



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JESSICA MARIA SILVA SOUSA

ASPECTOS TECNOLÓGICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO
CONCENTRADO DAS FIBRAS DO PEDÚNCULO DE CAJU
(Anacardium occidentale L.)

FORTALEZA

2018

JESSICA MARIA SILVA SOUSA

ASPECTOS TECNOLÓGICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO
CONCENTRADO DAS FIBRAS DO PEDÚNCULO DE CAJU
(*Anacardium occidentale* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.

Coorientadora: Pesquisadora Dr^ª. Ana Paula Dionisio.

FORTALEZA

2018

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)

- S697a Sousa, Jessica Maria Silva.
Aspectos tecnológicos e atividades biológicas do extrato concentrado das fibras do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) / Jessica Maria Silva Sousa. – 2018.
192 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.
Coorientação: Profa. Dra. Ana Paula Dionisio.
1. *Anacardium occidentale* L.. 2. fibra residual. 3. corante natural. 4. composto bioativo. 5. avaliação biológica. I. Título.

CDD 664

JESSICA MARIA SILVA SOUSA

ASPECTOS TECNOLÓGICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO
CONCENTRADO DAS FIBRAS DO PEDÚNCULO DE CAJU

(*Anacardium occidentale* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Pesquisadora Dr^a. Ana Paula Dionisio (Coorientadora)

Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Dr. Fernando Antônio Pinto de Abreu (Membro)

Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Pesquisadora Dr^a. Celli Rodrigues Muniz (Membro)

Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Prof^a. Dr^a. Larissa Moraes Ribeiro da Silva (Membro)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Luciana de Siqueira Oliveira (Membro)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina da Silva Pereira (Membro)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Dedico este trabalho aos meus pais, Salete e Valder, e à minha irmã, Larissa, por todo apoio e incentivo dedicados durante a caminhada até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo cuidado minucioso, por se fazer presente em todos os momentos, sobretudo nos mais difíceis, sempre usando as pessoas a minha volta como instrumentos do seu amor.

Ao Espírito Santo, pelas sutilezas do caminho: palavras doces, abraços carinhosos e razão envolta de muito amor, que me fizeram compreender tão bem certas situações e, sobretudo, despertaram em mim o sentimento de gratidão.

A Jesus que, através do seu próprio exemplo, ensinou que sempre posso me tornar uma pessoa melhor.

À minha mãe, pelo amor incondicional que transborda em gestos, palavras e cuidados materiais.

À minha irmã Larissa, por inúmeras conversas que acalmaram meu coração e meu espírito.

Ao meu pai, à minha irmã Jessiane, à Elenice e à tia Wânia, por toda torcida a favor de que eu conseguisse concluir mais essa etapa da minha vida.

À minha orientadora, Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, pelos ensinamentos, pela paciência, e pelos conselhos.

À minha coorientadora, Ana Paula Dionisio, por me acolher na Embrapa com todo carinho e atenção, pela preciosa parceria, pelo conhecimento repassado, pela convivência e sorriso fácil, pela paciência gigante e pela confiança.

À banca examinadora, pelas valiosas contribuições para aprimoramento deste trabalho.

Ao Professor José Maria, por disponibilizar o Laboratório de Controle de Qualidade e Secagem de Alimentos às minhas análises.

À pesquisadora Celli Rodrigues Muniz, por toda ajuda com a microscopia, sempre me recebendo com muita simpatia, educação e respeito.

A todos do Laboratório de Produtos Agroindustriais da Embrapa, que tanto ajudaram, seja no processamento das fibras, seja nas análises, seja nas conversas divertidas: Mikael, Iara, Carol, Lais, Mayara Goiana, Thiago, Bruno Damião, Lidiane, Robério, John, Monique, Larissa, Claudia, Fernando e Arthur.

À Carol Lima e à Mayara Iunes, que trabalharam arduamente nesse projeto e foram muito mais do que excelentes estagiárias da EMBRAPA, tendo sido parceiras compreensivas (ouviram muitos desabafos e reclamações). Aprendi muito com ambas e posso dizer que me tornei uma pessoa melhor depois de conviver com elas. Carol foi companheira de dancinhas e comentadora de séries e filmes também, e isso foi muito importante para aliviar o estresse do dia a dia. Sem essas meninas trabalhando nesse projeto nem consigo imaginar como teria sido.

À Carol Garcia, por toda ajuda. Embora ela tenha chegado na Embrapa mais para o fim do doutorado, exerceu um papel muito especial, pois, além de ajudar muitíssimo com análises, se mostrou uma pessoa muito querida e cheia de uma energia boa. Grata pelas conversas agradabilíssimas, pela boa influência no quesito alimentação saudável e pelos muitos desabafos ouvidos também.

À Sandra, que ajudou muitíssimo com os experimentos do zebrafish, sempre com um sorriso no rosto e muita boa vontade. Sem falar das conversas prazerosas que tivemos.

À Karine Holanda, por todas as vezes que me ajudou a mexer no Prisma (corrigindo os gráficos) e tantas outras dúvidas que me ajudou a eliminar, sempre com muita paciência, boa vontade e cheia de uma ótima energia.

A todos do Laboratório de Controle de Qualidade e Secagem de Alimentos, em especial ao Diácomo, Jovan, Luciana, Janaína, Ana Paula e Hamílton, não só por toda a ajuda com as secagens e análises, mas principalmente pela gentileza, pelo bom humor, pela descontração e pelas conversas engraçadas. Vocês fizeram com que os momentos cansativos e estressantes fossem menos penosos. Devo a vocês infinitos bolos de cenoura com cobertura de chocolate.

À Flayanna, não só por toda ajuda com a avaliação antimicrobiana, mas principalmente pela boa vontade e gentileza.

Ao analista Dr. Paulo Ricelli e ao doutorando Francisco Oiram Filho, do Laboratório de Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa, por toda a ajuda com os ácidos anacárdicos.

Ao Paulo Mendes, Secretário da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo profissionalismo e amizade.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Agroindústria Tropical), por financiar a pesquisa e disponibilizar a estrutura necessária para realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, por me propiciar cursar o Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos e assim me aprimorar profissionalmente.

RESUMO

O extrato concentrado de caju (ECC) é obtido a partir das fibras residuais do processamento do pedúnculo através de um processo que engloba diversas etapas tecnológicas. Possui intensa coloração amarela, devido a presença de carotenoides, com potencial de uso como corante alimentar. Além disso, contém ácidos anacárdicos (AA), que embora associados a efeitos biológicos positivos, tais como atividade antitumoral e antioxidante, também têm sido relatados como tóxicos. Assim, faz-se necessário estudos relativos ao seu processo de obtenção, estabilidade e toxicidade. Para tanto, fibras residuais foram processadas para obtenção do ECC e amostras após as seguintes etapas foram coletadas: prensagem, centrifugação, microfiltração e pasteurização, sendo analisadas com relação aos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE) e conteúdo de carotenoides totais (CT), polifenóis extraíveis totais (PET) e AA. Em seguida, empregou-se o delineamento de Plackett-Burman (PB) para avaliar o efeito de variáveis de processamento e armazenamento sobre a estabilidade do ECC. A influência de 8 variáveis foi avaliada: tempo de processo; temperatura de armazenamento; pH; tipo de embalagem; cor da embalagem, além da presença ou ausência de carboximetilcelulose, goma de cajueiro ou lecitina. Na sequência, foi realizado um delineamento do tipo composto central rotacional (DCCR), no qual a temperatura de processo e o pH foram estudados. A temperatura de processo variou de 60 a 90 °C e o pH de 2,5 a 7,0 e as variáveis de resposta foram os parâmetros de cor. Em paralelo, realizou-se a atomização do ECC e para isso foram empregados dois DCCRs, nos quais utilizou-se como material encapsulante goma de cajueiro (GC) ou maltodextrina (M). As variáveis independentes foram: concentração de encapsulante (2-5%) e temperatura de entrada no atomizador (130-170 °C) e as variáveis de resposta foram: higroscopicidade, umidade, solubilidade (S), reconstituição da cor (RC), fluidez e retenção de carotenoides totais (RCT). Concomitantemente a atomização, realizou-se uma liofilização, que deu origem a um extrato em pó sem adição de encapsulantes (ECC-L). Assim, O ECC-L e os ECCs atomizados (ECC-GC e ECC-M) foram avaliados *in vivo* com relação a sua toxicidade frente ao zebrafish e *in vitro* com relação a sua atividade antiproliferativa [glioma (U251), mama (MCF7), carcinoma do ovário multirresistente (NCI/ADR-RES), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), cólon (HT-29)] e antimicrobiana [*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 51812), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)]. Os resultados mostraram que as etapas de obtenção do ECC não causaram alterações relevantes para a cor final do ECC. A pré-filtração, a centrifugação e a pasteurização causaram diminuição dos CT e PET, entretanto, não causaram nenhuma alteração

nos teores de AA. Já a microfiltração concentrou os CT e os AA no ECC. O delineamento estatístico de PB mostrou que o emprego de menor tempo para o tratamento térmico e a ausência dos estabilizantes carboximetilcelulose, goma de cajueiro e lecitina são melhores para a estabilidade do ECC. Além disso, observou-se que o ECC pode ser armazenado fora de refrigeração, preferencialmente em embalagens de vidro, sendo sua cor indiferente, e é mais compatível com matrizes ácidas. Já o DCCR mostrou que a estabilidade do ECC foi afetada negativamente por condições de pH mais elevado e temperatura mais drástica. Os pontos dos DCCRs referentes a 150 °C e 5% de GC e 150 °C e 3,5% de M foram considerados ótimos para as respostas S e RCA, respectivamente. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que as microcápsulas obtidas apresentaram formas arredondadas e paredes sem rachaduras. Entretanto, as microcápsulas de GC apresentaram diâmetros maiores e maiores quantidades de pontos de retração da superfície. No ensaio de toxicidade *in vivo* frente ao zebrafish, o ECC não se mostrou tóxico durante 96 horas de análise. Já nos ensaios *in vitro* constatou-se que nenhuma das amostras apresentou atividade antiproliferativa ($IC_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$); e observou-se que o ECC-L (100 mg.mL^{-1} e 50 mg.mL^{-1}) exibiu halos de inibição de 13 e 11 mm, respectivamente, contra *L. monocytogenes*. O dano causado a essa bactéria foi comprovado por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Portanto, o ECC representa uma fonte potencial e segura de compostos bioativos para uso como aditivo pela indústria alimentícia, podendo ser empregado em uma ampla gama de produtos, especialmente aqueles de alta acidez e submetidos a tratamento térmico brando.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L. Fibra residual. Corante natural. Composto bioativo. Avaliação biológica.

ABSTRACT

The concentrated cashew extract (CCE) is obtained from the residual fibers of the peduncle processing through a process that encompasses several technological stages. It has intense yellow coloration, due to the presence of carotenoids, with potential of use as food coloring. In addition, it contains anacardic acids (AA), which although associated with positive biological effects, such as antitumor and antioxidant activity, have also been reported as toxic. Thus, studies on its process of obtaining, stability and toxicity are required. For this, residual fibers were processed to obtain the CCE and samples after the following steps were collected: pressing, centrifugation, microfiltration and pasteurization, being analyzed with respect to the color parameters (L^* , a^* , b^* and ΔE) and content of total carotenoids (TC), total extractable polyphenols (TEP) and AA. Next, the Plackett-Burman (PB) design was used to evaluate the effect of processing and storage variables on the CCE stability. The influence of 8 variables was evaluated: process time; storage temperature; pH; kind of packing; color of the package, in addition to the presence or absence of carboxymethylcellulose, cashew gum or lecithin. A rotational central composite design (RCCD) design was then carried out, in which the process temperature and pH were studied. The process temperature varied from 60 to 90 °C and the pH from 2.5 to 7.0 and the response variables were the color parameters. In parallel, the CCE was atomized and two DCCRs were used, in which cashew gum (CG) or maltodextrin (M) was used as the encapsulating material. The independent variables were: concentration of encapsulant (2-5%) and entry temperature in the atomizer (130-170 °C) and response variables were: hygroscopicity, moisture, solubility (S), color reconstitution (CR), fluidity and retention of total carotenoids (RTC). Concomitantly with the atomization, a lyophilization was carried out, which gave rise to a powdered extract without addition of encapsulants (CCE-L). Thus, CCE-L and CCE-M were evaluated in vivo for their zebrafish toxicity and in vitro for their antiproliferative activity [(glioma (U251), breast (MCF7), multidrug resistant ovary carcinoma (NCI/ADR-RES), lung (NCI-H460), prostate (PC-3), ovary (OVCAR-3), colon (HT-29)], and antimicrobial [*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 51812), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)]. The results showed that the steps of obtaining the CCE did not cause changes relevant to the final color of the CCE. Initial filtration, centrifugation and pasteurization caused a decrease in TC and TEP, however, did not cause any alteration in AA levels. Microfiltration concentrated TC and AA on CCE. The statistical design of PB showed that the use of less time for the heat treatment and the absence of stabilizers carboxymethylcellulose, cashew and lecithin are better for

CCE stability. In addition, it has been observed that the CCE can be stored out of refrigeration, preferably in glass containers, its color being indifferent, and more compatible with acid matrices. On the other hand, RCCD showed that CCE stability was negatively affected by higher pH and more drastic temperature conditions. The RCCD points for 150 °C and 5% GC and 150 °C and 3.5% M were considered optimal for S and RCA responses, respectively. Scanning electron microscopy (SEM) showed that the microcapsules obtained showed rounded shapes and walls without cracking. However, CG microcapsules presented larger diameters and higher amounts of surface retraction points. In the in vivo toxicity test against zebrafish, CCE did not prove to be toxic for 96 hours of analysis. In the in vitro assays, none of the samples showed antiproliferative activity ($IC_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$); and CCE-L (100 mg.mL^{-1} and 50 mg.mL^{-1}) was shown to have inhibition halos of 13 and 11 mm, respectively, against *L. monocytogenes*. The damage caused to this bacterium was confirmed by transmission electron microscopy (TEM). Therefore, the CCE represents a potential and safe source of bioactive compounds for use as an additive in the food industry and can be used in a wide range of products, especially those of high acidity and subjected to mild heat treatment.

Key words: *Anacardium occidentale* L. Residual fibers. Natural dye. Bioactive compound. Biological evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química de alguns carotenoides	31
Figura 2 -	Modelos de partículas encapsuladas	35
Figura 3 -	Esquema de um spray-dryer	37
Figura 4 -	Fibras residuais do processamento do pedúnculo de caju	59
Figura 5 -	Fluxograma do processamento das fibras residuais do pedúnculo para obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) com destaque para as etapas das quais foram retiradas amostras (1-5) para análises de cor, teor de carotenoides totais e ácidos anacárdicos	60
Figura 6 -	Etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC)	61
Figura 7 -	Distribuição das amostras nos eixos a^* e b^* do sistema de coordenadas de cores CIELAB	68
Figura 8 -	Identificação de ácidos anacárdicos por análise de UPLC-QToF-MS ^E , em modo de ionização negativo	72
Figura 9 -	Amostras do extrato concentrado em carotenoides (ECC) em diferentes condições de processamento (11 ensaios + controle)	86
Figura 10 -	Distribuição das amostras (obtidas nos diferentes tratamentos e tempos de estudo) nos eixos a^* e b^* do sistema de coordenadas de cores CIELAB	89
Figura 11 -	Curvas de contorno para o parâmetro L^* do extrato concentrado de carotenoides (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura em quatro tempos de estudo: 1 dia (a), 7 dias (b), 21 dias (c) e 42 dias (d)	103
Figura 12 -	Parâmetro a^* do extrato concentrado de carotenoides (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura em quatro tempos de estudo	106
Figura 13 -	Parâmetro b^* do extrato concentrado de carotenoides (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura em três tempos de estudo: 1 dia (a), 7 dias (b) e 42 dias (c)	108
Figura 14 -	Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de maltodextrina e a temperatura de secagem na entrada do atomizador para a solubilidade	126
Figura 15 -	Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de goma de cajueiro e a temperatura de secagem na entrada do atomizador para o rendimento	126

Figura 16 -	Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de maltodextrina e temperatura de secagem na entrada do atomizador para a retenção de carotenoides	127
Figura 17 -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato em pó microencapsulado com goma de cajueiro (ECC – GC)	134
Figura 18 -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato em pó microencapsulado com maltodextrina (ECC – M)	134
Figura 19 -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando o interior das microcápsulas de goma de cajueiro (a) e maltodextrina (b)	135
Figura 20 -	Microfotografias obtidas por microscopia óptica de microcápsulas de goma de cajueiro	137
Figura 21 -	Microfotografias obtidas por microscopia óptica de microcápsulas de maltodextrina	137
Figura 22 -	Atividade antimicrobiana do extrato concentrado de caju (ECC) contra a bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19115)	159
Figura 23 -	Micrografias eletrônicas de transmissão de <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19115)	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais tipos de corantes artificiais	29
Tabela 2 -	Efeito das etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) sobre os parâmetros de cor	66
Tabela 3 -	Efeito das etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) sobre o conteúdo de carotenoides totais	68
Tabela 4 -	Efeito das etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) sobre o conteúdo de polifenóis extraíveis totais (PET)	70
Tabela 5 -	Identificação dos diferentes ácidos anacárdicos, trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1), presentes no ECC, via UPLC-QTOF-MSE	72
Tabela 6 -	Efeito das etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) sobre o conteúdo de ácidos anacárdicos	73
Tabela 7 -	Variáveis e níveis avaliados no delineamento de Plackett-Burman	83
Tabela 8 -	Matriz do delineamento de Plackett-Burman com os valores codificados das variáveis independentes	83
Tabela 9 -	Características da amostra usada como controle	84
Tabela 10 -	Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) com os valores codificados e reais das variáveis independentes	86
Tabela 11 -	Resultados obtidos para os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE), potencial zeta (PZ), carotenoides totais (CT) e ácidos anacárdicos (AA) após 1 dia, 45 dias e 90 dias de armazenamento	88
Tabela 12 -	Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia, 45 dias e 90 dias de armazenamento para os parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e ΔE	91
Tabela 13 -	Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1, 45 e 90 dias para os carotenoides totais	93
Tabela 14 -	Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia, 45 dias e 90 dias para o potencial zeta	96
Tabela 15 -	Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia, 45 dias e 90 dias para os teores de ácidos anacárdicos: trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1)	98

Tabela 16 -	Resultados experimentais dos parâmetros L^* , a^* , b^* e ΔE de cor do extrato concentrado de caju (ECC) submetido a diferentes condições de processamento	100
Tabela 17 -	Coefficientes de regressão para o parâmetro L^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura	102
Tabela 18 -	ANOVA para o parâmetro L^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura	102
Tabela 19 -	Coefficientes de regressão para o parâmetro a^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura	104
Tabela 20 -	ANOVA para o parâmetro a^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura	105
Tabela 21 -	Coefficientes de regressão para o parâmetro b^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura	107
Tabela 22 -	ANOVA para o parâmetro b^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura	107
Tabela 23 -	Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com os valores reais e codificados das variáveis independentes	119
Tabela 24 -	Classificação dos pós de acordo com sua higroscopicidade	120
Tabela 25 -	Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) com temperatura de entrada e concentração de encapsulante (GC ou M) e dados experimentais obtidos para as variáveis respostas estudadas	124
Tabela 26 -	Coefficientes de regressão para as respostas solubilidade, rendimento e retenção de carotenoides	125
Tabela 27 -	Análise de variância do modelo quadrático para as variáveis solubilidade, rendimento e retenção de carotenoides	125
Tabela 28 -	Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo do processo	133
Tabela 29 -	Caracterização das amostras ECC-L, ECC-M e ECC-GC	154
Tabela 30 -	Toxicidade aguda de ECC-L, ECC-M e ECC-GC em zebrafish adulto	156
Tabela 31 -	Concentração de doxorubicina, ECC-L, ECC-M, ECC-GC e micropartículas de GC e M vazias, necessária para causar 50% de inibição do crescimento celular (valores de IC_{50}), em $\mu\text{g/ml}$, após 48 horas de tratamento	157

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores de L^* obtidos em cada tempo de armazenamento (dias) para todos os ensaios do delineamento e controle	101
Gráfico 2 -	Valores de a^* obtidos em cada tempo de armazenamento (dias) para todos os ensaios do delineamento e controle	104
Gráfico 3 -	Valores de b^* de acordo com o tempo de armazenamento (dias) para todos os ensaios do delineamento e controle	106
Gráfico 4 -	Efeito do ECC-L ou ECC-M ou ECC-GC (2 ou 40 ou 200 mg/Kg; v.o.) na atividade locomotora do zebrafish adulto, analisado individualmente durante 0-5 minutos no teste de campo aberto	155

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	20
1.1	Objetivos	25
<i>1.1.1</i>	<i>Objetivo geral</i>	25
<i>1.1.2</i>	<i>Objetivos específicos</i>	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1	Corantes alimentícios	26
<i>2.1.1</i>	<i>Legislação</i>	27
<i>2.1.2</i>	<i>Corantes artificiais</i>	28
<i>2.1.3</i>	<i>Corantes naturais</i>	29
2.2	Carotenoides como corantes naturais	30
2.3	Extrato concentrado de caju (ECC) obtido a partir das fibras residuais do pedúnculo	33
2.4	Encapsulação por atomização aplicada aos corantes naturais	34
2.5	Ácidos anacárdicos	39
2.6	Avaliação toxicológica de extratos naturais	40
<i>2.6.1</i>	<i>Danio rerio</i>	42
<i>2.6.2</i>	<i>Atividade antiproliferativa</i>	42
<i>2.6.3</i>	<i>Atividade antimicrobiana</i>	43
<i>2.6.3.1</i>	<i>Teste de difusão em ágar</i>	45
3	EXTRATO CONCENTRADO DE CAJU: EFEITO DAS ETAPAS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO NA COR E TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS	56
3.1	Introdução	58
3.2	Material e métodos	59
<i>3.2.1</i>	<i>Matéria-prima</i>	59
<i>3.2.2</i>	<i>Obtenção do extrato concentrado de caju (ECC)</i>	60
<i>3.2.2.1</i>	<i>Tratamento enzimático</i>	60
<i>3.2.2.2</i>	<i>Prensagem, pré-filtração e centrifugação</i>	61
<i>3.2.2.3</i>	<i>Microfiltração</i>	62
<i>3.2.2.4</i>	<i>Tratamento térmico</i>	62
<i>3.2.3</i>	<i>Avaliação dos efeitos das etapas do processamento para obtenção do ECC</i>	62

3.2.3.1	<i>Cor</i>	63
3.2.3.2	<i>Carotenoides totais (CT)</i>	63
3.2.3.3	<i>Polifenóis extraíveis totais (PET)</i>	64
3.2.3.4	<i>Identificação de ácidos anacárdicos por UPLC-QTOF-MS^E</i>	64
3.2.3.5	<i>Quantificação de ácidos anacárdicos por HPLC-DAD</i>	65
3.2.4	<i>Análise estatística</i>	65
3.3	Resultados e discussão	66
3.3.1	<i>Cor</i>	66
3.3.2	<i>Carotenoides totais (CT)</i>	68
3.3.3	<i>Polifenóis extraíveis totais (PET)</i>	69
3.3.4	<i>Ácidos anacárdicos (AA)</i>	71
3.3.4.1	<i>Identificação de ácidos anacárdicos por UPLC-QToF-MS^E</i>	71
3.3.4.2	<i>Quantificação de ácidos anacárdicos por HPLC-DAD</i>	72
3.4	Conclusão	74
4	EXTRATO CONCENTRADO DE CAJU: DETERMINAÇÃO DE FATORES-CHAVE PARA SUA ESTABILIDADE	79
4.1	Introdução	81
4.2	Material e métodos	83
4.2.1	<i>Matéria-prima e obtenção do extrato concentrado de caju (ECC)</i>	83
4.2.2	<i>Delineamento de Plackett-Burman (PB)</i>	83
4.2.2.1	<i>Métodos analíticos</i>	84
4.2.2.1.1	<i>Cor</i>	84
4.2.2.1.2	<i>Carotenoides totais (CT)</i>	85
4.2.2.1.3	<i>Potencial zeta (PZ)</i>	85
4.2.2.1.4	<i>Identificação (UPLC-QToF-MS^E) e quantificação (HPLC-DAD) de ácidos anacárdicos (AA)</i>	85
4.2.3	<i>Delineamento composto central rotacional (DCCR 2²)</i>	85
4.3	Resultados e discussão	87
4.3.1	<i>Avaliação dos efeitos das variáveis de processamento e armazenamento do delineamento de Plackett e Burman (PB)</i>	87
4.3.1.1	<i>Cor (L*, a*, b* e ΔE)</i>	87
4.3.1.2	<i>Carotenoides totais (CT)</i>	92
4.3.1.3	<i>Potencial zeta (PZ)</i>	95

