

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

DAYANE VIEIRA DE SOUSA

**SEPARAÇÃO DO ÁCIDO ANACÁRDICO A PARTIR DO LÍQUIDO DA CASCA DA
CASTANHA DE CAJU (LCC)**

FORTALEZA

2017

DAYANE VIEIRA DE SOUSA

SEPARAÇÃO DO ÁCIDO ANACÁRDICO A PARTIR DO LÍQUIDO DA CASCA DA
CASTANHA DE CAJU (LCC)

Monografia apresentada ao curso de Química do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Maria Teresa Salles Trevisan

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S696s Sousa, Dayane Vieira de.
Separação do Ácido Anacárdico a partir do Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC)
/ Dayane Vieira de Sousa. – 2017.
36 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro
de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

Coorientação: Prof. Dr. Luiz Arthur Zampieri.

1. Caju. 2. Ácido Anacárdico. 3. LCC. 4. Métodos de Separação. I. Título.

CDD 540

DAYANE VIEIRA DE SOUSA

SEPARAÇÃO DO ÁCIDO ANACÁRDICO A PARTIR DO LÍQUIDO DA CASCA DA
CASTANHA DE CAJU (LCC)

Monografia apresentada ao curso de Química do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Maria Teresa Salles Trevisan

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Luiz Arthur Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Dávila de Souza Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A todos aqueles que aos poucos me fizeram descobrir o melhor que há em mim, em especial aos meus pais e irmãos

AGRADECIMENTOS

Todos os experimentos necessários para a realização deste trabalho foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LaPNBio) da UFC, sob orientação da Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan, a quem gostaria de agradecer imensamente pela oportunidade dada, pelo seu tempo, apoio, dedicação e disposição em ajudar.

Ao Dr. Luiz Arthur Zampieri pelo compartilhamento de seu conhecimento, pela paciência, dedicação e ajuda dada nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Dávila de Souza Zampieri que em meio a todas as suas atribuições aceitou o convite para participar desta banca, cedendo seu tempo e conhecimento para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais e irmão que sempre acreditaram em mim, mais do que eu mesma.

Aos amigos que me fizeram permanecer firme frente a todos os obstáculos, em especial, a Rafael Andrade Sampaio.

A todos que fazem parte da Nova Acrópole, que me mostraram que tudo na natureza tem o seu papel e que as dificuldades, na verdade, são desafios para mostrarmos o nosso melhor e termos atenção ao nosso presente e realidade.

A todos os professores que me fizeram chegar a esse momento.

“Nada é absoluto nesse plano de consciência, há momentos e oportunidades para tudo. A sabedoria consiste em saber quando é o lugar para fazer uma coisa ou outra, e de que maneira podemos alterná-las. “

(Jorge Angel Livraga)

RESUMO

O Estado do Ceará é o principal produtor e exportador de castanha de caju do Brasil. Devido ao período de baixo índice pluviométrico entre 2001 e 2016, com 9 anos de chuvas abaixo da média histórica, esta cultura vem sendo bastante prejudicada tanto em quantidade, quanto em qualidade e, por isso, vem se investindo não somente na produção e exportação do fruto, mas também na pesquisa de seus subprodutos, gerando produtos e compostos de maior valor agregado. O ácido anacárdico, principal componente do líquido da casca da castanha de caju (LCC), é conhecido por suas atividades bactericida, moluscicida e anticarcinogênica. Uma gama de outras atividades foi proposta nos últimos anos, mas estas carecem de pesquisa *in vitro* e *in vivo*. Para suprir esta necessidade é preciso que se obtenha ácido anacárdico com elevada pureza e baixos níveis de cardol, componente do LCC que o torna levemente cáustico, para que seja utilizado em testes com animais e humanos. Neste trabalho foram testados três métodos de separação, dois baseados em técnicas de extração líquido-líquido e um baseado em cromatografia. Nos métodos de extração, a separação do ácido anacárdico foi realizada a partir de sua conversão em anacardato de cálcio, seguida por extração ácida ou básica. Já na separação cromatográfica, fez-se uma coluna de sílica-gel com eluição do LCC *in natura* em solventes de polaridade crescente. Este método mostrou-se eficaz, pois além da obtenção de um composto de alta pureza, permite a reciclagem dos solventes utilizados.

Palavras-chave: Caju, Ácido Anacárdico, LCC, Métodos de Separação

ABSTRACT

The State of Ceará is the leader on production and exportation of cashew nuts in Brazil. Due to the low rainfall index between 2001 and 2016, including 9 years of rainfalls below the historical average, this crop is being prejudiced in quantity, as in quality, so it has been increasing the investments not only in the production and exportation of the fruit, but also in the research of its by-products, creating products and compounds with higher associated price. The anacardic acid, the main component of *cashew nut shell liquid* (CNSL), is known for its bactericidal, molluscicidal and anticarcinogenic activities. A range of other activities has been proposed in recent years, but these lack on in vitro and in vivo research. To surplus this necessity is needed to obtain anacardic acid with high purity and low levels of cardol, a compound of CNSL that makes it slightly caustic, for use in animal and human tests. In this work three separation methods were tested, two based on liquid-liquid extraction and one based on chromatography. On extraction methods, the separation of the anacardic acid was carried out from its conversion into calcium anacardate, followed by acidic or basic extraction. Already in the chromatographic separation, a column of silica gel was made with elution of the CNSL in solvents of increasing polarity. This method proved to be effective, since in addition to obtaining a high purity compound, it allowed the recycling of used solvents.

Keywords: Cashew, CNSL, Anacardic Acid, Separation Methods

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LCC – Líquido da Castanha de Caju

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, HPLC)

CNSL – Cashew Nut Shell Liquid

HCl - Ácido clorídrico

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema dos constituintes da castanha de caju.....	4
Figura 2 – O LCC.....	4
Figura 3 – Esquema dos constituintes do LCC in natura e do LCC técnico.....	5
Figura 4 – Forma mais abundante do ácido anacárdico.....	5
Figura 5 – Amostras dos testes 1 e 2.....	11
Figura 6 – Amostras dos testes 1 e 2 em centrífuga.....	11
Figura 7 – Amostra homogeneizada antes da centrifugação.....	11
Figura 8 – Amostras após a centrifugação.....	11
Figura 9 – Amostra após lavagem com água destilada e solução de NaCl.....	11
Figura 10 – Comparação entre as amostras dos testes 1 e 2.....	12
Figura 11 – Amostras depois da extração da fase orgânica.....	12
Figura 12 – Amostras de ácido anacárdico obtidas no teste 2.....	12
Figura 13 – Obtenção de ácido anacárdico a partir de cromatografia em coluna.....	14
Figura 14 – Amostras obtidas por cromatografia em coluna.....	14
Figura 15 – Amostras obtidas por cromatografia em coluna.....	14
Figura 16 – Cromatograma do LCC bruto.....	21
Figura 17 – Cromatograma da amostra após a realização do Teste 1.....	22
Figura 18 – Cromatograma da amostra após a realização do Teste 2.....	23
Figura 19 – Cromatograma da amostra após a realização do Teste 3	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção e exportação de castanha de caju no Ceará entre 2001 e 2016.....	3
Tabela 2 – Composição do LCC Natural e LCC Técnico	4
Tabela 3 – Reagentes utilizados para a eluição do LCC	13
Tabela 4 – Constituintes do ácido anacárdico.....	16

