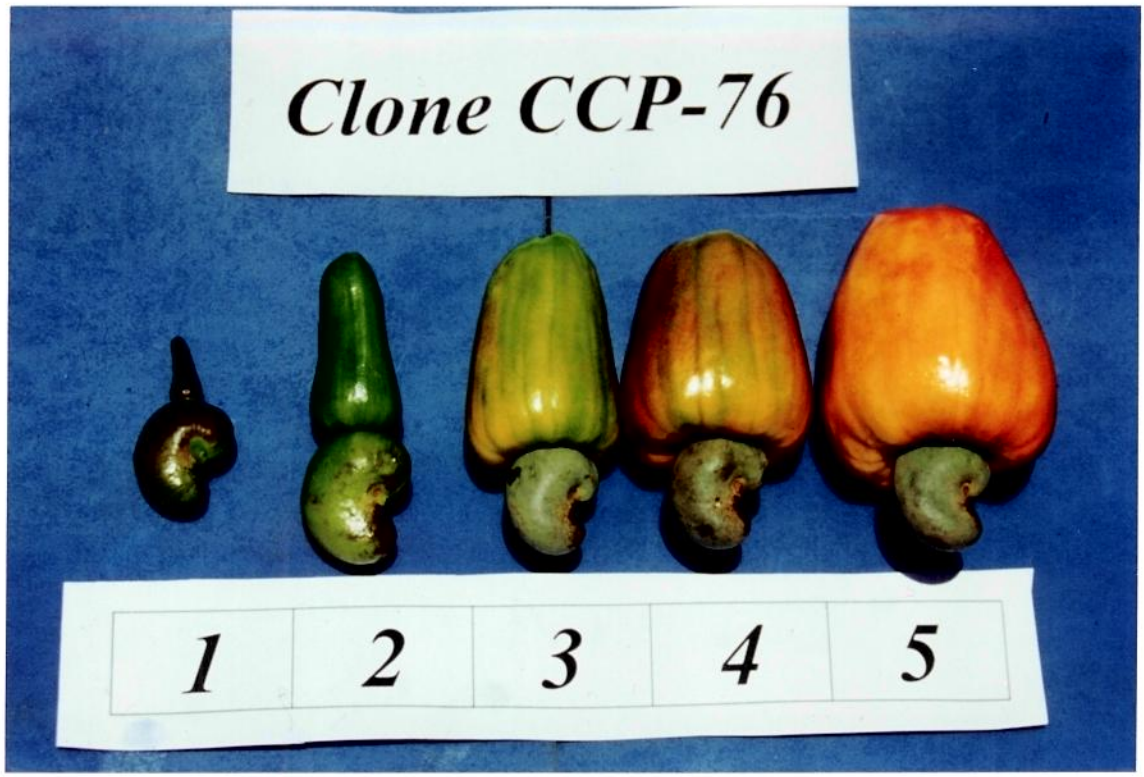


Figura 5. Estágios de maturação do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76.

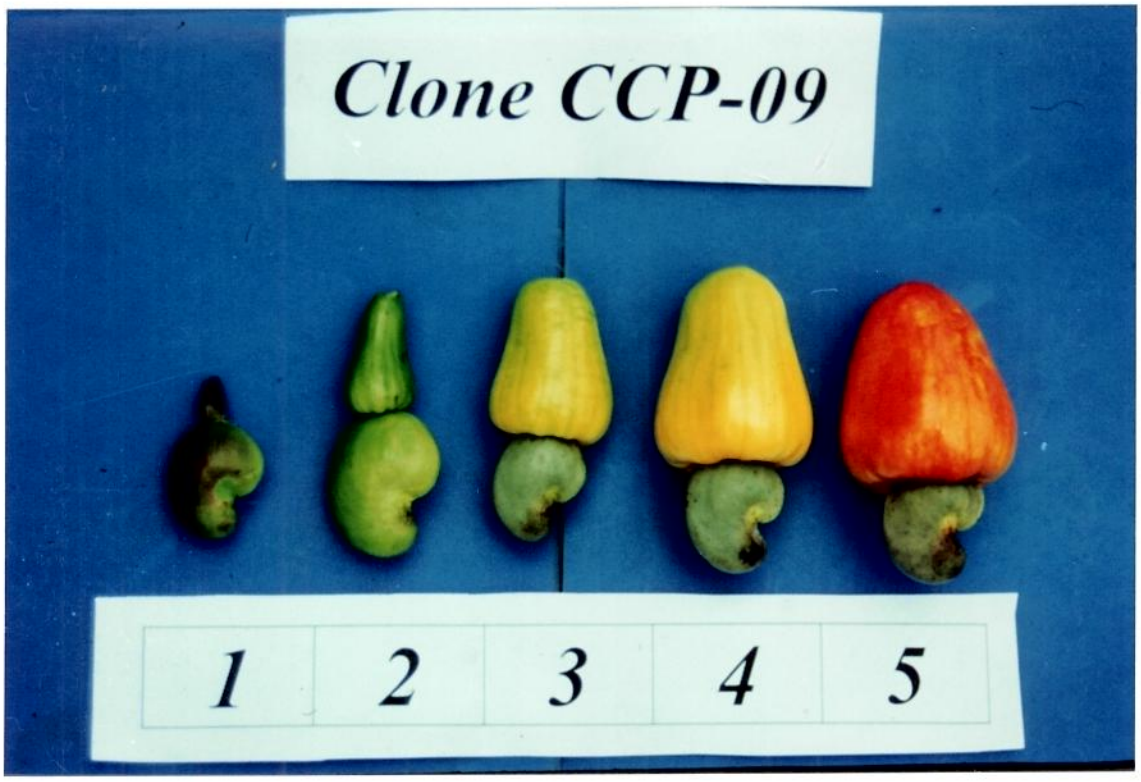


Figura 6. Estágios de maturação do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09.

4.2.9. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação

Quatro microlitros dos extratos etílicos brutos do CNSL obtidos de acordo com o ítem 4.2.8. foram aplicados em cromatoplacas de silica gel 60 F_{254} 10 x 10 cm. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 50 minutos, utilizando-se como sistema de solvente clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (95:5:2 v/v/v). Após desenvolvimento as placas foram observadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm, utilizando-se iluminador U.V.

4.2.10. Cromatografia Preparativa dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação

Quatrocentos microlitros dos extratos etílicos brutos obtidos de acordo com o ítem 4.2.8. foram aplicados em placas de silica gel 60 de 45g de silica gel e 90 ml de água destilada para Cromatografia em Camada Delgada. A mistura foi aplicada em placas de vidro 20 x 20 cm com aplicador Desaga. As placas foram aquecidas a 120°C por 1 - 2 horas. Foi utilizado o sistema eluente clorofórmio:acetato de etila: ácido fórmico (95:5:2 v/v/v) TYMAN et alii (1989). Ao término do desenvolvimento, as manchas azúis fortes visualizadas

correspondentes aos ácidos anacárdicos foram assinaladas com uma espátula, e em seguida, raspadas e o pó recolhido em papel celofane. O adsorvente raspado foi colocado em um frasco de vidro e o ácido anacárdico foi extraido com o solvente hexano:acetato de etila:ácido ácetico (75:25:1 v/v/v).

4.2.11. Cromatografia em Coluna dos ácidos anacárdicos dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação

A alíquota de 4,5 ml dos ácidos anacárdicos obtida de acordo com o ítem 4.2.10 foi transferida para um tubo cromatográfico de 40 cm de comprimento por 3,0 cm de diâmetro interno contendo 25g de silica gel 60 (0,2 a 0,5mm, Merck) como adsorvente, de acordo com especificações de NAGABHUSHANA & RAVINDRANATH (1995).

O adsorvente inicialmente foi submetido a um pré-tratamento que consistiu na adição de hexano para obtenção de uma pasta. A relação exata entre o peso do adsorvente e os volumes de solventes não foi fixa, a mistura devia ser de tal ordem, a permitir a fácil transferência para a coluna cromatográfica. Após o empacotamento, a altura total do leito foi de aproximadamente 12cm.

Utilizou-se a seguinte sequência de eluição na coluna cromatográfica: Fração 1- (F_1): eluída com acetato de etila e hexano (25:75, v/v). Fração 2- (F_2):

ácido anacárdico - eluída com acetato de etila e hexano (25:75, v/v) e 1% de ácido acético.

O solvente de eluição foi evaporado em roto-evaporador e, com auxílio de um pequeno volume de hexano, o extrato foi transferido para um frasco pré-tarado. O solvente foi parcialmente evaporado com nitrogênio (N_2).

O monitoramento das frações foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance, de silica gel 60 F_{254} ativada a 120°C por 60 minutos. O sistema de solventes de eluição foi clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (95:5:2, v/v/v). As placas desenvolvidas foram observadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm, utilizando-se iluminador U.V.

Após análise dos resultados obtidos por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance, a fração 2 (F_2) correspondente aos ácidos anacárdicos foi selecionada para ser analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

4.2.12. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa do padrão dos ácidos anacárdicos e dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação

Quatro microlitros da fração 2 (F_2) obtida de acordo com o ítem 4.2.11, foram aplicados em um cromatógrafo líquido Waters 600-E acoplado com um detector UV. 484 operando a 280 nm, equipado com coluna Nova-Pak C18 (3,9 x 300mm), contendo dimetyloctadecylsilye ligado a sílica amorfa. Os dados sobre os tempos de retenção e as percentagens dos ácidos anacárdicos foram obtidos através de um integrador processador Waters 746, acoplado ao cromatógrafo contendo a coluna Nova-Pak C18. Os ácidos anacárdicos das amostras foram identificados através do tempo de retenção por comparação com o padrão obtido durante a realização da pesquisa e com a literatura especializada de NAGABHUSHANA & RAVINDRANATH (1995) e SHOBHA et alii (1992). As amostras dos ácidos anacárdicos e padrão, antes de serem injetadas no cromatógrafo, foram previamente filtradas em membrana Millipore com porosidade 0,45 μm. Após otimização, foram fixados os seguintes parâmetros de operação.

Para a coluna Nova-Pak C18:

- Fase móvel: acetonitrila:água (80:20 v/v) contendo 1% de ácido acético
- Fluxo do solvente: 1,3ml/min

- Pressão: 1200-1300 psi

- Temperatura da coluna: 35°C

- Detector UV a 280 nm

A quantificação dos ácidos anacárdicos foi realizada calculando a concentração de cada ácido anacárdico (C_i) na amostra injetada mediante a relação que existe entre a área do pico do ácido anacárdico desconhecido (A_i) e a área (A_p) e concentração (C_p) do ácido anacárdico padrão correspondente, de acordo com a seguinte expressão.

$$C_i = C_p \times \frac{A_i}{A_p}$$

4.2.13. Identificação dos ácidos anacárdicos

4.2.13.1. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos para cromatografia gasosa

O procedimento adotado neste trabalho para a metilação do grupo carboxila e hidroxila dos ácidos anacárdicos foi descrito por GELLERMAN & SCHLENK (1968) e KUBO et alii (1993).

A esterificação foi realizada pela adição de 5 ml do reagente esterificante diazometano no tubo de ensaio contendo a amostra. Os ácidos anacárdicos metilados foram extraídos pela adição de 5 ml de éter etílico, seguido de agitação vigorosa por 30 segundos, após agitação foi adicionado alguns mililitros de acetato de etila. Os ésteres metílicos foram acondicionados em frascos escuros e armazenados a 4 °C até serem analisados por cromatografia gasosa.

4.2.13.2. Cromatografia Gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos

A solução dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos foi injetada num cromatógrafo gasoso Hewlett Packard Series II, modelo 5890, com detetor de ionização de chama utilizando-se uma coluna de separação Carbowax HP (25m x 0,2mm x 0,2 μm). O cromatógrafo foi operado nas seguintes condições:

gás de arraste H_2 = 1 ml/min

vácuo = 2,7 x 10^5 Torr

T° do injetor = 240°C

Programa de Temperatura

T° do injetor = 240°C

T° do detector = 240°C

T° inicial e taxa de aumento = 60°C/ 2 minutos e aumento de 5°C/minuto

T° final = 200°C

4.2.13.3. Cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas

A solução de ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos foi injetada no cromatógrafo gasoso HP 5890 series II acoplado a detetor seletivo de massas MSD-HP 5979. A coluna de separação foi a Carbowax HP 20m (25m x 0,2mm x 0,25μm). O detetor foi mantido em 240°C e o injetor a 200°C. O forno foi aquecido a 60°C por 2 minutos, e elevado até 200°C numa razão de 5°C/min, e então aquecido até 300°C. O potencial de ionização do detetor utilizado foi de 72 eV.

4.2.13.4. Identificação dos ácidos anacárdicos por espectrometria de massas

Os ácidos anacárdicos foram tentativamente identificados por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas e tiveram sua identificação realizada comparando-se com os resultados observados na literatura científica.

4.2.14. Análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL

Foi selecionado o extrato etílico do CCP-09 no quinto estágio de maturação para análise da atividade antimicrobiana através do teste espectrofotométrico e teste de antibiograma, tendo em vista este clone ter apresentado a maior concentração dos ácidos anacárdicos.

4.2.15. Microrganismos e meios de cultura

Os microrganismos selecionados para a análise da atividade antimicrobiana foram *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida utilis* adquiridos da coleção da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", e os seus meios foram descritos por (HIMEJIMA et alii, 1992; KUBO & HIMEJIMA, 1991 e HIMEJIMA & KUBO, 1991). Os dois

fungos selecionados *Aspergillus sp* e *Trichodermus sp* foram obtidos da coleção do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, os meios de cultura empregados foram descritos por MUROI et alii (1993).

4.2.16. Análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL pelo método espectrofotométrico

A análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL foi realizada com bactéria e levedura pela técnica da diluição em caldo de acordo com TANIGUCHI & SATOMURA (1972) e PELCZAR et alii (1981). O crescimento de cada cultura foi monitorado através de dois métodos, medição da densidade ótica (densidade ótica 660 nm) e contagem de células/ml. As bactérias *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* foram inoculadas em 9 tubos de ensaio contendo meio BHI (brain-heart-infusion). Com auxílio de uma alça de níquel cromo foi retirado uma alçada dos microrganismos e transferido para 3,0 ml de água destilada e esterilizada. Em seguida, transferiu-se 30 µl desta suspensão de células para os tubos com o meio de cultura esterilizado. Após inoculação foi adicionado o composto teste (ácidos anacárdicos), inicialmente, este composto foi dissolvido em N,N-dimetilformamida (DMF), a concentração de DMF no meio foi 1%, a qual não afeta o crescimento dos microrganismos, de acordo com (KUBO et alii, 1993), e 30 µl da solução dos ácidos anacárdicos em suas respectivas concentrações foram adicionadas ao meio. Os tubos foram incubados por 24 horas a 37 °C. Decorrido o

período de incubação foi realizada a leitura da turbidez (densidade ótica 660 nm) MUROI et alii (1993) e contagem do número de células/ml.

Para leveduras e fungos foi utilizado extrato de malte a 2,5%, a temperatura de incubação foi 30 °C. Os tubos foram incubados por 24 horas e a concentração mínima para inibir o crescimento das leveduras foi realizada através da leitura no espectrofotometro (densidade ótica 660 nm) KUBO et alii (1993), os outros passos foram realizados de acordo como descrito no ítem anterior. O crescimento do fungos foi analisado através da determinação da massa seca após 48 horas em estufa a 105 °C e observação a olho nú MUROI et alii (1993).

4.2.17. Preparo dos discos dos ácidos anacárdicos do CNSL para o teste de antibiograma

Os discos de papel de filtro Whatman n° 3 (com 5 x 1 mm de diâmetro) foram inicialmente secos em estufa e, em seguida, 30 µl dos ácidos anacárdicos obtidos conforme ítem 4.2.16 foram adicionados nos discos de papel de filtro. Os discos foram então transferidos para placas de Petri estéreis e secos no dessecador à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, foram mantidos na estufa a 30°C por 24 horas para eliminação de qualquer resíduo de solventes. Amostras de 30 µl das suspensões de células obtidas conforme ítem 4.2.16 foram inoculadas em placas de Petri e espalhadas com auxílio da alça Drigalsk.

4.2.18. Análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos utilizando discos de papel de filtro

A análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL em bactérias Gram positiva *Streptococcus mutans* foram realizadas de acordo com o método descrito por (KIM et alii, 1995; SIVROPOULOU et alii, 1995 e PELCZAR et alii, 1981). Amostras de 30 µl de culturas ativas do *Streptococcus mutans* foram inoculadas por espalhamento com auxílio da alça de Drigauski estéreis em placas de Petri contendo "brain heart agar". Os discos de papel de filtro impregnados com os ácidos anacárdicos foram transferidos para as placas de Petri inoculadas com os microrganismos. A atividade inibitória do crescimento a 37 °C, após 24 horas de incubação foi determinada pela medição da zona de inibição (halo inibitório) após subtração do disco de papel de filtro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas cinco amostras de dois clones de cajueiro-anão-precoce da cidade de Mossoró do Estado do Rio Grande do Norte. Os nomes populares cajueiro-precoce, cajueiro-de-seis-meses, cajueiro-do-ceará são nomes pelos quais é conhecido o cajueiro-anão-precoce, devido ao seu baixo porte e precocidade.

Este tipo de cajueiro ocorre com maior frequência nos municípios cearenses de Maranguape, Aquiraz, Cascavel, Pacajus e Araçoiaba, e já está sendo explorado em outros estados brasileiros, principalmente Piauí e Rio Grande do Norte.

O porte baixo da planta, que na idade adulta alcança até 6m de altura com uma envergadura da copa entre 4m e 7m, é uma característica que facilita bastante a condução e o manejo da cultura , tornando possível o controle eficiente de pragas e doenças, bem como a colheita. A precocidade do ciclo produtivo da planta e dos períodos produtivos é outra característica importante que, além de permitir melhor distribuição e aproveitamento da mão-de-obra na propriedade, amplia também o período de beneficiamento do pedúnculo.