4.3.1.4	<i>Ácidos anacárdicos (AA)</i>	97
4.3.2	<i>Delineamento composto central rotacional (DCCR 2²)</i>	99
4.3.2.1	<i>Parâmetro L*</i>	101
4.3.2.2	<i>Parâmetro a*</i>	104
4.3.2.3	<i>Parâmetro b*</i>	106
4.4	Conclusão	109
5	EXTRATO CONCENTRADO DE CAJU: SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PÓ	114
5.1	Introdução	116
5.2	Material e métodos	117
5.2.1	<i>Matéria-prima e obtenção do extrato concentrado em carotenoides (ECC)</i>	117
5.2.2	<i>Agentes encapsulantes</i>	117
5.2.3	<i>Preparação da microcápsula</i>	118
5.2.4	<i>Atomizador e condições do processo</i>	118
5.2.5	<i>Delineamento experimental</i>	118
5.2.6	<i>Métodos analíticos</i>	119
5.2.6.1	<i>Rendimento (R)</i>	119
5.2.6.2	<i>Umidade (U)</i>	119
5.2.6.3	<i>Higroscopicidade (H)</i>	120
5.2.6.4	<i>Solubilidade (S)</i>	120
5.2.6.5	<i>Teste de fluidez (TF)</i>	120
5.2.6.6	<i>Reconstituição da cor (RC)</i>	121
5.2.6.7	<i>Carotenoides totais (CT) e retenção de carotenoides totais (RCT)</i>	121
5.2.7	<i>Validação do modelo e caracterização das microcápsulas</i>	122
5.3	Resultados e discussão	123
5.3.1	<i>Rendimento (R)</i>	127
5.3.2	<i>Higroscopicidade (H) e teste de fluidez (TF)</i>	129
5.3.3	<i>Umidade (U)</i>	130
5.3.4	<i>Solubilidade (S)</i>	130
5.3.5	<i>Reconstituição da cor (RC)</i>	131
5.3.6	<i>Retenção de carotenoides totais (RCT)</i>	132
5.3.7	<i>Validação do modelo e caracterização das microcápsulas</i>	133
5.4	Conclusão	137

6	EXTRATO CONCENTRADO DE CAJU: UMA ABORDAGEM BIOLÓGICA DESSE POTENCIAL ADITIVO ALIMENTAR	143
6.1	Introdução	146
6.2	Material e Métodos	147
6.2.1	<i>Amostras de extrato concentrado de caju (ECC)</i>	147
6.2.2	<i>Métodos analíticos para caracterização das amostras</i>	147
6.2.2.1	<i>Cor</i>	148
6.2.2.2	<i>Carotenoides totais</i>	148
6.2.2.3	<i>Identificação e quantificação de ácidos anacárdicos</i>	148
6.2.3	<i>Avaliação dos efeitos biológicos</i>	148
6.2.3.1	<i>Avaliação toxicológica frente ao zebrafish (Danio rerio)</i>	148
6.2.3.1.1	<i>Zebrafish (Danio rerio)</i>	148
6.2.3.1.2	<i>Protocolo geral</i>	149
6.2.3.1.3	<i>Teste de campo aberto</i>	149
6.2.3.1.4	<i>Toxicidade aguda</i>	149
6.2.3.2	<i>Atividade antiproliferativa</i>	150
6.2.3.2.1	<i>Condições de cultura celular</i>	150
6.2.3.2.2	<i>Preparação das amostras</i>	150
6.2.3.2.3	<i>Protocolo de atividade antiproliferativa</i>	150
6.2.3.3	<i>Atividade antimicrobiana</i>	151
6.2.3.3.1	<i>Microrganismos</i>	151
6.2.3.3.2	<i>Preparo do inóculo</i>	151
6.2.3.3.3	<i>Método de difusão em ágar</i>	151
6.2.3.3.4	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	152
6.3	Resultados e discussão	152
6.3.1	<i>Caracterização das amostras</i>	152
6.3.1	<i>Avaliação toxicológica frente ao zebrafish (Danio rerio)</i>	155
6.3.3	<i>Atividade antiproliferativa</i>	157
6.3.4	<i>Atividade antimicrobiana</i>	158
6.4	Conclusão	160
7	CONCLUSÃO GERAL	167
8	SUGESTÕES FUTURAS	168
	REFERÊNCIAS	168

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma cultura com papel econômico e social de destaque na região Nordeste do Brasil (REIS *et al.*, 2017). O principal produto é a castanha de caju, que corresponde a apenas 10% do peso total do fruto enquanto o pedúnculo de caju corresponde a cerca de 90% (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). O principal produto obtido do pedúnculo de caju é o suco, comercializado como suco integral ou néctar (QUEIROZ *et al.*, 2011).

O processo industrial de produção do suco de caju produz um volume de resíduo que corresponde a aproximadamente 20% do peso do pedúnculo de caju (SANTOS *et al.*, 2007; AL-DHABI *et al.*, 2017), representando um dos principais resíduos do agronegócio brasileiro (CORREIA *et al.*, 2013; WANDERLEY *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2014). Entretanto, apenas pequenas quantidades desse subproduto são usadas, geralmente como um complemento nutricional para a alimentação animal. Em contrapartida, esse subproduto retém altos níveis de nutrientes e compostos bioativos que poderia ser utilizado pela indústria de alimentos, minimizando possíveis problemas ambientais e gerando produtos com valor agregado (AL-DHABI *et al.*, 2017).

Assim, visando o aproveitamento das fibras residuais do processamento do pedúnculo de caju, a EMBRAPA Agroindústria Tropical desenvolveu um método, que engloba diversas etapas tecnológicas, tais como tratamento enzimático, prensagem, filtração e microfiltração, para obtenção de um extrato concentrado de caju (ECC) (ABREU *et al.*, 2013a e 2013b). Esse extrato possui intensa coloração amarela, com potencial para ser empregado como corante natural alimentício, podendo vir a ser uma alternativa ao uso do corante artificial tartrazina, que vem sendo relacionado a efeitos adversos a saúde humana como asma, bronquite, rinite, náusea, broncoespasmos, urticária, eczema e dor de cabeça (BRASIL, 2007).

O ECC apresenta um perfil de 11 carotenoides, sendo os isômeros da auroxantina e a β -criptoxantina os principais constituintes, representando em torno de 50% do total de carotenoides, seguidos de zeaxantina, mutatoxantina e luteína e, com menor concentração α e β -caroteno, além de outros, como anteraxantina (ABREU *et al.*, 2013a). Os carotenoides, além de apresentar importante valor nutricional, devido a atividade pró-vitâmica (α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina), apresentam propriedades funcionais, podendo prevenir a degeneração macular relacionada a idade (luteína e zeaxantina) e doenças degenerativas como arteriosclerose, catarata, esclerose múltipla e câncer (RODIGUEZ-AMAYA; KIMURA;

AMAYA-FARFAN, 2008; VALDUGA *et al.*, 2009; RAMEL *et al.*, 2012.) devido ao seu potencial de capturar radicais livres e oxigênio singlete.

Além da presença de carotenoides, recentemente foram identificados e quantificados ácidos anacárdicos em sua constituição (DIONISIO *et al.*, 2018). Os ácidos anacárdicos, termo coletivo para a mistura de congêneres do ácido 6-alkilbenzóico, são produzidos em várias plantas (RADDE *et al.*, 2016) e apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, incluindo inibição da atividade da histona acetiltransferase (HEMSHKHAR *et al.*, 2012), atividade antioxidante (KUBO *et al.*, 2006), inibição de células tumorais de mama (SCHULTZ, 2010; HSIEH; HERNÁNDEZ-LEDESMA; LUMEN, 2011) e próstata (WU *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2012), além de exercer atividade antimicrobiana (KUBO *et al.*, 1993; MUROI; KUBO, 1996; KUBO; LEE; KUBO, 1999; NARASIMHAN *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2013; HUNDT; LI; LIU, 2015; HOLLANDS *et al.*, 2016; MUZZAFAR *et al.*, 2016) e inseticida (OLIVEIRA *et al.*, 2010). De acordo com Correia *et al.* (2006) o comprimento das cadeias alquílicas afeta sua atividade biológica, que pode estar relacionada com o aumento da solubilidade das porções fenólicas nas regiões lipídicas das membranas celulares. Por outro lado, são encontrados na literatura relatos de toxicidade atribuída aos ácidos anacárdicos e que variam de acordo com a dose administrada (CARVALHO *et al.*, 2011; MOTTI *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2015).

Vislumbrando o emprego do ECC como aditivo alimentar algumas lacunas precisam ser preenchidas, principalmente no que diz respeito a sua toxicidade, uma vez que apresenta em sua constituição ácidos anacárdicos e outros componentes concentrados em relação aos teores iniciais presentes no pedúnculo devido ao processo de microfiltração. Além disso, para tornar viável o uso do ECC torna-se interessante estudos acerca de seu processamento, estabilidade, atomização e avaliação das atividades antiproliferativa e antimicrobiana.

Para tanto, o presente estudo foi dividido em 5 etapas. Inicialmente, é apresentada uma revisão bibliográfica com os principais assuntos abordados ao longo do trabalho. Em seguida, é realizado um estudo dos efeitos das etapas do processo de obtenção do ECC sobre sua cor e seus conteúdos de compostos bioativos. Posteriormente, é abordado extenso estudo, com o auxílio de ferramentas estatísticas, acerca dos efeitos das variáveis de processamento e armazenamento sobre a estabilidade físico-química do ECC. Após, é abordada a otimização da secagem do ECC por atomização, utilizando goma de cajueiro ou maltodextrina como agentes encapsulantes. Por fim, é apresentado um estudo de avaliações biológicas do ECC: toxicidade *in vivo* frente ao modelo animal zebrafish (*Danio rerio*) e atividades antimicrobiana e antiproliferativa contra células tumorais humanas.

Referências

ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M.; DIONISIO, A. P.; CARAIL, M.; CARIS-VEYRAT, C.; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: a focus on carotenoids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 25-31, 2013a.

ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M.; PALLET, D.; REYNES, M.; VAILLANT, F.; FURLANI, F. C. T. **Processo de concentração e purificação de extrato obtido a partir de resíduos de pseudofruto de caju e produto de elevado teor de carotenoides**. Pedido Internacional no PCT/BR2013/000130. Instituição promotora/financiadora: Embrapa/CIRAD, 2013b.

AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 34, p. 206-213, 2017.

BRASIL. Informe técnico N° 30, de 24 de julho de 2007. **Considerações sobre o corante amarelo tartrazina**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+30%2C+de+24+de+julho+de+2007/d47a1fea-fd03-4e94-8dff-fd87d3b1296a>>. Acesso em: 04/10/2018.

CARVALHO, A. L.; ANNONI, R.; SILVA, P. R.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; TREVISAN, M. T.; MAUAD, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.

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

CORREIA, J. A.C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P.; Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: study of parameters. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 139, p. 249–256, 2013.

DIONISIO, A. P.; ABREU, F. A. P. de; BRITO, E. S. de; WURLITZER, N. J.; RIBEIRO, P. R. V.; GOES, T. de S.; SOUSA, J. M. S.; IUNES, M. F.; LIMA, A. C. V. de; OIRAM FILHO, F. Extrato concentrado de carotenoides obtido da fibra do pedúnculo de caju: avaliação da toxicidade com uso do bioensaio de *Artemia salina*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 162, 2018.

FIGUEIREDO R. W. de; LAJOLO, F. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Physical-chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during development and maturation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 77, p. 343-347, 2002.

HEMSHEKHAR, M.; SANTHOSH, M. S.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s.l.], v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012.

HOLLANDS, A.; CORRIDEN, R.; GYSLER, G.; DAHESH, S.; OLSON, J.; ALI, S. R.; KUNKEL, M. T.; LIN, A. E.; FORLI, S.; NEWTON, A. C.; KUMAR, G. B.; NAIR, B. G.; PERRY, J. J. P.; NIZET, V. Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates neutrophil extracellular trap production and bactericidal activity. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 291, n. 27, p. 13964–13973, 2016.

HSIEH, C.-C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; LUMEN, B. O. de. Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 125, p. 630-636, 2011.

HUNDT, J.; ZHUBING, L.; LIU, O. The inhibitory effects of anacardic acid on hepatitis C virus life cycle. **PloS One**, [s.l.], DOI:10.1371/journal.pone.011751, p. 1-11, 2015.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Structure–antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 41, p. 1016–1019, 1993.

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-helicobacter pylori agentes from the cashew apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 47, p. 533–537, 1999.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HÁ, T. J.; TSUJIMOTO, K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 99, n. 33, p. 555-562, 2006.

LEITE, A. de S.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L. da S. O.; GOMES JÚNIOR, A. L.; LIMA, S. G. de L.; CITÓ, A. M. das G. L.; FREITAS, R. M. de; MELO-CAVALCANTE, A. A. de C.; LOPES, J. A. D. L. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays.(Research Article)(Report). **BioMed Research International**, [s.l.], p. 1-16, 2015.

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

MUROI, H.; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, [s.l.], v. 80, p. 387–394, 1996.

MUZAFFAR, S.; BOSE, C.; BANERJI, A.; NAIR, B. G.; CHATTOO, B. B. Anacardic acid induces apoptosis-like cell death in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 100, p.323–335, 2016.

NARASIMHAN, B.; PANGHAL, A.; SINGH, N.; DHAKE, A. S. Efficiency of anacardic acid as preservative in tomato products. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.l.], v. 32, p. 600–609, 2008.

OLIVEIRA, M. S. C.; MORAIS, S. M.; MAGALHÃES, D. V.; BATISTA, W. P.; VIEIRA, I. G. P.; CRAVEIRO, A. A.; MENEZES, J. E. S. A.; CARVALHO, A. F. U.; LIMA, G. P. G. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 117, p. 165–170, 2010.

- QUEIROZ, C.; SILVA, A. J. R.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 125, n. 1, p. 128–132, 2011.
- RADDE, B. N.; ALIZADEH-RAD, N.; PRICE, S. M.; SCHULTZ, D. J.; KLINGE, C. M. Anacardic acid, salicylic acid, and oleic acid differentially alter cellular bioenergetic function in breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 117, p. 2521–2532, 2016.
- RAMEL, F.; BIRTIC, S.; CUINÉ, S.; TRIANTAPHYLIDÉS, R. J. L.; HAVAUX, M. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. **Plant Physiology Preview**, [s.l.], v. 158, p. 1267-1278, 2012.
- REIS, C. L. B.; SILVA, L. M. A.; RODRIGUES, T. H. S.; FÉLIX, A. K. N.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S. de; CANUTO, K. M.; ROCHA, M. V. P. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 224, p. 694–701, 2017.
- ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; DE ALBUQUERQUE, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; DE MACHADO, G. R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 243, p. 234–243, 2014.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008, 100p.
- SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, R. P.; FREIRE, V. N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 79, n. 4, p. 1432-1437, 2007.
- SCHULTZ, D. J.; WICKRAMASINGHE, N. S.; IVANOVA, M. M.; ISAACS, S. M.; DOUGHERTY, S. M.; IMBERT-FERNANDEZ, Y.; CUNNINGHAM, A. R.; CHEN, C.; KLINGE, C. M. Anacardic acid inhibits estrogen receptor alpha-DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 594–605, 2010.
- SHARMA, R.; KISHORE, N.; HUSSEIN, A.; LALL, N. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. **BMC Complementary Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 292, p. 1-10, 2013.
- TAN, J.; CHEN, B.; HE, L.; TANG, Y.; JIANG, Z.; YIN, G.; WANG, J.; JIANG, X. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. **Chinese Journal of Cancer Research**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 275-283, 2012.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

WANDERLEY, M. C., de, A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G. J., de, M.; GOUVEIA, E. R. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 128, p. 448–453, 2013.

WU, Y.; HE, L.; ZHANG, L.; CHEN, J.; YI, Z.; ZHANG, J.; LIU, M.; PANG, X. Anacardic acid (6-Pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, [s.l.], v. 339, n. 2, 2011.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de processamento e armazenamento na estabilidade do ECC, além de definir o processo agroindustrial de obtenção do material em pó, avaliando os potenciais efeitos biológicos desses produtos em modelos *in vitro* e *in vivo*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos das etapas do processo de obtenção do ECC na cor e conteúdos de carotenoides totais, polifenóis extraíveis totais e ácidos anacárdicos;
- Determinar fatores-chave de processamento e armazenamento responsáveis pela estabilidade do ECC utilizando um delineamento experimental tipo Plackett-Burman, avaliando a cor, o potencial zeta e os conteúdos de carotenoides totais e ácidos anacárdicos;
- Determinar as melhores condições de emprego do ECC em matrizes alimentícias;
- Obter ECC encapsulado com goma de cajueiro ou maltodextrina através de secagem por atomização, utilizando para isso um delineamento composto central rotacional (DCCR), e caracterizar os pós obtidos através de análises de rendimento, umidade, higroscopicidade, solubilidade, fluidez, reconstituição da cor, retenção de carotenoides, microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica de contraste;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do ECC, liofilizado e encapsulado com maltodextrina ou goma de cajueiro, frente ao modelo animal *zebrafish* (*Danio rerio*) e as atividades antiproliferativa, contra sete células tumorais humanas [U251 (glioma), MCF7 (mama), NCI/ADR-RES (carcinoma do ovário multirresistente), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário) e HT29 (cólon)] e uma célula não tumoral [HaCaT (queratinócitos humanos)], e antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar, contra *Escherichia coli* (ATCC 259222), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 51812), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Corantes alimentícios

As civilizações antigas já tinham o hábito de retirar substâncias da natureza para colorir seus alimentos, e assim melhorar sua aparência. Muitas substâncias de origem animal, vegetal ou mineral utilizadas como especiarias e condimentos, tinham o objetivo de colorir os alimentos, mas foram sendo gradualmente substituídas por outras com o objetivo específico de conferir cor (PRADO; GODOY, 2003).

A aparência de um alimento interfere em sua aceitabilidade e ambas são bastante afetadas pela cor. Desde muito cedo a natureza ensina-nos que certos alimentos devem ter determinadas cores e a aceitação futura desses alimentos depende muito de tais expectativas. A expressão “comer pelos olhos” traduz muito bem a importância da cor nos alimentos e é levada muito a sério pela indústria, que usa a cor como um importante parâmetro de controle de qualidade. Várias pesquisas comprovam que o consumidor avalia a cor de um produto alimentício associando-o ao sabor (PRADO; GODOY, 2003; HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013; ADITIVOS E INGREDIENTES, 2015).

Existe uma grande semelhança entre o que chamamos “ingrediente” e “aditivo”. Ambos são substâncias químicas que fazem parte integrante dos produtos. De uma forma geral, consideram-se como ingredientes as substâncias básicas incluídas na fórmula em maior volume, e aditivos as substâncias complementares, que em pequeno volume se destinam a preservar ou produzir determinadas características nos alimentos formulados (PRADO; GODOY, 2003). O item 1.2 da Portaria SVS/MS 540/97 define aditivo como sendo qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento (BRASIL, 1997). Portanto, os corantes artificiais são uma classe de aditivos sem valor nutritivo, introduzidos nos alimentos e bebidas com o único objetivo de conferir cor, tornando-os mais atrativos (PRADO; GODOY, 2003).

A Resolução nº 44 de 1977 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) define os corantes como sendo a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimentos (e bebidas); excluindo dessa definição os sucos e/ou os extratos de vegetais e outros ingredientes utilizados na elaboração

de alimentos (e bebidas) que possuem coloração própria, salvo se adicionados com a finalidade de conferir ou intensificar a coloração própria do produto.

2.1.1 Legislação

No Brasil, a agência reguladora que controla o uso de corantes nos alimentos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que se baseia em estudos internacionais para liberar o uso dos aditivos alimentares. Essa agência utiliza como referência as normas estabelecidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), pelo Codex Alimentarius, pela União Européia (EU) e pela Lista Geral Harmonizada de Aditivos do MERCOSUL (HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013).

A Resolução nº 44 de 1977 da CNNPA classifica os corantes em quatro tipos: corante orgânico natural; corante orgânico sintético (que pode ser artificial ou idêntico ao natural); corante inorgânico e caramelo (que pode ser natural ou obtido pelo processo amônia). Essa mesma Resolução estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas.

Pela legislação atual, através das Resoluções RDC nº 382 a 388, de 9 de agosto de 1999, da Agência Nacional e Vigilância Sanitária (ANVISA), são permitidos no Brasil para alimentos e bebidas o uso de apenas onze corantes artificiais: Amarelo crepúsculo; Amarelo Tartrazina; Azul brilhante FCF; Azul de Indigotina; Bodeaux S ou amaranto; Eritrosina; Ponceau 4 R; Vermelho 40; Azorrubina; Verde Rápido e Azul Patente V.

Com relação à rotulagem dos aditivos nos alimentos, a Resolução RDC nº 259, de 20 setembro de 2002 da ANVISA, determina que os aditivos alimentares devem ser declarados fazendo parte da lista de ingredientes. Nessa declaração, deve constar o nome completo ou seu número de INS (Sistema Internacional de Numeração, Codex Alimentarius FAO/OMS), ou ambos, com exceção do corante tartrazina, que deve obrigatoriamente ter o nome do corante escrito por extenso, segundo a Resolução RDC nº340 de 13 de dezembro de 2002 da ANVISA. Ademais, o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961 obriga que os alimentos contendo corante artificial apresentem a declaração: "Colorido Artificialmente".

Devido à diversidade de substâncias com poder corante, a lista de corantes permitidos em cada país varia substancialmente (PRADO; GODOY, 2003). Segundo Barros e Barros, (2010) nos EUA são autorizados apenas nove corantes sintéticos, sendo dois de uso controlado. Em países como o Japão, os corantes artificiais permitidos não passam de onze e na Europa há

até países que não admitem o uso de corantes artificiais em alimentos, como é o caso da Noruega e Suécia.

2.1.2 Corantes artificiais

Os corantes artificiais fornecem ampla gama de cores, proporcionando praticamente todas as tonalidades do espectro visível de cor. Além disso, a maioria dos corantes artificiais apresenta alta estabilidade (luz, oxigênio, calor e pH), uniformidade na cor conferida, alto poder tintorial, isenção de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo. (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2009).

Os corantes artificiais podem ser classificados com relação à função química: Corantes AZO, corantes trifenilmetanos e corantes indigóides (TABELA 1). A classe dos monoazos compreendem vários compostos que apresentam um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzeno por uma ligação azo ($N=N$). Esses anéis podem conter um, dois ou três grupos sulfônicos. Representa a classe de corantes sintéticos em alimentos mais importante e utilizada. A classe dos trifenilmetanos apresenta estrutura básica de três radicais arila, em geral grupos fenólicos, ligados a um átomo de carbono central; apresentam, ainda, grupos sulfônicos que lhes conferem alta solubilidade em água (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2009).

Devido ao aumento do número de compostos com poder corante e de seu uso estendido aos alimentos e bebidas, tornou-se necessário o controle de suas aplicações e surgiu uma maior preocupação com possíveis efeitos à saúde humana (PRADO; GODOY, 2003). O único objetivo dos corantes artificiais é conferir cor aos alimentos, essas substâncias não apresentam valor nutritivo. Segundo a ANVISA, estudos toxicológicos mostram que os corantes, se forem usados dentro dos limites definidos pela legislação, não fazem mal à saúde. Por outro lado, existem controvérsias quanto aos seus malefícios. Estudos recentes mostram que os corantes artificiais são cancerígenos, podem causar dermatite alérgica e irritação da pele. Além disso, apresentam efeitos ecotoxicológicos negativos e bioacumulação em animais (HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013). Por isso, cada vez mais, com o intuito de atender uma crescente demanda por alimentos naturais e livres de aditivos sintéticos, a indústria alimentícia volta-se para a pesquisa de corantes naturais.

Tabela 1 - Principais tipos de corantes artificiais

Nome	Origem	Aplicação	Efeitos adversos
Classe dos Monoazos			
Amaranto ou Vermelho Bordeaux	Sintetizado a partir do carvão	Cereais, balas, laticínios, geléias, gelados, recheios, xaropes, preparados líquidos.	Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina. Esse corante já causou polêmica sobre sua toxicidade em animais de laboratório, sendo proibido em vários países.
Vermelho Ponceau 4 R	Tinta do alcatrão de carvão	Frutas em caldas, laticínios, xaropes de bebidas, balas, cereais, refrescos e refrigerantes, sobremesas.	Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos. Podem causar anemia e aumento da incidência de glomerulonefrite (doença renal).
Vermelho 40	Sintetizado quimicamente	Alimentos à base de cereais, balas, laticínios, recheios, sobremesas, xaropes para refrescos, refrigerantes, geléias.	Pode causar hiperatividade em crianças, eczema e dificuldades respiratórias
Amarelo Tartrazina	Tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, licores, fermentados, produtos de cereais, frutas, iogurtes.	Reações alérgicas em pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos. Recentemente tem-se sugerido que a tartrazina em preparados de frutas causa insônia em crianças. Há relatos de casos de afecção da flora gastrointestinal.
Amarelo Crepúsculo	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão e tintas azóicas	Cereais, balas, caramelos, coberturas, xaropes, laticínios, gomas de mascar	A tinta azóica, em algumas pessoas, causa alergia, produzindo urticária, angioedema e problemas gástricos.
Classe dos Trifenilmetanos			
Azul Brillante	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, balas, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, refrescos	Pode causar hiperatividade em crianças, eczema e asma. Deve ser evitado por pessoas sensíveis às purinas.
Classe dos Indigóides			
Indigotina (azul escuro)	Tinta do alcatrão de carvão	Goma de mascar, iogurte, balas, caramelos, pós para refrescos artificiais.	Pode causar náuseas, vômitos, hipertensão e ocasionalmente alergia, com prurido e problemas respiratórios.
Vermelho Eritrozina	Tinta do alcatrão de carvão	Pós para gelatinas, laticínios, refrescos, geléias	Pode ser fototóxico. Contém 557 mg de iodo por grama de produto. Consumo excessivo pode causar aumento de hormônio tireoidiano no sangue em níveis para ocasionar hipertireoidismo.