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Panorama da Cajucultura no Ceará.....	2
2.2 O LCC e seus constituintes.....	3
2.3 O Ácido Anacárdico.....	5
2.4 Conceitos Teóricos	
2.4.1 Precipitação de Anacardato de Cálcio.....	6
2.4.2 Extração.....	6
<i>2.4.1.1 Escolha de um método de extração.....</i>	<i>8</i>
2.4.2 Agentes de secagem.....	9
2.4.3 Cromatografia.....	9
<i>2.4.3.1 Cromatografia em coluna.....</i>	<i>10</i>
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Teste 1.....	11
3.2 Teste 2.....	12
3.3 Teste 3.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	17
6. REFERÊNCIAS.....	18
ANEXOS.....	21

1. INTRODUÇÃO

O ácido anacárdico é uma mistura de quatro compostos intimamente relacionados que se distinguem somente pelo grau de saturação de sua cadeia lateral, que pode ser saturada, monoeno, dieno ou trieno. É encontrado principalmente na castanha de caju, constituindo 71% do óleo extraído durante seu beneficiamento na ausência de processos térmicos (LCC in natura).

Este composto é um fitoquímico de interesse, com algumas atividades biológicas comprovadas e outras ainda em estágio de pesquisa, mas que demonstram grande potencial na indústria farmacêutica.

Apesar da abundância do LCC no nordeste brasileiro, há escassez de ácido anacárdico para a realização destas pesquisas. Este trabalho tem como objetivo estudar métodos de separação do ácido anacárdico de sua matriz e produzir um extrato de pureza elevada que possa ser utilizado em pesquisas diversas, como, por exemplo, pesquisas em animais e seres humanos. Para isso, o trabalho foi dividido em duas partes, uma de pesquisa bibliográfica para se obter dados relacionados ao LCC, ao ácido anacárdico e aos métodos de separação e uma outra parte, experimental, onde foram testados três diferentes métodos.

2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

2.1 Panorama da Cajucultura no Ceará

A Cajucultura é uma importante atividade econômica para região Nordeste, principalmente para o estado do Ceará, que produz cerca de 40% da castanha de caju do país, cerca de 75% da produção regional, o que no ano de 2017 correspondeu a 42 mil toneladas, segundo o IBGE. Tendo um amplo número de atividades relacionadas, o que se deve a um grande número de produtos e subprodutos, a cajucultura é fonte de emprego e renda tanto para o interior, no período entressafra de outras culturas, quanto para o setor industrial inserido nas zonas urbanas. Seus principais produtos são a amêndoa da castanha de caju (ACC) e o líquido da casca da castanha de caju (LCC), ambos produtos de baixo valor comercial. Seu pendúculo é bastante versátil, podendo produzir sucos, refrigerantes, doces, ser adicionado à ração animal ou mesmo ser vendido como fruto de mesa, mas estima-se que 90% dele seja desperdiçado, o que o torna um subproduto pouco aproveitado.

Devido ao baixo índice de precipitações pluviométricas e a incidência de doenças e pragas entre 2012 e 2016, a cajucultura vem sofrendo com a baixa produtividade e diminuição da qualidade de seus produtos, o que afeta diretamente a indústria de beneficiamento, que não consegue atender a demanda do mercado internacional. Para que esta demanda seja cumprida, o nordeste teve de importar castanha de caju de países africanos nos últimos anos.

No quadro abaixo são mostrados os indicadores da cajucultura nos últimos 16 anos. Percebe-se que por 9 vezes as chuvas atingiram um índice pluviométrico abaixo da média histórica, o que se acentuou nos últimos 5 anos.

Tabela 1 – Produção e exportação de castanha de caju no Ceará entre 2001 e 2016

Estado do Ceará Ano/Safra	Produção Castanha de Caju in natura			Pluviometria Índice de Desvio sobre a média histórica do Estado (%)	Exportação <i>Amêndoa da Castanha de Caju</i>	
	Área colhida (mil/ha)	Produção (mil/t)	Produtividade (kg/ha)		Quantidade (mil/t)	Em Dólar (milhões/\$)
2001	342.550	67.935	198	-28,7	23.199	87.919
2002	362.2	102.431	282	+1,7	22.423	79.986
2003	364.6	108.051	296	+3,8	31.725	109.947
2004	366.5	86.576	236	+29,1	36.071	142.109
2005	368.9	66.090	179	-27,4	30.500	136.506
2006	371.0	130.544	351	-4,9	31.378	136.161
2007	376.1	53.420	142	-16,3	40.877	180.001
2008	386.7	121.045	312	+15,3	26.003	146.323
2009	396.5	104.421	263	+53,1	38.496	187.028
2010	401.3	39.596	98	-32,2	33.414	182.015
2011	402.2	111.718	278	+29,2	20.453	176.049
2012	400.2	38.574	96	-51,4	20.343	148.575
2013	405.4	53.112	131	-31,2	17.230	109.801
2014	378.0	51.211	135	-29,4	13.597	89.693
2015	374.4	52.118	139	-33,5	10.681	85.092
2016	376.0	30.763	82	-28,9	12.227	103.206

Fonte: IBGE – Funceme – SECEX

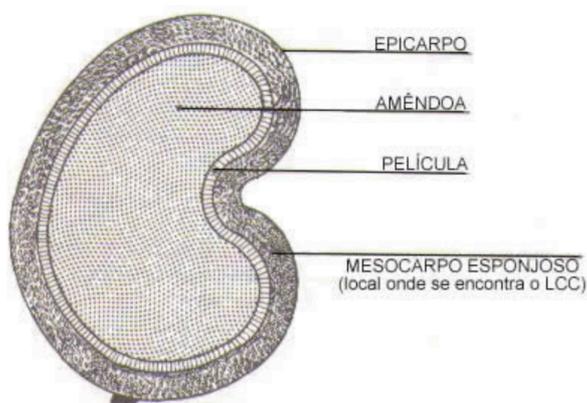
Visando diminuir este problema, em 2013 foi criado o FUNCAJU – Fundo de Apoio à Cultura do Caju, que tem como finalidade não somente estimular a produção e a exportação do fruto, como também investir em seus subprodutos. Mas para que este obtenha um bom resultado, é necessário saber em quais subprodutos investir.