Em função dessas características e dos tratos culturais e fitossanitários que sejam dispensados ao pomar, a produtividade do cajueiro-anão-precoce pode atingir até 3.000kg/ha de castanha. O fruto, a castanha desenvolve-se por seis a oito semanas após a polinização com o pedúnculo (maçã ou pseudofruto) desenvolvendo-

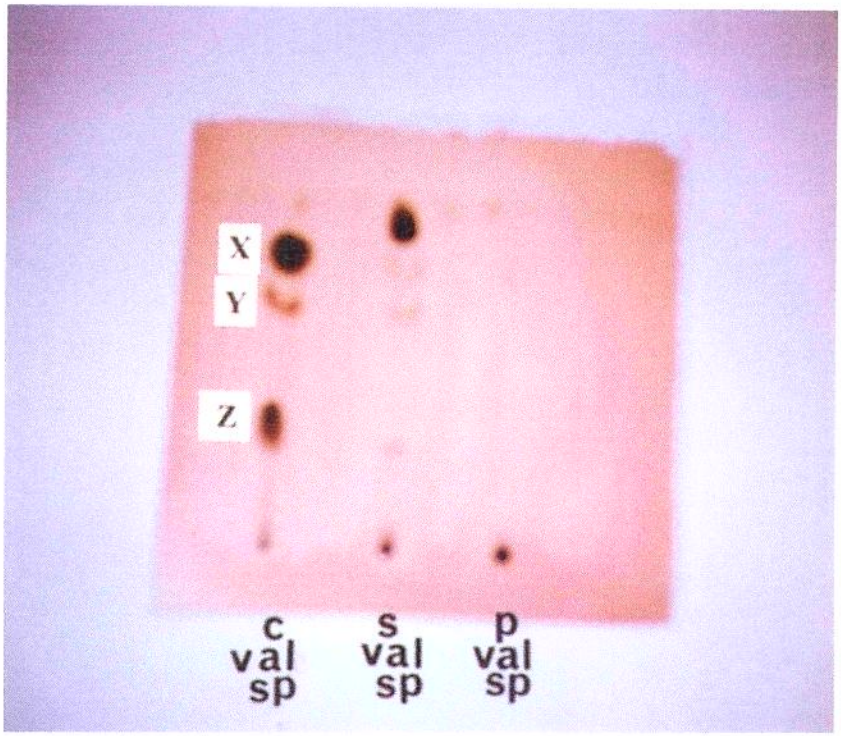
se mais intensamente durante as duas últimas semanas. O fruto e o pedúnculo caem juntos e espontâneamente após sete a oito semanas WUNNACHIT & SEDGLEY (1992). O período normal de desenvolvimento do caju deve variar ligeiramente de uma região geográfica para outra (SHOBHA et alii, 1992).

5.1. Resultados dos estudos preliminares para seleção dos clones de cajueiro com maior teor dos ácidos anacárdicos

5.1.1. Análise por Cromatografia em Camada Delgada dos extratos etílicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju da Ceasa Campinas-SP

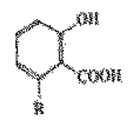
Os extratos etílicos do óleo da casca, semente e pedúnculo de caju foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (TLC), de acordo com o método descrito no ítem 4.2.1.2. A Figura 7 ilustra o cromatograma dos ácidos anacárdicos, cardois e cardanois que aparecem como manchas escuras contra um fundo cor de rosa. A TLC permite uma observação do número de frações de compostos existentes em cada amostra de casca, semente e pedúnculo. Como podemos observar, os extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) apresentam três frações de compostos, as quais podem ser denominadas de (x) ácidos anacárdicos R_f 0,77, (y) cardóis R_f 0,50 e (z) cardanóis R_f 0,30. Como verificamos a amostra de casca da castanha de caju apresenta altos teores de ácidos anacárdicos, portanto maior intensidade da mancha correspondente aos ácidos

anacárdicos no cromatograma, quando comparada com as amostras de semente e pedúnculo. Nas amostras de semente observa-se três frações com os mesmos valores de R_{fs} das frações apresentadas na casca, e intensidade de cor pouco intensa quando comparadas com a amostra de casca, portanto demonstrando possuir baixos teores de ácidos anacárdicos, cardois e cardanois. A amostra de pedúnculo apresentou apenas uma mancha com valor de R_f 0,77 semelhante a fração dos ácidos anacárdicos apresentado pela casca e semente, e intensidade de cor muito baixa no cromatograma demonstrando apresentar baixo teor de ácido anacárdico. Os dados obtidos por visualização da intensidade das manchas nas frações, associados aos valores de R_{fs} , são semelhantes aos resultados apresentados pela literatura (SENGUPTA et alii, 1974) e (TYMAN et alii, 1989), portanto, podemos supor que estas frações correspondem aos ácidos anacárdicos, cardois e cardanois, a seguir apresentamos as estruturas dos respectivos compostos fenólicos Figura 8.

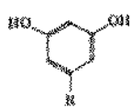


x - ácido anacárdico y - cardol z - cardanol

Figura 7. Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos extratos etílicos do do óleo da casca (C), semente (S) e pedúnculo (P) de caju da Ceasa Campinas-SP.

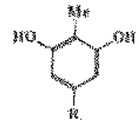


1 - Ácido Anacárdico



2 - Cardol

3 - Cardanol



2 - Metilcardol

Figura 8. Estrutura dos principais constituintes do óleo do CNSL

5.1.2. Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca, semente, pedúnculo de caju e suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2)

Os extratos etílicos do óleo da casca, semente, pedúnculo e sucos de caju de duas marcas comerciais foram analisados por HPTLC de acordo com o método descrito no ítem 4.2.1.4. A Figura 9 apresenta o cromatograma observado a 254 nm, os ácidos anacárdicos aparecem na luz ultravioleta como manchas azuis fortes fluorescente contra um fundo verde. A Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance permite uma visualização rápida da intensidade e número de frações presentes em cada amostra. Como podemos observar a amostra que apresenta altos teores de ácidos anacárdicos (casca) verifica-se a presença de três frações, onde observa-se uma mancha com forte intensidade da cor azul fluorescente no cromatograma, característica dos (x) ácidos anacárdicos R_f (0,77) e (y) cardol R_f 0,58 (Z) cardanol R_f (0,28) (GELLERMAN & SCHLENK, 1968). Observando-se as amostras de semente, verifica-se que esta apresenta duas frações, (x) ácidos anacárdicos R_f (0,77) e cardanol R_f (0,26) com baixa intensidade das manchas no

cromatograma observados a 254 nm, demonstrando portanto baixos teores dos ácidos anacárdicos e cardanois. Com relação as amostras de pedúnculo verifica-se a presença de duas frações correspondente aos (x) ácidos anacárdicos R_f (0,77) e (y) cardol R_f (0,53), os ácidos anacárdicos apresentam cor azul fluorescente característica e intensidade de cor baixa, demonstrando baixos teores destes ácidos no pedúnculo. As amostras de sucos industrializados apresentam duas frações com baixa intensidade de cor nos cromatogramas observados a 254 nm correspondentes aos (x) ácidos anacárdicos R_f (0,77) e (y) cardol R_f (0,56), sendo possível observar que a mancha correspondente aos ácidos anacárdicos (x) apresenta a cor azul fluorescente um pouco mais forte quando comparada com as amostras de semente e pedúnculo. Assim, através da Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance com detecção a 254 nm, é possível determinar onde os ácidos anacárdicos estão presentes em maior concentração, porém para uma determinação quantitativa das frações de ácidos anacárdicos é necessário utilizar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

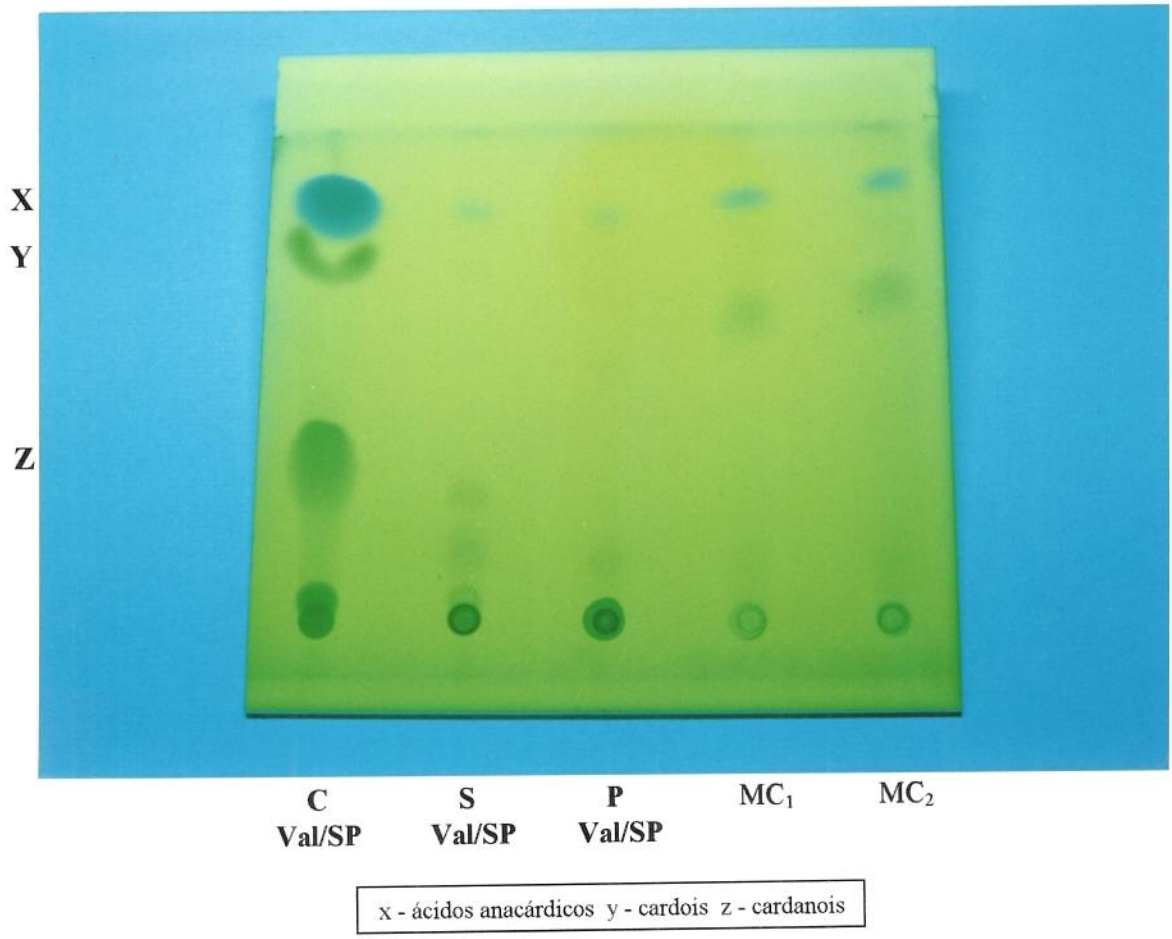


Figura 9. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca (C), semente (S) e pedúnculo (P) de caju, de Valinhos-SP, e suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2).

5.1.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2)

As amostras de suco de caju processados industrialmente foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa, de acordo com o método descrito no ítem 4.2.1.5. Conforme dados da literatura COLLINS et alii (1993); CASTEELE et alii (1982), para substâncias polares, a separação através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa é superior a Fase Normal, uma vez que a possibilidade de algum composto altamente polar se ligar irreversivelmente à fase estacionária é considerada menor. Os cromatogramas ilustrados nas Figuras 10 e 11 , demonstram que os ácidos anacárdicos das amostras de suco de caju processados apresentam perfil dos picos similares, sendo identificados três ácidos anacárdicos 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienyl]ácido salicílico 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienyl]ácido salicílico e 6-[8(Z)-pentadecenyl]ácido salicílico, em ordem de eluição. A amostra de suco de caju comercial MC_1 apresenta os ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) com maiores teores (µg/ml) quando comparada com a amostra MC_2. Além disso, os sucos de caju processados apresentam maiores teores de ácidos anacárdicos com uma dupla ligação, portanto, monoenos, seguido dos trienos e dienos, esses resultados estão de acordo com (KUBO et alii, 1986) e (SHOBHA et alii, 1992). Estes compostos sendo encontrados no suco de caju parece não ser tóxico quando ingerido por via oral ou senão sua toxicidade ainda não foi observada.

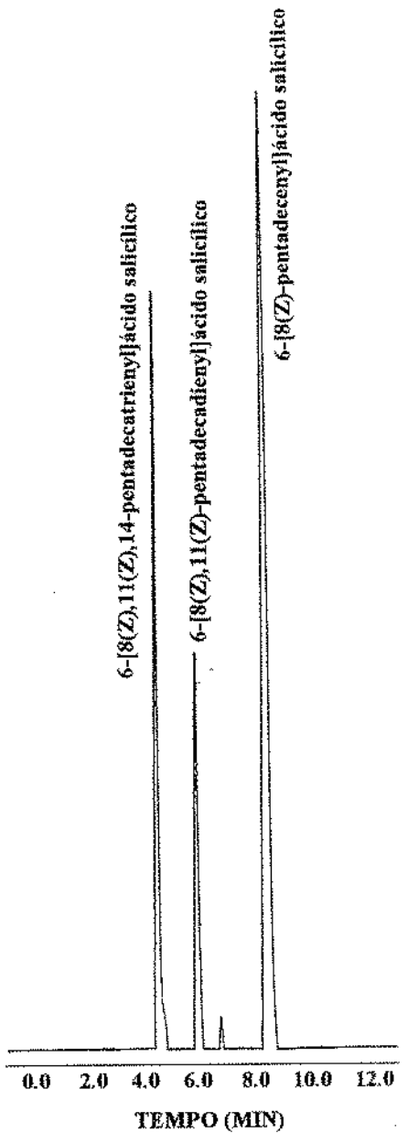


Figura 10. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do suco de caju da marca comercial (MC_1).

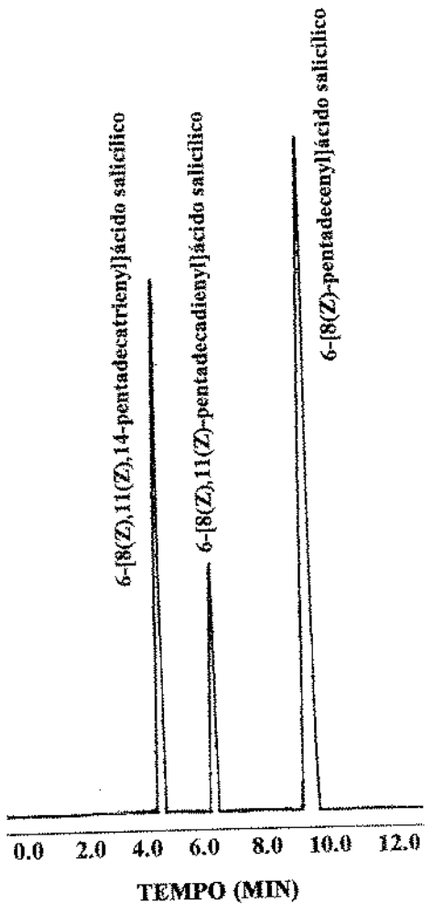


Figura 11. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do suco de caju da marca comercial (MC_2).

Tabela 3. Análise dos ácidos anacárdicos das amostras de suco de caju de duas marcas comerciais (MC_1 e MC_2) por HPLC em Fase Reversa.

	Concentração dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) em μg/ml		
Amostras	Monoenos	Dienos	Trienos
Suco de caju MC_1	7,68	3,18	4,15
Suco de caju MC_2	4,64	2,12	2,62

5.1.4. Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum

A Figura 12 apresenta a análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum, de acordo com o método descrito no ítem 4.2.5. Observando-se os cromatogramas apresentados na Figura 12 verifica-se a presença de três frações nas cinco amostras analisadas, permitindo também uma visualização rápida da intensidade das manchas em cada amostra de CNSL. É possível observar que as amostras que apresentam maiores teores de (x) ácidos anacárdicos R_f 0,77 possuem uma intensidade da cor azul mais forte no cromatograma, quando comparadas com as amostras que apresentam teores mais baixos. Nas amostras dos clones de cajueiro

CCP-1001 e CCP-06 observa-se uma menor intensidade das manchas cor azul fluorescente contra um fundo verde nos cromatogramas a 254 nm, demonstrando menor teor dos ácidos anacárdicos, por outro lado as amostras CCP-76, CCP-09 e cajueiro comum apresentam maior intensidade das manchas azuis no cromatograma, quando comparadas com CCP-1001 e CCP-06, demonstrando possuir maior teor de ácidos anacárdicos. As amostras de CCP-76 e CCP-09 quando comparadas com os outros clones apresentam visualmente maior intensidade da mancha azul fluorescente, ou seja maior teor dos ácidos anacárdicos. Pelo exposto, é possível determinar o teor de ácidos anacárdicos através da análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance com detecção a 254 nm, embora que para termos uma determinação quantitativa das frações de ácidos anacárdicos é necessário utilizar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Como podemos observar nos cromatogramas das amostras dos clones de cajueiro anão-precoce CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e cajueiro comum, verifica-se em todas essas amostras duas outras frações (y) cardol R_f 0,58 e (Z) cardanol R_f 0,30, comparando-se os dados obtidos nesse experimento, com os valores citados na literatura, verifica-se que os valores de R_{fs} das três frações são similares.

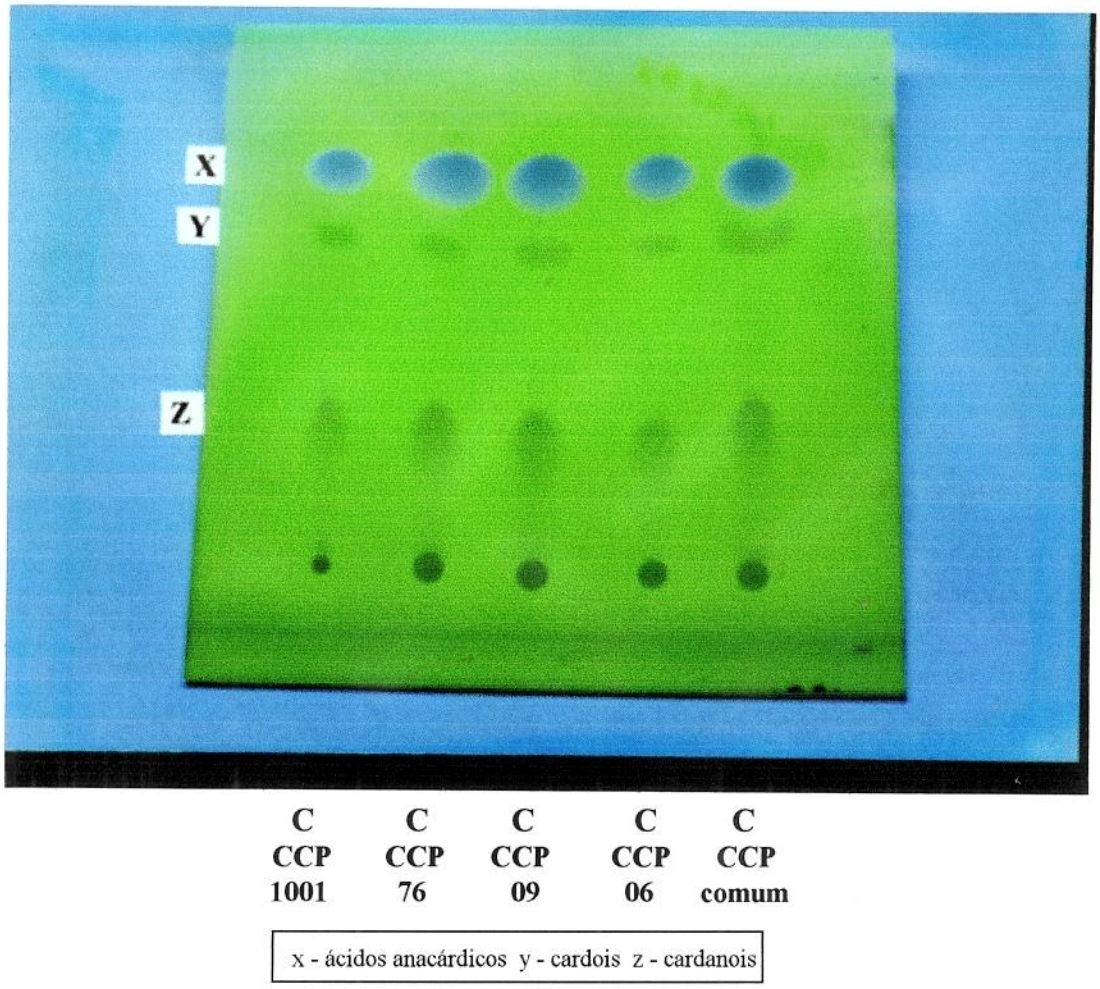


Figura 12. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca (C) da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-1001, CCP-76, CCP-09, CCP-06 e caju comum, de Mossoró-RN.