Fonte: adaptado de Food Ingredients Brasil (2009) e Aditivos e Ingredientes (2009).

2.1.3 Corantes naturais

Optar por alimentos mais saudáveis tornou-se uma tendência mundial. No Brasil, é visível a crescente preferência dos consumidores em buscar alternativas naturais para substituir a variedade artificial. Esse fato impulsiona a inovação dos ingredientes naturais para atender as exigências do mercado, e seguindo esta tendência, um dos ingredientes alimentícios que exerce um papel importante nos alimentos é o corante natural. Esse por sua vez, confere ao produto uma aparência mais natural, ao contrário do que ocorre com as tonalidades sintéticas. Baseando-se nisso, a indústria alimentícia começa a entender que não é necessário obter exatamente o

mesmo tom dos corantes artificiais, mas sim, obter uma tonalidade agradável e atrativa, que relacione a cor ao sabor dos produtos (FOOD INGREDIENTS, 2009, 2011).

Os corantes naturais podem ser divididos em três grupos principais: os compostos heterocíclicos com estrutura tetra-pirrólica (clorofilas, o heme e as bilinas); os compostos de estrutura isoprenóide (carotenoides) e os compostos heterocíclicos contendo oxigênio (flavonóides). Além desses, existem outros dois grupos de corantes presentes unicamente em vegetais: as betalainas, que são compostos nitrogenados, e os taninos, que agrupam diversos compostos de estruturas altamente variáveis (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2009).

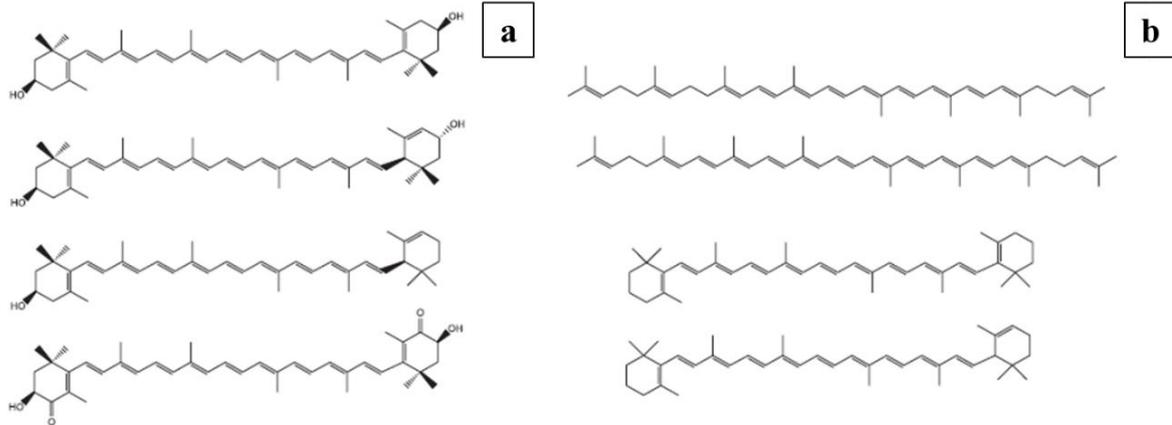
Conforme a Resolução nº 44 de 1977 da CNNPA, corante orgânico natural é aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado. Os corantes orgânicos naturais tolerados em alimentos são: curcumina, riboflavina, cochonilha, ácido carmínico, urzela, orceína, orceína sulfonada, clorofila, caramelo, carvão medicinal, α , β e γ – caroteno, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina, licopeno, flavoxantina, luteína, criptoxantina, rubixantina, violaxantina, rodoxantina, cantaxantina, pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina e malvidina. O caramelo é o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão, mas existe, também, o corante caramelo orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo com amônia (BRASIL, 1978).

2.2 Carotenoides como corantes naturais

Dentre os corantes naturais permitidos, destacam-se os carotenoides. Os carotenoides são tetraterpenóides C₄₀ formados pela união cauda-cabeça de oito unidades isoprenóides C₅, exceto na posição central, onde a junção ocorre no sentido cauda-cauda, invertendo assim a ordem e resultando numa molécula simétrica. Os grupos metilas centrais estão separados por seis carbonos, ao passo que os demais, por cinco. A característica de maior destaque nestas moléculas é um sistema extenso de duplas ligações conjugadas, responsável por suas propriedades e funções tão especiais. Este sistema é o cromóforo que confere aos carotenoides as cores laranja, amarela e vermelha de frutas, flores, hortaliças, gema de ovos, fungos, bactérias, algas, alguns peixes e crustáceos (VALDUGA *et al.*, 2009; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Alguns exemplos de frutas que apresentam os carotenoides como metabólito secundário são buriti, tucumã, tomate, melancia, mamão, goiaba, entre outros (HAMERSKI *et al.*, 2013).

Encontramos na natureza duas classes de carotenoides: os carotenos, tais como β -caroteno, hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula; e os derivados oxigenados de carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, denominados xantofilas. Os grupos substituintes oxigenados mais comuns são os grupos hidroxila (como da β -criptoxantina), ceto (como da cantaxantina), epóxido (como da violaxantina) e aldeído (como da β -citraurina). Na natureza, os carotenoides se apresentam predominantemente na forma toda-trans (ou toda-E), que é mais estável, embora pequenas quantidades de isômeros cis (ou Z) também possam ser encontradas. A Figura 1 apresenta a estrutura de algumas xantofilas e carotenos (BOTELLA-PAVÍA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Figura 1 - Estrutura química de alguns carotenoides



Fonte: VALDUGA *et al.* (2009).

Legenda: (a) = Xantofilas – zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina, respectivamente; (b) = Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente.

O esqueleto básico desta família de moléculas pode ser modificado de muitas maneiras, as quais incluem ciclização, hidrogenação, desidrogenação, introdução de grupos contendo oxigênio, rearranjos, encurtamento de cadeias ou combinações dessas modificações, resultando numa imensa variedade de estruturas. O sistema de duplas ligações conjugadas (cromóforo), que exige, no mínimo, sete ligações duplas conjugadas, além de ser responsável pela cor desses pigmentos, confere também a esses, alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados, principalmente quando submetidos a condições não controladas de processamento e/ou estocagem, mais especificamente em produtos naturais. Além disso, o calor, a luz, o oxigênio e enzimas como lipoxigenase e/ou ácidos presentes em frutas levam a alterações ou parcial destruição dos pigmentos. A exposição destes a tais agentes resulta na formação de isômeros cis, epóxidos, diminuição da cor, perda da atividade pró-vitáminica A e

quebra da cadeia (BOTELLA-PAVÍA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). A principal causa de perdas ou destruição de carotenoides durante o processamento ou a estocagem é a oxidação, seja ela enzimática ou não. A isomerização dos trans-carotenoides para isômeros cis altera a sua atividade biológica e a cor, mas não na mesma extensão que a oxidação (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Além de colorir, os carotenoides possuem atividades biológicas importantes destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (VALDUGA *et al.*, 2009). Além disso, apresentam alto valor nutricional, pois no organismo são transformados em vitamina A (retinol), ou seja, possuem atividade pró-vitáminica A (MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

Do ponto de vista comercial, os Estados Unidos, seguido da Europa, são atualmente os principais responsáveis pelas vendas no mercado global de carotenoides. A empresa DSM Nutritional Products representa o maior produtor mundial de carotenoides sintéticos, a BASF é o segundo produtor, e em conjunto, representam cerca de 55% do mercado mundial de carotenoides (PRWEB, 2011; SILVEIRA; OKADA; CAMPOS-TAKAKI, 2014). Devido a todas as características apresentadas pelos carotenoides, o mercado mundial destes compostos vem aumentando anualmente. Em 2017, o mercado global de carotenoides atingiu 1,5 bilhões e deve alcançar 2,0 bilhões de dólares em 2022 (BCC RESEARCH, 2018; SILVEIRA; OKADA; CAMPOS-TAKAKI, 2014).

Os carotenoides produzidos por métodos biológicos (processos biotecnológicos ou extração de plantas) têm surgido como um crescente segmento do mercado industrial. Eles são aplicados em alimentos, como suplemento nutricional, e em indústrias cosmética e farmacêutica. Desde o início dos anos 80, várias companhias biotecnológicas têm desenvolvido métodos para produzir pigmentos em culturas bacterianas, de algas e fungos (VALDUGA *et al.*, 2009). Porém, o custo relacionado a processos biotecnológicos e dificuldades de extração do carotenoide intracelular tem dificultado a busca por estes processos, tornando-o uma estratégia cada vez menos promissora.

A obtenção de extratos naturais, ricos em carotenoides, e, portanto, com poder corante, a partir de resíduos da agroindústria tem sido alvo de muitas pesquisas, tendo como impacto uma diminuição dos custos de produção e problemas ambientais relacionados ao descarte incorreto desses resíduos. Além disso, fornece a indústria alimentícia matéria-prima para a produção de alimentos mais saudáveis, livres de corantes artificiais, agregando, ainda, valor

funcional aos produtos. Segundo a Food Ingredients (2009) os carotenoides mais utilizados são provenientes de fontes naturais como o urucum, o açafrão e a cúrcuma. Os carotenoides provenientes dessas fontes conferem uma coloração amarelo-alaranjado.

2.3 Extrato concentrado de caju (ECC) obtido a partir das fibras residuais do pedúnculo

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é um fruto típico do nordeste brasileiro e cada vez mais o seu cultivo adquire maior importância socioeconômica. Do total produzido anualmente na região nordeste, 15% é aproveitado para a fabricação do suco e o restante é destinado à produção da castanha de caju (BROINIZI *et al.*, 2007). Portanto, o processamento do caju envolve a separação da castanha e a separação da polpa, gerando com isso uma grande quantidade de fibras residuais que normalmente são descartadas pela indústria.

No entanto, todo esse resíduo gerado torna-se um problema para a indústria e órgãos competentes, pois requerem um descarte adequado. Eles apresentam elevada composição orgânica. Seu descarte no meio ambiente é fonte de sérios problemas; a liberação excessiva de nutrientes como fósforo e nitrogênio, pode causar eutrofização de ambientes aquáticos, com conseqüente diminuição de oxigênio dissolvido, causando morte de organismos aeróbios e desequilíbrio do ecossistema local (PELTZER *et al.*, 2008).

Para minimizar os impactos ambientais, pesquisas estão sendo realizadas no sentido de desenvolver formas de utilização desse bagaço como, por exemplo, farinha para formulação de pães e biscoitos, na composição de ração animal ou adubação de terras e mais recentemente, esses resíduos estão sendo utilizados como fonte de matéria-prima para pesquisas de novos compostos bioativos e extração de substâncias com poder corante. Além disso, esses subprodutos podem prover maior rentabilidade para as indústrias processadoras.

Pesquisa realizada pela Embrapa em parceria com o CIRAD/França (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), entre os anos de 2008 e 2012, resultou na obtenção de um extrato bruto rico em carotenoides a partir da prensagem e reprensagem, assistida por enzimas, das fibras residuais do caju. Esse extrato foi concentrado por microfiltração associada a uma etapa final de diafiltração, que resultou em um extrato concentrado cerca de 20 vezes e que possui potencial de uso como um corante natural amarelo intenso, podendo vir a ser um substituto do corante sintético amarelo tartrazina. Esse extrato concentrado apresentou um perfil diversificado de moléculas de interesse comercial e biológico, tendo sido identificados pelo menos 11 carotenoides, com possibilidade de uso em diversos setores da indústria alimentícia (ABREU *et al.*, 2013; ABREU *et al.*, 2012). Dentre os

carotenoides majoritários, dois isômeros da auroxantina foram identificados como predominantes, seguidos de β -criptoxantina, luteína e zeaxantina, com menor concentração para α e β -caroteno e outros como zeinoxantina e mutatoxantina (ABREU *et al.*, 2013). Segundo Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), o β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina são pró-vitaminas A. Basicamente, a estrutura da vitamina A (retinol) é a metade da molécula do β -caroteno, com uma molécula de água adicionada no final da cadeia poliênica. Conseqüentemente, o β -caroteno é o carotenoide de maior potência vitamínica A e ao qual se atribui 100% de atividade. A exigência mínima para um carotenoide possuir atividade pró-vitamínica A é ter um anel- β não substituído, com uma cadeia poliênica de 11 carbonos. Assim, o α -caroteno e a β -criptoxantina têm cerca de 50% da atividade do β -caroteno, ao passo que a luteína, zeaxantina e licopeno não possuem atividade.

Embora o mercado de carotenoides seja bastante expressivo, um dos fatores limitantes para o seu crescimento é a estabilidade de seus componentes quando extraídos de fontes naturais. Os carotenoides podem apresentar instabilidade porque as moléculas podem facilmente sofrer modificações estruturais devido a oxidação de suas duplas ligações, causadas principalmente pelo calor, oxigênio e exposição a luminosidade (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008; FERREIRA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; THANE; REDDY, 1997). Nesse sentido, processos não térmicos, visando a preservação desses e de outros componentes de interesse – como vitaminas e antioxidantes naturais – tem sido cada vez mais utilizados em processamento de alimentos (ODRIOZOLA-SERRANO *et al.*, 2015; PLAZA *et al.*, 2011), destacando-se o uso de tecnologia de membranas (ABREU *et al.*, 2012; RAGHAVARAO *et al.*, 2014; BELLEVILLE; PAOLUCCI-JEANJEAN; RIOS, 2013; PINELO; JONSSON; MEYER, 2011).

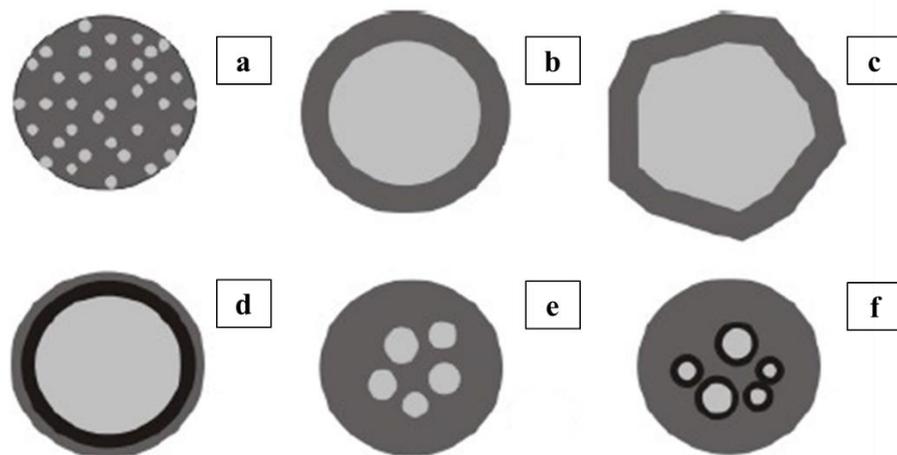
É possível, também, encontrar na literatura diversos trabalhos utilizando a técnica de encapsulação por spray-drying para melhorar a estabilidade e ampliar as possibilidades de uso dos extratos naturais com poder corante (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005; OTÁLORA *et al.*, 2015; NORBRILLINDA *et al.*, 2016).

2.4 Encapsulação por atomização aplicada aos corantes naturais

A encapsulação é um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver sólidos, líquidos ou gases, isolando-os e protegendo-os das condições ambientais como luz, ar e umidade (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). O material

encapsulado é denominado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (GIBB *et al.*, 1999). As cápsulas podem ser classificadas por tamanho em 3 categorias: macro – ($>5000 \mu\text{m}$), micro – ($0,2 - 5000 \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($<0,2 \mu\text{m}$). Com relação a sua estrutura, as cápsulas podem ser divididas em dois grupos: aquelas nas quais o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, e aquelas nas quais o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz. O primeiro grupo pode ser classificado como sistema do tipo reservatório, e caracteriza as “verdadeiras” microcápsulas; e o segundo, classificado como sistema matricial, resulta nas chamadas microesferas. As microcápsulas podem ter ainda mais de um núcleo, ou várias paredes para um mesmo núcleo. A Figura 2 apresenta alguns dos principais modelos de microcápsulas (AZEREDO, 2005).

Figura 2 – Modelos de partículas encapsuladas



Fonte: Fonte: Arshady (1993); Gibbs (1999) e Azeredo (2005).

Legenda: (a) = matriz (microesfera); (b) = microcápsula simples; (c) = simples, irregular; (d) = duas paredes; (e) = vários núcleos; (f) = agrupamento de microcápsulas.

A associação do uso de corantes sintéticos a efeitos adversos à saúde tem motivado a sua substituição por pigmentos naturais. Além disso, a demanda por alimentos naturais e saudáveis, livres de aditivos químicos, aumenta a cada ano. No entanto, além de mais caros que os sintéticos, os pigmentos naturais são muito instáveis quimicamente. Os carotenoides, por exemplo, que constituem uma das principais classes de corantes naturais, são muito susceptíveis a oxidação e isomerização, que resultam em perda de cor. A encapsulação, além de evitar essa degradação, possibilita, ainda, a dispersão dos carotenoides em água, facilitando sua aplicação em alimentos (AZEREDO, 2005; SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005; MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA 2003).

Atualmente existem muitos processos de encapsulação sendo estudados em escala laboratorial, piloto e alguns já implementados em escala industrial (DORDEVIĆ *et al.*, 2015). Azeredo (2005) destaca como principais os seguintes: Atomização, extrusão, leiteo fluidizado, coacervação, liofilização, secagem em tambor, inclusão molecular e inclusão em lipossomas.

A escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de uma série de fatores, como: tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo (RÉ, 1998).

A secagem por atomização é a técnica mais utilizada para transformar soluções, emulsões, suspensões, lamas e pastas em pós sólidos, pois está bem estabelecida na indústria alimentícia e é relativamente barata. Aproximadamente 90% dos encapsulados são preparados por secagem por pulverização (AZEREDO, 2005; LI *et al.*, 2010; DORDEVIĆ *et al.*, 2015). Como agentes encapsulantes têm sido usados carboidratos, derivados de celulose semi-sintéticos, e polímeros sintéticos. Cada qual exibindo diferenças em suas propriedades, custo e eficiência de encapsulação (DAVIDOV-PARDO; AROZARENA; MARÍN-ARROYO, 2013).

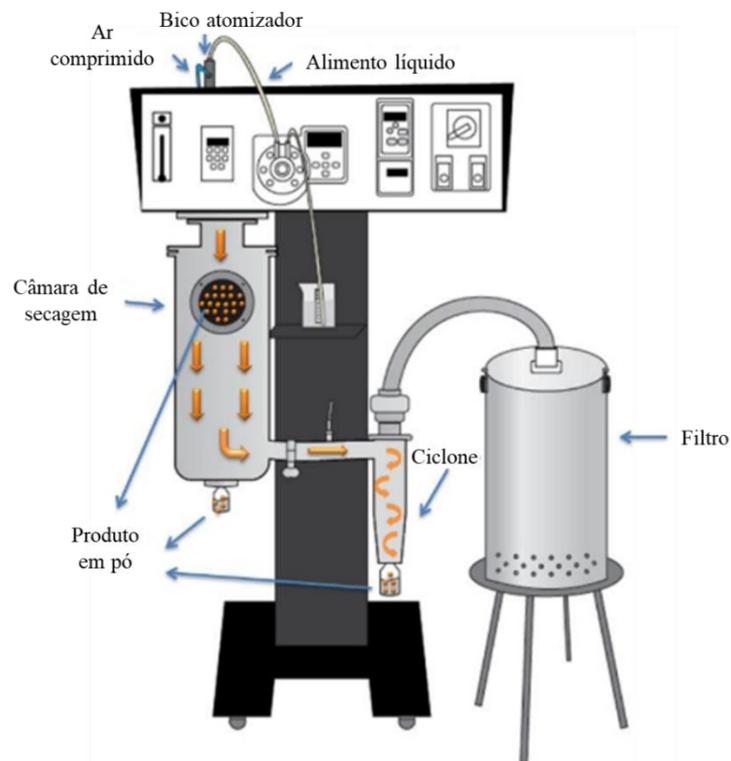
A ideia básica na secagem por atomização é realizar a mistura dentro de um recipiente (câmara de secagem) entre um gás aquecido (ar) e uma massa fluida, pulverizada em forma de gotículas com grande proporção de superfície para provocar pelo contato direto a evaporação do solvente (sobretudo água) de forma rápida e uniforme (CARVALHO, 2011).

O processo de secagem por spray-dryer consiste de três etapas fundamentais. Na primeira fase, o fluído é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Com a transferência de calor do ar aquecido às gotículas, o líquido da superfície evapora rapidamente. As partículas solidificadas geralmente apresentam o mesmo tamanho e forma da gotícula que as originou. Na última etapa, o produto de secagem é transportado por uma corrente de ar, sendo posteriormente coletado (RANKELL *et al.*, 2001). A evaporação superficial da gotícula conduz à formação de uma camada de material seco externa. Através desta camada, o líquido situado no interior da gotícula propaga-se para o exterior. Dependendo da elasticidade e da permeabilidade da crosta, serão produzidos distintos materiais secos como esferas intactas, com superfície imperfeita ou fragmentada, sólidas ou ocas (RANKELL *et al.*, 2001; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A escolha do tipo de atomizador é muito importante, pois as características finais do produto dependem não somente das propriedades dos produtos atomizados e condições de processo, mas também da eficiência do atomizador. Quanto maior a energia fornecida ao líquido, menores são as gotículas formadas e, para uma mesma quantidade de energia, o tamanho das gotículas vai ser dependente da vazão de alimentação. Quanto maior a vazão de alimentação, maior será o tamanho das gotículas e, portanto, maiores serão as partículas formadas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). A Figura 3 mostra uma figura esquemática de uma configuração básica de spray-dryer.

Figura 3 – Esquema de um spray-dryer



Fonte: Ribeiro (2014).

O material a ser encapsulado, geralmente hidrofóbico, é emulsificado em uma solução aquosa ou disperso no material encapsulante, e a emulsão óleo-em-água resultante é bombeada através de um atomizador para uma câmara a alta temperatura. A etapa de secagem a alta temperatura dura apenas alguns milissegundos até alguns segundos. Portanto, mesmo os compostos sensíveis ao calor podem ser atomizados sem uma perda significativa. Outra vantagem é o pequeno tamanho das partículas (geralmente menores que 100 μm), o que torna o produto altamente solúvel. Por outro lado, torna-o mais susceptível à oxidação, além de poder

gerar problemas de separação em misturas secas (AZEREDO, 2005; BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2011; DORDEVIĆ *et al.*, 2015).

As microcápsulas produzidas por secagem por atomização são do tipo matriz. O material do núcleo é homogeneamente distribuído por todo o material da parede, enquanto as paredes são compactas e sem rachaduras ou interrupções. Esse último atributo é importante para garantir uma menor permeabilidade de gás e melhor proteção do composto ativo. No entanto, algumas irregularidades na superfície já foram registradas (DORDEVIĆ *et al.*, 2015).

A principal desvantagem da secagem por pulverização é o tamanho e forma não uniforme das partículas obtidas, bem como a tendência das partículas se agregarem. Assim, as microcápsulas podem ter dentes ou concavidades na superfície exterior cujo surgimento é atribuído a evaporação rápida de gotas de líquido durante o processo de secagem no atomizador. Elas também podem conter poros na superfície, que são formados como uma consequência da pressão dentro das cápsulas (DORDEVIĆ *et al.*, 2015).

Os pontos críticos da encapsulação são: a composição correta entre o material encapsulante e o núcleo, a comestibilidade do alimento que contém o ingrediente encapsulado, a escolha correta do material de parede da microcápsula (suas características físico-químicas, solubilidade, cristalinidade, capacidade de formação de filme e propriedades de barreira), o tamanho desejado da microcápsula, a sensibilidade do material encapsulado, o custo de operação, a aplicabilidade para produtos alimentícios e o mecanismo de liberação do material ativo. Porém, na prática, na maioria das vezes o critério decisivo na escolha é o custo do material de parede (ARSHADY, 1993; NORI, 1996; SANTOS, 2003).