2.2 O LCC e seus constituintes

O líquido da casca da castanha de caju (LCC) é um óleo escuro, viscoso, cáustico e inflamável presente nos alvéolos do mesocarpo, correspondendo a 25% da massa da castanha de caju, conhecido internacionalmente como *cashew nut shell liquid* (CNSL), é uma das fontes mais ricas de lipídeos fenólicos não isoprenóides de origem natural. (Mazzeto et al., 2009)

Na indústria química, o LCC é utilizado na produção de polímeros para a fabricação de resinas, isolantes, antioxidantes, adesivos, tintas, esmaltes especiais, vernizes, lubrificantes, pigmentos, fungicidas e plastificantes.

Figura 1 – Esquema dos constituintes da castanha de caju



Fonte: <http://www.mecol.com.br/> Acesso em 28/11/2017

Figura 2 – O LCC



Fonte: Imagem de acervo pessoal

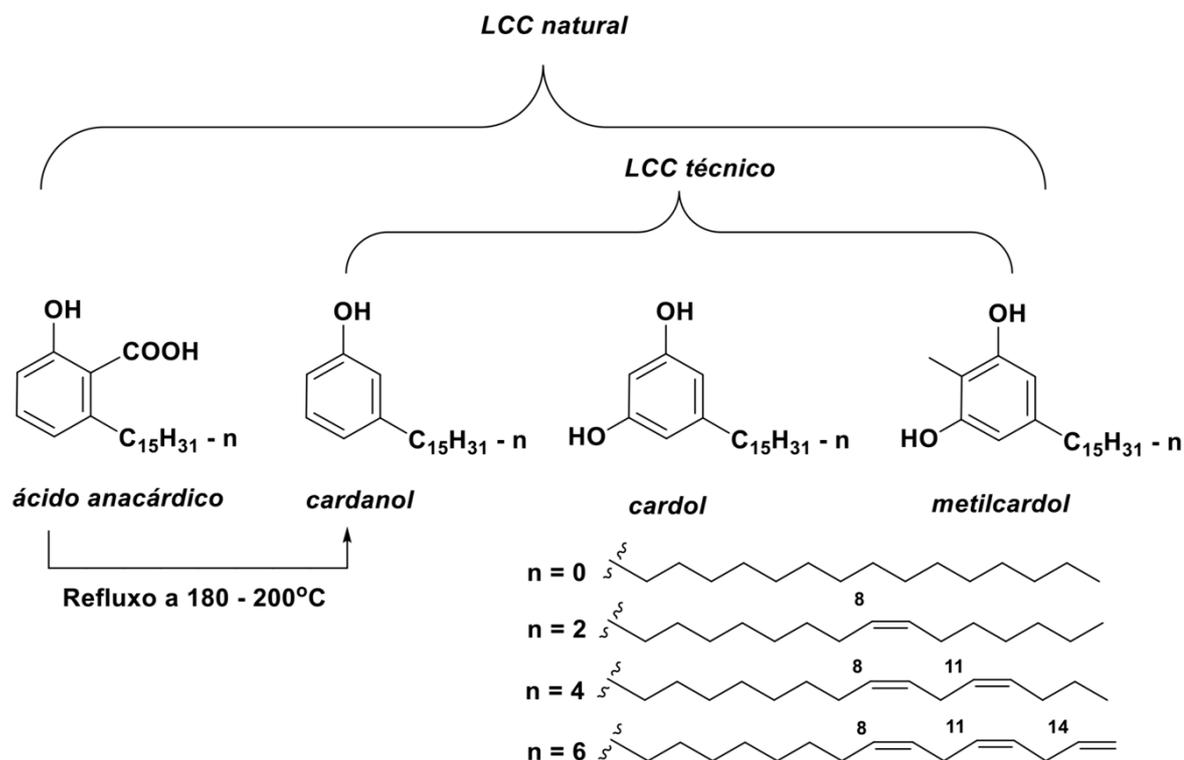
Estudo iniciais com o LCC, na década de 40, apontavam a presença de apenas dois componentes na mistura, que seria constituída basicamente por 90% de ácidos anacárdico e 10% de cardóis. (Wasserman et al., 1945). Mais tarde descobriu-se que a mistura era mais complexa, sendo constituída por ácidos anacárdico, cardanóis, 2-metilcardóis e cardóis (Tyman e colaboradores, 1986), e que as proporções de seus constituintes dependiam do modo de extração do líquido da castanha, pois ao passar por processos térmicos, com temperaturas maiores que 180°C, o ácido anacárdico contido na mistura é descarboxilado, sendo convertido quase que completamente em cardanol (Gedam, 1986). A mistura que passa por esse tipo de tratamento é chamada LCC técnico.

Tabela 2 – Composição do LCC Natural e LCC Técnico

Componentes Fenólicos	LCC Natural (%)	LCC Técnico (%)
Ácido anacárdico	71,70 – 82,00	1,09 – 1,75
Cardanol	1,60 – 9,20	67,82 – 94,60
Cardol	13,80 – 20,10	3,80 – 18,86
2-Metilcardol	1,65 – 3,90	1,20 – 4,10
Componentes minoritários	2,20	3,05 – 3,98
Material polimérico	---	0,34 – 21,63

Fonte: Adaptado de Tyman e colaboradores, 1981

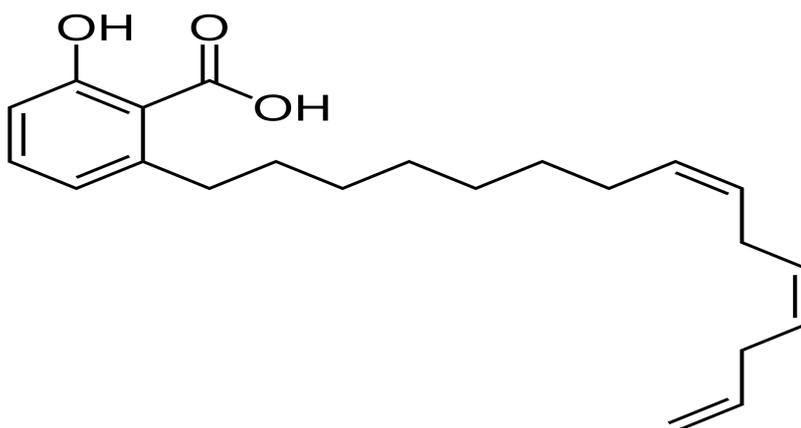
Figura 3: esquema dos constituintes do LCC in natura e do LCC técnico



Fonte: Tyman e colaboradores, 1981

2.3 O Ácido Anacárdico

Figura 4 – Forma mais abundante do ácido anacárdico



Fonte: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/18532>

O ácido anacárdico é um fitoquímico de interesse devido as suas amplas atividades biológicas, que compreendem atividades microbicidas, inseticidas e moluscicidas. (Gellerman et al., 1969; Mendes et al., 1990; Begum et al., 2002; Kubo et al. 2003).