5.2. Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance do padrão ácido anacárdico obtido por cromatografia em coluna de sílica gel 60

A determinação dos ácidos anacárdicos das amostras de extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) foi realizada de acordo com o ítem 4.2.7. A Figura 13 apresenta o cromatograma observado a 254 nm, os ácidos anacárdicos aparecem como manchas azuis fluorescente contra um fundo verde. A Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance permite uma visualização dos ácidos anacárdicos existentes na amostra de óleo da casca da castanha de caju. Como podemos observar a purificação do extrato etílico do CNSL foi realizada satisfatoriamente tendo em vista o cromatograma não apresentar nenhuma banda que demonstre a presença de outros compostos na fração (F_{2a}) e (F_{2b}).

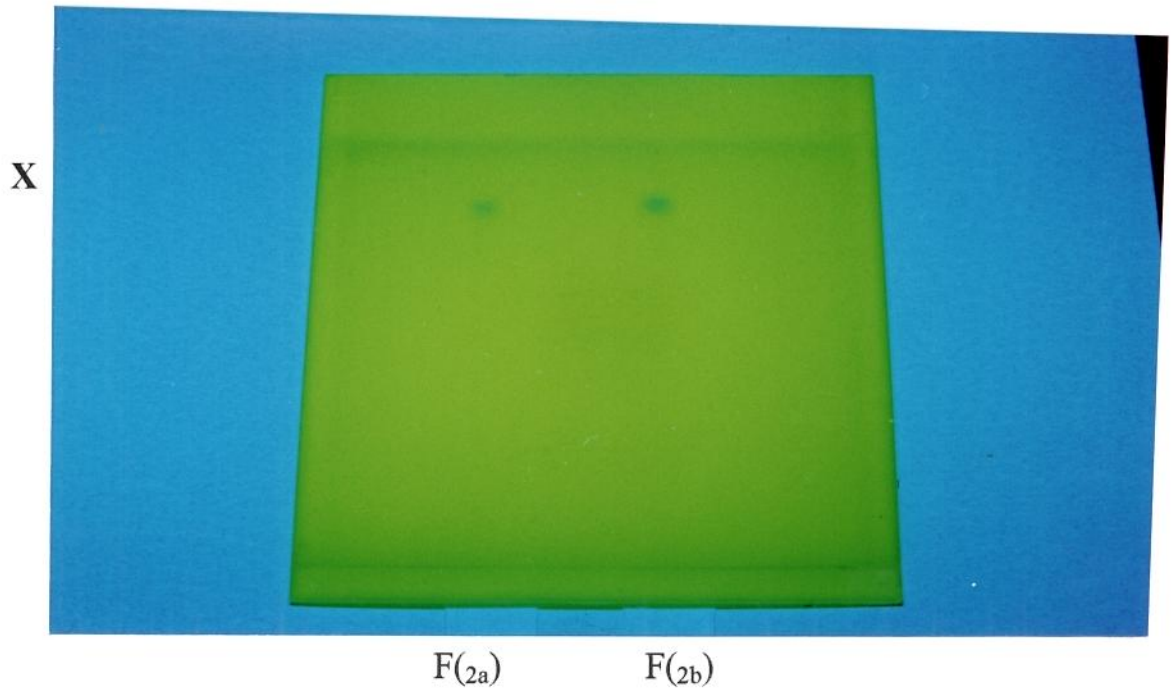


Figura 13. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance do padrão dos ácidos anacárdicos.

5.2.1. Determinação do peso médio das castanhas de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação

A Figura 14 apresenta o peso médio das castanhas de caju dos clones de cajueiro CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação, realizado conforme ítem 4.2.6. De acordo com a Figura 14 pode-se verificar um aumento no peso médio das castanhas de caju até o segundo estágio de maturação, seguido de uma gradual diminuição em ambos os clones até o quinto estágio de maturação, portanto, observando-se uma redução no tamanho da castanha o que demonstra uma diminuição no peso médio das castanhas de caju.

Esses resultados estão de acordo com IREMIREN (1984) o qual relatou que os estágios finais de desenvolvimento são caracterizados pela maturação do pedúnculo acompanhado por uma perda de umidade e concomitante diminuição da castanha.

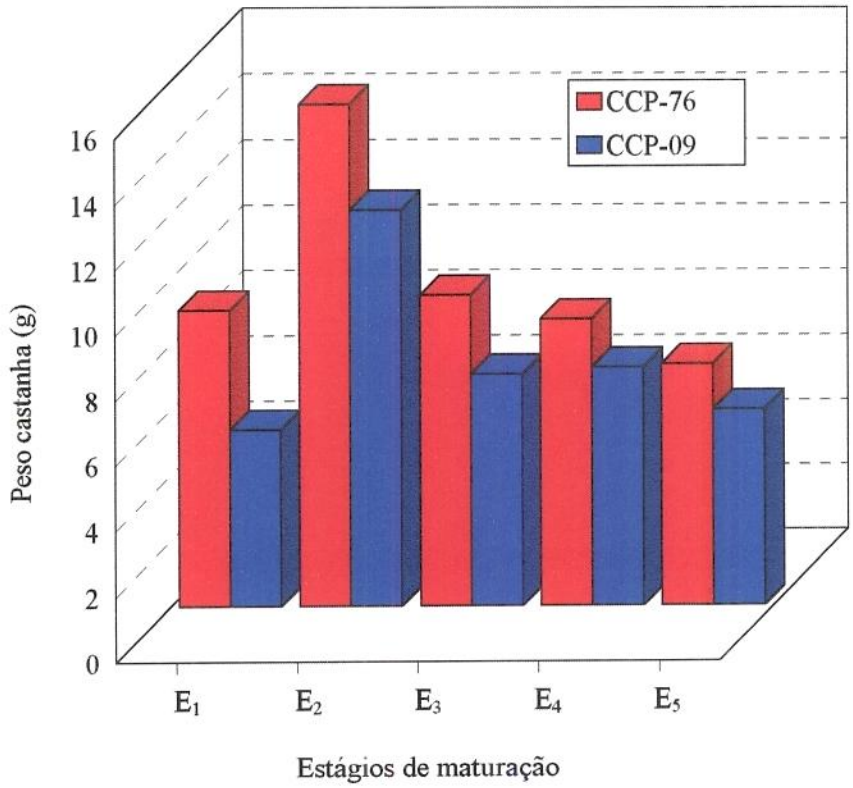


Figura 14. Peso médio das castanhas de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5).

5.2.2. Determinação do óleo da casca da castanha de caju dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação utilizando diferentes solventes

As características físicas dos extratos brutos do óleo da casca da castanha de caju dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação obtidos de acordo com o ítem 4.2.8. foram muito variáveis quando comparadas com estágios diferentes, ao passo que quando se compara o mesmo estágio com solventes diferentes essa diferença deixa de existir. A cor do óleo bruto nos dois primeiros estágios apresentaram-se ligeiramente esverdeada, característico deste estágio devido talvez a presença de pigmentos, ao passo que nos estágios seguintes observou-se uma coloração castanha brilhante TYMAN (1980). A produção de óleo da casca da castanha de caju bruto foram semelhantes com os solventes éter etílico, pentano e hexano como observado na Tabela 3.

Tabela 4. Porcentagem relativa da extração do óleo da casca da castanha de caju dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5) utilizando os solventes (éter etílico, pentano e hexano).

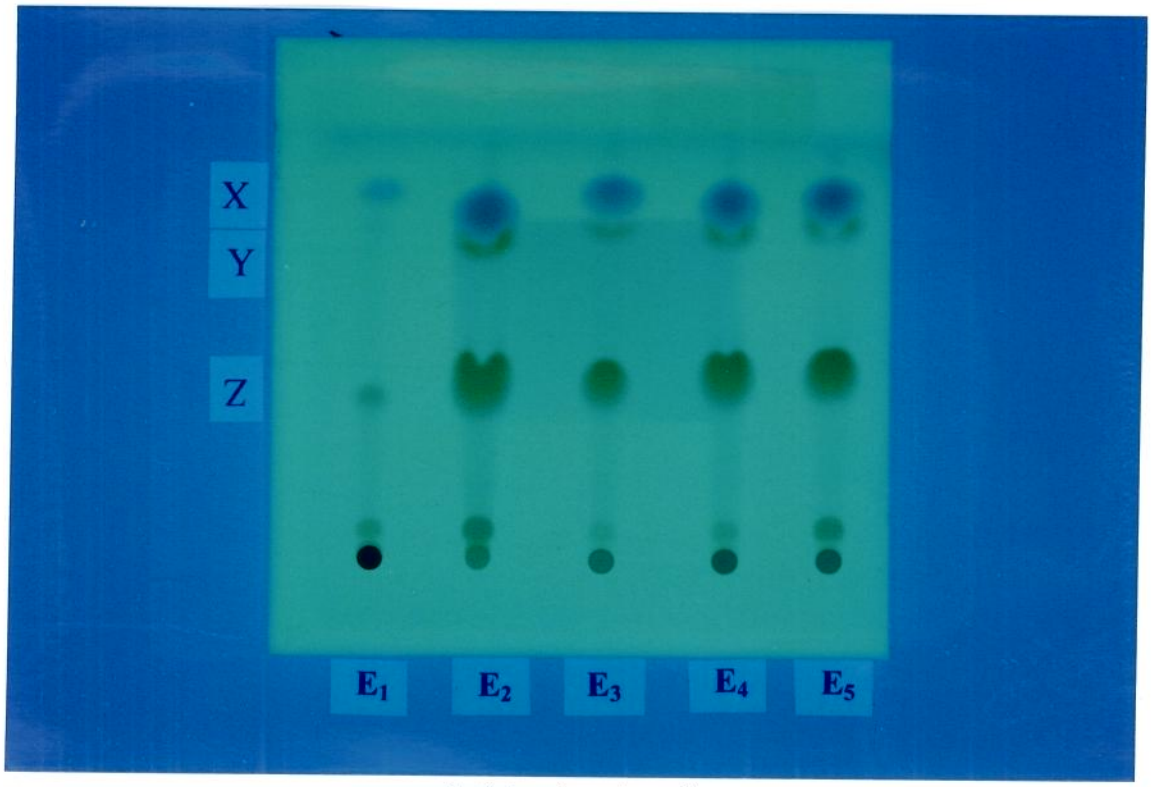
Solventes de extração	% Relativa da Extração do CNSL									
	Clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76					Clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09				
	Estágios de maturação					Estágios de maturação				
	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5
Éter etílico	15,7	17,7	17,2	26,7	30,7	16,2	17,4	18,0	28,9	32,5
Pentano	15,5	16,5	16,9	26,3	29,8	15,9	16,9	17,6	26,7	31,4
Hexano	14,9	16,0	16,4	25,0	30,4	15,8	16,5	17,8	27,2	30,9

5.2.3. Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos bruto do CNSL dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação

As Figuras 15 e 16 apresentam os cromatogramas observados a 254 nm, de acordo com o ítem 4.2.9. onde os ácidos anacárdicos apresentam-se como manchas azuis fortes fluorescentes contra um fundo verde. Como pode-se observar a Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance permite uma imagem

rápida e real da intensidade de cor e número de frações existentes em cada amostra de óleo da casca da castanha de caju dos clones CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação.

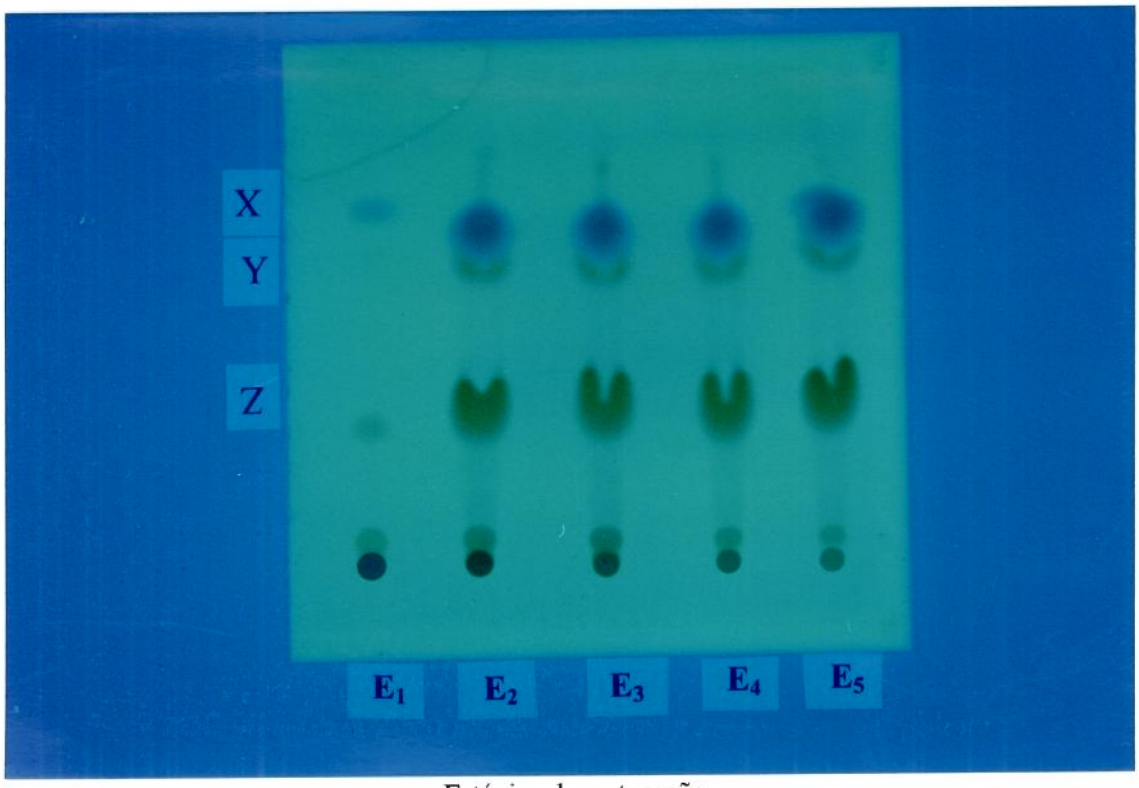
As amostras de óleo da casca da castanha de caju dos clones CCP-76 e CCP-09 apresentaram baixo teor dos ácidos anacárdicos no estágio de maturação E_1 comparado com os etágios E_2, E_3, E_4 e E_5. Nas amostras do clone CCP-76 em cinco estágios de maturação quando comparadas com as amostras do clone CCP-09 nos mesmos estágios verifica-se que os dois clones apresentaram o mesmo número de frações nos cinco estágios de maturação. Como podemos observar as amostras do clone CCP-76 apresentaram uma menor intensidade das manchas azuis no cromatograma a 254 nm, quando comparadas com as amostras do clone CCP-09 demonstrando assim menor teor dos ácidos anacárdicos. As amostras do clone de cajueiro CCP-09 apresentaram nitidamente maior intensidade das manchas azuis no cromatograma a 254 nm, ou seja maior teor dos ácidos anacárdicos. Assim, podemos determinar a qualidade do óleo da casca da castanha de caju em termos do teor de ácidos anacárdicos através da Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance com detecção a 254 nm, porém para uma determinação quantitativa dos ácidos anacárdicos é necessário utilizar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.



Estágios de maturação

x - ácidos anacárdicos y - cardois z - cardanois

Figura 15. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5).



Estágios de maturação

x - ácidos anacárdicos y - cardois z - cardanois

Figura 16. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) dos extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5).

5.2.4. Análise por Cromatografia em Coluna dos ácidos anacárdicos

Os ácidos anacárdicos separados dos extratos etílicos brutos por cromatografia preparativa de acordo com o ítem 4.2.10. foram purificados por Cromatografia em Coluna conforme ítem 4.2.11. As Figuras 17 e 18 ilustram o monitoramento da purificação dos ácidos anacárdicos em coluna de silica gel 60 , realizado através da cromatografia das frações em Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance. Esta técnica permitiu a visualização das manchas azuis fluorescentes características dos ácidos anacárdicos. (GELLERMAN & SCHLENK, 1968), como também a presença ou não de outras frações nos cromatogramas, demonstra visualmente portanto que as amostras dos clones CCP-76 e CCP-09 nos cinco estágios de maturação possam estar puras. Os resultados obtidos por visualização da intensidade das manchas demonstram que o estágio primeiro do clone CCP-76 não apresenta a cor azul fluorescente dos ácidos anacárdicos, portanto, talvez este ácido não esteja presente ou necessita de um método mais sensível como HPLC para detectar sua presença.