A caracterização morfológica das microcápsulas é um passo essencial, pois analisa se o processo de encapsulação foi eficiente ou não, através da qual se pode observar visualmente se ocorreu a formação das cápsulas, a integridade e relevo das paredes e também a distribuição de tamanho das mesmas (ROSENBERG *et al.*, 1988).

Várias são as pesquisas que utilizam a técnica de encapsulação para estabilizar extratos naturais com poder corante. No trabalho de Mاتيoli e Rodriguez-Amaya (2003) foi microencapsulado licopeno, extraído da goiaba, utilizando α -, β - e γ -ciclodextrinas (CD), a fim de estabilizar o corante e torná-lo solúvel em água, avaliando também a sua estabilidade à luz. Foi inicialmente estudado pelos autores a formação de complexos com o licopeno: CD na razão 1:50, sendo que a β - e γ -CD formam complexos, não sendo observado o mesmo para a α -CD. Após 180 dias de estocagem sob refrigeração (15°C) o licopeno se manteve constante no complexo formado com a γ -CD e diminuiu 80% no complexo com a β -CD. Foi avaliado também no estudo a melhor razão molar licopeno: CD para a inclusão utilizando γ -CD, sendo a inclusão

máxima encontrada quando se utiliza a razão molar de 1:200. O complexo mostrou-se dispersível em água e manteve a cor vermelha do licopeno. A estabilidade à luz mostrou-se excelente mantendo 100% de retenção em 40 dias de monitoramento a temperatura ambiente.

Santos, Fávaro-Tridade e Grosso (2005) microencapsularam oleoresina de páprica por atomizaao, utilizando goma arábica e grânulos porosos de amido-gelatina. A avaliaao morfológica, feita por microscopia eletrônica de varredura, mostrou que as microcápsulas elaboradas com goma arábica possuíam formato arredondado, com concavidades, sem poros ou rachaduras, paredes contínuas e o recheio estava distribuído em vacúolos nas paredes; já as produzidas com grânulos porosos de amido/gelatina apresentavam formato arredondado, paredes formadas pela aglomeraao dos grânulos e colocadas pela gelatina, entretanto, apresentavam poros ou interstícios. A análise da morfologia deu indícios de que a oleoresina estaria mais protegida quando encapsulada em goma arábica. As microcápsulas apresentaram tamanhos dentro da faixa obtida para este tipo de processo e excelente solubilidade.

Otálora *et al.* (2015) microencapsularam betalaínas, obtidas da polpa do fruto *Opuntia ficus-indica*, por spray-drying usando mucilagem de cacto cladode e maltodextrina. As microcápsulas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, análise térmica, análise de cor, umidade e atividade de gua. O conteúdo de agente ativo foi medido por espectrometria de UV-Vis e sua composiao confirmada por HPLC-ESIMS. Um teste de estabilidade foi conduzido a 18C e diferentes umidades relativas. A adiao da mucilagem na formulaao melhorou a eficiência de encapsulaao, o conteúdo de umidade foi diminuído e permitiu obter partículas esféricas com tamanho mais uniforme e com alto conteúdo de fibra dietética. As microcápsulas foram consideradas promissoras como aditivo a ser utilizado pela indústria alimentícia.

2.5 Ácidos anacárdicos

Outros compostos encontrados no extrato concentrado de caju (ECC), de grande interesse dos pesquisadores, são os ácidos anacárdicos (DIONÍSIO *et al.*, 2018). Esses compostos são fenólicos derivados do ácido salicílico, apresentam caráter lipídico devido sua cadeia carbonica lateral. Possuem nomenclatura como ácido 2-hidroxi-6-pentadecil-benzóico (SEONG *et al.*, 2014), e são encontrados em todas as partes do cajueiro, porém as maiores concentraoes são observadas no líquido da casca da castanha de caju (LCC) (NETO *et al.*, 2014).

A cadeia alifática desses compostos pode variar o número de carbonos entre 2 e 17 (ČESLA *et al.*, 2006; HEMSHEKHAR *et al.*, 2012; JERZ *et al.*, 2012). No entanto, cadeias longas compostas por 15 carbonos são comumente majoritárias no LCC e em outras partes do caju. Outra característica estrutural importante da molécula de ácidos anacárdicos é o grau de insaturação de sua cadeia carbônica, variando de nenhuma (saturado) até 3 insaturações (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003; TREVISAN *et al.*, 2006).

Os ácidos anacárdicos têm atraído bastante interesse dos pesquisadores por possuírem uma vasta atividade biológica como: atividade antitumoral, antioxidante, gastro-protetora (TOYOMIZU *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2006; ACHANATH *et al.*, 2012; HAMAD; MUBOFU, 2015), agindo também como antimicrobiano (LIMA *et al.*, 2000; PARASA *et al.*, 2011). Entretanto, tem-se relatos a respeito de sua toxicidade. De uma forma geral, Carvalho *et al.* (2011) mencionam que o efeito biológico, nocivo ou benéfico, destes lipídeos fenólicos varia do teor e da forma como estes são consumidos. O tamanho da cadeia lateral e a variação das insaturações influenciam diretamente na atividade biológica dos ácidos anacárdicos, mostrando maior, menor ou nenhuma eficácia para uma determinada aplicação (KUBO *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2017).

2.6 Avaliação toxicológica de extratos naturais

Existe uma crença de que extratos vegetais, por serem naturais, não apresentam qualquer efeito tóxico ao organismo humano. Entretanto, essa ideia é equivocada. Após a aplicação de diferentes tecnologias para obtenção de extratos vegetais podemos concentrar ou isolar os compostos presentes, ou ainda, causar mudanças nas suas estruturas química a ponto de afetar a atividade biológica desses compostos ou do extrato como um todo (LAPA, 1999).

Assim, devido ao presente trabalho ter sido voltado para o desenvolvimento de um extrato vegetal com poder corante, obtido a partir das fibras residuais do pedúnculo de caju, torna-se fundamental a realização de estudos toxicológicos, que vão contribuir para sua utilização segura e eficaz pela indústria de alimentos.

Existem diversos métodos utilizados para avaliar a toxicidade de um extrato vegetal ou substância isolada. Os testes *in vitro* são aqueles que podem substituir ou diminuir o uso de animais na experimentação. As técnicas utilizadas compreendem a utilização de organismos como: bactérias, fungos, algas e crustáceos além de frações subcelulares presentes no sistema biológico como suspensões celulares, cultivo de tecidos, cultivo celulares, enzimas, ou de poderem servir como prévia de um estudo toxicológico *in vivo*, complementando e melhorando

a sensibilidade e especificidade de estudos com animais (FRAZIER, 1992). Os testes *in vivo* incluem ensaios de toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade crônica, abordando aspectos como mutagenicidade, carcinogenicidade, alterações de fertilidade, teratogenicidade, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos e sensibilização cutânea (SPIELMANN, 2002; BARROS; DAVINO, 2003).

Segundo as diretrizes do guia 423 da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (OECD, 2001), no ensaio de toxicidade aguda a substância é administrada oralmente em dose única ou múltiplas doses, que não podem ultrapassar o tempo de 24 horas, a um grupo de animais experimentais em uma das doses definidas: 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg. Existe um protocolo a ser seguido para cada uma dessas doses, que direciona a investigação de modo a utilizar um número mínimo de animais. Assim, a substância é testada usando um procedimento passo a passo, cada passo usando três animais de um único sexo (normalmente fêmeas). A ausência ou presença de mortalidade, relacionada ao composto, dos animais doseados num passo determinará o passo seguinte, por exemplo: não são necessários mais ensaios, dosagem de três animais adicionais com a mesma dose ou dosagem de três animais adicionais no nível de dose seguinte mais alto ou seguinte. Após a administração da dose os animais são observados individualmente e diariamente, durante 14 dias, para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos. Esse método permite uma avaliação no que diz respeito à classificação da substância em uma série de classes de toxicidade definidas por valores-limite fixados de DL_{50} .

Segundo o guia 452 da OECD (OECD, 2018), no ensaio toxicológico crônico, o produto em teste é administrado diariamente em doses graduadas a vários grupos de animais experimentais, normalmente por um período de 12 meses. Esse tempo é escolhido por ser suficientemente longo a fim de permitir que quaisquer efeitos de toxicidade cumulativa se manifestem, sem os efeitos confusos das mudanças geriátricas. Normalmente, a administração da substância é feita por via oral, embora o teste por via inalatória ou dérmica também possa ser usado. Durante o período de administração, os animais são cuidadosamente observados quanto a sinais de toxicidade. Os animais que morrem ou são mortos durante o teste são necropsiados e, na conclusão do teste, os animais sobreviventes são mortos e necropsiados.

Neste trabalho, foram realizados testes toxicológicos *in vitro* (atividade antiproliferativa frente a células tumorais humanas e atividade antimicrobiana) e teste de toxicidade aguda *in vivo* (bioensaio frente ao *Danio rerio*).

2.6.1 *Danio rerio*

O zebrafish, conhecido também como paulistinha ou peixe-zebra, é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm), da espécie *Danio rerio*, tropical de água doce, que desde a década de 1930 tem sido submetido a vários estudos. Isso se deve ao fato de serem peixes de pequeno porte, de manutenção fácil, econômicos para criação, com alta taxa reprodutiva, com seu genoma sequenciado e por apresentarem importante homologia com os mamíferos (LIESCHKE *et al.*, 2007; KARI; RODECK; DICKER, 2007)

Os métodos de laboratório para a sua criação estão bem estabelecidos (WESTERFIELD, 1994; WIXON, 2000). Em condições adequadas, o zebrafish se reproduz facilmente e gera grandes quantidades de ovos imersivos (200-300 ovos a cada 2 a 3 dias), não aderentes e transparentes. Outra vantagem é o curto período de desenvolvimento desde a fertilização até a incubação (aproximadamente 96 horas, a 28 °C). Logo após a incubação, o embrião torna-se uma larva de natação livre, que exibe uma ampla gama de comportamentos: nada, engole, mostra respostas de fuga, é sensível ao toque e, no dia 5, parece capaz de responder a estímulos acústicos (BRIGGS, 2002). Devido ao curto ciclo de vida (cerca de 3 anos), estudos que envolvem diferentes períodos do desenvolvimento podem ser realizados com relativa rapidez. Além disso, métodos e estratégias de avaliação genética e embriológica são aplicados com facilidade no modelo. A indução de processos malformativos de órgãos internos pode ser alcançada sem sacrificar as fêmeas já que os embriões são transparentes e com desenvolvimento externo ao corpo materno (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

Como resultado de todas essas características mencionadas, o zebrafish tem sido o foco de vários estudos de biologia e genética do desenvolvimento e emergiu como um importante organismo modelo para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos (LIESCHKE *et al.*, 2007; KARI; RODECK; DICKER, 2007; RAYMOND *et al.*, 2007)

2.6.2 *Atividade antiproliferativa*

O câncer pode ser reconhecido por sete características: crescimento incontrolável; auto-suficiência em sinais de crescimento; insensibilidade a inibidores de crescimento; evasão de morte celular programada; capacidade de desenvolver vasos sanguíneos; eventual invasão de outros tecidos e metástase; e a presença de um microambiente inflamatório (MANTOVANI, 2009). Dados divulgados pela World Health Organization - WHO (2017) indicam que a cada ano 8,8 milhões de pessoas morrem de câncer, principalmente em países de baixa e média renda. O câncer é responsável por quase 1 em cada 6 mortes no mundo, sendo uma das principais

causas de morte no mundo. Todos os anos, mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer e estima-se que em 2030 esse número suba para mais de 21 milhões.

Inicialmente, a estratégia quimioterápica para o câncer era a interação com o DNA ou seus precursores, inibindo a síntese de novo material genético e causando lesões ao DNA tanto em células malignas quanto normais. Com o avanço da biologia molecular, descobriram-se alvos específicos como receptores de fatores de crescimento, vias de sinalização intracelular, defeitos no reparo de DNA e vias de morte celular. Entretanto, apesar de todo progresso já conquistado, muitos tumores ainda são de difícil atenuação, o que torna, diante do cenário atual, a busca por novos agentes antitumorais necessária (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; RIVA *et al.*, 2012). Assim, pesquisas se voltam para os ensaios de atividade antiproliferativa, que têm como objetivo a descoberta de novas substâncias que sejam capazes de inibir o crescimento de células tumorais.

Com o aprimoramento da metodologia de cultura de células foi possível o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro*. Assim, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolveu um painel de células cancerígenas que conta com linhagens oriundas de diferentes tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia) (SKEHAN *et al.*, 1990; MONKS *et al.*, 1991; RUBINSTEIN *et al.*, 1990, CARVALHO, 2006).

A linha de estudo segue, portanto, para os testes de citotoxicidade, ou seja, substâncias são avaliadas com relação a sua capacidade de matar células neoplásicas em cultura, correlacionando a concentração, a resposta e a seletividade para alguma linhagem tumoral. É o método mais utilizado para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas, pois é uma técnica que avalia grande número de substâncias em pouco tempo, é relativamente simples, barata, reproduzível e, ainda, providencia um provável mecanismo de ação da droga (QUEIROZ *et al.*, 1999; ITHARAT *et al.*, 2004; SUGGIT; BIBBY, 2005; SACOMAN, 2007).

2.6.3 Atividade antimicrobiana

Os produtos naturais são importantes fontes de substâncias bioativas, entre essas encontramos as substâncias antimicrobianas. Por isso, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais. O objetivo é descobrir compostos com atividade comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de microrganismos patogênicos e com menor impacto ambiental, para que

assim possam ser utilizados em produtos farmacêuticos, cosméticos e na indústria alimentícia (BONA *et al.*, 2014).

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA *et al.*, 2001). Além disso, a possibilidade de descobrir uma substância antimicrobiana que possa ser utilizada pela indústria alimentícia como conservante natural, aumentando a vida de prateleira de muitos produtos, é bastante interessante.

Vários métodos de avaliação da atividade antimicrobiana são descritos na literatura, cada um com sensibilidade diferente, o que vai influenciar no resultado final, assim como a escolha dos microrganismos utilizados no ensaio que de preferência devem ser adquiridos de coleções de cultura como as da ATCC (American Type Culture Collection) para que assim seja possível a comparação com outras pesquisas (OLIVEIRA, 2010).

Esta área de pesquisa enfrenta muitos problemas inerentes devido às diferentes metodologias utilizadas na preparação de extratos de plantas e ensaios antimicrobianos. A solubilidade dos metabólitos de plantas extraídos com solventes de diferentes polaridades parece também contribuir para os resultados dos ensaios antimicrobianos utilizados (OTHMAN *et al.*, 2011).

Os métodos do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) usados para testes de suscetibilidade antimicrobiana são amplamente aceitos pelos órgãos reguladores em todo o mundo. No entanto, estes métodos foram concebidos em testes com moléculas antimicrobianas puras, tais como antibióticos, e modificações são necessárias para que possam ser usados em ensaios com extratos de plantas (HAMMER *et al.*, 1999).

As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos e uma grande variação encontrada na composição química de alguns extratos podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas (DUARTE, 2006). A ausência de padronização das metodologias limita as pesquisas sobre atividade antimicrobiana de extratos vegetais no que tange à comparação de resultados obtidos por diferentes pesquisadores, que avaliam a mesma amostra com diferentes metodologias. Isso está relacionado a um caráter multifatorial que pode modificar a inibição *in vitro* de crescimento de microrganismos, como o método de obtenção dos extratos, a espécie de microrganismo utilizada, a concentração da amostra e do inóculo e o método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana (RIOS *et al.*, 1988; KING *et al.*, 2008). Outro fato importante é que não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com padrões de antibióticos.

Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com inibição inferior as de antibióticos (DUARTE, 2006).

Na maioria dos estudos publicados de ensaios antimicrobianos, a concentração de bactérias é estimada utilizando o padrão 0,5 da escala Macfarland, o que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) / mL. Esta estimativa requer que o investigador avalie visualmente o nível de turbidez no caldo de cultura comparando ao padrão. Esta estimativa é, portanto, altamente subjetiva e pode conduzir a resultados inconsistentes (OTHMAN *et al.*, 2011).

Há poucos estudos comparativos relatando qual é o melhor método a ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais (COWAN, 1999; BONA *et al.*, 2014). Os métodos mais conhecidos e que têm sido amplamente utilizados na avaliação das atividades antimicrobianas incluem difusão em ágar (poço ou disco) e métodos de macrodiluição e microdiluição, os quais são realizados em caldo.

No presente trabalho utilizou-se o método de difusão em ágar por poços.

2.6.3.1 Teste de difusão em ágar

O método de difusão em ágar é bastante utilizado para iniciar uma pesquisa, servindo como uma triagem qualitativa dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana. Esta técnica possui elevada sensibilidade, pois a presença de um “halo de inibição” indica crescimento microbiano inibido. Outras vantagens desta técnica são a necessidade de pequenas quantidades de amostra e a economia de material (JOHANN, 2003; VIEIRA, 2005). Entretanto, deve-se ressaltar que o resultado desta técnica tem apenas caráter qualitativo e que não é recomendada qualquer comparação quantitativa, como caracterizar uma substância como mais ativa em virtude do tamanho do halo de inibição formado (JOHANN, 2003).

Esse método é geralmente realizado em meio de cultura sólido e podem ser utilizadas diferentes técnicas para a adição do composto ou extrato a ser testado como, por exemplo, por meio de discos de papel, cilindros de porcelana, ou de aço inoxidável, ou mesmo orifícios feitos no próprio meio de cultura (OSTROSKY *et al.*, 2008; TAVARES, 2009).

O teste consiste em uma placa de petri contendo meio de cultura sólido, onde é inoculado (semeado) uniformemente, em toda a superfície, uma quantidade conhecida do organismo teste. Logo depois, as substâncias antimicrobianas investigadas são colocadas sobre a superfície do meio de cultura ou em poços feitos no próprio meio. Durante a incubação, os agentes

quimioterápicos difundem-se no meio de cultura. Quanto mais distante do disco ou poço menor é a concentração do agente difundido. Se o agente antimicrobiano é efetivo, uma zona de inibição forma-se ao redor do disco ou poço. Como o tamanho da zona de inibição é afetado pela taxa de difusão do agente quimioterápico, uma zona grande nem sempre indica uma grande atividade antimicrobiana. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A realização deste teste com antibióticos já apresenta valores padronizados para tamanhos das zonas de inibição para cada espécie bacteriana e o respectivo antibiótico, permitindo, portanto, classificar o microrganismo testado em resistente, intermediário ou sensível (TAVARES, 2009; GOODMAN; GILMAN, 2010).

A realização deste método pode ser significativamente influenciada por fatores relacionados ao material a ser utilizado e à execução do método como o tipo e tamanho do disco ou orifício e a espessura e uniformidade do agar na placa (quando se tratar do teste de difusão com orifício). É importantíssimo o controle rigoroso destes parâmetros para evitar variações e para uma boa resolução dos resultados (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Referências

ABREU, F. A. P. de. **Etude d' un procede intégrant la microfiltration tangentielle pour la production d' extraits concentrés en caroténoïdes à partir de pomme de caju (*Anacardium occidentale L.*)**. Tese de Doutorado, Université Montpellier 2 Sciences et Techniques, França, 2012.

ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M; DIONISIO, A. P; CARAIL, M; CARIS-VEYRAT, C; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) extract from by-product of juice processing: a focus on carotenoids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 25-31, 2013.

ACHANATH, R.; SRINIVAS, M.; RAMADOS, C.S.; CANDADAL, S. **Antimicrobial derivatives of anacardic acid and process for preparing the same**. U.S, Patente n. 8, v. 338, p.638, 2012.

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Os corantes alimentícios**. Revista Aditivos e Ingredientes, n. 62, p. 7-20, 2009. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/edicoes_materias.php?id_edicao=39> Acesso em: 16 jul. 2018.

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Uso de corantes artificiais em alimentos: legislação brasileira**. Revista Aditivos e Ingredientes, n. 122, p. 32-37, 2015. Disponível em: <http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201601/2016010903353001453481886.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2018.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A.; ABREU, L. N.; ROSSETTI, A. G.; SILVEIRA, E. R. Determinação de ácido anacárdicos em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 5, n. 2, p-77-81, 2003.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 413-435, 1993.

AZEREDO, H. M. C. de. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BARROS, A. A. de; BARROS, E. B. de P. A química dos alimentos: produtos fermentados e corantes. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Química, Coleção Química no Cotidiano**, v. 4, 2010. 88p. Disponível em:
<http://www.ciencias.seed.pr.gov.br/arquivos/File/sugestao_leitura/51quimica_alimentos.pdf
> Acesso em: 16/08/2018.

BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. **Avaliação da toxicidade**. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BECK-BROICHSITTER, M.; SCHMEHL, T.; SEEGER, W.; GESSLER, T. Evaluating the controlled release properties of inhaled nanoparticles using isolated, perfused, and ventilated lung models. **Journal of Nanomaterials**, [s.l.], p. 1-16, 2011.

BCC RESEARCH. **The global market for carotenoids**. BCC Research Report Overview. Disponível em:
<https://cdn2.hubspot.net/hubfs/308401/FOD%20Report%20Overviews/FOD025F%20Report%20Overview.pdf?t=1537182142888&utm_campaign=FOD025F&utm_source=hs_automation&utm_medium=email&utm_content=62915556&_hsenc=p2ANqtz-_sxnVnBG4OCFaqzIFSA2hWloKao6uU-nSFmkcTyslhV3IRRxUQ1LqMoUZf2q_AQsvrjHQoiXQIIKRQhQeISjDWhYdEQQ&_hsmi=62915556>. Acesso em: 17/09/2018.

BELLEVILLE, M. -P.; PAOLUCCI-JEANJEAN, G.; RIOS, D. M. **Membrane bioreactors and the production of food ingredients**. In: Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2013. p. 314-337.

BONA, E. A. M. de; PINTO, F. G. da S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 126, n. 3, p. 369–381, 2006.

BRASIL. Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961. Dispõe sobre as Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 de jan. 1961.

BRASIL. Resolução nº 44 - CNNPA, de 25 de novembro de 1977. Estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos (e bebidas). **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de fevereiro de 1978.

BRASIL. Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out. 1997.

BRASIL. Resolução RDC nº 382 a 388 – ANVISA/MS, de 5 de agosto de 1999. Regulamentos Técnicos para o uso de Aditivos Alimentares. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 ago. 1999.

BRASIL. Resolução RDC nº 259 - ANVISA/MS, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2002.

BRASIL. Resolução RDC nº 340 – ANVISA/MS, de 13 de dezembro de 2002. As empresas fabricantes de alimentos que contenham na sua composição o corante tartrazina (INS 102) devem obrigatoriamente declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 dez. 2002.

BRIGGS, JP. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s.l.], v. 282, p. 3-9, 2002.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. de; SILVA, A. M. de O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. Ed. Porto Alegre: Artmed McGraw Hill Brasil, 2012. 2112p.

CARVALHO, A. L.; ANNONI, R.; SILVA, P. R.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; TREVISAN, M. T.; MAUAD, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.

CARVALHO, J. E. de. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. Divisão de Farmacologia e Toxicologia CPQBA/Unicamp. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, [s.l.], #7, 2006.

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

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agentes. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I.; MARRÍN-ARROYO, M. R. Optimization of a wall material formulation to microencapsulaa a grape seed extract using a mixture design of experiments. **Food and Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 6, p. 941-951, 2013.

DIONÍSIO, A. P.; ABREU, F. A. P. de; BRITO, E. S. de; WURLITZER, N. J.; RIBEIRO, P. R. V.; GOES, T. de S.; SOUSA, J. M. S.; IUNES, M. F.; LIMA, A. C. V. de; OIRAM FILHO, F. Extrato concentrado de carotenoides obtido da fibra do pedúnculo de caju: avaliação da toxicidade com uso do bioensaio de *Artemia salina*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 162, 2018.

DORDEVIĆ, V; BALANČ, B; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A; LEVIĆ, S; TRIFKOVIĆ, K; KALUŠEVIĆ, A; KOSTIĆ, I; KOMES, D; BUGARSKI, B; NEDOVIĆ, V. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. **Food Engineering Reviews**, [s.l.], v. 7, p. 452-490, 2015.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Divisão de Microbiologia CPQBA/Unicamp. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, [s.l.], n. 7, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2018.

FERREIRA, J. E. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Degradation of lycopene and beta-carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: Kinetics, structure, and matrix effects. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 78, p. C589-C594, 2008.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Corantes. Dossiê corantes**, n. 9, p. 40-59, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2015.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **A nova tendência no mercado de corantes**. Food Ingredientes Brasil, n. 18, p. 52-54, 2011. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/189.pdf>>. Acesso em: 16 de julho de 2018.

FRAZIER, J. M. **In vitro Toxicity testing. Applications to safety evaluation**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, p. 300.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, [s.l.], v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GIBBS, B.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s.l.], v. 50, p. 213-224, 1999.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11a Ed. Porto Alegre: AMGH, 2010, 1821p.

HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 8569–8590, 2015.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; SILVA, B. V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: Substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.

HAMMER, K. A; CARSON, C. F; RILEY, T. V; Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 86, p. 985-990, 1999.