As propriedades bactericidas do ácido anacárdico são mais efetivas contra bactérias Gram-positivas, que incluem o *Streptococcus mutans*, agente causador da cárie dentária, a *Propionibacterium acnes*, causadora da acne e o agente infeccioso *Staphylococcus aureus*, que é resistente à metilicina. (Muroi e Kubo, 1993, 1996; Kubo et al., 1994, 1999). Este composto também apresenta grande poder antioxidante (Trevisan et al., 2006) e, portanto, é capaz de proteger as células humanas do estresse oxidativo e promover um efeito gastroprotetor contra danos induzidos pelo etanol (Morais et al., 2010). Devido a sua função antioxidante, o ácido anacárdico é visto como potencial quimioprotetor (Trevisan et al., 2006) e agente de cuidados com a pele (Kubo et al., 2006).

Estudos ainda em desenvolvimento tem mostrado que o ácido anacárdico também é capaz de inibir determinadas enzimas no organismo humano, como, por exemplo, a ciclo-oxigenase, responsável pela síntese de prostaglandinas, que possuem atividade carcinogênica. (Grazzini et al., 1991).

Apesar de seu grande potencial, muitos resultados ainda carecem de pesquisas in vivo e in vitro para que o ácido anacárdico seja utilizado pela indústria farmacêutica.

2.4 Conceitos teóricos

2.4.1 Precipitação de Anacardatos de Cálcio

A precipitação de anacardatos de cálcio é feita tratando-se o LCC com cloreto de cálcio diidratado em presença de solução de hidróxido de sódio a 80°C.

Uma outra técnica consiste em tratar o LCC em álcool isopropílico com hidróxido de cálcio até observar a mudança da cor da solução. O rendimento da reação é de cerca de 70%.

2.4.2 Extração

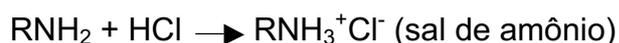
A extração é uma das técnicas mais importantes para o isolamento e a purificação de substâncias orgânicas. Neste método, uma solução é agitada com um segundo solvente, imiscível com o primeiro. O soluto é extraído de um solvente para o outro devido diferença de solubilidade.

A extração dos tecidos com um solvente imiscível em água é empregada para isolar os produtos naturais, geralmente envolvendo a formação de uma fase aquosa e outra orgânica. Muitas vezes, o dietil-éter é usado para isto, outras vezes, usa-se solventes imiscíveis em água, como hexano, éter de petróleo, ligroína e cloreto de metileno.

As extrações podem ser agrupadas em três categorias, dependendo da natureza das impurezas que devem ser removidas.

A primeira categoria envolve a extração ou lavagem de uma mistura orgânica com água. A lavagem com água destina-se a remover materiais muito polares, como sais inorgânicos, ácidos ou bases fortes, e substâncias polares de baixo peso molecular, incluindo álcoois, ácidos carboxílicos e aminas. Muitos compostos com menos de cinco carbonos são solúveis em água. A extração com água é também usada imediatamente após a extração de uma mistura com um ácido ou uma base, para garantir a remoção de traços do ácido ou da base.

A segunda categoria inclui a extração de uma mistura orgânica de um ácido diluído, usualmente o ácido clorídrico 1-2 M. A extração com ácido remove impurezas básicas, especialmente aminas. As bases convertem-se em sais catiônicos. Se uma amina é um dos reagentes ou se piridina ou outra amina é um solvente, a extração pode ser usada para remover o excesso de amina após a reação.



Os sais de amônio são, usualmente, solúveis em água e, portanto, são extraídos do material orgânico. Uma extração com água pode ser feita imediatamente após a extração com ácido, para garantir a remoção de traços do ácido do material orgânico.

A terceira categoria é a extração de uma mistura orgânica com uma base diluída, geralmente bicarbonato de sódio 1 M, embora a extração com hidróxido de sódio diluído também possa ser usada. A extração com base converte impurezas ácidas, como ácidos orgânicos, em sais aniônicos. Na preparação de um éster, por exemplo, a extração com bicarbonato de sódio pode ser usada para remover o excesso de ácido carboxílico presente.



Os sais carboxilatos, sendo muito polares, são solúveis em fase aquosa. Como resultado, as impurezas ácidas são extraídas do material orgânico pela

solução básica. Uma extração com água pode ser feita após a extração com base para garantir a remoção de toda a base do material orgânico.

Ocasionalmente, fenóis podem estar presentes na mistura de reação como impurezas, e pode-se desejar sua remoção por extração. Como os fenóis, embora sejam ácidos, são cerca de 10^5 vezes menos ácidos do que os ácidos carboxílicos, pode-se fazer extrações básicas para separar os fenóis dos ácidos carboxílicos se a base for cuidadosamente selecionada. Se a base for um bicarbonato de sódio, os ácidos carboxílicos serão extraídos para a fase aquosa, mas os fenóis não. Os fenóis não são suficientemente ácidos para serem desprotonados pela base fraca. A extração com hidróxido de sódio, por outro lado, extrai os ácidos carboxílicos e os fenóis para a fase aquosa porque o íon hidróxido é suficientemente básico para desprotonar os fenóis.

Os ácidos e bases orgânicas que foram extraídos podem ser recuperados por neutralização do reagente de extração. Isto seria feito se o ácido ou a base orgânicos fosse o produto da reação, e não, uma impureza. Se o ácido carboxílico, por exemplo, for extraído em meio aquoso, o composto pode ser recuperado por acidificação do extrato com HCl 6M até que a solução fique ligeiramente ácida. Quando a solução fica ácida, o ácido carboxílico se separa da solução aquosa. Se o ácido for um líquido, ele forma uma camada orgânica, que usualmente é extraída da mistura com éter ou cloreto de metileno. Após a remoção da camada orgânica e da secagem, o solvente pode ser evaporado para que se obtenha o ácido carboxílico puro.