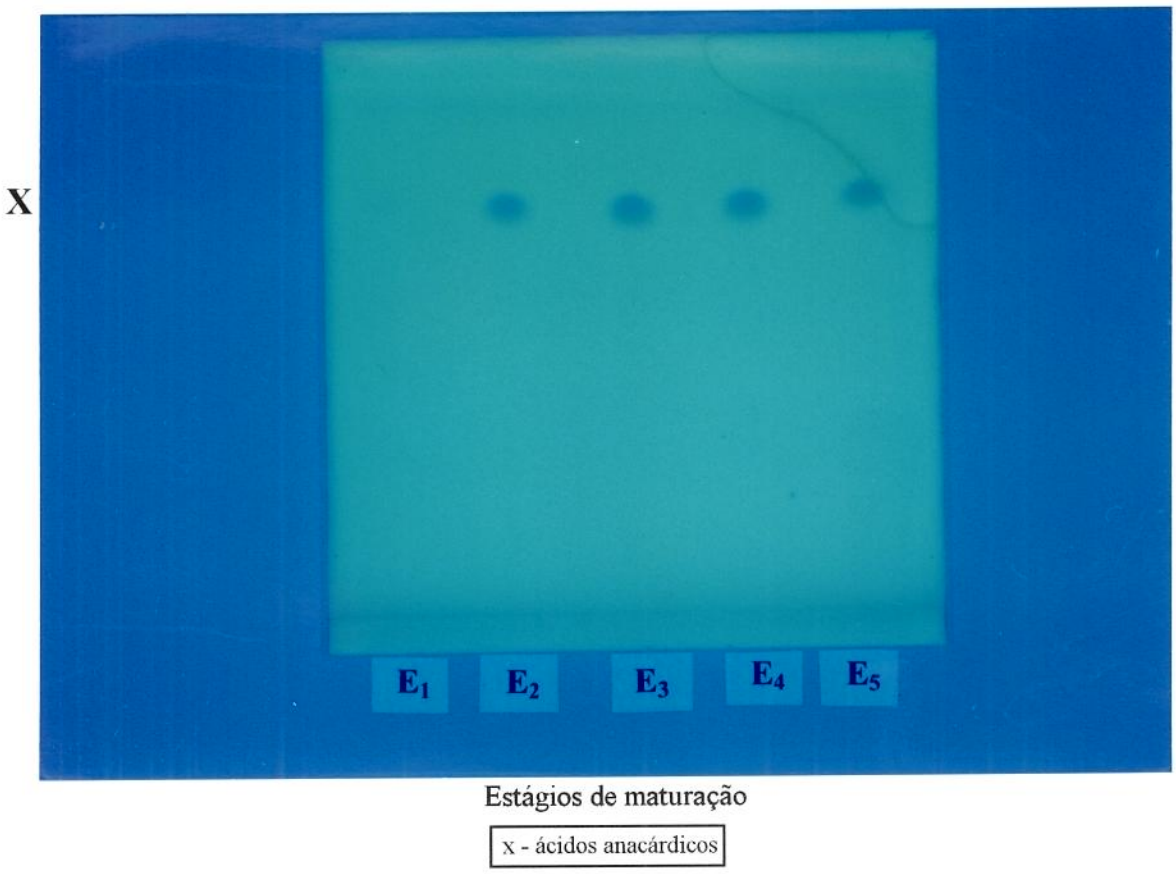


Figura 17. Monitoramento das frações separadas pela cromatografia em coluna de silica gel 60 dos ácidos anacárdicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 em cinco estágios de maturação.

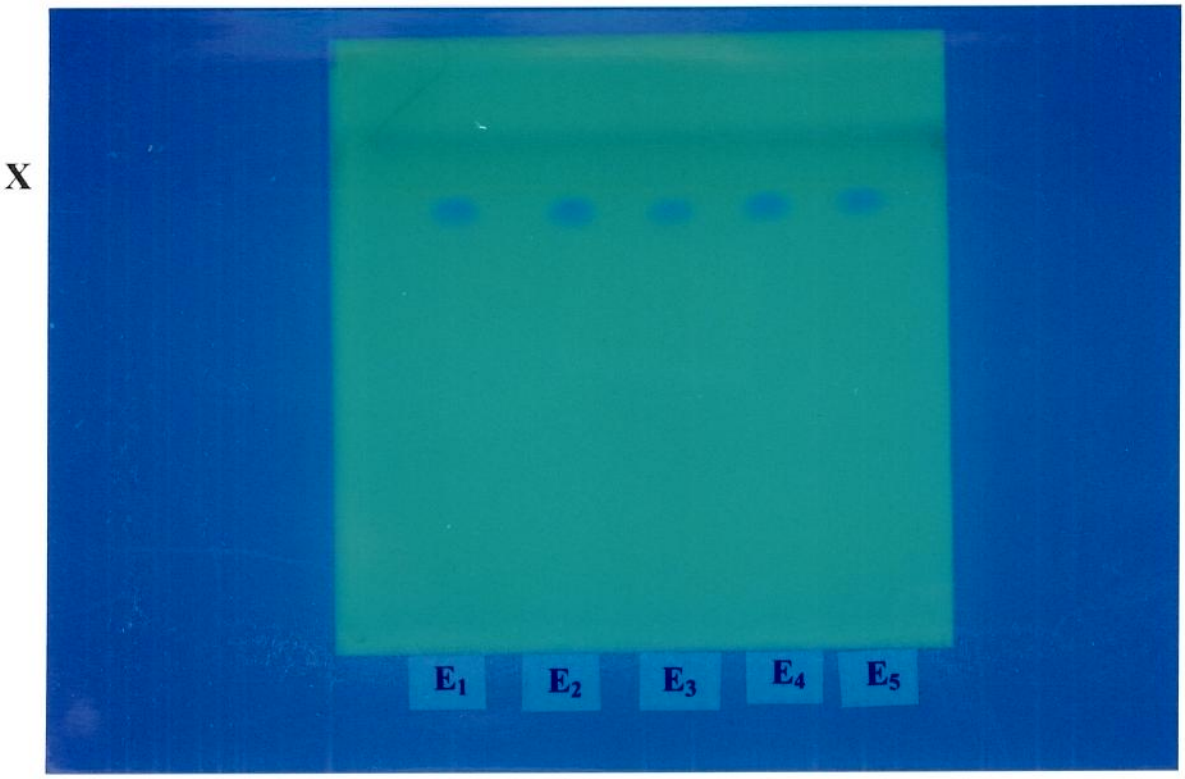


Figura 18. Monitoramento das frações separadas pela cromatografia em coluna de silica gel 60 dos ácidos anacárdicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 em cinco estágios de maturação.

5.2.5. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Fase Reversa

Foram selecionadas amostras do padrão ácido anacárdico (Figura 19) e dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação para serem analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa, de acordo com o método descrito no ítem 4.2.12. Conforme dados da literatura COLLINS et alii (1993); CASTEELE et alii (1982), para substâncias polares, a separação através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa é superior a Fase Normal, uma vez que a possibilidade de algum composto altamente polar se ligar irreversivelmente à fase estacionária é considerada menor.

Todos os cromatogramas dos extratos etílicos do CNSL dos clones de cajueiro CCP-76 e CCP-09 das Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, e 33 apresentaram perfil dos picos semelhantes, indicando três ácidos anacárdicos 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienyl]ácido salicílico, 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienyl]ácido salicílico e 6-[8(Z)-pentadecenyl]ácido salicílico, em ordem de eluição, de acordo com o padrão Figura 19 e NAGABHUSHANA & RAVINDRANATH (1995); SHOBHA & RAVINDRANATH (1991). Portanto, observa-se que o clone CCP-76 Figura 20 e 21 e o clone CCP-09 Figura 27 e 28 no quinto estágio de maturação (60 dias) apresentam maior concentração dos ácidos anacárdicos com três duplas ligações (trienos) quando comparado com os frutos no primeiro estágio (12 dias) que apresentam maior concentração dos ácidos anacárdicos com uma dupla ligação (monoenos). De um modo em geral, as amostras dos clones CCP-09 apresentam maiores teores dos ácidos anacárdicos (monoenos,

dienos e trienos) μg/ml quando comparados aos clones CCP-76. Além disso, o quinto estágio do clone CCP-09 apresenta teor dos ácidos anacárdicos muito superior em relação aos estágios do CCP-76. Os resultados obtidos da análise dos ácidos anacárdicos do CNSL por HPLC demonstram que existe uma diferença entre os clones e também ocorre uma nítida falta de semelhança entre os estágios dos respectivos clones. SHOBHA et alii (1992) sugeriram que a formação dos monoenos, dienos e trienos dos ácidos anacárdicos durante a maturação ocorre através de uma via semelhante a síntese dos ácidos graxos em plantas. Os autores também relataram a possibilidade da dessaturação ocorrer após a formação do anel aromático dos ácidos anacárdicos.

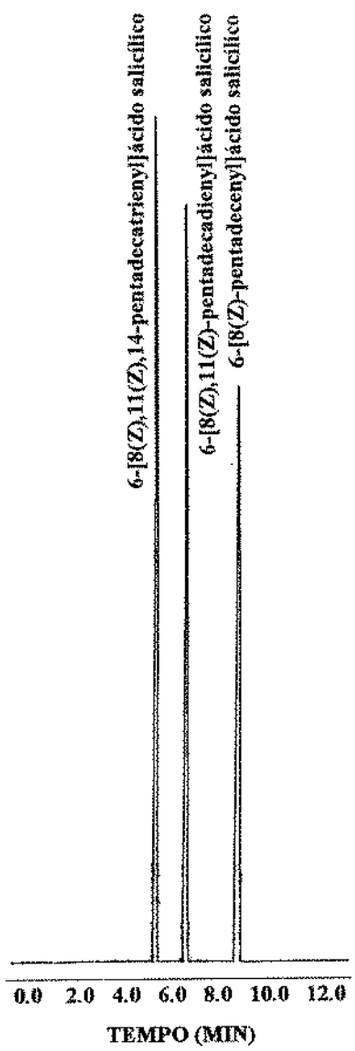


Figura 19. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do padrão dos ácidos anacárdicos.

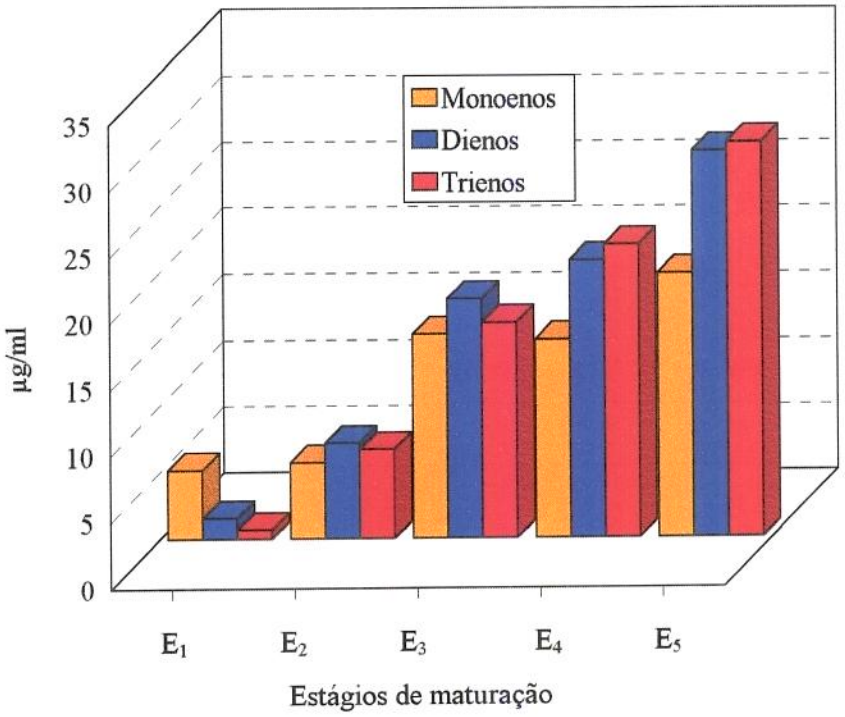


Figura 20. Concentração absoluta dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) dos extratos etílicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5).

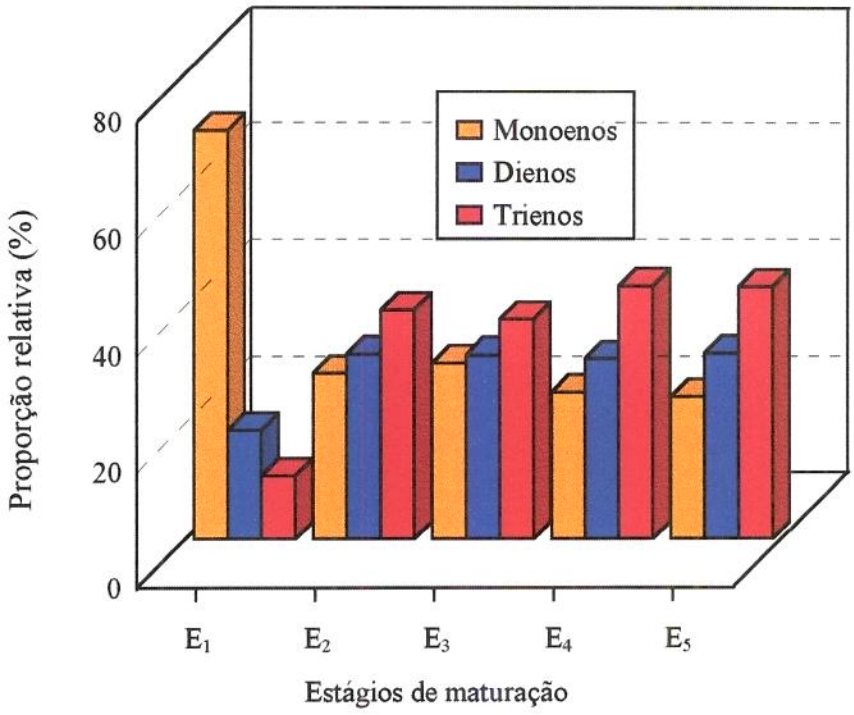


Figura 21. Proporção relativa dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) dos extratos etílicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5).

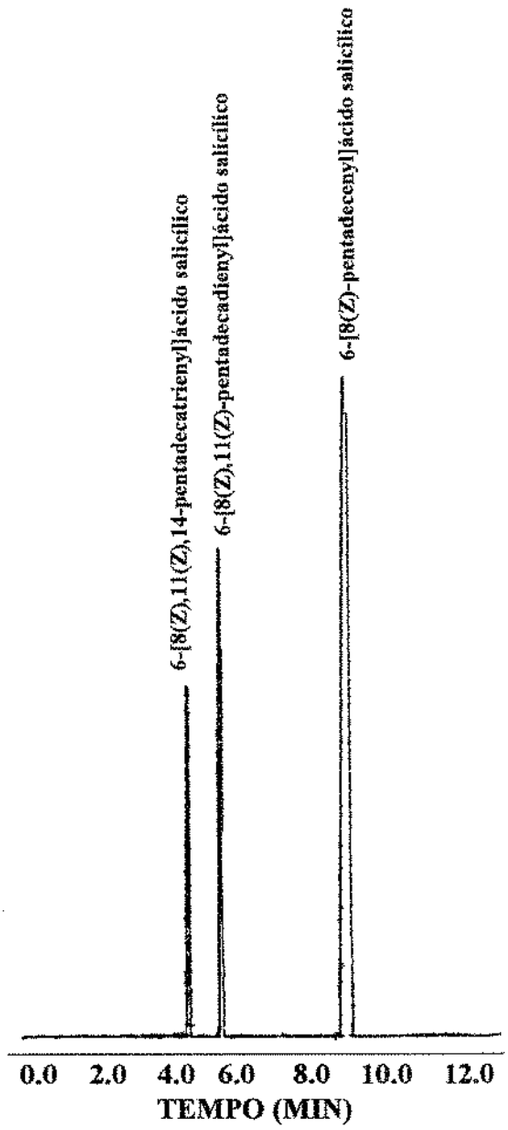


Figura 22. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no primeiro estágio de maturação.

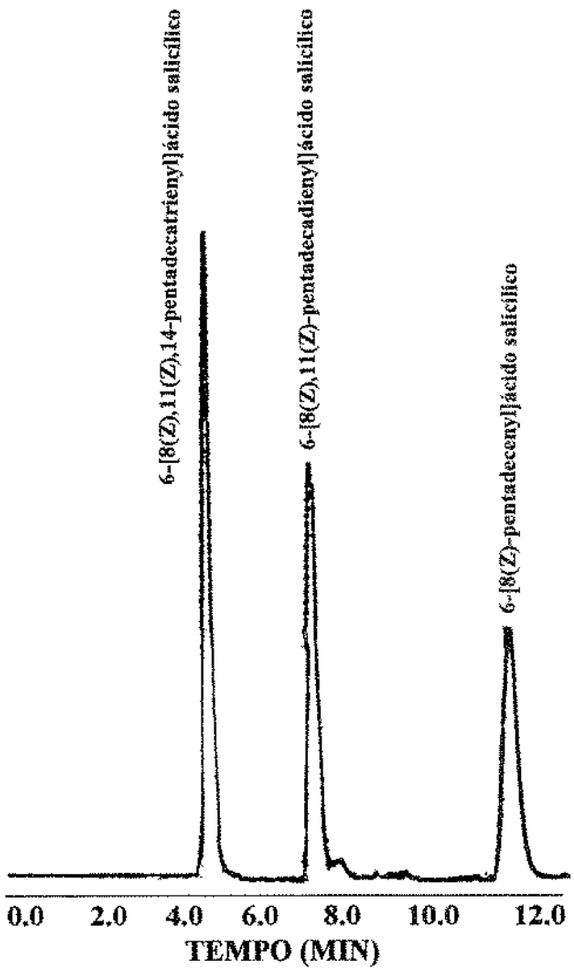


Figura 23. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no segundo estágio de maturação.

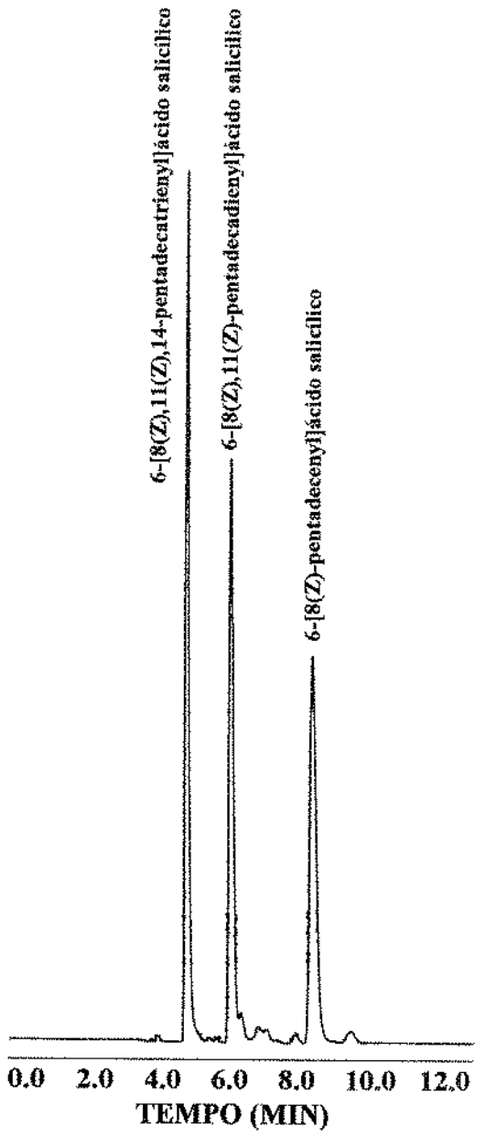


Figura 24. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no terceiro estágio de maturação.