HEMSHEKHAR, M.; SEBASTIN, S. M.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s.l.], v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 90, p. 33-39, 2004.

JERZ, G.; MURILLO-VELÁSQUEZ, J.A.; SKRJABIN, I.; GOK, R.; WINTERHALTER, P. (2012). **Anacardic acid profiling in cashew nuts by direct coupling of preparative high-speed countercurrent chromatography and mass spectrometry (prep HSCCC-ESI-/APCI-MS/MS)**. In: Recent advances in the analysis of food and flavors. American Chemical Society, p. 145-165.

JOHANN, S. **Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos**. 2003. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s.l.], v. 82, n.1. 2007.

KING, T.; DYKES, G.; KRISTIANTI, R. Comparative evaluation methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. **Journal of AOAC International**, [s.l.], v. 91, n. 6, p. 1423-1429, 2008.

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

LAPA, A. J. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Simões C. M. O. (Ed). Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999. p.181-196.

LIESCHKE, J. G.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews-Genetics**, [s.l.], v. 8, n.5. 2007.

LIMA, C. A. de. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, E. D. P. D. A. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre

microrganismos da cavidade bucal. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 358-362, 2000.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: the büchi nano spray dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 147, n. 2, p. 304-310, 2010.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region. **Brazilian Journal Microbiology**, [s.l.], v. 38, n.1, p. 65-70, 2007.

MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**, [s.l.], v. 457, p. 36-37, 2009.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclo dextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (Supl), p. 102-105, 2003.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 83, p. 757-766, 1991.

MORAIS, S. M.; SILVA, K. A.; ARAUJO, H.; VIEIRA, I. G.; ALVES, D. R.; FONTENELLE, R. O.; SILVA, A. M. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 31, 2017.

NETO, L.; MATOS, N.; GONZAGA, W.; ROMEIRO, L.; SANTOS, M.; SANTOS, D.; MOTOYAMA, A. Characterization of cytotoxic activity of compounds derived from anacardic acid, cardanol and cardol in oral squamous cell carcinoma. **BioMed Central Proceedings**, [s.l.], v. 8 (suppl 4), p.30, 2014.

NORBRILLINDA, M. T.; MAHANOH, H.; ELYANA, N. N.; FARINA, S. N. I. Optimization of spray drying process of *Sargassum muticum* color extract. **Drying Technology**, [s.l.], v. 34, n. 14, p. 1735-1744, 2016.

NORI, M. Ingredientes e aditivos microencapsulados na indústria de alimentos. **Engenharia de Alimentos**, n. 9, p. 33-35, 1996.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guideline 423: **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**, 2001. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071001-en.pdf?expires=1534416411&id=id&acname=guest&checksum=83B9FF7DB1717DCAF9E9639E4BEAFBC7>>. Acesso em: 16/08/2018

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guideline 452: **Chronic Toxicity Studies**, 2018. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071209-en.pdf?expires=1534416128&id=id&acname=guest&checksum=C6BEDF7D32BBC28B3C27CC2818CB7E29>>. Acesso em: 16/08/2018.

ODRIOZOLA-SERRANO, G.; OMS-OLIU, R.; SOLIVA-FORTUNY, O.; MARTÍN-BELLOSO. **Carotenoids in nonthermally treated fruit juices**. In: Processing and impact on active components in food. Academic Press, 2015. p. 637-642.

OLIVEIRA, D. A. de. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah**. 2010. 209p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OTÁLORA, M. C.; CARRIAZO, J. G.; ITURRIAGA, L.; NAZARENO, M. A.; OSORIO, C.; Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 187, p. 174-181, 2015.

OTHMAN, M.; LOH, H. S.; WIART, C.; KHOO, T. J.; LIM, K. H.; TING, K. N. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 84, p. 161-166, 2011.

PARASA, L. S.; SUNITA, T.; RAO, K. B.; RAO, A. H.; RAO, J. S.; KUMAR, L. C. A. Acetone extract of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts shell liquid against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by minimum inhibitory concentration (MIC). **Journal Chemical and Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 736-742, 2011.

PELTZER, P. M., LAJMANOVICH, R. C., SÁNCHEZ-HERNANDEZ, J. C., CABAGNA, C. C., ATTADEMO, A. M., BASSÓ, A. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 185-197, 2008.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal Ethnopharmacol**, [s.l.], v. 77, p. 37-40, 2001.

PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A. S. **Advances in the effective application of membrane technologies in the food industry**. 2011. p.180-201. In: Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries. 1. ed. Woodhead Publishing, 2011. 694p.

PLAZA, L.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; ANCOS, B.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O.; CANO, M. P. Carotenoid and flavone content during refrigerated storage of

orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. **LWT-Food Science and Technology**, [s.l.], v. 44, n. 4, p. 834-839, 2011.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 14, p. 237-250, 2003.

PRWEB, 2011. **Global carotenoids market to reach US\$ 1,3 billion by 2017**. Disponível em: <http://www.prweb.com/pdfdownload/8849957.pdf>. Acesso em: 13 de dezembro de 2015.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R. A new monothetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona spinesces*. **Natural Products Letters**, [s.l.], v. 13, p. 21, 1999.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; MADHUSUDHAN, M. C.; HRISHIKESH T. A.; NIRANJAN, K. **Athermal membrane processes for the concentration of liquid foods and natural colors**. In: Emerging Technologies for Food Processing. 2 ed. Dublin: Academic Press-Elsevier, p. 213-237, 2014.

RANKELL, A. S.; LIEBERMAN, H. A.; SCHIFFMAN, R. F.; 2001. **Secagem**. In: LACHMAN L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v. 1, p. 83-112.

RAYMOND, E. E.; LARISSA, B. P.; ANDREW, A. R.; DAVID, M. P. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, [s.l.], v. 16, p. 1195-1236, 1998.

RIBEIRO, L. C. **Produção de acerola em pó: métodos de secagem e avaliação da estabilidade**. 2014. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAW, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 2, p. 127-149, 1988.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. É. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. de; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 974-977, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008, 100p.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. The microstructure of spray-dried microcapsules. **Food Microstructure**, [s.l.], v. 7, p. 15-23, 1988.

RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; BOYD, M. R. Comparison of in vitro

anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, [s.l.], v. 82, p. 1113-1118, 1990.

SACOMAN, J. L. **Atividade anticancer e mecanismo de morte celular dos extratos brutos e frações de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) e *Pothomorphe umbrella* (L.) Miquel (Piperaceae)**. 2007. 110p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Departamento de Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

SANTOS, A. B. **Encapsulação de oleoresina de páprica por atomização em goma arábica e em aglomerados porosos de amido/gelatina: Estabilidade e aplicação**. 2003. 173p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SANTOS, A. B. dos; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 322-326, 2005.

SEONG, Y.-A.; SHIN, P.-G.; YOON, J.-S.; YADUNANDAM, A. K.; KIM, G.-D. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 68, n. 2, p. 369-377, 2014.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: Modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 2, 2012.

SILVEIRA, A. A. B.; OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Beta-caroteno e astaxantina – características e importância: uma revisão. **Revista Eletrônica Interdisciplinar de Saúde e Educação – RISE**, [s.l.], v. 1, n. 1, 2014.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A., MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, [s.l.], v. 82, p. 1107- 1118, 1990.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, [s.l.], v. 43, p. 11-17, 2002.

SUGGIT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 11, p. 971-981, 2005.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2a Ed. São Paulo: Atheneu, 2009, 599p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10a Ed. Editora Artmed, 2012, 934p.

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

THANE, C.; REDDY, S. Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. **Nutrition and Food Science**, [s.l.], v. 2, p. 58-65, 1997.

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

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VIEIRA, G. R. T. **Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. Visando a produção de substâncias antibacterianas**. 2005. 120 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*)**. Oregon: University of Oregon Press. Section 9, 1994, 388 p.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/detail/03-02-2017-early-cancer-diagnosis-saves-lives-cuts-treatment-costs>>. Acesso em agosto de 2018.

WIXON, J. Featured organism: danio rerio, the zebrafish. **Yeast**, [s.l.], v. 17, p. 225-231, 2000.

3 EXTRATO CONCENTRADO DE CAJU: EFEITO DAS ETAPAS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO NA COR E TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Food Technology (ISSN 1981-6723).

RESUMO

O processamento do pedúnculo de caju gera grande quantidade de fibras residuais, que podem ser aproveitadas para a obtenção de produtos de elevado valor agregado, como o extrato concentrado de caju (ECC). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das etapas do processo de obtenção do ECC com relação aos parâmetros de cor e conteúdos de compostos bioativos [carotenoides totais (CT), polifenóis extraíveis totais (PET) e ácidos anacárdicos (AA)], com o intuito de se conhecer as principais alterações que ocorrem durante o processamento das fibras para obtenção do ECC. A fibra residual do pedúnculo de caju foi processada segundo protocolo relatado em pesquisa anterior. Durante o processamento, foram coletadas amostras após as seguintes etapas: prensagem, centrifugação, microfiltração (permeado e retido) e pasteurização. A cor foi analisada por colorímetro, os CT e os PET foram analisados por espectrofotometria e os AA foram identificados e quantificados por UPLC-MS e HPLC-DAD, respectivamente. Os resultados mostraram que as etapas do processo de obtenção do ECC causaram alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros de cor, entretanto essas alterações não foram relevantes para a cor final do ECC. Com relação aos compostos bioativos, as etapas de pré-filtração e centrifugação juntas causaram diminuição dos CT e PET, sendo uma diminuição de 18% e 37%, respectivamente. Já para os teores de ácidos anacárdicos não se observou nenhuma influência dessas etapas. A microfiltração foi efetiva para concentração dos CT e AA (trieno, dieno e monoeno) no material retido, concentrando cerca de 13, 2 e 4 vezes, respectivamente. Os PETs, por sua vez, apresentaram maior afinidade a fração permeada, apresentando apenas traços no ECC. A pasteurização causou diminuição de 10 e 40% nos teores de CT e PET, respectivamente. Com relação aos teores de AA a pasteurização não afetou significativamente seus teores.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L. Cor. Carotenoides. Compostos fenólicos. Ácidos anacárdicos.

ABSTRACT

The processing of the cashew peduncle generates a large amount of residual fibers, which can be used to obtain products of high added value, such as the cashew concentrate extract (CCE). Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of the stages of the CCE process with respect to color parameters and contents of bioactive compounds [total carotenoids (TC), total extractable polyphenols (TEP) and anacardic acids (AA)] with the purpose of knowing the main alterations that occur during the processing of the fibers to obtain CCE. The residual fiber of the peduncle of cashew was processed according to protocol reported in previous research. During processing, samples were collected after the following steps: pressing, centrifugation, microfiltration (permeate and retention) and pasteurization. The color was analyzed by colorimeter, TC and TEP were analyzed by spectrophotometry and the AAs were identified and quantified by UPLC-MS and HPLC-DAD, respectively. The results showed that the stages of the CCE process caused statistically significant changes ($p < 0.05$) in the color parameters, however these changes were not relevant for the final color of the ECC. Regarding the bioactive compounds, the initial filtration and centrifugation stages together caused a decrease of CT and PET, a decrease of 18% and 37%, respectively. However, for the anacardic acid contents, no influence of these steps was observed. The microfiltration was effective for the concentration of TC and AA (triene, diene and monoene) in the retained material, concentrating about 13, 2 and 4 times, respectively. The TEPs, on the other hand, presented greater affinity to the permeated fraction, presenting only traces in the CCE. The pasteurization caused a decrease of 10 and 40% in the contents of TC and TEP, respectively. Regarding the contents of AA, pasteurization did not affect significantly its contents.

Keywords: *Anacardium occidentale* L. Color. Carotenoids. Phenolic compounds. Anacardic acids.

3.1 Introdução

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma das principais culturas sustentáveis da região Nordeste do Brasil. O processamento do pedúnculo de caju apresenta diversas opções tecnológicas de industrialização, principalmente na produção de cajuína (suco clarificado e pasteurizado) e sucos concentrados e prontos para beber. Além desses produtos, e em menor escala, pode ser transformado em doces, refrigerantes, vinhos e polpas (SANCHO, 2007; PINHO, 2011). Com o processamento do pedúnculo de caju, principalmente para a produção de sucos, é gerada grande quantidade de fibras residuais, que normalmente são descartadas sem nenhum aproveitamento, podendo causar graves problemas ambientais. O volume de resíduo gerado corresponde a aproximadamente 20% do peso do pedúnculo de caju e apenas uma pequena quantidade é utilizada, normalmente como complemento nutricional para ração animal (SANTOS *et al.*, 2007; AL-DHABI *et al.*, 2017). No entanto, esse resíduo agroindustrial apresenta nutrientes e compostos bioativos remanescentes, com destaque para os carotenoides e os compostos fenólicos, que podem ser explorados para obtenção de produtos com alto valor agregado (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003; AGOSTINI-COSTA, *et al.*, 2004; RABELO *et al.*, 2009; MICHODJEHOUN-MESTRE *et al.*, 2009; RUFINO *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2011).

Nesse sentido, pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de promover o aproveitamento das fibras residuais do processamento do caju. Assim, Abreu *et al.* (2013 a e b), visando a extração e concentração dos carotenoides remanescentes nas fibras resultantes do processamento do pedúnculo de caju, desenvolveu um processo, composto por diversas etapas tecnológicas (maceração enzimática, prensagem, filtração, centrifugação, microfiltração e pasteurização), que resultou na obtenção de um extrato concentrado de caju (ECC), de intensa coloração amarela devido ao seu alto teor de carotenoides. A ingestão desses compostos tem sido associada a diminuição do risco de muitos distúrbios mediados por espécies reativas de oxigênio, tais como câncer (DONALDSON, 2004; KEY, 2011), transtornos cardiovasculares (MAYNE, 1996; VOUTILAINEN *et al.*, 2006) e degeneração macular relacionada a idade (BEATTY *et al.*, 2000; KOUSHAN *et al.*, 2013).

Assim, o ECC apresenta grande potencial para ser usado como corante alimentício, podendo, inclusive, vir a ser uma opção saudável de substituição ao corante artificial tartrazina, frequentemente associado a reações adversas à saúde, causando urticária, asma, náuseas, eczema, bronquite, rinite, broncoespasmos e dor de cabeça (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2009; FREITAS, 2012). Ademais, recentemente foi reportado que o ECC apresenta em sua

constituição ácidos anacárdicos (AA) (DIONÍSIO *et al.*, 2018), que são compostos fenólicos derivados do ácido salicílico e apresentam caráter lipídico devido a sua cadeia carbônica lateral (SEONG *et al.*, 2014). Esses compostos têm atraído o interesse de pesquisadores por possuírem vasta atividade biológica como: atividade antitumoral, antioxidante, gastro-protetora e antimicrobiana (LIMA *et al.*, 2000; TOYOMIZU *et al.*, 2003; KUBO *et al.*, 2006; PARASA *et al.*, 2011; ACHANATH *et al.*, 2012; HAMAD; MUBOFU, 2015). No entanto, nenhum estudo acerca dos efeitos das etapas do processo de obtenção do ECC na cor e compostos bioativos foi realizado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das etapas do processo de obtenção do ECC com relação aos parâmetros de cor e conteúdos de compostos bioativos (carotenoides totais, polifenóis extraíveis totais e ácidos anacárdicos monoeno, dieno e trieno) com o intuito de se conhecer as principais alterações que ocorrem durante o processamento para obtenção do ECC.

3.2 Material e métodos

3.2.1. Matéria-prima

Pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.), da variedade CCP-76, foram processados na empresa “Natvita”, no Eusébio (Ceará – Brasil). Após a remoção das castanhas, os frutos foram lavados e sanitizados, e então processados para obtenção do suco integral. As fibras residuais (FIGURA 4) foram armazenadas sob congelamento (-20 °C) e transportadas para o Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram utilizadas como matéria-prima para a obtenção do extrato concentrado de caju (ECC).

Figura 4 – Fibras residuais do processamento do pedúnculo de caju

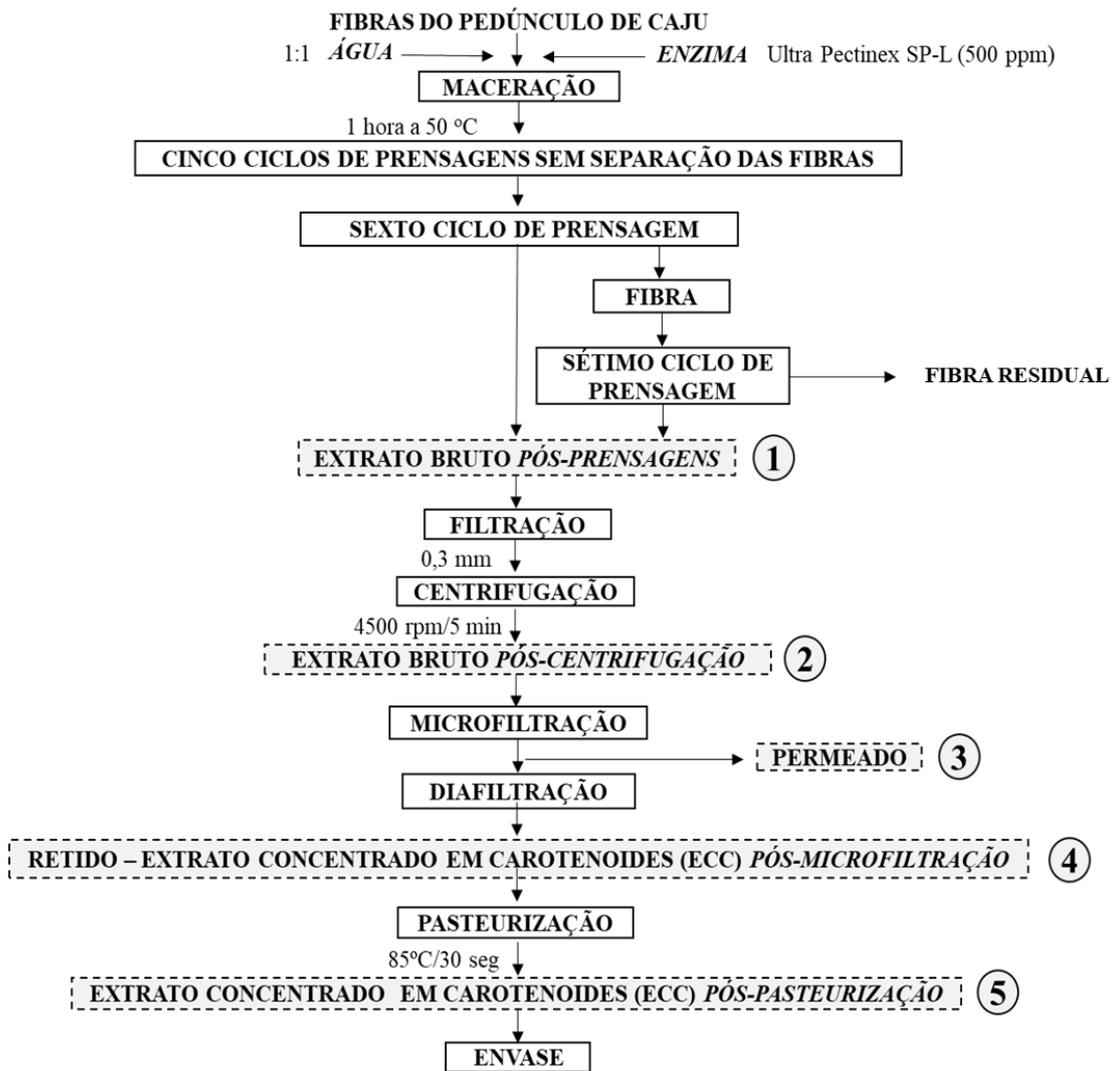


Fonte: autor.

3.2.2 Obtenção do extrato concentrado de caju (ECC)

O processo de obtenção do ECC seguiu o protocolo descrito por Abreu *et al.* (2013 a, b), com modificações relativas a etapa de centrifugação do material e tratamento térmico. A Figura 5 mostra o fluxograma de obtenção do ECC.

Figura 5 - Fluxograma do processamento das fibras residuais do pedúnculo para obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) com destaque para as etapas das quais foram retiradas amostras (1-5) para análises de cor e compostos bioativos



Fonte: adaptado de ABREU *et al.* (2013a).

3.2.2.1 Tratamento enzimático

Para obtenção do extrato concentrado de caju (ECC), a massa de fibras de caju foi adicionada de água na proporção 1:1 (m/m), 500 ppm de enzima (Pectinex Ultra SP-L) e

homogeneizada manualmente em tacho aberto encamizado. O tratamento enzimático ocorreu por 1 hora a 50 °C (FIGURA 6a).

Figura 6 - Etapas do processo de obtenção extrato concentrado de caju (ECC)



Fonte: autor.

Legenda: (a) = maceração, (b) = prensagem das fibras, (c) = pré-filtração, (d) (e – Retido com fator de redução volumétrica de 16) = microfiltração e (f) = pasteurização.

3.2.2.2 Prensagem, pré-filtração e centrifugação

Após o tratamento enzimático, a mistura foi prensada utilizando uma prensa do tipo helicoidal contínua (Incomap 300), com uma capacidade nominal de 300 kg/h para a liberação do extrato aquoso (FIGURA 6b). A prensa foi ajustada para uma força aplicada na placa de 2500 N. A operação de prensagem foi repetida por cinco ciclos consecutivos sem separação do extrato e das fibras. Somente no sexto ciclo de prensagem as fibras foram separadas do extrato e em seguida submetidas a mais um ciclo de prensagem (sétimo). Após os sete passos de prensagem, uma suspensão de cor amarela foi obtida e então submetida à uma pré-filtração (FIGURA 6c), através de uma malha de aço inoxidável de 0,3 mm, a fim de remover grandes

partículas em suspensão. Terminada a pré-filtração, a suspensão foi centrifugada (4500 rpm por 5 minutos) e o extrato sobrenadante embalado em sacos de polietileno, que foram estocados e congelados (-20 °C) até que fosse possível realizar a etapa de concentração por microfiltração.

3.2.2.3. Microfiltração

Nesta etapa, o extrato bruto foi submetido a um sistema de microfiltração equipado com membranas de cerâmica em óxido de alumínio (FIGURA 6d e 6e). A microfiltração foi realizada em escala de laboratório usando um equipamento piloto de bancada, com um conjunto de 4 membranas monotubulares em série (MEMBRALOX Pall-Exekia), com área total de filtração de 0,022 m² e diâmetro médio de poro de 0,2 µm. A pressão transmembrana média foi de 2,75 bar, com temperatura controlada a 40 °C (± 2 °C). O processo foi conduzido sempre usando o modo de concentração até uma taxa de redução volumétrica (FRV= Vf/Vr, com Vf e Vr sendo os volumes da alimentação e do retido, respectivamente) de 16. Terminada a microfiltração, as impurezas hidrossolúveis foram eliminadas por diafiltração, e o material resultante foi denominado de extrato concentrado de caju (ECC).

3.2.2.4. Tratamento térmico

O ECC foi pasteurizado (85 °C/30 s) com o uso de um trocador de calor tubular (Armfield FT74) (FIGURA 6f). Seguiu-se o enchimento a quente (*hot fill*) em garrafas de vidro de 200 mL, previamente higienizadas com cloro (100 mg/L), e fechamento com tampa plástica rosqueável com lacre. As garrafas foram invertidas para pasteurização da tampa por 3 min, resfriadas em banho de gelo até temperatura ambiente, e estocadas sob refrigeração (5 ± 2 °C) até o momento das análises.

3.2.3 Avaliação dos efeitos das etapas do processamento para obtenção do ECC

Para avaliação dos efeitos das etapas foram selecionadas as amostras destacadas na Figura 2, sendo eles: Extrato bruto pós-prensagens (1), Extrato bruto pós-centrifugação (2), Permeado (3), Retido - Extrato concentrado em carotenoides (ECC) pós-microfiltração (4) e Extrato concentrado em carotenoides (ECC) pós-pasteurização (5). Aproximadamente 200 ml de cada uma das amostras foram coletados. As amostras 1, 2 e 3 foram acondicionadas em embalagens de vidro âmbar e estocadas em câmara de congelamento (-20 ± 2 °C) até o momento das análises. Já as amostras 4 e 5 foram acondicionadas em embalagens de vidro âmbar e estocadas em câmara de refrigeração (5 °C) para que não ocasionasse perda de estabilidade da emulsão.

As amostras selecionadas foram submetidas às análises de cor (L^* , a^* e b^*) e teores de carotenoides totais, polifenóis extraíveis totais e ácidos anacárdicos (trieno, dieno e monoeno).

3.2.3.1 Cor

As análises de cor foram realizadas em triplicata por leitura direta da reflectância do sistema de coordenadas retangulares (L^* , Luminosidade; a^* , intensidade de vermelho e verde; e b^* , intensidade de amarelo e azul), aplicando a escala de cor CIELAB com o uso de colorímetro Konica Minolta, modelo CR-410.