2.4.2.1 Escolha de um método de extração

Três tipos de aparelhagens podem ser usados em extrações: frascos cônicos, tubos de centrífuga e funis de separação. Os frascos cônicos podem ser usados com volumes inferiores a 4 mL. Volumes superiores, até 10 mL, podem ser extraídos em tubos Falcon. Os frascos cônicos e os tubos de centrífuga são usados com mais frequência em experimentos de escala pequena, embora os últimos possam ser usados também em aplicações de grande escala. Os funis de separação são usados em experimentos de grande escala, com quantidades maiores de líquidos.

2.4.3 Agentes de secagem

Ao ser agitado com uma solução aquosa, um solvente orgânico absorverá água, mesmo que a solubilidade desta seja pequena. A quantidade de água absorvida varia de solvente para solvente. Para remover a água de uma camada orgânica, usa-se um agente de secagem, um sal inorgânico anidro capaz de adicionar água de hidratação quando exposto à umidade do ar ou a soluções úmidas.

O sulfato de sódio anidro é o agente de secagem mais utilizado. A variedade em grãos é recomendada porque ela é removida mais facilmente da solução seca do que a variedade em pó. O sulfato de sódio é pouco agressivo e muito eficiente. Ele remove água da maior parte dos solventes comuns, com a possível exceção do dietil-éter, para o qual uma secagem inicial com solução saturada de um sal pode ser aconselhável. Ele deve ser utilizado em temperatura ambiente para ser efetivo e não pode ser usado em soluções em ebulição.

Outros agentes de secagem conhecidos são: sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, sulfato de cálcio e carbonato de potássio.

Sinais comuns que indicam que uma solução está seca:

- a. Não existem gotas de água nas paredes do frasco ou em suspensão na solução.
- b. Não existe uma camada separada de água ou uma „poça“.
- c. A solução torna-se límpida. A turbidez indica a presença de água.
- d. Os grãos do agente de secagem (ou uma porção dele) escorrem livremente no fundo do recipiente agitado e não coalescem em uma massa sólida.

2.4.4 Cromatografia

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem a separação, identificação e determinação de componentes muito semelhantes de misturas complexas. Muitas dessas separações são impossíveis por outros meios. Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é, então, forçada a passar através de uma fase

estacionária imiscível fixa, colocada em uma coluna ou sobre uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em graus variados. Os componentes que são retidos mais fortemente na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que interagem mais fracamente com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. Como consequência dessas velocidades de migração diferentes, os componentes da amostra são separados em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente.

2.4.4.1 Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna é uma técnica de partição sólido-líquido que se baseia na adsorção e na solubilidade. O sólido pode ser praticamente qualquer material que não se dissolva na fase líquida associada. Os sólidos mais comuns são sílica gel, $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, também chamada de ácido silícico, e alumina, $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Estes compostos são usados na forma de pó (usualmente 200-400 mesh).

Se a sílica gel finamente dividida é colocada em uma solução que contém um composto orgânico, parte da substância adsorve nas partículas do sólido. Muitos tipos de forças intermoleculares, de intensidades diferentes, fazem as moléculas orgânicas ligarem-se à sílica gel. Compostos apolares ligam-se através de forças de van der Waals. Estas forças são fracas, e moléculas apolares não se ligam fortemente, a menos que o peso molecular seja muito alto. As interações mais importantes são de compostos orgânicos polares. Neste caso, as forças são do tipo dipolo-dipolo ou envolvem alguma interação direta (coordenação, ligação de hidrogênio, formação de sal). A força da interação também varia com a natureza dos compostos, ou seja, uma base forte, liga-se mais fortemente que uma base fraca.

Uma regra semelhante é válida para a solubilidade. Solventes polares dissolvem compostos polares mais efetivamente que compostos apolares. Os compostos apolares se dissolvem melhor em solventes apolares. Portanto, a capacidade de um solvente lavar um composto adsorvido na sílica gel depende quase diretamente da polaridade do solvente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Teste 1 – Extração em meio ácido (feito em quadruplicata):

Figura 5 – Amostras dos testes 1 e 2



Fonte: Imagem de acervo pessoal

Figura 6 – Amostras dos testes 1 e 2 em centrífuga



Fonte: Imagem de acervo pessoal

Figura 7 – Amostra homogeneizada antes da centrifugação



Fonte: Imagem de acervo pessoal

Figura 8 – Amostras após a centrifugação



Fonte: Imagem de acervo pessoal

Figura 9 – Amostra após lavagem com água destilada e solução de NaCl



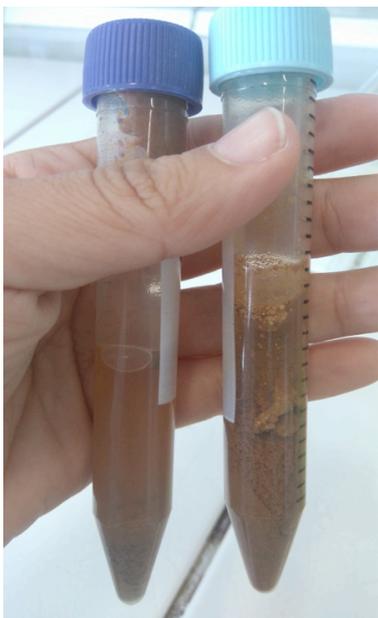
Fonte: Imagem de acervo pessoal

2 g de anacardato de cálcio foram dissolvidos em 7 mL de água destilada em um tubo Falcon de 15 mL. A este tubo fora adicionado 1 mL de ácido clorídrico concentrado. A mistura foi agitada por uma hora em uma mesa agitadora a 700 rpm. Após a agitação, fez-se a extração da fase orgânica com 6 mL de acetato de etila. O tubo foi agitado manualmente por cinco minutos e em seguida centrifugado na

velocidade 3 por mais cinco minutos. A fase orgânica, menos densa que a fase aquosa, foi transferida para um novo tubo Falcon de 15 mL. Neste tubo, a fração orgânica foi lavada com 5 mL de H₂O destilada e 2 mL de solução de NaCl 2M. A mistura foi agitada manualmente e centrifugada mais uma vez, com as mesmas condições. A fase orgânica foi transferida para um novo tubo de 15 mL, onde se adicionou sulfato de sódio. Após secagem, a amostra foi analisada por CLAE.