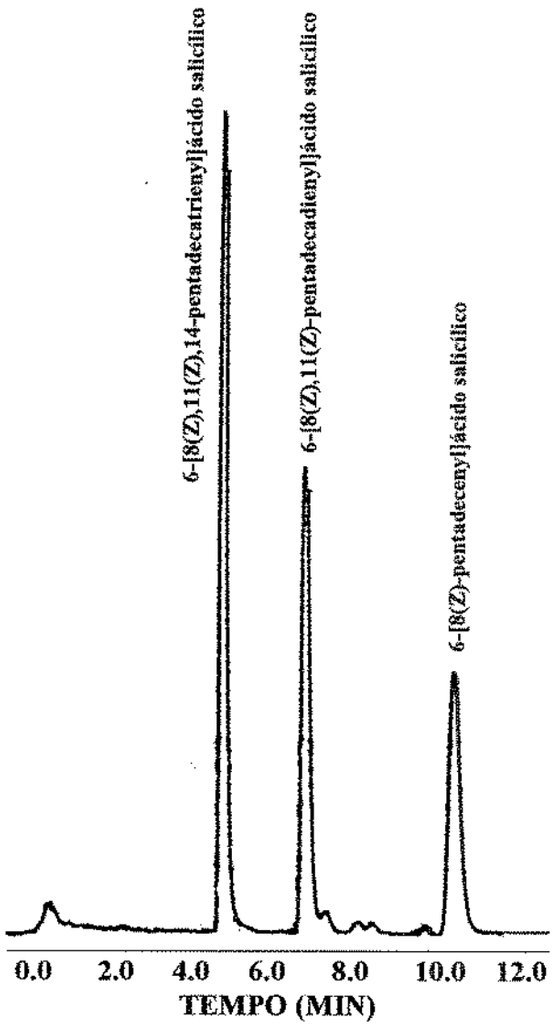


Figura 25. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no quarto estágio de maturação.

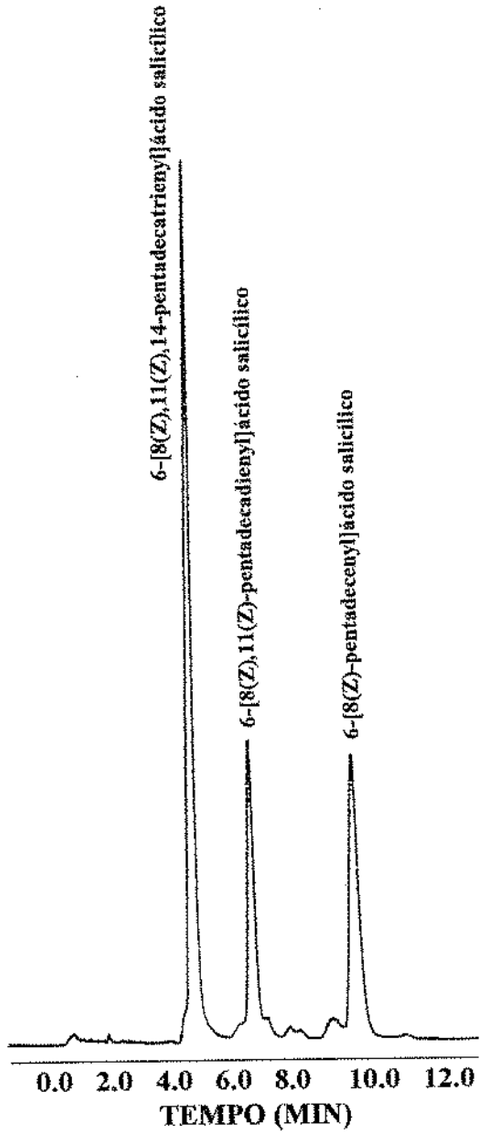


Figura 26. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-76 no quinto estágio de maturação.

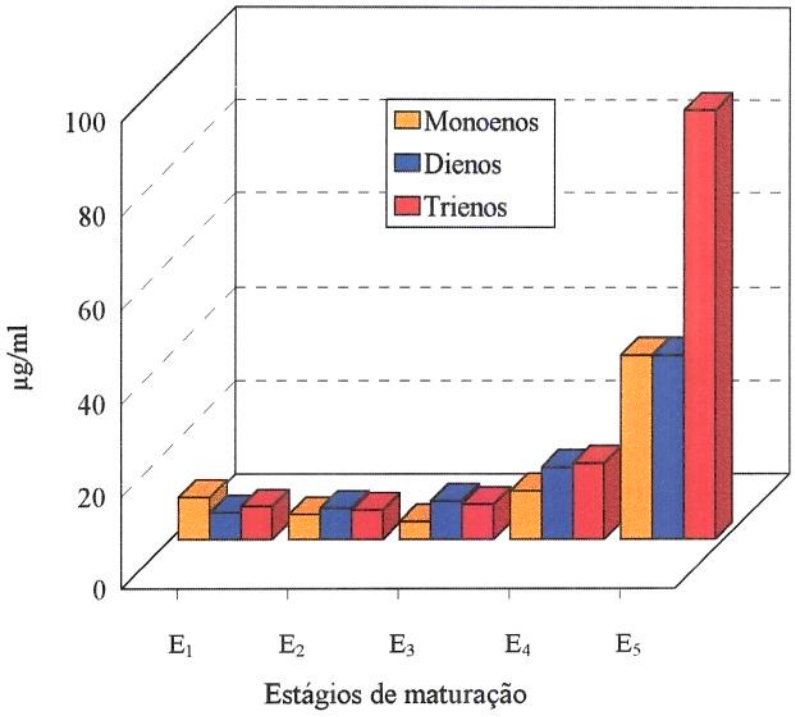


Figura 27. Concentração absoluta dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) dos extratos etílicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5).

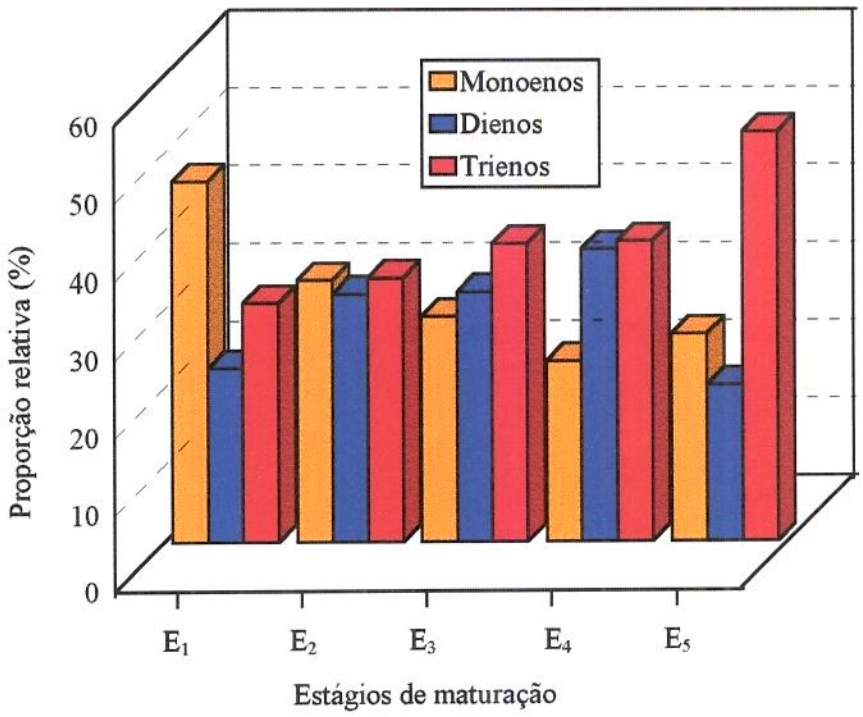


Figura 28. Proporção relativa dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) dos extratos etílicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 em cinco estágios de maturação (E_1, E_2, E_3, E_4 e E_5).

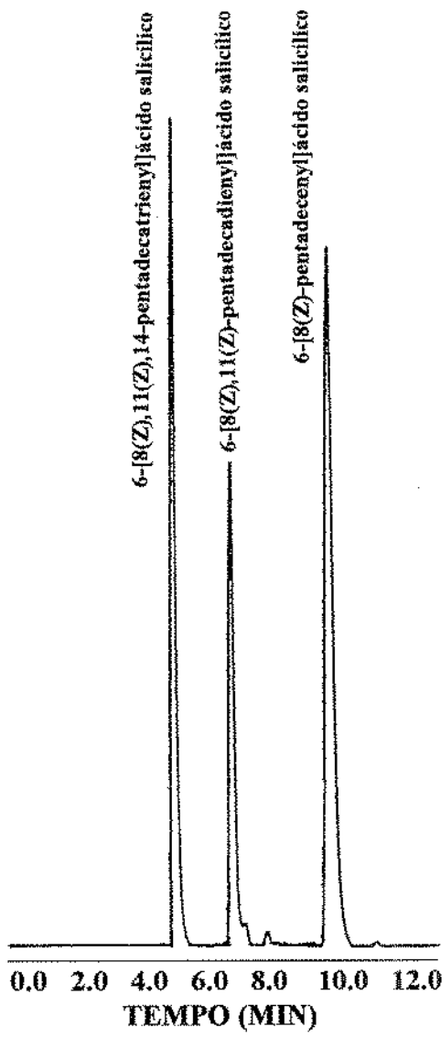


Figura 29. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no primeiro estágio de maturação.

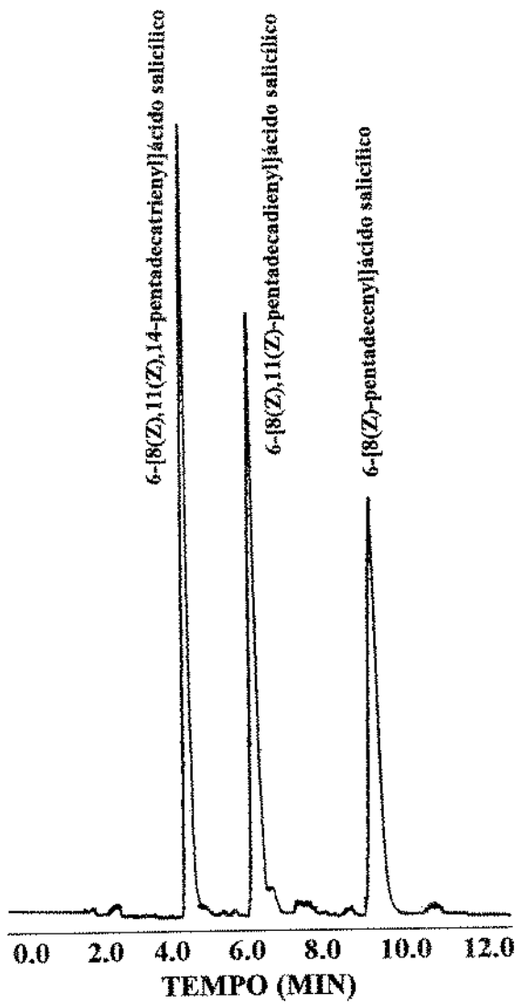


Figura 30. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no segundo estágio de maturação.

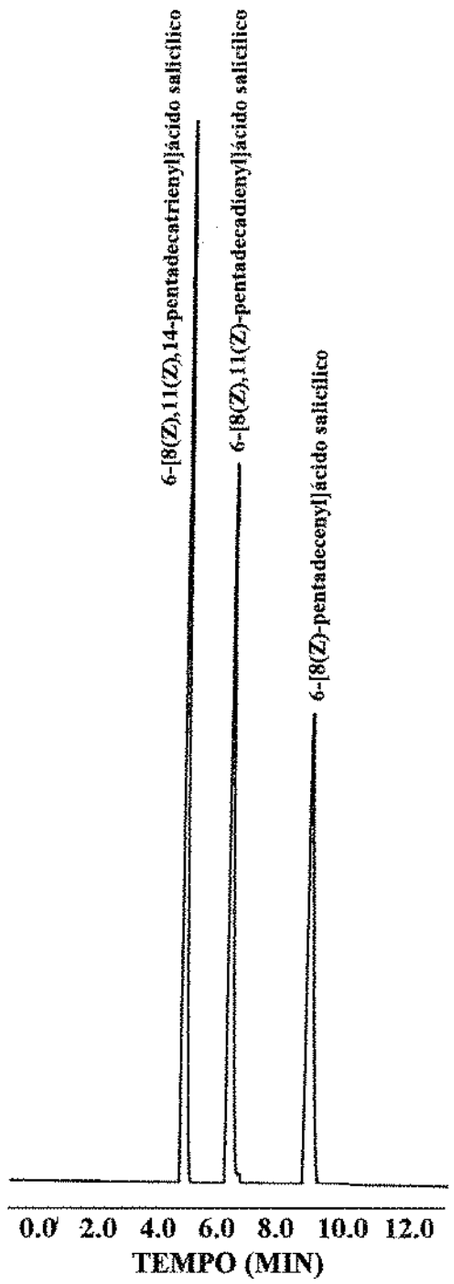


Figura 31. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no terceiro estágio de maturação.

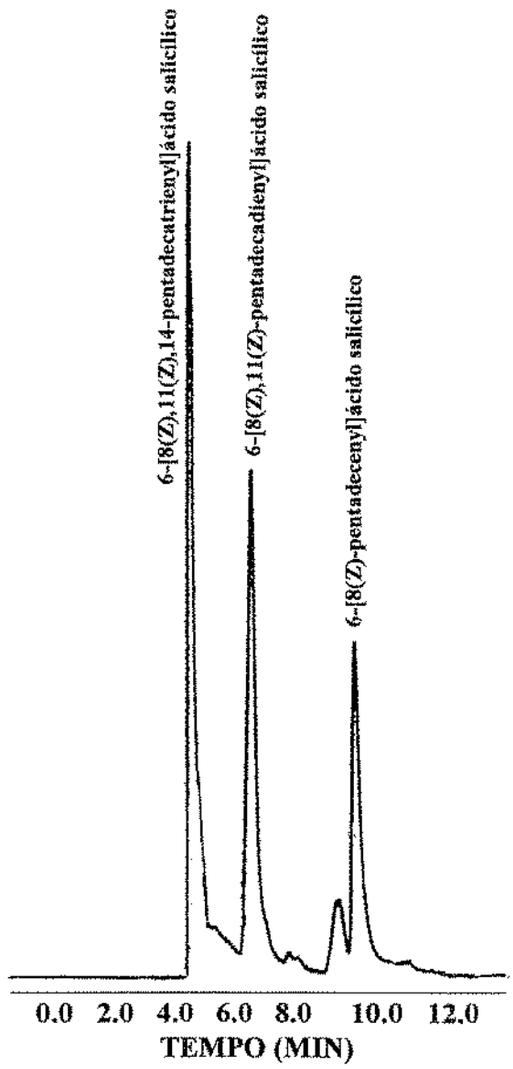


Figura 32. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no quarto estágio de maturação.

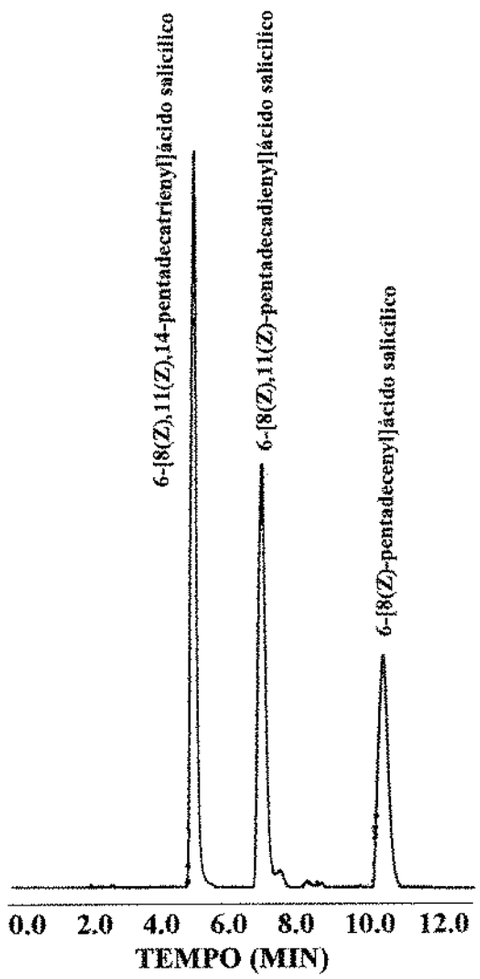


Figura 33. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos ácidos anacárdicos do CNSL extraído com solvente do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no quinto estágio de maturação.

5.2.6. Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos do CNSL

5.2.6.1. Identificação por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas

A ordem de eluição dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju em cromatografia gasosa obtido de acordo com o ítem 4.2.13.2. depende da polaridade da fase líquida na coluna. Esta ordem auxiliou a identificação dos ácidos anacárdicos no óleo da casca da castanha de caju, pois não se dispunha de padrões autênticos como ilustra a Figura 34.

De acordo com observações de GELLERMAN & SCHLENK (1968), foi verificado que não somente o número de duplas ligações, mas também a posição da dupla ligação influenciou a ordem de eluição dos ácidos anacárdicos na coluna Carbowax 20M. Em colunas polares, tais como Carbowax 20M, os ácidos insaturados emergem após os saturados de mesmo comprimento de cadeia.

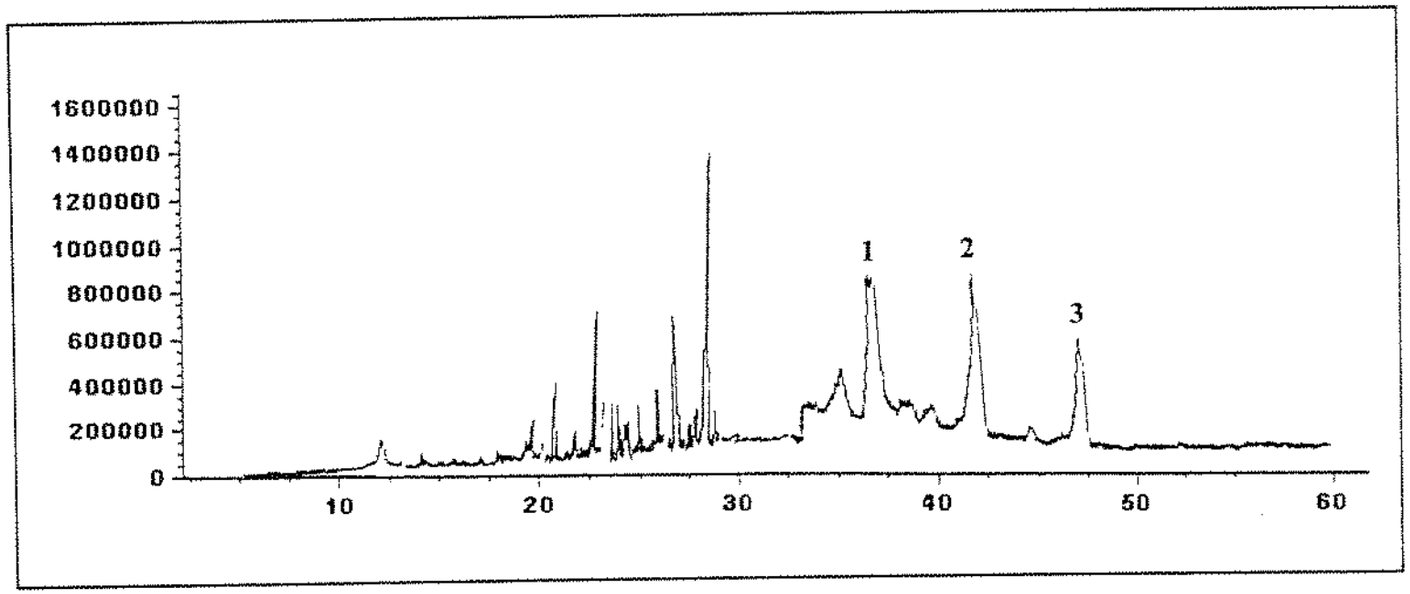


Figura 34. Cromatograma de ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos. Para identificação dos picos (Pico 1=Peso molecular 374; Pico 2= Peso molecular 372 e Pico 3= Peso molecular 370).