A diferença de cor resultante entre as amostras 4 e 5 (ECC pós-microfiltração e ECC pós-pasteurização, respectivamente) foi calculada pela equação (1), conforme descrito por Santipanichwong e Supphantharika (2007):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (1)$$

Onde: ΔE é a diferença de cor global; ΔL é a variação da coordenada L^* ; Δa representa a variação da coordenada a^* ; e Δb é a variação da coordenada b^* .

A discussão dos resultados de ΔE baseia-se nas faixas definidas por Mokrzycki e Tatol (2011), onde: $0 < \Delta E < 1$ – não são observadas diferenças entre as amostras; $1 < \Delta E < 2$ – somente pessoas treinadas observam as diferenças; $2 < \Delta E < 3,5$ – pessoas sem treinamento também observam as diferenças; $3,5 < \Delta E < 5$ – as diferenças são claramente observadas; $5 < \Delta E$ – pessoas observam duas diferentes cores entre as amostras.

3.2.3.2 Carotenoides totais (CT)

Para a determinação de carotenoides totais a extração foi realizada em triplicata de acordo com Higby (1961). A solução extratora de álcool isopropílico:hexano (3:1), ou seja, 30 mL de álcool isopropílico e 10 mL de hexano, foi adicionada a amostra e levada ao agitador magnético por cerca de 1 minuto. Em seguida, o conteúdo foi transferido para um funil de separação de 125 mL envolvido em papel alumínio, onde se completou o volume com água destilada e deixou-se em repouso por 30 minutos, seguindo-se a lavagem do material. Essa operação foi repetida por três vezes. Após as lavagens, a água foi retirada e a fração contendo os carotenoides foi filtrada, com algodão pulverizado com sulfato de sódio anidro, para um balão volumétrico de 50 mL, envolto em papel alumínio, onde foram adicionados 5 mL de acetona e completado o volume com hexano. As leituras foram feitas a 450 nm e os resultados expressos em mg/100mL ou mg de amostra, calculados através da equação 2:

$$\text{Carotenoides totais} = (A_{450\text{nm}} \times 100) / (250 \times L \times W) \quad (2)$$

Onde: $A_{450\text{nm}}$ = absorvância; L = largura da cubeta em cm; e W = quociente entre a massa da amostra original em gramas e o volume final da diluição em mL.

3.2.3.3 Polifenóis extraíveis totais (PET)

Os polifenóis extraíveis totais foram determinados de acordo com Larrauri, Rupérez & Saura-Calixto (1997) e Rufino *et al.* (2010), com modificações. Os extratos das amostras foram obtidos, em triplicata, homogeneizando-se 4 gramas de amostra com 4 mL de metanol P. A, 50%. Em seguida, deixou-se essa mistura no escuro à temperatura ambiente e em repouso por 1 hora. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada a 15.000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante foi filtrado e colocado em um balão volumétrico de 10 mL, ao resíduo da centrifugação foi adicionado 4 mL de acetona P.A. 70%, que foi homogeneizado e deixado em repouso no escuro à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada a 15.000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante foi filtrado e colocado no mesmo balão volumétrico de 10 mL citado anteriormente. O balão foi aferido com água destilada e após homogeneização o conteúdo foi transferido para um frasco escuro e mantido congelado até o momento das análises.

Em tubos de ensaio e em ambiente escuro foram adicionados 40 μL de extrato + 210 μL de H_2O para as amostras 1, 3 e 4; 50 μL de extrato + 200 μL H_2O para a amostra 2 e 70 μL de extrato + 180 μL de H_2O para a amostra 5, 250 μL de Reativo Fenol Folin Ciocateau, 500 μL de solução de carbonato de sódio anidro 20% e 500 μL de água destilada. Para o branco, no lugar de extrato, foi adicionado 250 μL de água. Em seguida, o conteúdo os tubos de ensaio foram homogeneizados e deixados em repouso à temperatura ambiente e protegidos da luz por 30 minutos. Após esse tempo, foram transferidos 300 μL de cada tubo para os poços da microplaca e com a utilização de um leitor de microplacas (Varian Cary 50 MPR) a leitura de absorvância foi realizada a 700 nm no aplicativo “concentration” a partir da curva padrão de ácido gálico obtida anteriormente e os resultados expressos em mg equivalente em ácido gálico (EAG)/100 gramas de amostra.

3.2.3.4 Identificação de ácidos anacárdicos por UPLC-QTOF-MS^E

Para a identificação dos ácidos anacárdicos utilizou-se metodologia desenvolvida e validada por Oiram Filho *et al.* (2018). Analizou-se apenas a amostra correspondente ao ECC pós-pasteurização, que foi congelada em ultra-frezeer (- 80 °C) e liofilizada. A partir de 1 mg

desse material foram identificados os ácidos anacárdicos, utilizando-se um sistema Acquity UPLC (Waters®) acoplado a um sistema de quadrupolo/tempo de voo (XEVO-QToF Waters®). As fases móveis foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente utilizado consistiu: 0-15 min, 2-95% de B; 15,1-17 min, 100% de B; 17,1-19,1 min, 2% de B. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2,1 mm, 1,7µm) com fluxo de 0,4 mL min⁻¹, temperatura fixa de 40 °C e volume de injeção de 5 µL. As condições de MS foram as seguintes: modo de ionização negativo; faixa de aquisição: 110-1180 Da; temperatura da fonte: 120 °C; temperatura de dessolvatação do gás: 350 °C; fluxo de dessolvatação do gás: 500 L/h; voltagem do cone de extração: 0,5 V; voltagem do capilar: 2,6 kV. O modo de aquisição foi MS^E. Leucina encefalina foi utilizada como bloqueador de massa. O equipamento foi controlado pelo programa Masslynx 4.1 (Waters® Corporation). A identificação dos ácidos anacárdicos foi realizada em triplicata.

3.2.3.5 Quantificação de ácidos anacárdicos por HPLC-DAD

As condições cromatográficas usadas para quantificação foram conduzidas usando um método otimizado e validado previamente por Oiram Filho *et al.* (2018). As amostras foram solubilizadas em metanol à uma concentração de 20 mg.mL⁻¹, filtradas em filtro de teflon (PTFE) 0,45 µm, injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-20AB Prominence, acoplado a um detector de arranjo de diodo Shimadzu SPD-M20A e equipado com uma coluna cromatográfica de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS(M) C₁₈ (150 x 4.6 mm x 5 µm). A fase móvel utilizada foi acetonitrila (solvente B), água (solvente A) e ácido acético, de modo isocrático numa proporção (80:20:1) para solvente B, solvente A e ácido acético, respectivamente. O tempo de corrida foi de 30 min, com fluxo de 1,5 mL/min, à temperatura de 30 °C e com volume de injeção da amostra de 20 µL. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através da Análise de Variância (ANOVA) e os valores encontrados foram comparados pelo Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. Para isso, utilizou-se o software Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicata com três repetições.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1. Cor

Na Tabela 2 são apresentados os resultados de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE) para cada uma das amostras analisadas, referentes às etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC).

Tabela 2 – Efeito das etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) sobre os parâmetros de cor

Nº	AMOSTRA	COR			
		L^*	a^*	b^*	ΔE
1	Extrato Pós-prensagens	74,77 ± 0,02c	-4,47 ± 0,05d	60,67 ± 0,54c	-
2	Extrato Pós-centrifugação	78,54 ± 0,09b	-7,72 ± 0,07e	61,10 ± 0,96c	-
3	Permeado da microfiltração	87,78 ± 0,06a	-0,58 ± 0,16c	1,22 ± 0,48d	-
4	ECC Pós-microfiltração (Retido)	66,85 ± 0,01d	2,67 ± 0,01b	65,81 ± 0,19a	5,1
5	ECC Pós-pasteurização	63,27 ± 0,12e	4,55 ± 0,29a	62,70 ± 0,30b	

Fonte: dados da pesquisa.

Resultados expressos como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias (n=3) seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Foi observado que, no início do processo de obtenção do ECC, o valor da coordenada L^* aumenta e atinge o seu máximo na fração permeada. Para as amostras referentes à fração retida (ECC pós-microfiltração e ECC pós-pasteurização), os valores de L^* são os menores. Esses resultados já eram esperados, uma vez que durante a microfiltração os sólidos são retidos pela membrana e o valor de L^* varia de acordo com os sólidos em suspensão. Pode-se observar que a pasteurização (85°C/30s) afetou significativamente os valores de L^* , isso pode ter ocorrido devido à pequena evaporação da água contida pela alta temperatura empregada, que ocasionou uma concentração ainda maior dos sólidos em suspensão.

Com relação a coordenada a^* , verificamos que seu valor diminui após as prensagens e com a etapa de microfiltração ocorre um aumento do valor, ou seja, a cor do ECC se distancia da coloração esverdeada. É possível observar, também, que a pasteurização provoca um aumento do valor de a^* .

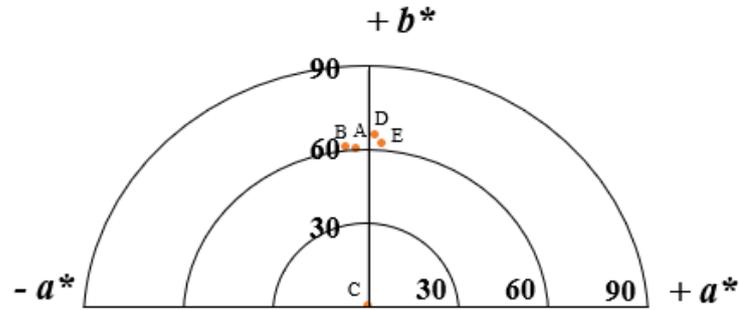
Para os valores da coordenada b^* , as amostras pós-prensagens e pós-centrifugação não diferem estatisticamente, mas o permeado tem seu valor diminuído drasticamente. Isso se deve ao fato de que os carotenoides se concentram no material retido na microfiltração. Portanto, esperava-se que no material permeado o parâmetro b^* tivesse seu valor reduzido. Observa-se, também, que com a pasteurização o valor de b^* diminui, indicando que o ECC passa a ter

coloração menos amarela e isso pode ser atribuído a degradação de carotenoides uma vez que, segundo Maiani *et al.* (2009), o processamento térmico dos alimentos pode diminuir o teor de carotenoides dos alimentos.

Ribeiro *et al.* (2017) avaliaram a cor de suco de umbu antes e após a pasteurização (86 °C/25 s) e, assim como no presente estudo, observaram a diminuição do valor de L^* e b^* , além de aumento do valor de a^* após pasteurização. A diminuição do valor de b^* foi atribuído a uma possível degradação dos carotenoides do suco de umbu. Já Santhirasegaram *et al.* (2015) obtiveram resultados diferentes em seu estudo, no qual comparou-se o tratamento ultravioleta ao tratamento térmico na qualidade de suco de manga. Nesse estudo, após o tratamento térmico (90 ± 1 °C/60 s) observou-se um aumento no valor de L^* e os pesquisadores atribuíram esse fato ao comprometimento dos compostos responsáveis pela cor presentes inicialmente no suco. Observou-se, também, diminuição dos valores de a^* e b^* , sendo isso atribuído ao desenvolvimento de componentes de escurecimento. Em adição, foi relatado que o aquecimento causa isomerização acelerada dos carotenoides, o que leva a perda da coloração amarela, indicada pelo valor de b^* .

Corroborando com esse resultado o valor de ΔE , calculado entre o ECC pós-microfiltração e pós-pasteurização, foi de 5,1. De acordo com Mokrzycki e Tatol (2011) quando o ΔE encontra-se entre 3,5 e 5 as diferenças de cor são claramente observadas e quando o $\Delta E > 5$ é possível observar duas diferentes cores entre as amostras. No entanto, podemos observar (FIGURA 7) que os pontos referentes as coordenadas a^* e b^* , no diagrama de cores, para todas as amostras, com exceção do permeado que é um subproduto do processo de obtenção do ECC, encontram-se nos quadrantes superiores na região referente ao amarelo. Desta forma, embora o processamento térmico tenha causado uma diferença de cor entre as amostras pode-se observar que o ECC apresenta ainda uma intensa coloração amarela.

Figura 7 – Distribuição das amostras nos eixos a^* e b^* do sistema de coordenadas de cores CIELAB



Fonte: autor.

Legenda: A = Extrato pós-prensagens, B = Extrato pós-centrifugação, C = Permeado, D = ECC pós-microfiltração (Retido) e E = ECC pós-pasteurização.

3.3.2 Carotenoides totais (CT)

Na Tabela 3 são apresentados os conteúdos de carotenoides totais para cada uma das amostras analisadas, referentes às etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC).

Tabela 3 – Efeito das etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) sobre o conteúdo de carotenoides totais

Nº	AMOSTRAS	CAROTENOIDES TOTAIS (mg/100g)
1	Extrato Pós-prensagens	2,36 ± 0,06c
2	Extrato Pós-centrifugação	1,92 ± 0,01c
3	Permeado da microfiltração	0,19 ± 0,04d
4	ECC Pós-microfiltração (Retido)	24,46 ± 0,15a
5	ECC Pós-pasteurização	22,04 ± 0,63b

Fonte: dados da pesquisa.

Resultados expressos em base úmida como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias (n=3) seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Verifica-se que o processo de concentração dos carotenoides por microfiltração foi efetivo, uma vez que os maiores conteúdos de carotenoides foram encontrados nas amostras referentes ao material retido (ECC pós-microfiltração e ECC pós-pasteurização) e os menores teores, próximos de 0,2 mg/100g, no material permeado. Com a microfiltração, os carotenoides remanescentes, presentes nas fibras, foram concentrados cerca de 13 vezes o valor do extrato inicial. Na literatura são encontrados resultados semelhantes, como no trabalho desenvolvido por Chaparro *et al.* (2017), que estudaram o efeito da microfiltração no conteúdo de carotenoides do suco de melancia e observaram que o processo de microfiltração produziu um

retido com uma concentração de trans-licopeno 10 vezes superior ao extrato inicial. Em outro trabalho, realizado por Chaparro *et al.* (2016), a concentração e purificação de licopeno em suco de melancia, por um processo integrado, que incluiu maceração enzimática, microfiltração de fluxo cruzado, diafiltração e centrifugação, aumentou a concentração de licopeno em 11 vezes no retido.

Com relação ao processamento térmico, observou-se que a pasteurização causou uma diminuição de 10% no conteúdo de carotenoides totais. Na revisão de literatura realizada encontraram-se variações nos valores de degradação de carotenoides devido à pasteurização, que são dependentes do material utilizado e das condições de processamento. Dutra *et al.* (2012) avaliaram o efeito de 11 tratamentos térmicos (88 a 100 °C e 16-44 s) em suco de tangerina “Murcote” em relação ao teor de carotenoides totais, e observaram que os teores sofreram reduções que variaram de 2,94 a 29,83% em função das condições do tratamento térmico quando comparados aos valores do suco *in natura*. Em alguns tratamentos, o teor de carotenoides totais aumentou como resultado de uma possível concentração do suco, dentro do trocador de calor, causada pela evaporação da água durante o tratamento térmico. Ribeiro *et al.* (2017) avaliaram os teores de carotenoides totais em suco de umbu antes e após a pasteurização (86 °C/25 s) e encontraram uma degradação de aproximadamente 5,4% com o tratamento térmico. Já Santhirasegaram *et al.* (2015) obtiveram uma degradação de carotenoides, em suco de manga pasteurizado (90 °C/60 s) na ordem de 40% em comparação a amostra controle sem tratamento.

Segundo Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), a principal causa de perdas ou destruição de carotenoides durante o processamento ou estocagem é a oxidação, seja ela enzimática ou não. A isomerização dos trans-carotenoides para isômeros cis altera a sua atividade biológica e a cor, mas não na mesma extensão que a oxidação. Em muitos alimentos, a degradação enzimática dos carotenoides pode ser mais comprometedora do que a decomposição térmica ou oxidação não enzimática. Independentemente do método de processamento, a retenção dos carotenoides diminui, em função do tempo e temperatura de processamento, assim como a desintegração dos tecidos.

3.3.3 Polifenóis extraíveis totais (PET)

Na Tabela 4 são apresentados os teores de polifenóis extraíveis totais (PET) obtidos para cada uma das amostras analisadas, referentes às etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC).

Tabela 4 – Efeito das etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) sobre o conteúdo de polifenóis extraíveis totais (PET)

Nº	AMOSTRAS	POLIFENÓIS EXTRAÍVEIS TOTAIS
		(mg Equivalente Ácido Gálico/100g)
1	Extrato Pós-prensagens	57,85 ± 1,98a
2	Extrato Pós-centrifugação	36,3 ± 2,31c
3	Permeado da microfiltração	46,17 ± 0,42b
4	ECC Pós-microfiltração (Retido)	32,83 ± 0,41c
5	ECC Pós-pasteurização	19,69 ± 0,36d

Fonte: dados da pesquisa.

Resultados expressos em base úmida como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias (n=3) seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Diferentemente do que ocorreu com os carotenoides, não se observou concentração de PET durante o processamento do ECC. Esse comportamento já era esperado, pois segundo Arend (2016), apesar da microfiltração ser muito utilizada para obtenção de sucos clarificados, através da retirada de sólidos em suspensão, não é capaz de reter compostos de baixa massa molar, como os compostos fenólicos. Esses são de natureza hidrofílica e atravessam facilmente os poros da membrana. Por outro lado, é importante considerar que as amostras de ECC foram avaliadas apenas após a diafiltração e, portanto, essa etapa pode ter eliminado muitos polifenóis do processo. No trabalho de Vergara *et al.* (2015), no qual foi estudada a clarificação de suco de figo da índia do tipo púrpura, é possível constatar essa possibilidade, pois quando o balanço de massa do processo de microfiltração foi realizado, observou-se que a quantidade de polifenóis no permeado foi de 37% da quantidade inicial e no retido foi de 41% da quantidade inicial, sendo que os autores afirmaram que a quantidade de polifenóis no permeado poderia ter sido maior, se estágios consecutivos de extração com água fossem realizados, ou seja, se a diafiltração realizada no presente trabalho tivesse sido aplicada. No trabalho de Arend (2016) também é possível fazer essa constatação, pois após a aplicação de microfiltração em suco de morango, não verificou-se grande diferença entre os teores de compostos fenólicos totais do suco in natura (14,8 mg EAG/mL) e do permeado (12,8 mg EAG/mL), mostrando que os compostos fenólicos se concentram na fração permeada e não na retida.

Adicionalmente, durante o processo de microfiltração pode ter ocorrido degradação dos PET devido a oxidação desses componentes. Castañeda-Ovando *et al.* (2009) afirmam que embora os processos de separação por membranas utilizem temperaturas brandas visando evitar à degradação dos compostos bioativos presentes no produto, em geral, esses processos são realizados em sistema aberto, e assim a turbulência verificada eleva a incorporação de oxigênio

no sistema que pode levar a degradação dos compostos fenólicos uma vez que estes são sensíveis a fatores como temperatura e exposição à luz e ao oxigênio.

Com relação ao processamento térmico, pode-se observar que os PET foram degradados na ordem de 40%. Na literatura, são encontrados resultados diferentes, como o relatado por Dutra *et al.* (2012), que avaliaram o efeito de 11 tratamentos térmicos (88 a 100 °C e 16 - 44 s) em suco de tangerina e observaram que o conteúdo de compostos fenólicos totais apresentaram reduções em seis condições avaliadas (90 °C/20 s, 90 °C/40 s, 98 °C/40 s, 94 °C/30 s e 94 °C/30 s), ao passo que, em cinco (88 °C/30 s, 94 °C/16 s, 94 °C/44 s, 98 °C/20 s e 100 °C/30 s) observou-se um aumento do conteúdo de compostos fenólicos totais, causado provavelmente pela evaporação da água presente no suco. No entanto, considerou-se que essas variações não foram significativas quando comparadas ao suco *in natura*. Ribeiro *et al.* (2017) também não observaram diferenças estatisticamente significativas após pasteurização (86°C/25s) quando avaliaram os teores de polifenóis totais no suco de umbu. Da mesma forma, Fischer, Carle e Kammerer (2013) observaram que o processamento térmico não afetou de forma significativa os teores de compostos fenólicos incolores quando estudaram a estabilidade térmica de sucos e soluções modelo de romã (*Punica granatum* L.).

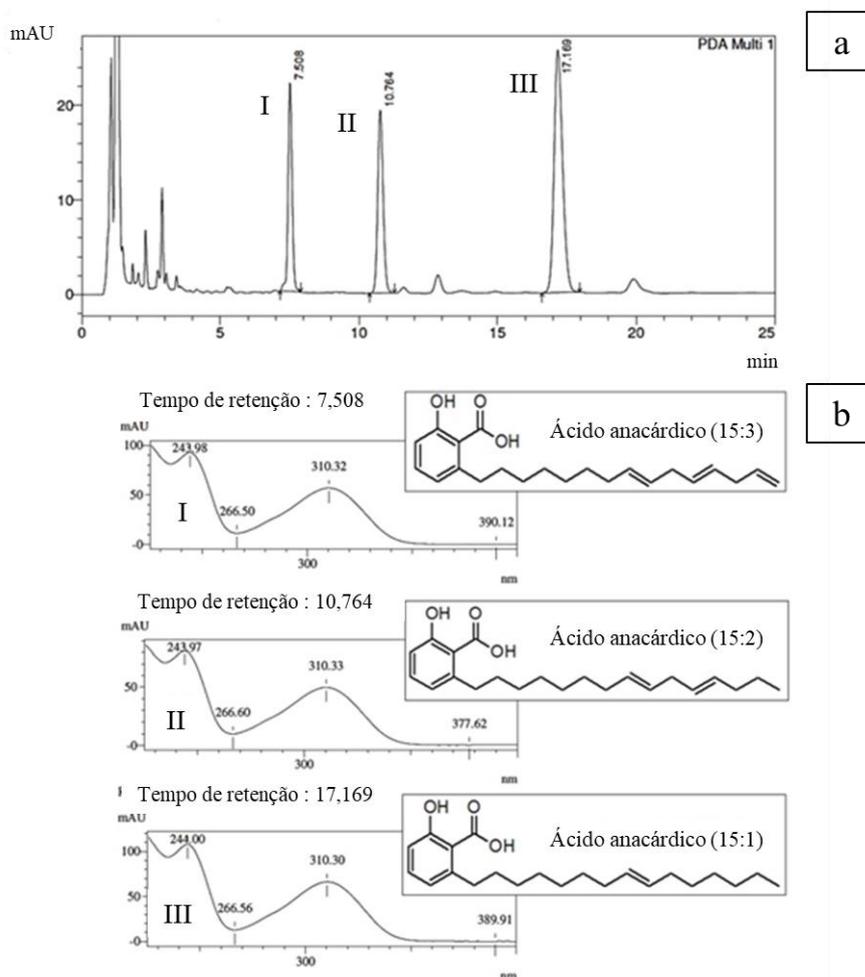
3.3.4 Ácidos anacárdicos (AA)

3.3.4.1 Identificação de ácidos anacárdicos por UPLC-QToF-MS^E

O ECC apresentou três tipos de ácidos anacárdicos, e somente traços de outros componentes fenólicos, como pode ser observado no cromatograma abaixo (FIGURA 8).

A Tabela 5 apresenta os dados obtidos dos espectros de massa de alta resolução e suas respectivas fragmentações. O ácido anacárdico trieno (15:3) foi identificado no tempo de retenção de 14,44 min, a partir de sua massa [M-H]⁻ 341,2094 Da, e um íon fragmento de m/z 297,2222 Da; o ácido anacárdico dieno (15:2) foi identificado no tempo de retenção de 15,14 min, com [M-H]⁻ 343,2245 Da e um íon fragmento de m/z 299,2355 Da; o ácido anacárdico monoeno (15:1) foi identificado no tempo de retenção de 15,90 min, mediante uma massa [M-H]⁻ 345,2409 Da, juntamente com um íon de fragmentação de m/z 301,2534 Da. Os espectros de massa de alta resolução apresentaram uma fragmentação de [M-H-44]⁻ em todos os 3 ácidos anacárdicos identificados. Essa massa é derivada da perda de uma molécula de CO₂ proveniente da clivagem do grupo carboxílico (JERZ *et al.*, 2012; ERŞAN *et al.*, 2016).

Figura 8 - Identificação de ácidos anacárdicos por análise de UPLC-QToF-MS^E, em modo de ionização negativo



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 5 - Identificação dos diferentes ácidos anacárdicos, trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1), presentes no ECC, via UPLC-QTOF-MSE

Nº	Nome do Composto	[M-H] ⁻ Experimental	[M-H] ⁻ Teórica	Erro (ppm)	Fragmento (m/z)	Formula Molecular
1	AcAn (15:3)	341,2094	341,2117	2,3	297,2222	C ₂₂ H ₃₀ O ₃
2	AcAn (15:2)	343,2245	343,2273	8,2	299,2355	C ₂₂ H ₃₂ O ₃
3	AcAn (15:1)	345,2409	345,243	6,1	301,2534	C ₂₂ H ₃₄ O ₃

Fonte: dados da pesquisa.