3.2 Teste 2 – Extração em meio levemente básico (feito em quadruplicata):

Figura 10 – Comparação entre as amostras dos testes 1 e 2



Fonte: Imagem de acervo pessoal

Figura 11 – Amostras depois da extração da fase orgânica



Fonte: Imagem de acervo pessoal

Figura 12 – Amostras de ácido anacárdico obtidas no teste 2



Fonte: Imagem de acervo pessoal

2 g de anacardato de cálcio foram dissolvidos em 7 mL de solução NaHCO₃ e 1 mL de NaCl em um tubo Falcon de 15 mL. A mistura foi agitada durante uma hora em uma mesa agitadora a 700 rpm. A fase orgânica foi extraída três vezes com 5 mL hexano. A cada extração, o tubo Falcon foi agitado manualmente e centrifugado na velocidade 3 por cinco minutos, para somente então ter sua fase orgânica suspensa retirada. À solução aquosa restante foi adicionado 1 mL de ácido acético P.A. e a mistura foi agitada gentilmente até que as bolhas formadas desaparecessem.

A fase orgânica formada foi extraída com 6 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada manualmente e centrifugada na velocidade 3 por cinco minutos. A fase orgânica foi transferida para um novo tubo Falcon, onde se adicionou sulfato de sódio e deixou-se a solução descansar por 30 minutos. Logo após, a amostra foi analisada por CLAE.

3.3 Teste 3 – Coluna Cromatográfica:

Montou-se uma coluna cromatográfica com cerca de 300g de sílica gel para a eluição de 30g de LCC. Logo em seguida adicionou-se hexano, que foi eluído até que a coluna estivesse perfeitamente empacotada, pronta para a eluição. Tomando-se cuidado para que a superfície da coluna não secasse, adicionou-se o LCC, formando uma segunda fase, onde foi adicionada a primeira fração do eluente, iniciando assim o processo de separação.

Ao todo, foram obtidas 9 frações, utilizando-se três diferentes eluentes. A proporção utilizada para a obtenção de cada fração encontra-se na tabela abaixo:

Tabela 3 – Reagentes utilizados para a eluição do LCC

ERLENMEYER	ELUENTES
1	85% hexano + 15% acetato de etila
2	85% hexano + 15% acetato de etila
3	85% hexano + 15% acetato de etila
4	85% hexano + 15% acetato de etila
5	60% hexano + 40% acetato de etila
6	100% acetato de etila
7	100% acetato de etila
8	100% acetato de etila
9	80% acetato de etila + 20% metanol

Após o término da eluição as amostras 6 e 7 foram analisadas por CLAE e comparadas com as amostras dos testes 1 e 2.

Figura 13 – Obtenção de ácido anacárdico a partir de cromatografia em coluna



Fonte: Imagem de acervo pessoal

Figura 14 – Amostras obtidas por cromatografia em coluna



Fonte: Imagem de acervo pessoal

Figura 15 – Amostras obtidas por cromatografia em coluna



Fonte: Imagem de acervo pessoal

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste 1 realizou-se a dissolução do anacardato de cálcio em água destilada e, em seguida, acidificou-se o meio para que o grupo carboxilato fosse protonado, gerando ácido anacárdico que, após adição de solvente orgânico, se separa da solução aquosa, gerando uma fase orgânica. Esta fase, menos densa, formada por acetato de etila, foi extraída e lavada com água destilada e solução salina, para se retirar qualquer impureza que tenha restado. O sulfato de sódio foi utilizado para retirar qualquer traço de água que tenha ficado em solução.

No teste 2 o anacardato de cálcio foi ressuspenso em solução levemente básica de NaHCO_3 , fazendo com que o grupo carboxilato permanecesse desprotonado, e os demais componentes do LCC, que são neutros, gerassem uma fase orgânica a ser extraída com hexano. O NaCl foi utilizado para aumentar a força iônica do meio, aumentando a solubilidade do anacardato no meio aquoso. À solução aquosa restante, contendo o íon do composto de interesse, adicionou-se ácido acético, o que levou à protonação do grupo carboxilato, formando o ácido anacárdico. Além disso, a acidificação do meio gerou CO_2 a partir do bicarbonato. A fase orgânica, contendo o composto de interesse, foi extraída com acetato de etila. As impurezas trazidas pelo LCC foram extraídas com o hexano, por isso não foi necessária a lavagem da solução. A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio para se retirar qualquer traço de água.

Nos cromatogramas encontrados nos anexos A, B, C e D, são mostradas as análises em CLAE do LCC bruto e das extrações realizadas nos testes 1, 2 e 3. Cada análise foi realizada em três comprimentos de onda: 340,4 nm, 254,4 nm e 278,4 nm.

No primeiro box (340,4 nm) observa-se a presença de três picos principais, que correspondem a três formas do ácido anacárdico, estando a quarta forma em quantidade muito pequena, sendo encoberta pelo ruído do próprio cromatógrafo. Isso condiz com a literatura, pois a forma saturada do ácido anacárdico compõe menos de 3% da mistura.

Tabela 4 – Constituintes do ácido anacárdico

CONSTITUINTE	ÁCIDO ANACÁRDICO
Saturado	2,2 – 3,0 %
Monoeno (8')	25,0 – 33,3 %
Dieno (8', 11')	17,8 – 32,1 %
Trieno (8', 11', 14')	36,3 – 50,4 %

Fonte: Adaptado de Mazzetto e colaboradores, 2009

No segundo e terceiro boxes a presença de outros compostos é ressaltada. Estes são compostos indesejados, sendo formados por outros componentes do LCC ou impurezas. Observa-se que a maior parte destes compostos indesejados se encontra antes dos 6 minutos, o que causa a sobreposição de picos no gráfico.

Comparando os resultados de cada cromatograma percebe-se que os três métodos apresentaram certo grau de purificação do ácido anacárdico e que, neste estudo, a coluna cromatográfica foi o método mais eficiente para a obtenção do ácido anacárdico, pois em seu cromatograma, é possível ver praticamente apenas os ácidos anacárdicos.

Apesar de os cromatogramas dos anexos B e C não serem tão limpos, as extrações não foram suficientemente otimizadas, logo, estes dois métodos podem se mostrar tão eficientes quanto o primeiro, devendo ser melhor estudadas.

5. CONCLUSÃO

Os três métodos testados mostraram certo grau de purificação do ácido anacárdico. Dentre eles, a cromatografia em coluna se mostrou mais eficiente, praticamente isolando todas as formas do ácido.