Neste trabalho, o estudo do comportamento de eluição, em colunas Carbowax 20M (polar), dos ácidos anacárdicos do CNSL, junto com os resultados relatados na literatura, usando as mesmas colunas ou similares, contribuiu para a identificação dos ésteres metílicos dos ácidos anacárdicos presentes nas amostras de CNSL.

A Figura 35 apresenta o éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z)-pentadecenyl]ácido salicílico $C_{15:1}$, (pico 1), de peso molecular 374, analisado por cromatografia gasosa acoplada a detetor seletivo de massas.

A Figura 36 apresenta o espectro de massa do éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienil] ácido salicílico, (pico 2), de peso molecular 372, analisado por cromatografia gasosa acoplado a detetor seletivo de massas.

A Figura 37 apresenta o éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienil] ácido salicílico, (pico 3), de peso molecular 370, analisado por cromatografia gasosa acoplado a detetor seletivo de massas.

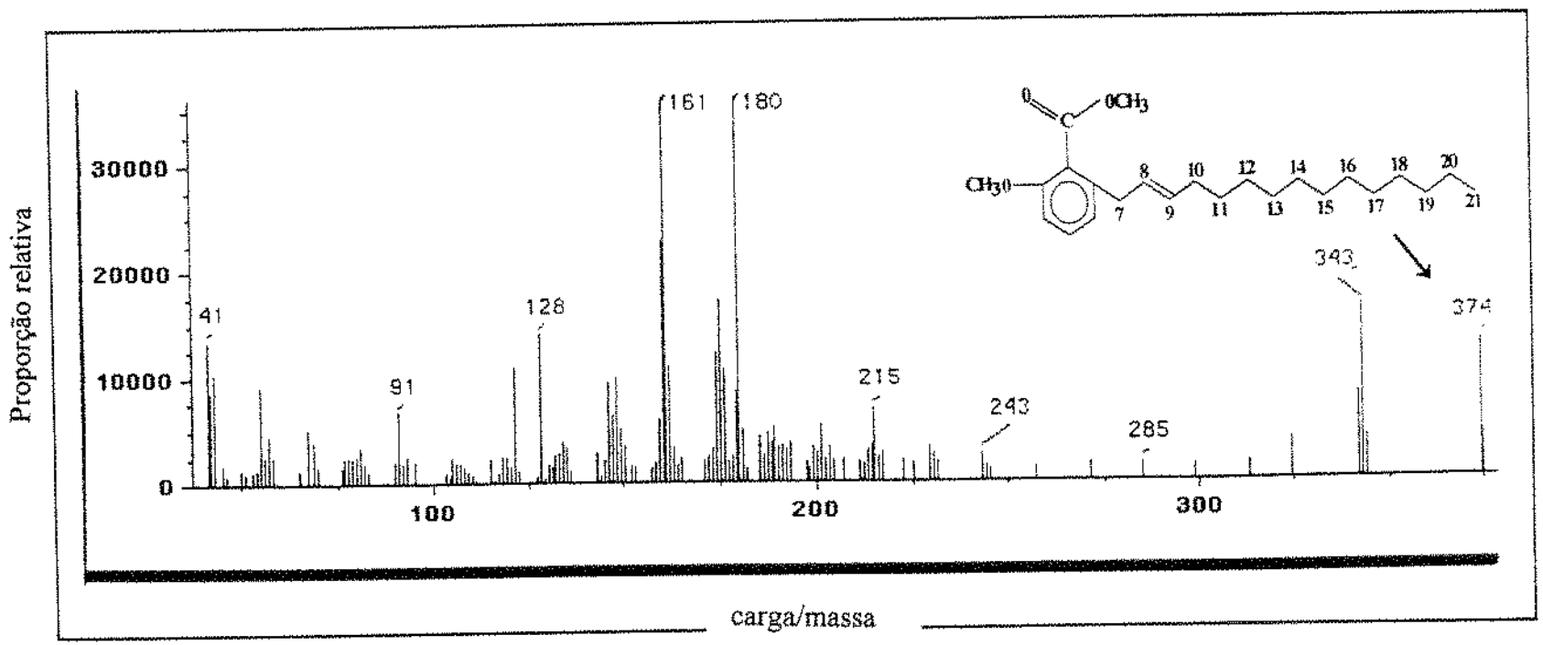


Figura. 35. Espectro de massas do pico 1, de peso molecular 374 (éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z)-pentadecenil] ácido salicílico.

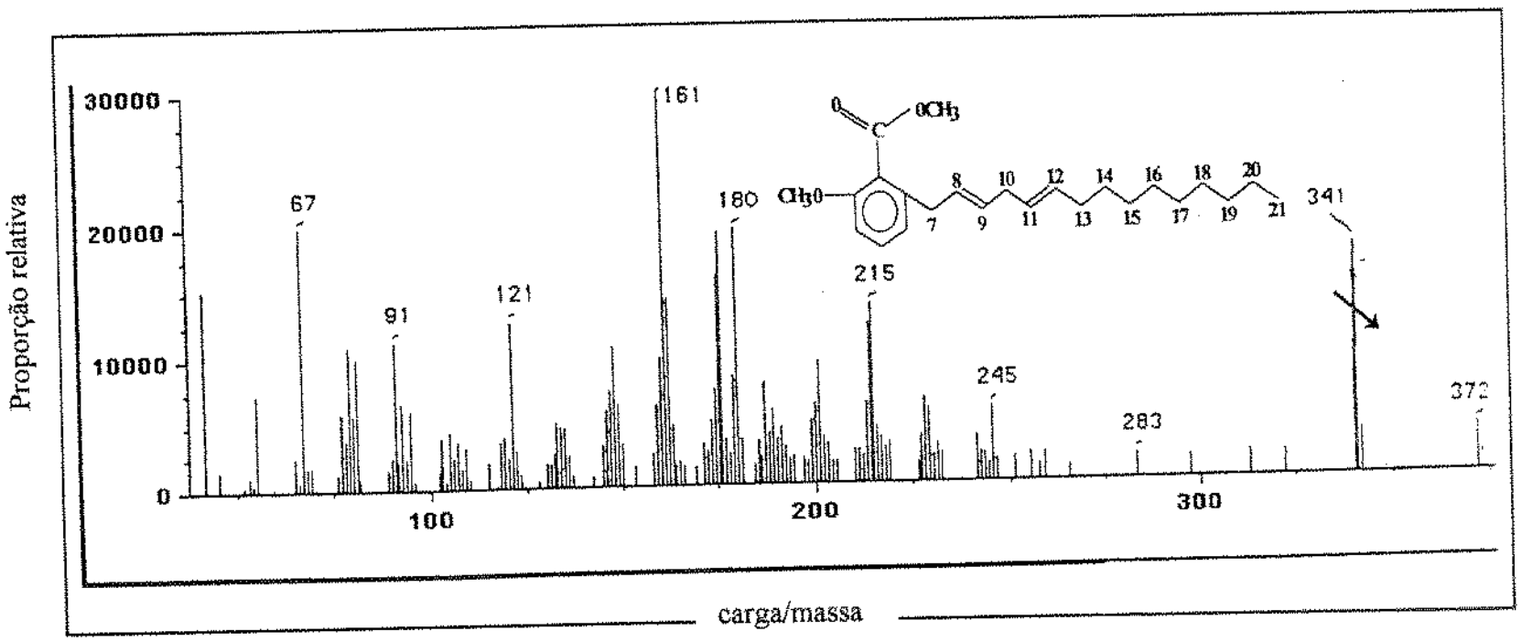


Figura 36. Espectro de massas do pico 2, de peso molecular 372 (éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienil] ácido salicílico.

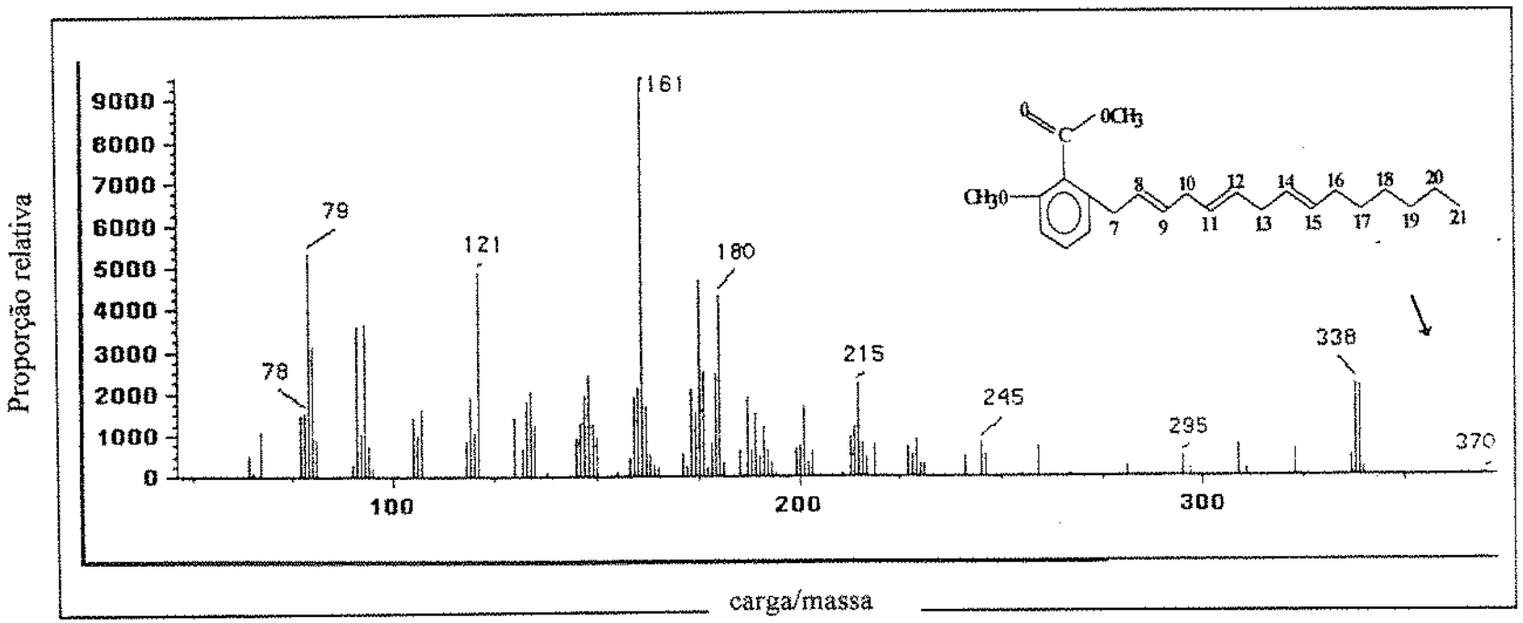


Figura 37. Espectro de massas do pico 3, de peso molecular 370 (éster metílico do ácido anacárdico 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienil] ácido salicílico.

A espectrometria de massa foi uma técnica muito útil na identificação conclusiva dos ácidos anacárdicos 6-[8(Z)-pentadecenyl]ácido salicílico, 6-[8(Z),11 (Z)-pentadecadienyl]ácido salicílico e 6-[8(Z),11(Z),14-pentadecatrienyl]ácido salicílico, presentes nas amostras do óleo da casca da castanha de caju. Para isto, foi feito uso da coluna Carbowax HP20M acoplada a um espectrômetro de massas, permitindo assim, obter os espectros de massas dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) das amostras de CNSL, cujas razões de massas dos principais fragmentos estão apresentados nas Figuras 35, 36 e 37.

5.2.7. Atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju do clone CCP- 09 no quinto estágio de maturação, utilizando o teste espectrofotométrico e teste de antibiograma

Os resultados da análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos através do teste espectrofotométrico sobre *Streptococcus mutans* (bactéria Gram positiva), realizado de acordo com o ítem 4.2.16. estão apresentados nas Figuras 38, 39 e 40, verificando-se uma diminuição da turbidez do meio com o aumento da concentração dos ácidos anacárdicos Figuras 38 e 39, demonstrando, que houve uma inibição do crescimento microbiano, e portanto, uma diminuição no número de células/ml Figura 46. Segundo dados da literatura MUROI & KUBO (1993); os ácidos anacárdicos apresentam potente atividade antibacteriana sobre bactérias Gram positiva, principalmente *Streptococcus mutans*,

maior que em bactérias Gram negativas, de acordo com HIMEJIMA & KUBO (1991). Embora apenas uma linhagem de *Streptococcus mutans* tenha sido testada, é esperado que compostos ativos retenham atividade contra uma variedade de linhagens das espécies. Por outro lado, a possibilidade de resistência entre linhagens está sempre presente (MUROI & KUBO, 1993).

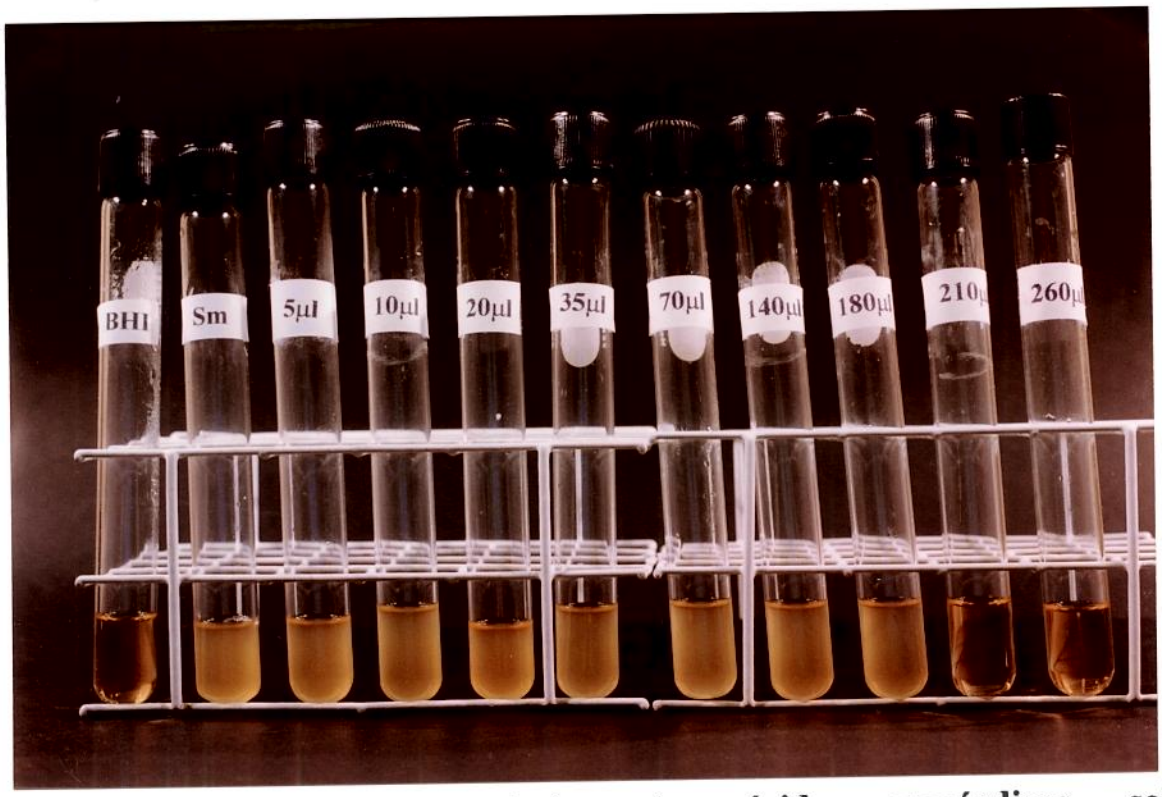


Figura 38. Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre a bactéria *Streptococcus mutans* (Sm):**5µl(28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06 µg/ml). (Sm) = Controle**

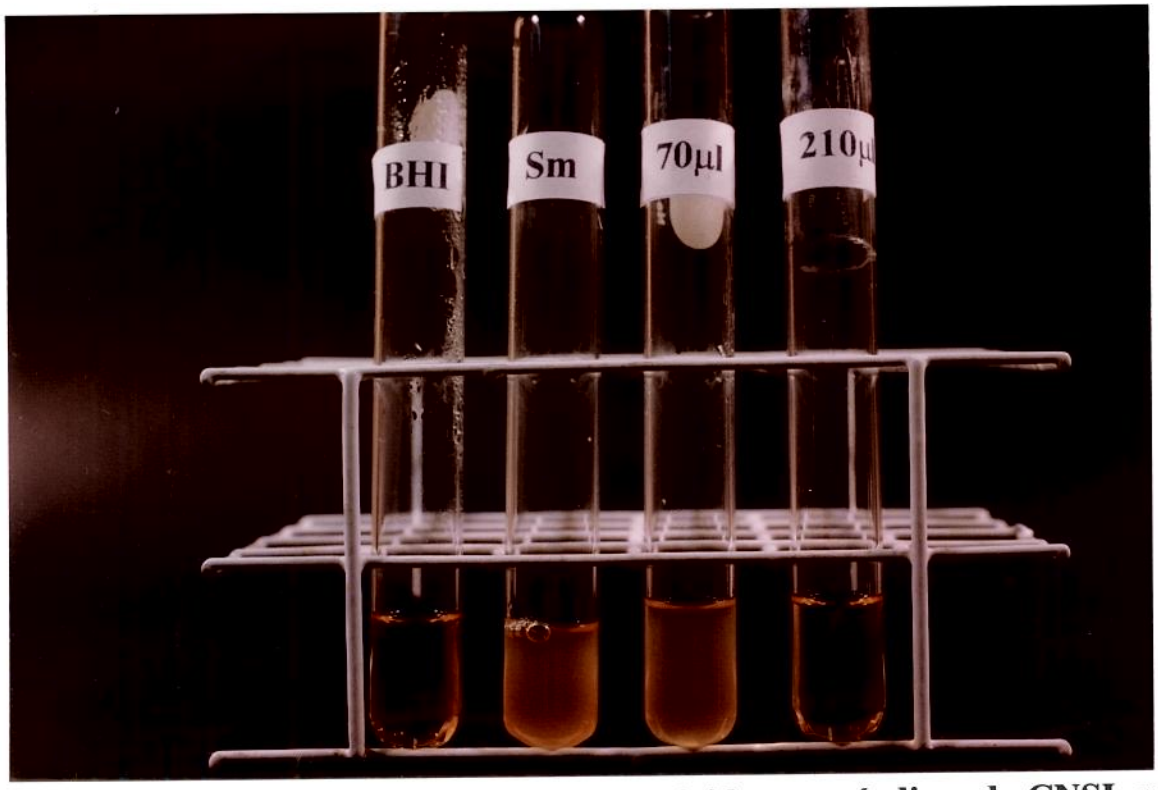


Figura 39. Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos do CNSL sobre a bactéria *Streptococcus mutans* (Sm): 70µl (400,63 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml). (Sm) = Controle

A Figura 40 apresenta os resultados da análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 quinto estágio de maturação sobre a bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans* utilizando o teste de antibiograma, de acordo com o ítem 4.2.18. A amostra de ácidos anacárdicos demonstra atividade antibacteriana pela formação de zona de inibição 3,5 mm para *Streptococcus mutans*.