3.3.4.2 Quantificação de ácidos anacárdicos por HPLC-DAD

Na Tabela 6 são apresentados os resultados de quantificação de ácidos anacárdicos por HPLC-DAD para cada uma das amostras analisadas, referentes às etapas-chave do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC).

Tabela 6 – Efeito das etapas do processo de obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) sobre o conteúdo de ácidos anacárdicos

Nº	AMOSTRAS	ÁCIDOS ANACÁRDICOS (mg/100g)			
		Trieno (15:3)	Dieno (15:2)	Monoeno (15:1)	Total
1	ECC Pós-prensagens	54,50 ± 0,71b	53,50 ± 0,71b	61,50 ± 2,12b	170
2	ECC Pós-centrifugação	54,00 ± 1,00b	54,00 ± 0,00b	57,00 ± 1,00b	165
3	Permeado	nd	nd	nd	nd
4	ECC Pós-microfiltração	108,50 ± 0,71a	124,00 ± 0,00a	210,50 ± 6,36a	443
5	ECC Pós-pasteurização	113,33 ± 4,51a	126,67 ± 2,89a	209,00 ± 7,07a	449

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: ECC Pós-microfiltração = Retido e nd = não detectado.

Resultados expressos em base úmida como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias (n=3) seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Podemos observar que os ácidos anacárdicos estão presentes em todas as amostras analisadas exceto no permeado. Isso se deve a natureza lipofílica desses compostos fenólicos que, assim como os carotenoides, são retidos pela membrana do processo de microfiltração (CORREIA, DAVID e DAVID, 2006). Além disso, observa-se que os teores de ácidos anacárdicos são concentrados ao longo do processamento, assim como os carotenoides. Nas etapas iniciais do processo de obtenção do ECC (Pós-prensagens e Pós-centrifugação) não se verificam diferenças significativas entre as amostras. Entretanto, após a microfiltração podemos verificar uma concentração 2 vezes maior para os ácidos anacárdicos trieno e dieno e 4 vezes maior para o ácido anacárdico monoeno (TABELA 6).

Em comparação com a literatura foram determinados no presente trabalho teores de ácidos anacárdicos em torno de 600x, 700x e 800x maiores (ácidos anacárdicos trieno, dieno e monoeno, respectivamente) que os encontrados nas fibras, conforme relatado por Trevisan *et al.* (2006). Os autores quantificaram os ácidos anacárdicos, trieno, dieno e monoeno na fibra (0,181 mg/100g, 0,181 mg/100g e 0,249 mg/100g, respectivamente) e no pedúnculo de caju (0,022 mg/100g, 0,032 mg/100g e 0,056 mg/100g, respectivamente). A diferença observada se dá devido ao processo de microfiltração, que concentrou esses compostos no material retido (ECC).

Na pesquisa bibliográfica realizada foram encontrados outros trabalhos relatando a quantificação de ácidos anacárdicos, entretanto, foram realizadas apenas quantificações totais, utilizando-se método espectrofotométrico, como a relatada por Agostini-Costa *et al.* (2004), que determinaram 33 mg/100g de ácido anacárdico em pedúnculo de caju do clone CCP 076 e a relatada por Lima (1999), que encontrou teores de ácidos anacárdicos na faixa de 0,98-1,5 mg/100g em suco de caju comercial, quantidades 34 vezes menores que a encontrada por

Agostini-Costa *et al.* (2004). No entanto, esses pesquisadores afirmam que, devido à característica lipossolúvel do ácido anacárdico, durante a extração do suco, grande parte do ácido anacárdico permanece adsorvida na fibra do pedúnculo. Essa afirmação corrobora com os resultados encontrados no presente estudo, pois se utilizou como matéria-prima para obtenção do ECC a fibra do pedúnculo de caju.

Ao contrário das outras respostas, diferenças estatisticamente significativas não são observadas após o processamento térmico do ECC e, portanto, nos faz concluir que a pasteurização não afetou os teores de ácidos anacárdicos. Quando submetido a altas temperaturas (180°C), o ácido anacárdico sofre reação de descarboxilação convertendo-se a cardanol (HAMAD; MUBOFU, 2015). No entanto, a temperatura de pasteurização utilizada no processo de obtenção do ECC é bem inferior (85 °C), e desta forma não causa degradação dos ácidos anacárdicos.

Conclusão

A microfiltração foi efetiva para concentração dos carotenoides totais e ácidos anacárdicos (trieno, dieno e monoeno) no material retido, sendo esses compostos concentrados cerca de 13, 2 e 4 vezes, respectivamente. Além disso, todas as etapas do processo de obtenção do ECC causaram alterações nos parâmetros de cor e nos teores de carotenoides totais e polifenóis extraíveis totais. Porém, exceto para a etapa de microfiltração, os teores de AA não foram influenciados por nenhuma das etapas de obtenção do ECC. Os polifenóis, por sua vez, apresentaram maior afinidade na fração permeada, apresentando apenas traços no ECC.

Referências

ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M; DIONISIO, A. P; CARAIL, M; CARIS-VEYRAT, C; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: a focus on carotenoids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 25-31, 2013a.

ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M.; PALLET, D.; REYNES, M.; VAILLANT, F.; FURLANI, F. C. T. **Processo de concentração e purificação de extrato obtido a partir de resíduos de pseudofruto de caju e produto de elevado teor de carotenoides**. Pedido Internacional no PCT/BR2013/000130. Instituição promotora/financiadora: Embrapa/CIRAD, 2013b.

ACHANATH, R.; SRINIVAS, M.; RAMADOS, C.S.; CANDADAL, S. Antimicrobial derivatives of anacardic acid and process for preparing the same. US n. 8338638 B2, 24 ago.

2007, 25 dez. 2012. Disponível em:

<<https://encrypted.google.com/patents/US8338638?hl=pt-BR&cl=pt>>. Acesso em: 01/05/18.

ADITIVOS E INGREDIENTES. **Os corantes alimentícios**. Editora Insumos, n. 62, 2009.

Disponível em:

<http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/edicoes_materias.php?id_edicao=39>.

Acesso em: 23/11/15.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A.; GARRUTI, D. S.; PADILHA, V. A.; LIMA, J. B.; AGUIAR, M. J.; PAIVA, J. R. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1075-1080, 2004.

AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 34, p. 206-213, 2017.

AREND, G. D. **Concentração de compostos fenólicos do suco de morango por nanofiltração**. 2016.119p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 81, p. 495-502, 2003.

BEATTY, S.; KOH, H. H.; HENSON, D.; BOULTON, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**, [s.l.], v. 45, p. 115-134, 2000.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁNVIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 113, p. 859-871, 2009.

CHAPARRO, L.; DHUIQUE-MAYER, C.; CASTILLO, S.; VAILLANT, F.; SERVENT, A.; DORNIER, M. Concentration and purification of lycopene from watermelon juice by integrated microfiltration-based processes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s.l.], v. 37, p. 153-160, 2016.

CHAPARRO, L.; CASTILLO, S.; VAILLANT, F.; SERVENT, A.; DORNIER, M. Efecto de la microfiltración y diafiltración em el contenido de carotenoides y compuestos aromáticos del jugo de sandía (*Citrullus lanatus* L.). **Bioagro**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 185-196, 2017.

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

DIONÍSIO, A. P.; ABREU, F. A. P. de; BRITO, E. S. de; WURLITZER, N. J.; RIBEIRO, P. R. V.; GOES, T. de S.; SOUSA, J. M. S.; IUNES, M. F.; LIMA, A. C. V. de; OIRAM FILHO, F. Extrato concentrado de carotenoides obtido da fibra do pedúnculo de caju:

avaliação da toxicidade com uso do bioensaio de *Artemia salina*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 162, 2018.

DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 2, n. 19, p. 1-21, 2004.

DUTRA, A. S.; FURTADO, A. A. L.; PACHECO, S.; OIANO NETO, J. Efeito do tratamento térmico na concentração de carotenoides, compostos fenólicos, ácido ascórbico e capacidade antioxidante do suco de tangerina murcote. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 198-207, 2012.

ERŞAN, S.; GÜÇLÜ ÜSTÜNDAĞ, O.; CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. M. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (Exo-and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS n. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 26, p. 5334-5344, 2016.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 1800-1809, 2013.

FREITAS, A. S. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 65-72, 2012.

HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 8569–8590, 2015.

HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natura and carotene – fortified orange juice. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 27, p. 42-49, 1962.

JERZ, G.; MURILLO-VELÁSQUEZ, J. A.; SKRJABIN, I.; GOK, R.; WINTERHALTER, P. (2012). **Anacardic acid profiling in cashew nuts by direct coupling of preparative high-speed countercurrent chromatography and mass spectrometry (prep HSCCC-ESI-/APCI-MS/MS)**. In: Recent advances in the analysis of food and flavors. Washington: American Chemical Society, [s.l.], 2012. p. 145-165.

KEY, T. J. Fruit and vegetables and cancer risk. **British Journal of Cancer**, [s.l.], v. 104, p. 6-11, 2011.

KOUSHAN, K.; RUSOVICI, R.; LI, W.; FERGUSON, L. R.; CHALAM, K. V. The role of lutein in eye-related disease. **Nutrients**, [s.l.], v. 5, p. 1823-1839, 2013.

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

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

LIMA, C. A. de A. **Estudos dos ácidos anacárdicos do óleo da casca de castanha de caju (CNSL) (*Anacardium occidentale* L.) dos clones de cajueiro anão precoce CCP 076 e CCP 09 em cinco estágios de maturação.** 1999. 184f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

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

MAIANI, G.; CASTÓN, M. S.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I. G.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; VOLOTI, M.; BÖHM, V.; MAYER-HIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition e Food Research**, [s.l.], v.53, n.2, p.194-218, 2009.

MAYNE, S. T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 10, p. 690-701, 1996.

MICHODJEHOUN-MESTRE, L.; SOUQUET, J.-M.; FULCRAND, H.; BOUCHUT, C.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.-M. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 112, n. 4, p. 851-857, 2009.

MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. **Color difference delta E: a survey.** **Machine Graphics and Vision**, Warszawa, v. 20, n. 4, p. 383-411, 2011. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/236023905_Color_difference_Delta_E_-_A_survey>. Acesso em: 15/12/17.

OIRAM FILHO, F; ALCÂNTARA, D. B; RODRIGUES, T. H. S; SILVA, L. M. A; SILVA, E. O; ZOCOLO, G. J; BRITO, E. S. Development and validation of reversed phase HPLC method for determination of anacardic acids in cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Chromatographic Science**, [s.l.], v. 56, n.4, p. 300-306, 2018.

PARASA, L. S.; SUNITA, T.; RAO, K. B.; RAO, A. H.; RAO, J. S.; KUMAR, L. C. A. Acetone extract of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts shell liquid against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by minimum inhibitory concentration (MIC). **Journal Chemical and Pharmaceutical Research**, [s.l.], v.3, n.5, p. 736-742, 2011.

QUEIROZ, C.; SILVA, A. J. R.; LOPEZ, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and Browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 125, n. 1, p. 128-132, 2011.

RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; RODRIGUEZ, S. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 23, p. 5574-5580, 2009.

RIBEIRO, L. O.; PONTES, S. M.; RIBEIRO, A. P. O.; PACHECO, S.; FREITAS, S. P.; MATTA, V. M. Avaliação do armazenamento a frio sobre os compostos bioativos e as características físico-químicas e microbiológicas do suco de umbu pasteurizado. **Brazilian Journal Food Technology**, [s.l.], v. 20, p. 1-8, 2017.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008, 100p.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PEREZ-JIMENEZ, E. S. J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 121, p. 996–1002, 2010.

SANCHO, S. O.; MAIA, G. A.; DE FIGUEIREDO, R. W.; RODRIGUES, S.; DE SOUSA, P. H. M. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 878-882, 2007.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; GEORGE, D. S.; SOMASUNDRAM, C. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Food and Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 94, p. 313-321, 2015.

SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, R. P.; FREIRE, V. N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 79, n. 4, p. 1432-1437, 2007.

SEONG, Y. -A.; SHIN, P. -G.; YOON, J. -S.; YADUNANDAM, A. K.; KIM, G. -D. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 68, n. 2, p. 369-377, 2014.

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

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

VERGARA, C.; CANCINO-MADARIAGA, B.; RAMÍREZ-SALVO, A.; SÁENZ, C.; ROBERT, P.; LUTZ, M. Clarification of purple cactus pear juice using microfiltration membranes to obtain a solution of betalain pigments. **Brazilian Journal Food Technology**, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 220-230, 2015.

VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T. H. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 83, p. 1265-1271, 2006.

4 EXTRATO CONCENTRADO DE CAJU: DETERMINAÇÃO DE FATORES-CHAVE PARA SUA ESTABILIDADE

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Food Technology (ISSN 1981-6723).

RESUMO

O extrato concentrado de caju (ECC) é um produto de intensa coloração amarela, obtido a partir da fibra do pedúnculo de caju, por um processo que contempla tratamento enzimático, prensagens sequenciais e microfiltração. Vislumbra-se o uso do ECC como corante alimentar, porém não se tem informações acerca de sua estabilidade frente a distintas condições de processamento e armazenamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi empregar o delineamento de Plackett-Burman (PB) para estudar os efeitos de oito variáveis [tempo de processo, temperatura de armazenamento, pH, tipo de embalagem, cor de embalagem, presença ou ausência de carboximetilcelulose (CMC), goma de cajueiro (GC) ou lecitina (L)], em três tempos de estudo (1, 45 e 90 dias), sobre a estabilidade do ECC. As variáveis resposta foram: parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE), conteúdo de carotenoides totais (CT), potencial zeta (PZ) e teores de ácidos anacárdicos trieno, dieno e monoeno. Sequencialmente, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), que permitiu determinar as melhores condições de emprego do ECC. A temperatura de processo variou de 60 a 90°C e o pH de 2,5 a 7,0. Como variáveis de resposta utilizou-se os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE), que foram avaliados em quatro tempos de armazenamento (1, 7, 21 e 42 dias). Os resultados do PB mostraram que o uso de menor tempo de processo e a ausência dos estabilizantes CMC, GC e L são melhores para a estabilidade do ECC. Além disso, o ECC pode ser armazenado à temperatura ambiente, preferencialmente em embalagens de vidro, e é mais compatível com matrizes ácidas. Já os resultados obtidos no DCCR mostraram que a estabilidade do ECC foi afetada negativamente por condições de pH mais elevado e temperatura mais drástica. Isso limita sua aplicação em matrizes alimentares que possuem pH próximo a neutralidade e que requeiram condições drásticas de temperatura. Por outro lado, pode ser empregado, sem perdas significativas de suas características, em uma ampla gama de produtos alimentícios de alta acidez e submetidos a tratamento térmico brando.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L. Fibras. Corante alimentar. Cor. Carotenoides. Ácidos anacárdicos.

ABSTRACT

The concentrated cashew extract (CCE) is a product of intense yellow coloration, obtained from the cashew peduncle fiber, by a process that includes enzymatic treatment, sequential pressing and microfiltration. The use of CCE as food dye is envisaged, but there is no information about its stability against different processing and storage conditions. The objective of this work was to use the Plackett-Burman (PB) design to study the effects of eight variables [process time, storage temperature, pH, packaging type, packaging color, presence or absence of carboxymethylcellulose (CMC), cashew gum (CG), or lecithin (L)], in three study times (1, 45 and 90 days), on the stability of CCE. The response variables were: color parameters (L^* , a^* , b^* and ΔE), total carotenoids (TC) content, zeta potential (ZP) and triene, diene and monoenoanacardic acid contents. Sequentially, a rotational central composite design (RCCD) was used, which allowed to determine the best conditions of use of CCE. The process temperature varied from 60 to 90 ° C and the pH from 2.5 to 7.0. As response variables, the color parameters (L^* , a^* , b^* and ΔE) were used, which were evaluated in four storage times (1, 7, 21 and 42 days). PB results have shown that the use of shorter process time and the absence of CMC, CG and L stabilizers are better for CCE stability. In addition, CCE can be stored at room temperature, preferably in glass containers, and is more compatible with acid matrices. The results obtained in the RCCD showed that the CCE stability was negatively affected by higher pH conditions and more drastic temperature. This limits its application in food matrices that have pH close to neutrality and require drastic temperature conditions. On the other hand, it can be used, without significant losses of its characteristics, in a wide range of food products of high acidity and subjected to mild heat treatment.

Key words: *Anacardium occidentale* L. Fibers. Food coloring. Color. Carotenoids. Anacardic acids.

4.1 Introdução

A preocupação do consumidor em relação à segurança dos corantes sintéticos levou à restrição de suas aplicações em alimentos e aumentou o uso de corantes naturais (JESPERSEN *et al.*, 2005). Uma cor típica e de aspecto natural em um alimento sinaliza alta qualidade, enquanto um produto artificialmente brilhante pode dar a impressão oposta (AROCAS *et al.*, 2013). Além disso, os compostos naturais responsáveis por diferentes cores demonstram ter efeitos biológicos benéficos ao organismo.

Nesse sentido, pesquisas têm sido conduzidas no intuito de se descobrir novas fontes desses ingredientes, tal como os estudos relatados por Abreu *et al.* (2013 a e b), nos quais desenvolveu-se um processo, que contempla etapas de maceração, prensagem, filtração, centrifugação e microfiltração, para a produção de um extrato concentrado de caju (ECC) a partir das fibras residuais do pedúnculo. Esse extrato apresenta intensa coloração amarela, podendo vir a ser um substituto ao corante artificial tartrazina, que tem potencial toxicológico e mutagênico comprovado (ANASTÁCIO *et al.*, 2016). Além disso, apresenta importante valor nutricional, devido à presença de xantofilas que possuem atividade pró-vitamínica (α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina) e propriedades funcionais, podendo prevenir a degeneração macular relacionada a idade (devido à presença de luteína e zeaxantina) e doenças como arteriosclerose, catarata, esclerose múltipla e câncer (devido à alta concentração de carotenoides em geral) (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; VALDUGA *et al.* 2009; ABREU *et al.* 2013a).

Adicionalmente aos carotenoides do ECC, foi reportada a presença de ácido anacárdico nesse extrato (DIONÍSIO *et al.*, 2018). Esse composto é uma mistura de ácidos 6-alkil-salicílico e muitas pesquisas têm atribuído efeitos biológicos a esses compostos, tais como a inibição de vários tipos de células tumorais humanas (CARVALHO, 2011; HSIEH; HERNÁNDEZ-LEDESMA; LUMEN, 2011; WU *et al.*, 2011; TAN *et al.* 2012), além de exercer atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica (MUROI; KUBO, 1996; KUBO; LEE; KUBO, 1999; NARASIMHAN *et al.* 2008; SHARMA *et al.* 2013; HUNDT; LI; LIU, 2015; HOLLANDS *et al.*, 2016; MUZZAFAR *et al.* 2016).

A degradação de carotenoides durante o processamento e armazenamento de alimentos foi relatada em diversos trabalhos, sendo relacionada a mudanças de pH, luz, reações de oxidação-redução, temperatura, dentre outras (CHEN; PENG; CHEN, 1995; FERREIRA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008; OLIVEIRA *et al.* 2014; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). No entanto, segundo Rodriguez-Amaya, (2016), o conhecimento das reações e dos mecanismos subjacentes ainda é limitado, assim como são

escassos trabalhos avaliando a degradação de carotenoides quando expostos a diferentes valores de pH (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Os ácidos anacárdicos também podem sofrer degradação. A literatura afirma que, devido à termolabilidade do grupo carboxílico, quando submetido a altas temperaturas (>180 °C), o ácido anacárdico sofre reação de descarboxilação convertendo-se a cardanol (SHOBHA; KRISHNASWAMY; RAVINDRANATH, 1992; HAMAD; MUBOFU, 2015).

Assim, condições de processamento e armazenamento dadas ao ECC podem vir a comprometer sua qualidade nutricional e funcional, bem como aspectos de sua aplicação alimentar, devido a mudanças em sua cor.

O ECC, uma vez disponibilizado para uso como aditivo alimentar, poderá ser submetido a um segundo tratamento térmico, o que poderá causar prejuízos em sua cor, e a diferentes valores de pH, pois o pH da fase aquosa em emulsões de alimentos e bebidas pode variar consideravelmente, como de ácido em refrigerantes a ligeiramente básico em algumas bebidas nutricionais (QIAN *et al.* 2012). Além disso, como o ECC é uma emulsão instável (GOES, 2017), pois ao longo de seu armazenamento apresenta separação de fases, torna-se interessante estudar o emprego de estabilizantes (carboximetilcelulose, goma de cajueiro e/ou lecitina de soja), que possam promover sua homogeneidade (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010). Ademais, o uso de embalagens transparentes ou âmbar, assim como o tipo de material da embalagem, plástico ou vidro, são questões importantes para a preservação dos compostos de interesse, pois as mesmas podem oferecer maior ou menor proteção à luz e permeabilidade ao oxigênio (AYHAN *et al.*, 2001). Da mesma forma, verificar a necessidade ou não de temperatura de refrigeração para o armazenamento, sem prejuízo de suas características, é fundamental.

Para tanto, o objetivo inicial do presente trabalho foi empregar o delineamento de Plackett-Burman (PB) para estudar os efeitos de oito variáveis [tempo de processo, temperatura de armazenamento, pH, tipo de embalagem, cor de embalagem, presença ou ausência de carboximetilcelulose (CMC), goma de cajueiro (GC) ou lecitina (L)], em três tempos de estudo (1, 45 e 90 dias), sobre a estabilidade do ECC. Sequencialmente, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), que permitiu determinar as melhores condições de emprego do ECC.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Matéria-prima e obtenção do extrato concentrado de caju (ECC)

A matéria-prima e o processo de obtenção do ECC, a ser utilizado nos delineamentos experimentais, estão descritos nos subitens 3.2.1 e 3.2.2 do tópico 3 desta tese de doutorado.

4.2.2 Delineamento de Plackett e Burman (PB)

O delineamento de Plackett e Buman com oito variáveis e dois níveis (TABELA 7) foi empregado resultando em um total de doze tratamentos, que foram realizados de acordo com a matriz apresentada na Tabela 8.

Tabela 7 – Variáveis e níveis avaliados no delineamento de Plackett-Burman

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Tempo de processamento (min)	60	30
Temperatura de armazenamento (°C)	2	25
Potencial hidrogeniônico	2,5	7
Carboximetilcelulose (%)	0%	0,2%
Tipo de embalagem	Vidro	Plástico
Cor da embalagem	Transparente	Âmbar
Goma de cajueiro (%)	0%	0,2%
Lecitina (%)	0%	0,1%

Fonte: autor.

Tabela 8 – Matriz do delineamento de Plackett-Burman com os valores codificados das variáveis independentes

Ensaio	Variáveis Independentes							
	TP*	TE	pH	CMC	TE	CE	GC	L
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Fonte: autor.

Legenda: TP = Tempo de processamento, TE = Temperatura de armazenamento, CMC = Carboximetilcelulose, TE = Tipo de embalagem, CE = Cor da embalagem, GC = Goma de cajueiro, L = Lecitina, V = Vidro, P = Plástico, T = Transparente e Â = Âmbar. *A temperatura de processamento foi fixada em 90°C.

De acordo com as definições do planejamento estatístico (TABELA 8), a partir do ECC obtido realizaram-se diferentes tratamentos, nos quais o pH do ECC foi ajustado com ácido cítrico anidro PA-ACS (DINÂMICA) para pH 2,5 ou com hidróxido de potássio 85% P.A. (VETEC) para pH 7,0. Em seguida, o ECC foi submetido ao tratamento térmico. O tempo empregado no tratamento térmico foi de 30 min ou 60 min e a temperatura de processamento foi fixada em 90 °C, utilizando-se para isso um banho maria (MARCONI, Brasil). Após o tratamento térmico, em uma cabine asséptica (FT83, Sterile Filler System, Armfield), as amostras foram transferidas para frascos de 100 mL com tampas rosqueáveis, de plástico ou vidro, transparente ou âmbar, previamente higienizados com cloro (100 mg/L), de acordo com as definições do planejamento estatístico. Os frascos foram armazenados em câmara de refrigeração com temperaturas ajustadas em 2 ou 25 °C. Nos tempos definidos (1 dia, 45 dias ou 90 dias), as amostras foram avaliadas quanto a cor (parâmetros L^* , a^* , b^* e ΔE), potencial zeta (PZ) e conteúdos de carotenoides totais (CT) e ácidos anacárdicos (AA). Para cálculo do ΔE , as amostras obtidas nos diferentes tratamentos foram comparadas a amostra controle (ECC obtido após o processo descrito no subitem 3.2.2 do tópico 3 desta tese de doutorado), que não recebeu tratamento térmico adicional, não foi adicionado de estabilizantes, não teve o pH ajustado e foi armazenado em embalagem de vidro âmbar na temperatura de 5°C (TABELA 9). Para a análise estatística, utilizou-se o programa *Protimiza Experimental Design* (Versão 2014), considerando $p < 0,05$.