Apesar de os outros dois métodos não terem se mostrado tão eficientes, estes carecem de otimização, logo não se pode descartá-los.

Apesar de a cromatografia em coluna ter mostrado um bom resultado, este método é indicado somente para pesquisas em pequena escala, pois esta é uma técnica complexa, que necessita de pessoal especializado e é utilizado muito solvente, o que o torna também mais caro. Quando o objetivo for produzir ácido anacárdico em maior quantidade, a melhor solução é buscar otimizar os outros dois métodos.

O objetivo de produzir ácido anacárdico puro o suficiente para a utilização em animais foi atingido. Testes com os extratos obtidos já estão sendo realizados em ratos e os primeiros resultados se mostraram promissores.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, Virgínia Kelly Gonçalves. **Efeito antioxidante do ácido anacárdico na estabilidade da gema de ovo in natura e desidratada, e da carne e mortadela de frango.** 2013.. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

ARUN B, Goss P. **The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention.** *Semin Oncol* (2004).

BEGUM P, Hashidoko Y, Islam MT, Ogawa Y, Tahara S. **Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*.** (2002)

CARIOCA, José Osvaldo B., et al. **Processo de purificação do líquido da castanha do caju (LCC) para isolamento do cardanol.** In: *3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, Fortaleza.* (2005)

DE MATOS, José Everardo Xavier; DA SILVA, Fernando José Araújo; VIEIRA, Priscila Batista. **Solventes para extração do líquido da castanha de caju (LCC) e compatibilidade ambiental.** *Revista Tecnologia*, 2009, 29. Jg., Nr. 1.

GEDAM, P. H.; SAMPATHKUMARAN, P. S. Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 14, n. 2, p. 115-157, 1986.

GELLERMAN JL, Walsh NJ, Werner NK, Schlenk H. **Antimicrobial effects of anacardiac acids.** (1969)

GRAZZINI R, Hesk D, Heininger E, Hildenbrandt G, Reddy CC, Cox-Foster D, Medford J, Craig R, Mumma RO. **Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids.** (1991)

GUISSONI, A. C. P., et al. **Larvicidal activity of *Anacardium occidentale* as an alternative to control *Aedes aegypti* and its toxicity in *Rattus norvegicus*.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2013, 15. Jg., Nr. 3, S. 363-367.

HIMEJIMA M., Kubo I.J. **Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale*(Anacardiaceae) nut shell oil.** (1991)

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R.. **Princípios de análise instrumental.** 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1056 p. Tradução de Celio Pasquini [coordenação]; Jarbas José Rodrigues Rohwedder... [et al.].

KUBO, Ha T.J., I. **Lipoxygenase inhibitory activity of anacardic acids.** (2005)

MAZZETTO, Selma Elaine; LOMONACO, Diego; MELE, Giuseppe. **Cashew nut oil: opportunities and challenges in the context of sustainable industrial development.** *Quimica Nova*, 2009, 32. Jg., Nr. 3, S. 732-741.

MENDES N.M., de Oliveira AB, Guimarães JE, Pereira JP, Katz N. (1990) **Molluscicide activity of a mixture of 6-*n*-alkyl salicylic acids (anacardic acid) and 2 of its complexes with copper (II) and lead (II).**

MORAIS T.C., Pinto NB, Carvalho KM, Rios JB, Ricardo NM, Trevisan MT, Rao VS, Santos FA. **Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice.** (2010)

MUROI H., Kubo I. **Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *J Appl Bacteriol* (1996) 80:387–394

MUROI H., Kubo I. **Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids.** *J Agric Food Chem* (1993) 41:1780–1783

PAVIA, Donald L. et al. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena.** 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p. Tradução de Ricardo Bicca de Alencastro.

SEVERINO, Richele Priscila, et al. **Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas.** 2008.

SILVA, M. S. S., et al. **Anacardic acid derivatives from Brazilian propolis and their antibacterial activity**. *Eclética Química*, 2008, 33. Jg., Nr. 3, S. 53-58.

SOOD, S. K.; Tyman, H. P.; Durrani, A.; Johnson, R. A.; *Lipids*. 1986, 21, 241.

SOUSA, Denise Lins de; RODRIGUES, Lidiany Karla Azevedo. **Efeito antibacteriano do ácido anacárdico em culturas plantctônicas e biofilmes de *Streptococcus mutans***. 2014. 71 f. Tese (doutorado).

TREVISAN, MT, Pfundstein B, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen RW. **Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity**. *Food Chem Toxicol* (2006) 44:188–197