FARAG et alii (1989) relataram que parece existir um relacionamento entre as estruturas químicas dos compostos presentes no óleo e a atividade antimicrobiana. Geralmente, a extensão do efeito inibitório dos óleos poderia ser atribuída a presença de núcleos aromáticos contendo grupos funcionais polares. A larga aplicação dos compostos fenóis e clorofenóis como desinfetantes é muito conhecido. Pesquisas realizadas têm demonstrado que o grupo OH -(hidroxila) é muito reativo e facilmente forma pontes de hidrogênio com o sítio ativo das enzimas. Inibindo as atividades metabólicas dos microrganismos.

Figura 40. Teste de antibiograma dos ácidos anacárdicos do CNSL sobre a bactéria *Streptococcus mutans*. **C (controle): 210µl (1201,90 µg/ml); 70µl (400,63µg/ml).**

A Figura 41 demonstra a atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL no quinto estágio de maturação sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* Gram positiva, realizado de acordo com o ítem 4.2.16. Os ácidos anacárdicos apresentam uma menor atividade inibitória no crescimento sobre esta bactéria quando comparada com o *Streptococcus mutans*, verificando-se uma maior turbidez do meio líquido quando comparado com a Figura 38 e 39, portanto maior número de células/ml, como ilustra a Figura 46. Estes resultados estão de acordo com os dados apresentados por HIMEJIMA & KUBO (1991).

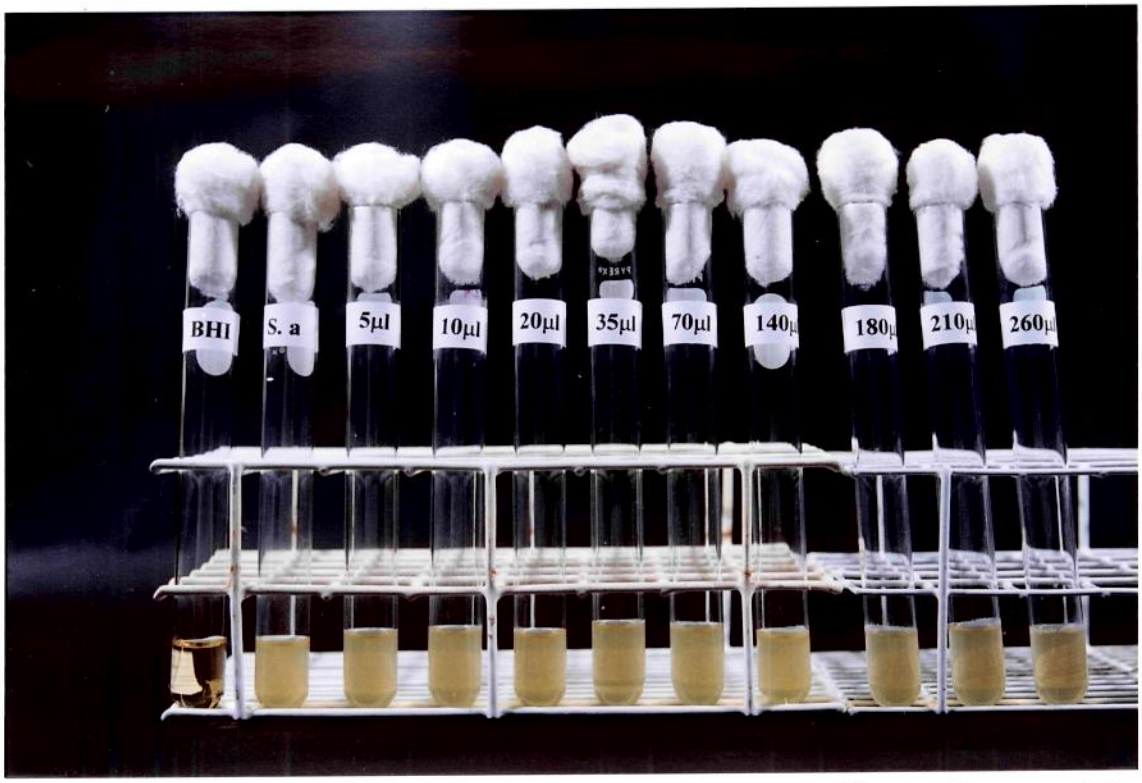


Figura 41. Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Staphylococcus aureus* (S.a); **5µl (28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml);70µl (400,63 µg/ml);140µl (801,27 µg/ml);180µl (1030,20µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06 µg/ml).**

S.a = Controle

Os resultados da análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos da amostra de óleo da casca da castanha de caju do clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no quinto estágio de maturação sobre as leveduras *Candida albicans*, *Candida utilis*, realizado de acordo com o ítem 4.2.16. estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 42 e 43. A susceptibilidade dos microrganismos aos ácidos anacárdicos foi determinada pelo método da diluição em tubos. O tubo da extrema esquerda é o controle e não contém ácidos anacárdicos. Após a incubação os resultados apresentados conforme observação das fotografias demonstram que o meio de cultura ficou turvo, portanto, observou-se que ocorreu fraca inibição no crescimento das leveduras conforme contagem do número de células.

De acordo com dados relatados na literatura por MUROI et alii (1993) e HIMEJIMA & KUBO (1991) os ácidos anacárdicos apresentam forte atividade antimicrobiana sobre as bactérias Gram positiva *Streptococcus mutans*, *Stapphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, porém fraca atividade contra os fungos.

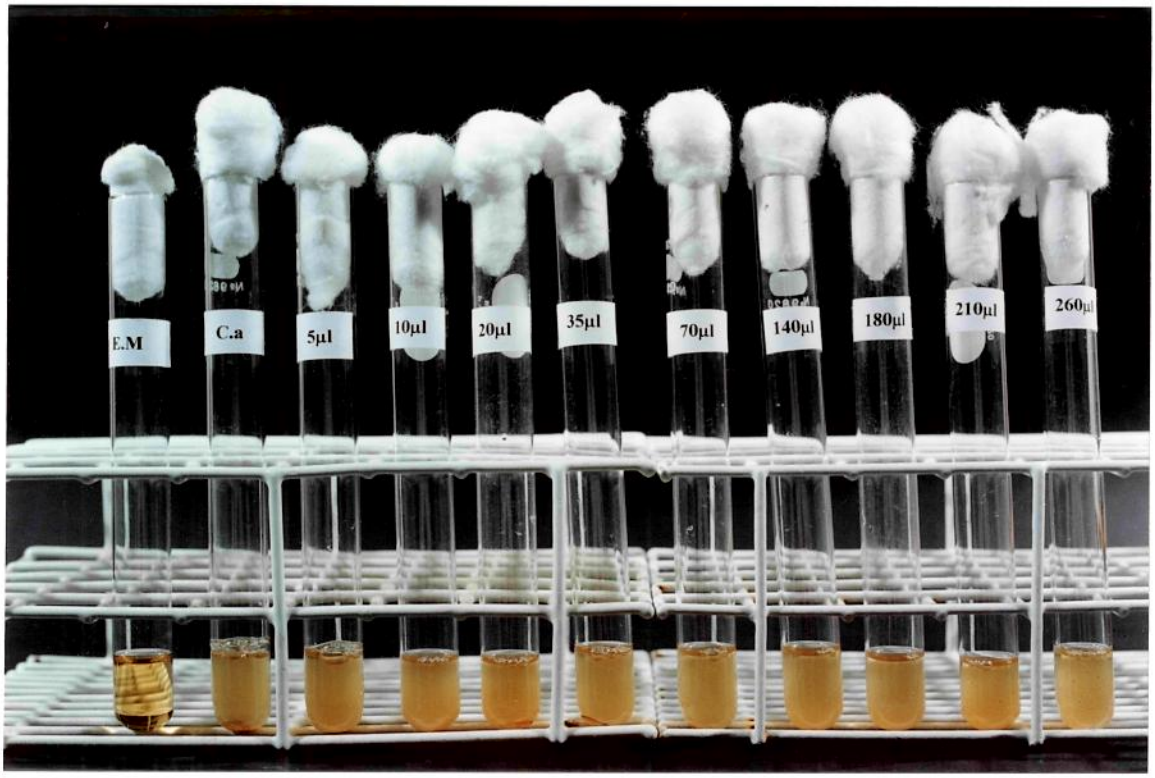


Figura 42. Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Candida albicans* **(*C.a*): 5µl (28,62 µg/ml);10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml);70µl (400,63 µg/ml);140µl(801,27 µg/ml);180µl(1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06 µg/ml).**

C.a = Controle

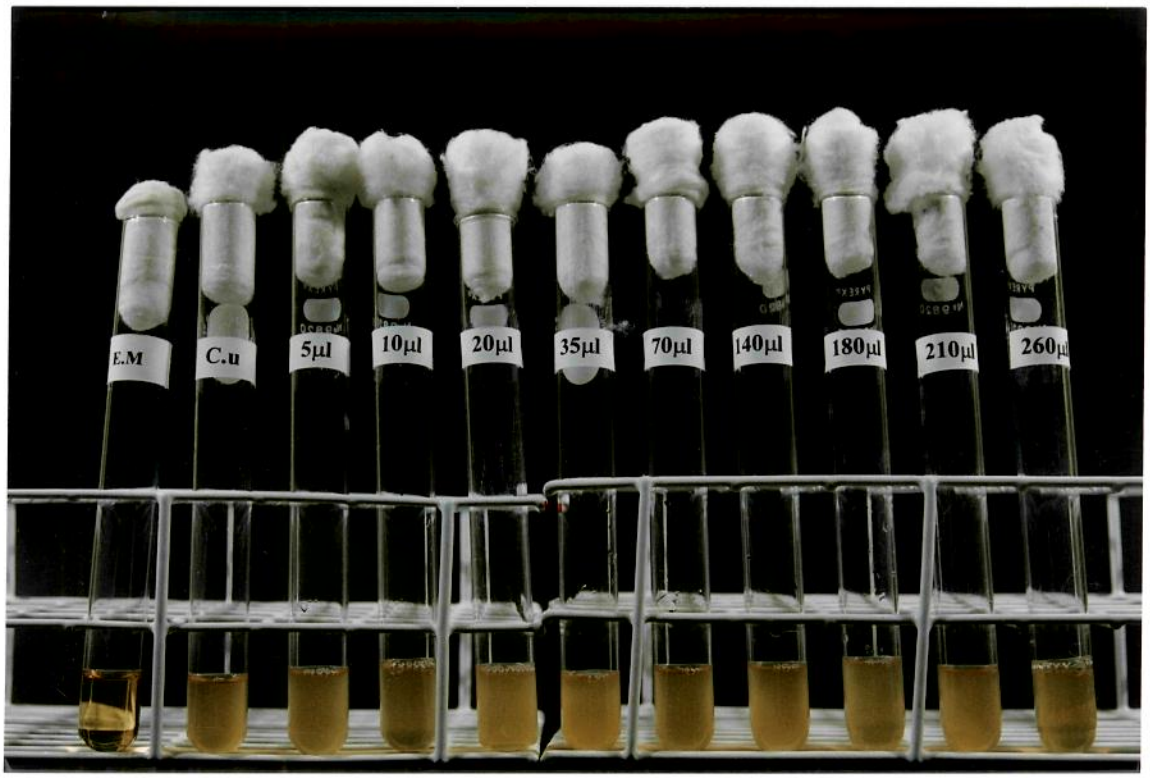


Figura 43. Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Candida utilis* *(C.u)*: **5µl (28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl(400,63 µg/ml); 140µl(801,27 µg/ml); 180µl (1030,20µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,0µg/ml).**

C.u = Controle

As Figuras 44 e 45 demonstram que os ácidos anacárdicos não apresentaram efeito inibitório sobre os fungos *Trichodermus sp* e *Aspergillus sp*, conforme observação a olho nú das fotografias não observou-se inibição em nenhuma das concentrações utilizadas e de acordo com o cálculo da matéria seca ilustrada na Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de matéria seca dos fungos *Trichodermus sp* **e** *Aspergillus sp.*

			Concentrações dos ácidos anacárdicos µg/ml								
Microrganismos	E.M	T	5µl	10µl	20µl	35µl	70µl	140µl	180µl	210µl	260µl
T. sp *M.S. (%)	2,6	2,5	2,7	2,6	2,6	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
A. sp *M.S. (%)	2,5	2,4	2,5	2,6	2,6	2,6	2,5	2,5	2,6	2,6	2,6

T.sp=Trichodermus sp; *A.sp=Aspergillus sp*: 5µl(28,62 µg/ml);10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl (400,63 µg/ml);140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06 µg/ml).

E.M = Extrato de Malte, Controle

T = Teste

*M.S. = Matéria seca

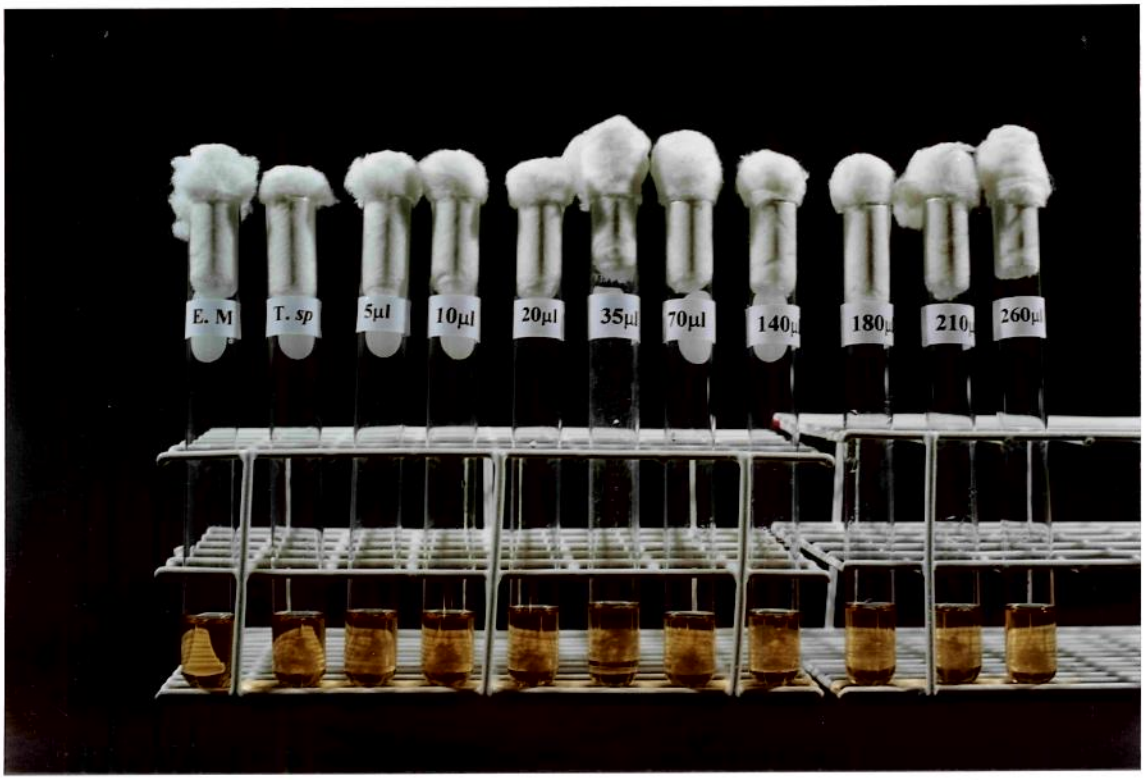


Figura 44. Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Trichodermus sp* (*T. sp*): **5µl (28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml);70µl (400,63 µg/ml);140µl (801,27 µg/ml);180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06 µg/ml).**

T. sp = Controle

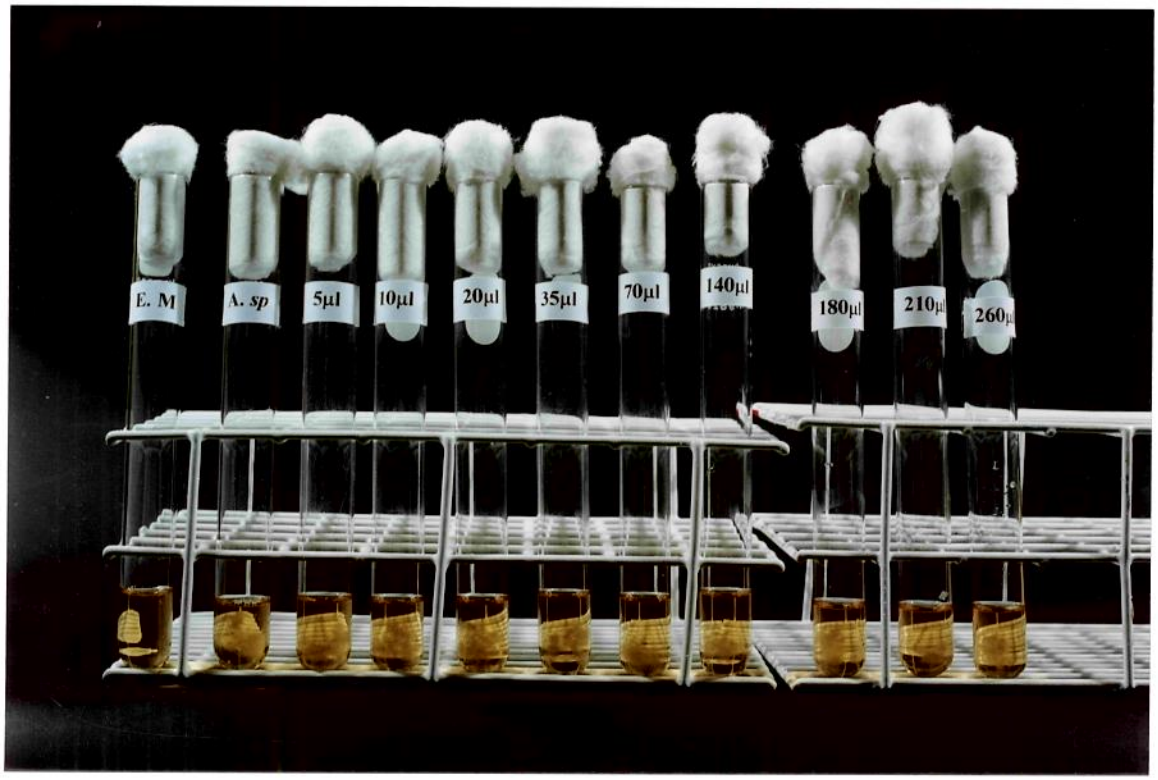


Figura 45. Teste espectrofotométrico dos ácidos anacárdicos sobre *Aspergillus sp* (*A*.sp): **5µl (28,62 µg/ml);10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml); 70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06µg/ml).**

A.sp = Controle

A Figura 46 ilustra os resultados da análise da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos das amostras de CNSL do clone CCP-09 no quinto estágio de maturação em concentrações crescentes do composto teste. A amostra de ácidos anacárdicos selecionada demonstrou ter atividade antimicrobiana mais potente sobre a bactéria *Streptococcus mutans* em relação a bactéria *Staphylococcus aureus* e as leveduras *Candida albicans* e *Candida utilis*. Após a incubação, observou-se que o crescimento do *Streptococcus mutans* foi inibido por 1200μg e 1500μg dos ácidos anacárdicos ocorrendo uma maior diminuição no número de células/ml de *Streptoccocus mutans* no meio em caldo quando comparado com *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida utilis*, respectivamente.

Através da Figura 46 podemos verificar que a atividade inibitória dos ácidos anacárdicos sobre *S. mutans* foi aproximadamente duas vezes superior em relação ao *S. aureus* e duas a três vezes maior sobre *C. albicans* e *C. utilis*, em cada uma dessas leveduras em particular.

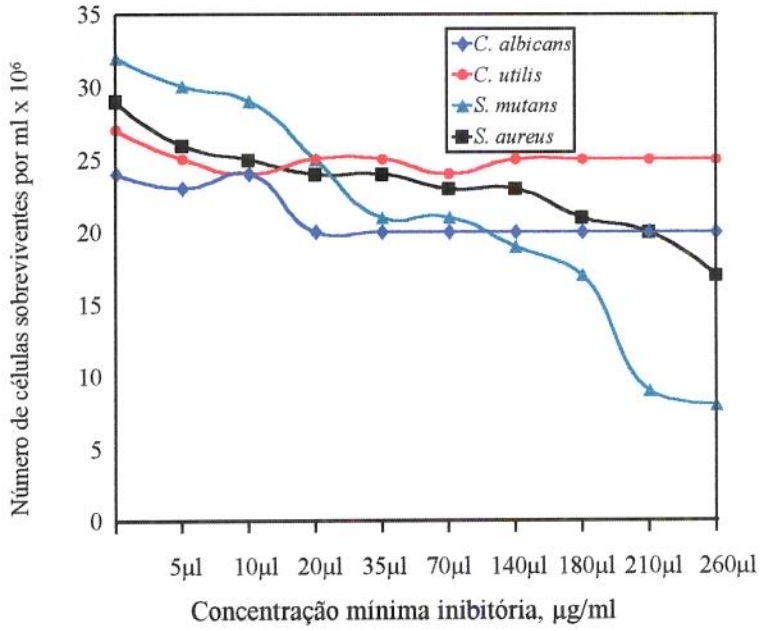


Figura 46. Atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do CNSL sobre *Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, Candida albicans e Candida utilis.* **5µl (28,62 µg/ml); 10µl (57,23 µg/ml); 20µl (114,46 µg/ml); 35µl (200,32 µg/ml);70µl (400,63 µg/ml); 140µl (801,27 µg/ml); 180µl (1030,20 µg/ml); 210µl (1201,90 µg/ml); 260µl (1488,06µg/ml).**

6. Conclusões

1. Os extratos etílicos do óleo da casca da castanha de caju apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas com relação ao teor dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) nos cinco estágios de maturação. As amostras de extratos etílicos dos clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 e CCP-76 e cajueiro comum apresentaram maiores teores de ácidos anacárdicos, quando comparadas com as amostras de clones de cajueiro-anão-precoce CCP-1001 e CCP-06.

2. A determinação dos ácidos anacárdicos nos clones de cajueiro CCP-76 e CCP-09 por HPTLC com detecção a 254 nm demonstrou diferenças no teor dos ácidos anacárdicos quando comparados os estágios de maturação. A concentração de ácidos anacárdicos no primeiro estágio de maturação dos clones CCP-76 e CCP-09 foi muito baixa. Assim, para uma determinação mais precisa foi necessário a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3. As análises dos ácidos anacárdicos dos clones CCP-76 e CCP-09 no primeiro estágio de maturação (12 dias) por HPLC demonstraram maiores teores dos ácidos anacárdicos monoenos, quando comparados com os estágios segundo, terceiro, quarto e quinto que apresentaram maiores teores dos ácidos anacárdicos (dienos e trienos). O quinto estágio do clone CCP-09 apresentou 3 vêzes mais ácido anacárdico trieno, como também o teor do ácido anacárdico dieno foi mais elevado, enquanto que o ácido anacárdico monoeno foi duas vêzes maior quando comparados com o clone CCP-76 no quinto estágio de maturação.

4. A amostra de clone de cajueiro-anão-precoce CCP-09 no quinto estágio de maturação selecionada (60 dias) apresentou atividade antimicrobiana mais acentuada sobre *Streptococcus mutans*, conforme teste espectrofotométrico e teste de antibiograma, quando comparado com *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Trichodermus sp* e *Aspergillus sp.*

Conclui-se a partir dos resultados deste estudo que o óleo da casca da castanha de caju é uma fonte potencial para obtenção dos ácidos anacárdicos. Por outro lado estes ácidos biodegradáveis são obtidos de fontes naturais e renováveis e apresentam propriedades terapêuticas muito importantes: antitumor no tratamento de câncer de mama, antimicrobiana, moluscicida, antiacne e inibidores de tirosinase, apresentando portanto uma grande aplicação para as indústrias de alimentos e farmacêutica, como por exemplo: ingrediente na formulação de alimentos, bebidas e produtos de confeitaria, pasta dentária como também produtos para higiene bucal. Deve-se ressaltar ainda que a produção comercial deste óleo para obtenção dos ácidos anacárdicos, poderia ser apresentada como uma fonte de divisa para os Estados do Nordeste produtores de caju, possibilitando assim mais uma opção no aproveitamento do caju, como também um estímulo para os pequenos produtores da região do Nordeste brasileiro.

7. Sugestões para trabalhos futuros:

Considerando que foram estudados dois clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação, tendo em vista na oportunidade os outros clones não estarem disponíveis, sugiro que sejam estudados outros clones de cajueiro.

Considerando que foi realizada a extração do óleo da casca da castanha de caju utilizando solventes, sugiro que seja utilizada a extração do CNSL utilizando dióxido de carbono supercrítico, embora a produção de óleo seja um pouco menor, no entanto iremos obter um produto de melhor qualidade, com diferentes possibilidades de aplicações.

Estudar a separação dos ácidos anacárdicos (monoenos, dienos e trienos) através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa, e analisar individualmente cada ácido anacárdico com relação a atividade antimicrobiana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEJANDRO, X.D.S. Cromatografia en papel y en capa delgada: cromatografia en capa delgada; Monterrey, México: Editora Eva V. Chesneau, 1975. 75 páginas.

ALMEIDA-DE, J.I.L.; BARROS, L.M.; LOPES, J.G.V.; ARAÚJO-DE, F.E. Estudo sobre o crescimento do fruto e pseudofruto do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) do tipo anão precoce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.9, n.3, p.21-30, 1987.

ASHOO, S.H.; KNOX, J.M. Determination of organic acids in foods high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography**, v.299, p.288-292, 1982.

AYAZ, F.A.; KADROGLU, A. Changes in phenolic acid contents of *Diospyros lotus* L. during fruit development. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.45, p.2539-2541, 1997.

BARROS, L. M.; PIMENTEL, C. R. M.; CORREA, M. P. F.; MESQUITA, A.L.M. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro-anão-precoce**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1993, 65 p. (EMBRAPA- CNPAT, Circular Técnica, 1).

BEAN, N.H.; GRIFFIN, P. M.; GOULDING, J.S.; IVEY, C.B. Food borne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. **Journal of Food Protection**, v.53, n.8, p.711-728, 1990.

CAI, LINING.; WU, C.D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal Natural Products**, v.59, n.10, p.987-990, 1996.

CASTEELE, K. V.; GEIGER, H. & SUMERE, C. F. V. Separation of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography**, v.240, p.81-94, 1982.

DOMÍNGUEZ, S.X.A. Cromatografia en papel y en capa delgada. ed. Eva V. Chesnau. Monterrey, 1975. 75p.

DZIEZAK, J.D. Agents antimicrobial. **Food Technology**, v.40, p.104-111, 1986.

EJECHI, B.O. Growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* by crude extractives of *Mansonia altísima* timber sawdust. **Current Microbiology**, v.32, p.297-298, 1996.

FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; HEWEDI, F.M.; EL-BAROTY, G.S.A. Antimicrobial activity of some egyptian spice essencial oils. **Journal of Food Protection,** v.52, n.9, p. 665-667, 1989.

GELLERMAN, J.L; SCHLENK, H. Methods for isolation and determination of anacardic acids. **Analytical Chemistry**, v.40, n.4, p.739-743, 1968.

GELLERMAN, J.L; WALSH, N.J.; WERNER, N.K.; SCHLENK, H. Antimicrobial effects of anacardic acids. **Cannadian Journal of Microbiology**, v.15, p.1219-1223, 1969.

GRAZZINI, R.; HESK, D.; HEININGER, E.; HILDENBRANDT, G.; REDDY, C.C.; COC-FOSTER, D.; MEDFORD, J.; CRAIG, R.; MUMMA, O. Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.176, n.2, 1991.

HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiological Reviews**, v.44, n.2, p.331-384, 1980.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antimicrobial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.39, p.418-421, 1991.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antimicrobial agents from *Licaria puchuri*-major and their synergistic effect with polygodial. **Journal of Natural Products**, v.55, n.5, p.620-625, 1992.

HIMEJIMA, M.; HOBSON, K.R.; OTAUKA, T.; WOOD, D.L.; KUBO, I. Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism against microbial invasion. Journal Chem. Ecol, v.18, p. 1809-1818, 1992.

IZZO, P.T.; DAWSON, C.R. Cashew nut shell liquid. VI. The olefinic nature of anacardic acid. **Journal Organic. Chemistry**, v.14, p.1039-1047, 1949.

IREMIREN, G.O. Fruit Growth and development in cashew (*Anacardium occidentale* Linn.). **In: Jounal of plantation crops,** v.12, p.81-85, 1984.

JOHSON, L.E.; CORT, W.M. Comparison of alternative antioxidant to BHA in citrus oil. **Beverages**, v.148, p.10-11 Y. v.1,p.49 10-12, 14, 1985.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.43, n.11, p.2839-2845, 1995.

KUBO, I.; KOMATSU, S.; OCHI, M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. **Journal Agriculture Food Chemistry,** v.34, n.6, p.970-973, 1986.

KUBO, I.; KIM, M.; NAYA, K.; KOMATSU, S.; YAMAGIRA, Y.; OHASHI, K.; SAKAMOTI, Y.; HIRAKAWA, S.; KAMIKAWA, T. Prostaglandin synthetase inhibitors from the African medicinal plant *Ozoroa mucronata*. **Chemistry Letters**, p.1101-1104, 1987.

KUBO, I.; HIMEJIMA, M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microrganisms. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.39, p.2290-2292, 1991.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.40, n.2, p.245-248, 1992.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Combination effects of antifungal nagilactones against *Candida albicans* and two other fungi with phenylpropanoids. **Journal of Natural Products,** v.56, n.2, p.220-226, 1992.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.41, n.6, p.1016-1019, 1993.

KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Naturally ocurring antiacne agents. **Jounal of Nature Products,** v.57, n.1, p.9-17, 1994.

KUBO, I.; OCHI, M.; VIEIRA, P.C.; KOMATSU, S. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 41, p. 1012-1015, 1993.

KUBO, I.; HORI-KINST, I.; YOKOKAWA, Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. **Journal of Natural Products**, v.57, n.4, p.543-551, 1994.

KUO, S.C.; TENG, C.M.; LEE, L.G.; CHIU, T.H.; WU, T.S.; HUANG, S.C.; WU, J.B.; SHIEH, T.Y.; CHANG, R.J.; CHOU, T.C. 6-Pentadecylsalicylic acid; An antithrombin component isolated from the stem of *Rhus semialata* var. *roxburghii*. **Planta Medical**, v.57, p.247-249, 1991.

LI, X.C.; CAI, L.; WU, C.D. Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens. **Phytochemistry**, v.46, p. 97-102, 1997.

MENESES, J.B.; ALVES, R.E. Fisiologia e tecnologia pós-colheita do pedúnculo do caju. EMBRAPA-CNPAT, 20p, 1995.

MUROI, I.; KUBO, I. Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 41, n. 10, p.1780-1783, 1993.

MUROI, H.; KUBO, A.; KUBO, I. Antimicrobial activity of cashew apple flavor compounds. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.41, n.7, p.1106-1109, 1993.

MURTHY, R.G.K.; SIVA SAMBAN, M.A.; Identification of some naturally ocurring alkyl-substituted phenols in cashew-nut shell liquid by chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**, v. 32, p. 519-528, 1968.

NAGABHUSHANA & K.S.; RAVINDRANATH, B. Efficient medium-scale chromatographic group separation of anacardic acids from solvent-extracted cashew nut (*Anacardium occidentale*) shell liquid. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 43, no.9, p. 2381-2383, 1995.

OLIVEIRA, V.H. de.; PARENTE, J. I. G.; SAUNDEERS, L. C.U. Irrigação em cajueiro-anão-precoce: uma perspectiva promissora. **Revista Frutar**, Fortaleza, v. 1, n.1, p. 4-5, 1995.

PARENTE, J.I.G.; OLIVEIRA, V.H. de. Manejo da cultura do cajueiro. In: ARAÚJO, J.P.P. & SILVA, V.V. (Org.). Cajucultura: modernas técnicas de produção, Fortaleza EMBRAPA/ CNPAT, 1995, p. 203-247.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Controle por agentes químicos. In: PELCAZR, M. Microbiologia: 1981. Brasil: McGraw-Hill do Brasil, 1981. v.2, p.493-517.

SAKANAKA, S.; KIM, M.; TANIGUCHI, M.; YAMAMOTO, T. Antibacterial substances in Japanese tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. **Agriculture Biological Chemistry**, v.53, p.2307-2311, 1989.

SERVIS, R.E.; KOSAK, A.I..; TSCHECHE, R.F.E.; FEHLHABER, H.W. Peptide alkaloids from *Ceanothus americanus* L (Rhamnaceae). **Journal of the American Chemical Society,** 1991 (20), 5619.

SENGUPTA, P.; SEN, A. R.; GHOSHDASTIDAR, N.; ROY, B.R. Detection of cashew nut shells in coffee, tea, and chicory. **Journal of the A.O.A.C**, v. 57, n.3, p.761-762, 1974.

SHOBHA, S.V.; RAVINDRANATH, B. Spercritical carbon dioxide and solvent extraction of the phenolic lipids of cashew nut (*Anacardium occidentale*) shells. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 39, no. 12, p. 2214-2217, 1991.

SHOBHA, S.V.; KRISHNASWAMY, P.R.; RAVINDRANATH, B. Phenolic lipid composition during development of cashew. **Phytochemistry**, v.31, n.7, p.2295-2297, 1992.

SHOBHA, S.V.; RAMADOSS, C.S.; RAVINDRANATH, B. Inhibition of soybean lipoxigenase-1 by anacardic acids, cardols, and cardanols. **Journal of Natural Products**, v.57, n.12, p.1755-1757, 1994.

SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.43, n.9, p.2384-2388, 1995.

SONDHI, S.P.; PRUTHI, J.S. Effect of variety, strain and stage of maturity on the quality of cashew apples. **Indian Journal of Horticulture**, v.7, n.3, p.270-275, 1980.

SUBBA, M.S.; SOUMITHRI, T.C.; RAO, S.R. Antimicrobial action of citrus oils. **Journal of Food Science**, v.32, p.225-227, 1967

TANIGUCHI, M.; SATOMURA, Y. Structure and Physiological activity of carbostyril compounds. **Agriculture Biological Chemistry,** v.36, n.12, p.2169-2175, 1972.

TOSCHI, T.G.; CABONI, M.F.; PENAZZI, G.; LERCKER, G.; CAPELLA, P. A study on cashew nut oil composition. **Journal Americal Oil Chemistry Society**, v.70, n.10, p.1017-1020, 1993.

TYMAN, J.H.P. Non-isoprenoid long chain phenols. **Chemistry Society Review**, v.8, p.499-537, 1979

TYMAN, J.H.P. Cultivation, processing and utilization of the cashew. **Chem. Ind**.(London), p. 59-62, 1980.

TYMAN, J.H.P.; TYCHOPOULOS, V.; CHAN, P. Quantitative analysis of the phenolic lipids in technical cashew nut-shell liquid, from *Anacardium occidentale*, by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography**, v.213, p.287-300, 1981.

TYMAN, J.H.P.; TYCHOPOULOS, V.; CHAN. P. XXV. Quantitative analysis of natural cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v 303, p.137-150, 1984.

TYMAN, J.H.P.; JOHNSON, R.A.; MUIR, M.; ROKHGAR, R. The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium occidentale*). **Journal Americal Oil Chemistry Society**, v.66, n.4, p.553-557, 1989.

WUNNACHIT, W.; SEDGLEY, M. Floral structure and phenology of cashew in relation to yield. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.67, n.6, p.769-777, 1992.

WURTZEN, G.P.; OLSEN, P.; POULSEN, E. The antioxidant butylated hydroxy toluene (BHT) A review of its toxicology and assessment of its safety in use. **Food Science Technology,** Abstract, v.18, p.18, 1986.

YAMAGIWA, Y.; OHASHI, K.; SAKAMOTO, Y.; HIRAKAWA, S.; KAMIKAWA, T.; KUBO, I. Syntheses of anacardic acids and ginkgoic acids. **Tetrahedron**, v.43, p. 3387-3394, 1987.