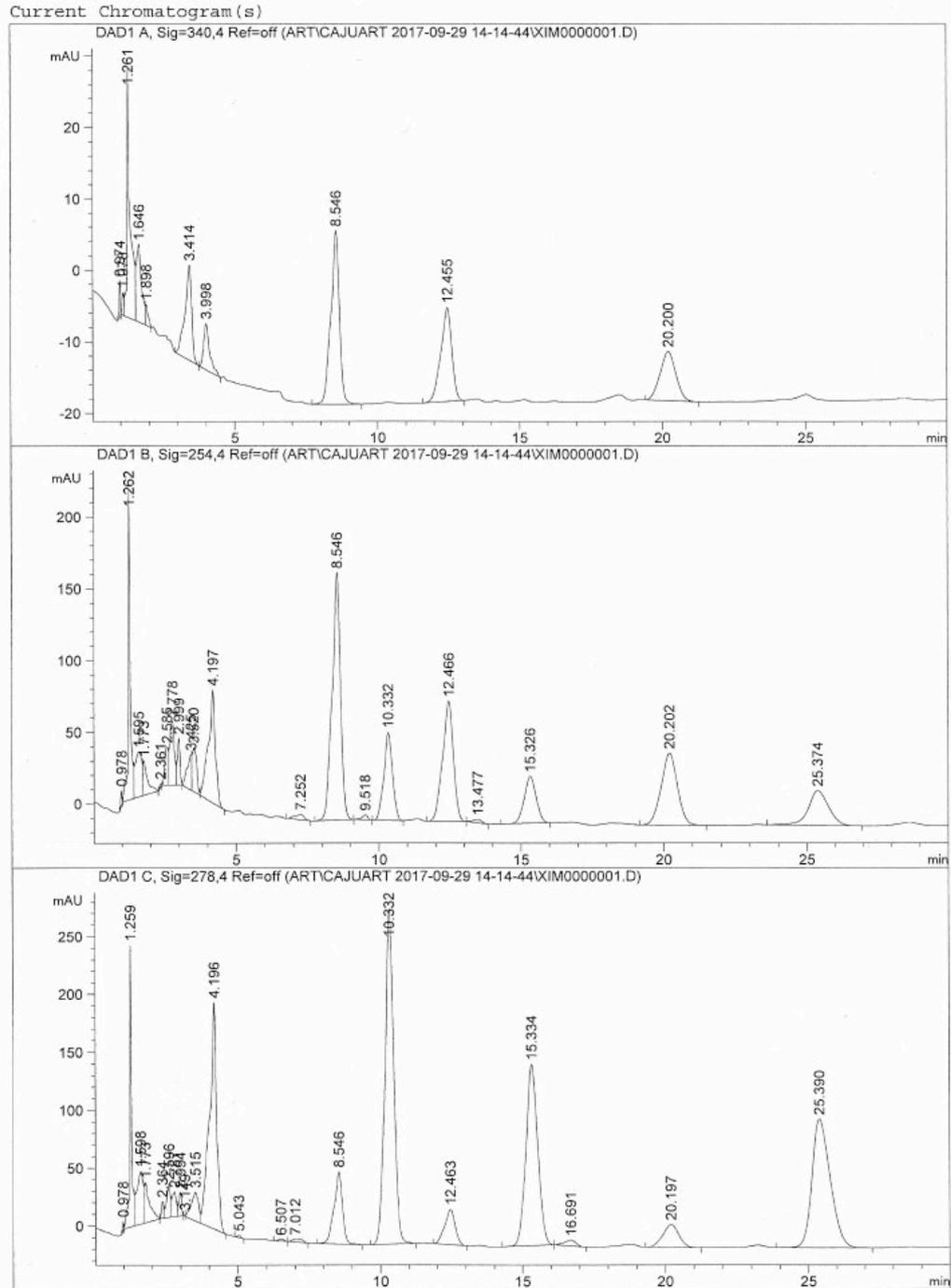
TYMAN, J. H. P.; TYCHOPOULOS, V.; COLENUTT, B. A. **Long-chain phenols: XXI. quantitative analysis of the phenolic lipids in technical cashew nut-shell liquid, from *anacardium occidentale*, by high-performance liquid chromatography**. *Journal of Chromatography A*, v. 213, n. 2, p. 287-300, 1981.

WASSERMAN, D.; Dawson, C. R.; *Ind. Eng. Chem*. 1945, 37, 396.

ANEXO A

Figura 16 – Cromatograma do LCC bruto

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



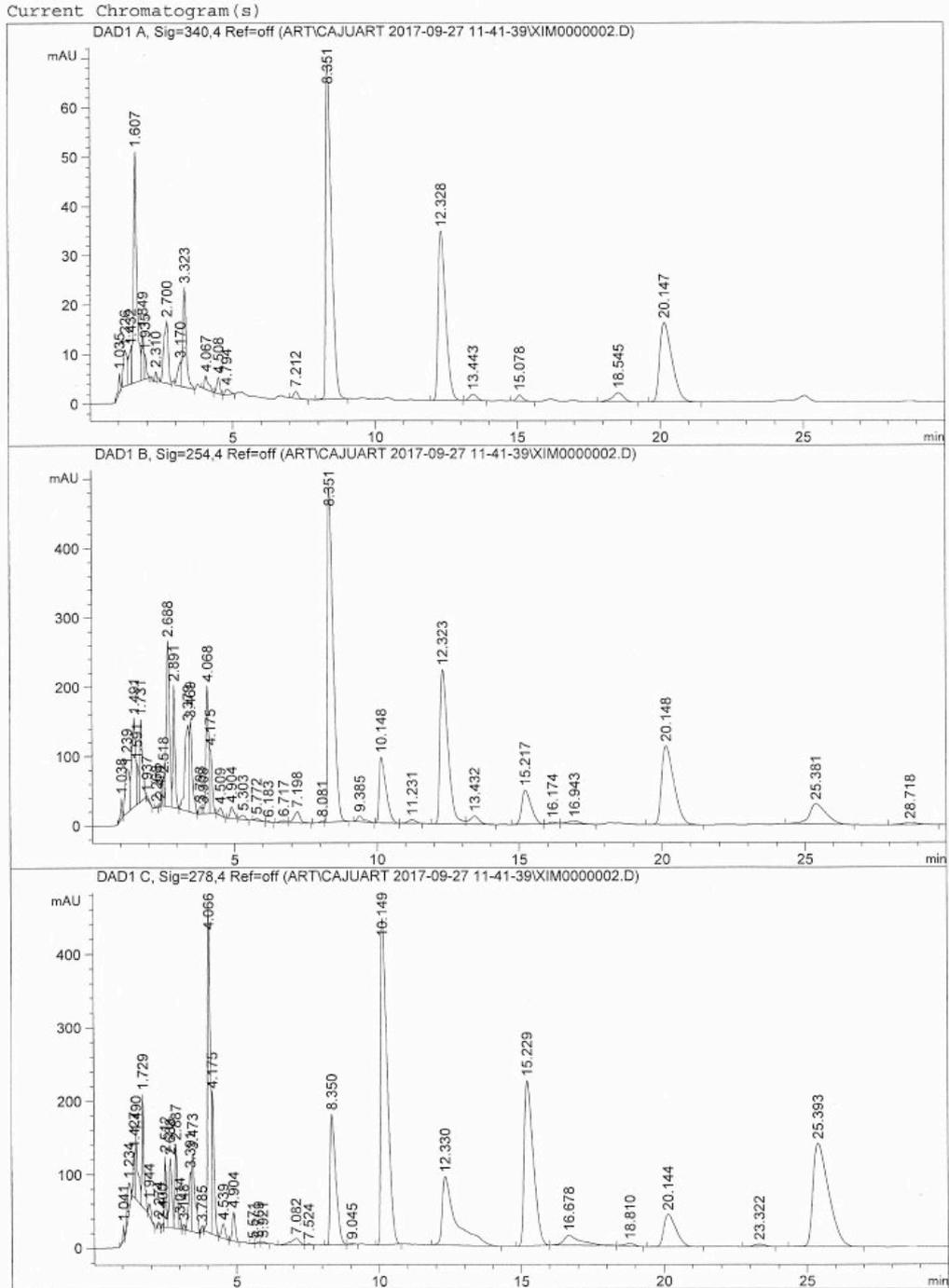
HPLC LPNBIO 12/4/2017 12:25:04 PM Administrator

Page 1 of 1

ANEXO C

Figura 18 – Cromatograma da amostra após a realização do Teste 2

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



ANEXO D

Figura 19 – Cromatograma da amostra após a realização do Teste 3