Tabela 9 – Características da amostra usada como controle

Amostra	TP	TE	pH	CMC	TE	CE	GC	L
Controle	85 °C/30s	5 °C	3,7	0	Vidro	Âmbar	0	0

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: TP = Tempo de processamento, TE = Temperatura de armazenamento, CMC = Carboximetilcelulose 0,2%, TE = Tipo de embalagem, CE = Cor da embalagem, GC = Goma de cajueiro (0,2%) e L = Lecitina (0,1%).

4.2.2.1. Métodos analíticos

Os métodos analíticos para avaliação dos efeitos das variáveis são descritos a seguir:

4.2.2.1.1 Cor

A análise de cor foi realizada conforme descrito no subitem 3.2.3.1 do tópico 3 desta tese de doutorado.

4.2.2.1.2 Carotenoides totais (CT)

A análise de carotenoides totais foi realizada conforme descrito no subitem 3.2.3.2 do tópico 3 desta tese de doutorado.

4.2.2.1.3 Potencial zeta (PZ)

O potencial zeta foi determinado pela mensuração da mobilidade eletroforética da partícula dispersa em um campo elétrico por meio do equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 para leitura. O potencial zeta foi determinado à temperatura ambiente de 25°C. As leituras foram realizadas em triplicata.

4.2.2.1.4 Identificação (UPLC-QToF-MS^E) e quantificação (HPLC-DAD) de ácidos anacárdicos

Essas metodologias foram descritas nos subitens 3.2.3.4 e 3.2.3.5 do tópico 3 desta tese de doutorado.

4.2.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR 2²)

A partir dos resultados obtidos no delineamento de Plackett e Burman (PB) observou-se que o pH foi a variável que mais afetou a estabilidade do ECC. Por conta disso e, também, pelo fato de não ter sido possível estudar a temperatura de processamento no PB, devido a um contratempo, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) com essas duas variáveis, resultando em 11 tratamentos, com o intuito de avaliar o efeito de diferentes valores de pH e temperatura sobre a cor do ECC. Como respostas, os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE) foram avaliados.

A partir do ECC obtido realizou-se diferentes tratamentos, de acordo com as condições definidas no planejamento estatístico (TABELA 10). O pH do ECC foi ajustado com ácido cítrico anidro PA-ACS (DINÂMICA) ou hidróxido de potássio 85% P.A. (VETEC) (pH variando entre 2,5 e 7,0) (TABELA 10). Em seguida, as amostras foram colocadas em frascos de vidro âmbar de 50 mL com tampas rosqueáveis, previamente higienizados com cloro (100 mg.L⁻¹), e submetidos ao tratamento térmico, utilizando-se um banho maria (MARCONI, Brasil), em condições que variaram de 60 a 90 °C, por 60 minutos.

Tabela 10 - Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) com os valores codificados e reais das variáveis independentes

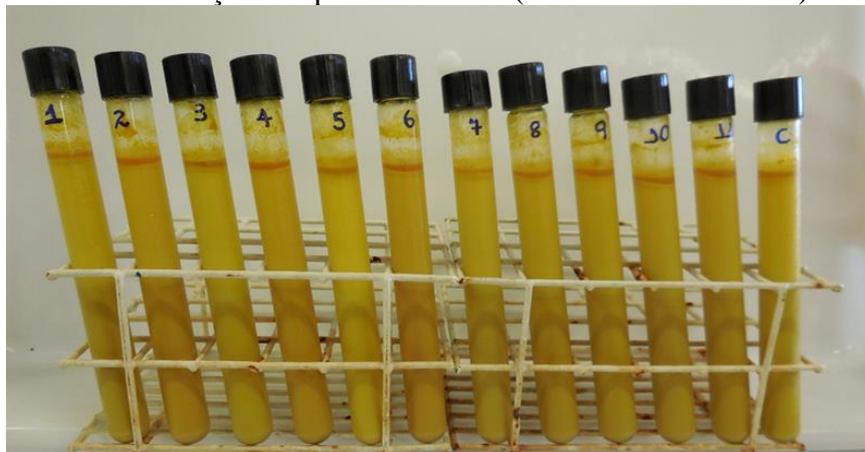
Ensaio	Variáveis Independentes			
	pH		Temperatura	
	Codificado	Real	Codificado	Real (°C)
1	-1	3,2	-1	64
2	1	6,4	-1	64
3	-1	3,2	1	86
4	1	6,4	1	86
5	-1,41	2,5	0	75
6	1,41	7,0	0	75
7	0	4,8	-1,41	60
8	0	4,8	1,41	90
9	0	4,8	0	75
10	0	4,8	0	75
11	0	4,8	0	75

Fonte: autor.

*O tempo de processamento foi fixado em 60 minutos.

Os frascos de vidro âmbar contendo o ECC foram armazenados em câmara de refrigeração com temperatura ajustada em 5 ± 2 °C. Nos tempos definidos (1 dia, 7 dias, 21 dias ou 42 dias), as amostras foram transferidas para tubos de ensaios transparentes (FIGURA 9) e avaliadas quanto a cor (parâmetros L^* , a^* , b^* e ΔE) da forma descrita no subitem 3.2.3.1 do tópico 3. Para cálculo do ΔE , as amostras obtidas nos diferentes tratamentos foram comparadas a amostra controle (TABELA 9). Para a análise estatística, utilizou-se o programa *Protimiza Experimental Design* (Versão 2014), considerando-se $p < 0,05$.

Figura 9 – Amostras do extrato concentrado de caju (ECC) em diferentes condições de processamento (11 ensaios + controle)



Fonte: autor.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Avaliação dos efeitos das variáveis de processamento e armazenamento do delineamento de Plackett e Burman (PB)

O PB possibilita o estudo simultâneo de um elevado número de fatores com um pequeno número de tratamentos e permite a triagem dos fatores que causam maior ou menor efeito nas variáveis avaliadas. Neste estudo, avaliaram-se oito variáveis, em dois níveis, sendo eles: o tempo de processamento térmico (60 ou 30 min), a temperatura de armazenamento (2 ou 25 °C), o pH (2,5 ou 7,0), o tipo de embalagem (vidro ou plástico), a cor da embalagem (transparente ou âmbar) e a incorporação de carboximetilcelulose (0 ou 0,2%) e/ou goma de cajueiro (0 ou 0,2%) e/ou lecitina (0 ou 0,1%) para testar a estabilidade do ECC ao tratamento térmico, forma de armazenamento, diferentes pHs e uso de estabilizantes.

Na Tabela 11 são mostrados os resultados de todas as variáveis respostas analisadas: parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE), carotenoides totais, potencial zeta e ácidos anacárdicos (trieno, dieno e monoeno). No entanto, a análise dos resultados foi feita por meio da estimativa dos efeitos dos parâmetros avaliados, após 1, 45 e 90 dias de armazenamento, com o auxílio do software Protimiza.

4.3.1.1 Cor (L^* , a^* , b^* e ΔE)

O parâmetro L^* indica a luminosidade da amostra. Para o presente trabalho, uma diminuição do seu valor significa que o ECC se torna mais escuro, assim como um aumento no seu valor significa que o ECC se torna mais claro. Já as coordenadas a^* e b^* indicam a intensidade de vermelho e verde e a intensidade de amarelo e azul, respectivamente. A diminuição nos valores dessas coordenadas significa que o ECC se torna menos vermelho (ou mais verde) e menos amarelo (ou mais azul), respectivamente. Um aumento dessas coordenadas significa exatamente o inverso. Já a diferença de cor total é usada como um indicador de qualidade de cor na indústria. Quantifica a magnitude da diferença de cor entre as amostras submetidas aos diferentes tratamentos e armazenamento e a amostra controle (WIBOWO *et al.*, 2015).

Tabela 11 - Resultados obtidos para os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE), potencial zeta (PZ), carotenoides totais (CT) e ácidos anacárdicos (AA) após 1 dia, 45 dias e 90 dias de armazenamento

	Variáveis de resposta	Tempo (dias)	Ensaio													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C	
Cor	L^*	1	59,82	65,58	59,10	59,30	65,68	59,48	58,12	58,48	64,60	65,99	66,16	66,33	62,97	
		45	58,87	64,67	57,45	58,07	64,26	58,35	57,00	58,01	63,70	64,89	63,36	64,68	62,95	
		90	58,72	65,16	57,50	57,88	63,63	57,84	55,93	57,71	64,11	64,59	62,54	64,55	62,19	
	a^*	1	5,47	4,16	6,91	6,16	4,47	6,27	6,11	5,77	5,30	3,92	4,42	4,44	1,19	
		45	5,24	6,85	8,16	5,44	6,15	7,55	8,00	5,74	4,57	3,36	4,95	4,03	1,63	
		90	5,11	7,27	6,53	5,84	6,90	6,29	7,59	5,34	4,12	2,69	5,80	3,69	1,99	
	b^*	1	51,97	62,32	53,43	50,31	62,58	54,13	48,70	48,94	60,51	61,00	62,75	62,48	57,85	
		45	51,12	62,90	47,75	49,14	60,07	48,92	47,90	48,36	58,41	60,77	57,14	59,97	55,47	
		90	49,95	62,39	48,09	48,38	59,27	50,72	45,75	47,56	59,20	59,06	55,52	59,8	56,34	
	ΔE	1	7,92	5,97	8,20	9,76	6,36	7,20	11,46	10,98	5,16	5,14	6,70	6,59	-	
		45	6,97	9,24	11,52	8,85	6,58	9,96	11,55	9,59	4,23	5,91	3,75	5,39	-	
		90	7,91	8,56	10,52	9,84	5,90	8,32	13,52	10,42	4,06	3,70	3,92	4,52	-	
	Análise física	PZ (mV)	1	-35,40	-29,40	-22,40	-40,20	-35,30	-25,40	-47,40	-46,00	-40,30	-27,90	-39,90	-40,50	-34,70
			45	-33,45	-40,77	-30,95	-35,65	-44,14	-31,40	-33,76	-40,50	-46,10	-24,20	-22,00	-26,30	-24,25
			90	-37,86	-23,58	-40,40	-46,08	-20,26	-39,32	-44,02	-42,24	-22,12	-18,90	-17,80	-12,90	-28,94
Compostos bioativos	CT (mg/100g)	1	13,36	13,10	13,16	13,72	12,87	13,44	12,68	13,20	13,10	13,60	12,61	12,84	14,08	
		45	12,72	12,44	12,98	13,89	12,02	12,85	12,66	13,40	12,11	12,45	11,78	12,00	13,80	
		90	11,73	13,51	13,30	12,23	11,98	12,89	18,29	14,44	11,47	13,85	10,60	11,67	13,52	
Compostos bioativos	ÁcAn Trieno (µg/mg)	1	0,83	0,84	0,88	0,91	0,92	0,88	0,92	0,92	0,87	0,95	0,95	0,93	0,85	
		45	0,87	0,88	0,87	0,95	0,92	0,79	0,84	0,87	0,86	0,89	0,88	0,86	0,80	
		90	0,87	0,9	0,83	0,89	0,91	0,87	0,93	0,91	0,86	0,92	0,91	0,90	0,79	
Compostos bioativos	ÁcAn Dieno (µg/mg)	1	0,99	0,98	1,04	1,07	1,08	1,03	1,08	1,07	1,01	1,12	1,10	1,10	0,97	
		45	0,93	1,00	0,98	1,06	1,01	0,93	0,95	0,97	1,01	1,02	1,00	1,01	0,91	
		90	0,99	1,02	0,97	1,02	1,07	1,01	1,00	1,02	1,00	1,06	1,05	1,02	0,92	
Compostos bioativos	ÁcAn Monoeno (µg/mg)	1	1,39	1,40	1,53	1,59	1,59	1,53	1,62	1,60	1,50	1,67	1,64	1,54	1,40	
		45	1,36	1,49	1,46	1,54	1,46	1,34	1,42	1,44	1,38	1,53	1,52	1,45	1,31	
		90	1,44	1,53	1,34	1,50	1,58	1,49	1,47	1,53	1,48	1,59	1,57	1,54	1,31	

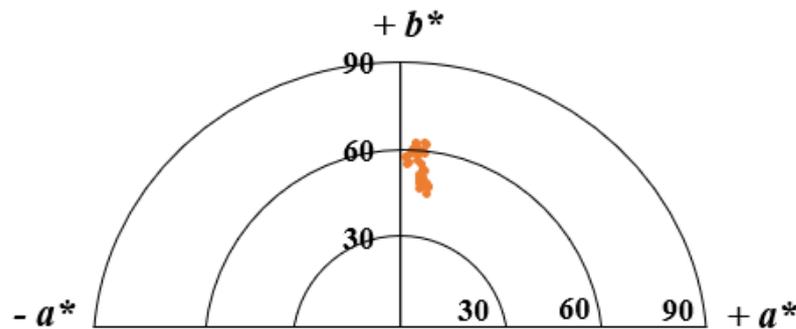
Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: C = Controle e (-) = ΔE não calculado.

Valores médios de análises realizadas em triplicata.

Na Tabela 11, é possível verificar, nos doze ensaios realizados, variação entre 55,93 e 66,33 nos valores do parâmetro L^* , variação entre 3,36 e 8,16 nos valores do parâmetro a^* , variação entre 45,75 e 62,90 nos valores do parâmetro b^* e variação entre 3,70 e 13,52 nos valores de ΔE . Essas variações indicam mudanças na coloração do ECC, deixando-o mais ou menos escuro, mais ou menos vermelho (ou verde) e mais ou menos amarelo (ou azul), comparado ao controle. No entanto, apesar de 83,33% dos valores de ΔE se apresentarem maiores que 5, o que indica que as pessoas observam duas diferentes cores entre a amostras e o controle (MOKRZYCKI; TATOL, 2011), é possível notar, se plotarmos os valores de a^* e b^* no diagrama de cores CIELAB (FIGURA 10), que a cor do ECC se mantém na região referente a coloração amarela brilhante.

Figura 10 – Distribuição das amostras (obtidas nos diferentes tratamentos e tempos de estudo) nos eixos a^* e b^* do sistema de coordenadas de cores CIELAB



Fonte: autor.

Na Tabela 12 são mostrados os dados da estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia (T1), 45 dias (T2) e 90 dias (T3) de armazenamento para os parâmetros de cor: L^* , a^* , b^* e ΔE .

É possível observar que o pH foi a única variável que mostrou efeito estatisticamente significativo em todos os tempos de estudo. Para os parâmetros L^* e b^* , os efeitos obtidos foram negativos, indicando que para pH 7 seus valores diminuíram, o que significa que o ECC se torna mais escuro e menos amarelo, respectivamente. Entretanto, para o parâmetro a^* e ΔE , os efeitos observados foram positivos, indicando que para pH 7 seus valores aumentaram, o que corresponde a uma maior intensidade da tonalidade vermelha (ou menor intensidade da tonalidade verde) no ECC e maior diferença de cor das amostras em relação ao controle, respectivamente. Oliveira *et al.* (2014) avaliando a estabilidade dos carotenoides de um purê de pêssego em diferentes valores de pH (2,5, 3,0, 3,5, 4,0 e 4,5), durante 90 dias de armazenamento a 4 e 23 °C, perceberam que os valores mais baixos do parâmetro L^* foram obtidos para pH 2,5

a 4 °C, enquanto que para 23 °C os valores de L^* não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes valores de pH. Já os menores valores de b^* foram obtidos para pH 4,0 e 4,5, enquanto os maiores valores foram obtidos para pH 3,5. Com relação ao parâmetro a^* , os maiores valores foram obtidos em pH 4,5. Assim, os autores afirmaram que durante os 90 dias de armazenamento os parâmetros L^* e b^* diminuíram, enquanto a^* aumentou para todos os valores de pH. Essa variação de cor envolveu uma mudança dos tons de amarelo para vermelho entre os valores de pH testados. Afirmaram ainda que a diminuição da luminosidade e, conseqüentemente, o aumento do escurecimento pode ser indicativo de alguma precipitação ao longo do armazenamento.

Observou-se que a partir do segundo tempo de estudo (45 dias) até o final do armazenamento (90 dias), o tempo de processamento mostrou efeito positivo ($p < 0,05$) para o parâmetro L^* . Já para o parâmetro b^* , isso foi observado apenas para 90 dias de armazenamento. Esses resultados indicam que quando o tempo de processo foi maior (60 minutos) os valores de L^* e b^* diminuíram. Isso já era esperado porque um tempo maior de processamento favorece a uma maior evaporação da água presente, concentrando os sólidos solúveis, e causando, conseqüentemente, diminuição do valor de L^* . Por outro lado, é importante lembrar que algumas reações de oxidação podem contribuir para a redução do brilho (RAMOS *et al.*, 2008). Além disso, como os carotenoides são os responsáveis pela cor do ECC e sabendo da instabilidade desses compostos, devido a presença de duplas ligações conjugadas em suas estruturas, a diversos fatores como, por exemplo, o calor (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008), esperava-se que com o emprego de um segundo tratamento térmico, referente a uma possível aplicação do ECC a uma matriz alimentícia, ocorresse alguma degradação desses compostos. Por outro lado, para o parâmetro a^* e ΔE não foram observados efeitos estatisticamente significativos do tempo de processo. O emprego do tratamento térmico de 30 ou 60 minutos a 90 °C foi indiferente para a diferença de cor total.

Observou-se, também, que no terceiro tempo de estudo (90 dias) a temperatura de armazenamento causou efeito negativo no ECC, indicando que quando a temperatura de armazenamento foi maior (25 °C) o valor de L^* diminuiu, enquanto para o parâmetro a^* observou-se efeito positivo nos dois últimos tempos de estudo (45 e 90 dias), o que significa que quando a temperatura de armazenamento foi 25 °C o valor de a^* aumentou. Já o parâmetro b^* e ΔE não sofreram nenhum efeito estatisticamente significativo da temperatura de armazenamento.

Tabela 12 – Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia, 45 dias e 90 dias de armazenamento para os parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e ΔE

Fator	Tempo (dias)	Efeito				Erro padrão				t calculado				p-valor			
		L^*	a^*	b^*	ΔE	L^*	a^*	b^*	ΔE	L^*	a^*	b^*	ΔE	L^*	a^*	b^*	ΔE
Média	1	62,39	5,28	56,59	7,62	0,12	0,11	0,26	0,26	541,83	49,72	218,08	29,55	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
	45	61,11	5,84	54,37	7,79	0,09	0,13	0,36	0,57	645,78	44,28	152,93	13,67	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008
	90	60,85	5,60	53,81	7,60	0,12	0,07	0,33	0,44	526,05	75,09	162,25	17,28	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004
Tempo processo	1	0,51	-0,42	0,92	-1,12	0,23	0,21	0,52	0,52	2,21	-1,96	1,77	-2,18	0,1136	0,1448	0,1755	0,1176
	45	0,82	-0,14	2,23	0,25	0,19	0,26	0,71	1,14	4,38	-0,54	3,14	0,22	0,0220	0,6244	0,0517	0,8426
	90	0,91	0,17	2,31	-0,45	0,23	0,15	0,66	0,88	3,95	1,15	3,48	-0,52	0,0290	0,3330	0,0400	0,6407
Temperatura de armazenamento	1	-0,07	0,21	1,45	0,06	0,23	0,21	0,52	0,52	-0,29	1,00	2,79	0,11	0,7911	0,3894	0,0682	0,9194
	45	-0,52	2,21	-0,51	1,94	0,19	0,26	0,71	1,14	-2,79	8,40	-0,72	1,70	0,0681	0,0035	0,5213	0,1869
	90	-0,83	2,27	-0,37	1,72	0,23	0,15	0,66	0,88	-3,57	15,19	-0,56	1,95	0,0375	0,0006	0,6174	0,1463
pH	1	-6,67	1,66	-10,69	3,27	0,23	0,21	0,52	0,52	-28,98	7,83	-20,60	6,33	0,0001	0,0043	0,0003	0,0080
	45	-6,30	1,70	-11,01	3,89	0,19	0,26	0,71	1,14	-33,76	6,46	-15,49	3,41	0,0001	0,0075	0,0006	0,0421
	90	-6,50	1,04	-10,80	4,98	0,23	0,15	0,66	0,88	-28,10	6,96	-16,28	5,66	0,0001	0,0061	0,0005	0,0109
CMC	1	-0,85	0,09	-2,07	1,32	0,23	0,21	0,52	0,52	-3,71	0,42	-3,98	2,57	0,0341	0,7005	0,0283	0,0828
	45	-0,31	0,58	0,18	1,09	0,19	0,26	0,71	1,14	-1,69	2,19	0,26	0,96	0,1901	0,1165	0,8116	0,4096
	90	-0,22	1,16	-0,10	2,23	0,23	0,15	0,66	0,88	-0,95	7,77	-0,15	2,54	0,4118	0,0044	0,8915	0,0846
Tipo de embalagem	1	0,33	0,31	0,34	-0,89	0,23	0,21	0,52	0,52	-1,43	1,47	0,66	-1,73	0,2473	0,2368	0,5556	0,1817
	45	0,00	0,17	-0,65	0,34	0,19	0,26	0,71	1,14	0,01	0,64	-0,91	0,30	0,9934	0,5649	0,4291	0,7850
	90	0,10	-0,57	0,35	-0,89	0,23	0,15	0,66	0,88	0,43	-3,83	0,53	-1,01	0,6947	0,0313	0,6327	0,3853
Cor da embalagem	1	0,22	0,16	-0,72	-0,10	0,23	0,21	0,52	0,52	-0,97	0,75	-1,39	-0,19	0,4037	0,5062	0,2595	0,8586
	45	-0,43	-0,38	-1,31	-0,84	0,19	0,26	0,71	1,14	-2,29	-1,45	-1,85	-0,74	0,1055	0,2419	0,1615	0,5147
	90	-0,73	-0,42	-1,40	-0,75	0,23	0,15	0,66	0,88	-3,16	-2,81	-2,12	-0,85	0,0510	0,0675	0,1244	0,4592
Goma de Cajueiro	1	-0,02	-0,51	-1,21	0,95	0,23	0,21	0,52	0,52	-0,10	-2,42	-2,32	1,84	0,9257	0,0945	0,1026	0,1638
	45	-0,09	-0,53	-0,29	-0,81	0,19	0,26	0,71	1,14	-0,47	-2,00	-0,41	-0,71	0,6683	0,1396	0,7123	0,5303
	90	-0,65	-0,05	-1,91	-0,07	0,23	0,15	0,66	0,88	-2,82	-0,35	-2,88	-0,09	0,0665	0,7518	0,0634	0,9374
Lecitina	1	-0,07	-0,10	0,35	-0,60	0,23	0,21	0,52	0,52	-0,29	-0,49	0,68	-1,16	0,7911	0,6601	0,5448	0,3311
	45	0,10	-0,04	0,21	-1,01	0,19	0,26	0,71	1,14	0,54	-0,15	0,29	-0,89	0,6239	0,8890	0,7886	0,4410
	90	0,33	0,11	0,83	-0,80	0,23	0,15	0,66	0,88	1,44	0,77	1,25	-0,91	0,2453	0,4967	0,2987	0,4293

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: CMC = Carboximetilcelulose.

Parâmetros em negrito são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Resultado semelhante foi obtido por Qian *et al.* (2012), que estudaram a influência da temperatura e pH na estabilidade físico-química de nano emulsões enriquecidas com β -caroteno. Os autores observaram que, de maneira geral, a luminosidade (L^*) e a intensidade de cor (a^* e b^*) diminuem progressivamente durante a estocagem e que a taxa de perda de cor aumenta com o aumento da temperatura de estocagem (faixa estudada entre 5 e 55 °C).

Wibowo *et al.* (2015) estudaram mudanças na cor de suco de laranja pasteurizado (92 °C/30s) durante armazenamento (20 e 28 °C/32 semanas, 35 °C/12 semanas e 42 °C/8 semanas) e observaram diminuição nos valores de L^* e b^* e aumento nos valor de a^* e ΔE quando a temperatura e tempo de armazenamento foram maiores, o que significa que o suco de laranja escureceu, teve seu tom amarelado reduzido e apresentou um tom avermelhado crescente. Ademais, apresentou diferença de cor total, entre o suco pasteurizado antes e após armazenamento, bem visível ($\Delta E > 3$).

A adição de CMC ao ECC apresentou efeito negativo aos parâmetros L^* e b^* , o que indica que a adição de CMC diminuiu os valores desses parâmetros. No caso do parâmetro L^* isso já era esperado, pois a luminosidade diminui com o aumento dos sólidos solúveis. Já o parâmetro a^* sofreu efeito positivo, o que significa que com a adição de CMC o valor de a^* aumentou, tornando a intensidade da cor vermelha maior.

Além disso, o parâmetro a^* sofreu efeito negativo do tipo de embalagem, indicando que quando a embalagem utilizada foi de plástico o valor de a^* diminuiu. Isso corresponde a uma menor intensidade da cor vermelha (ou maior intensidade da cor verde) no ECC.

Ademais, a cor da embalagem e a presença ou ausência de goma de cajueiro e/ou lecitina não apresentaram nenhum efeito estatisticamente significativo sobre os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE). No entanto, esperava-se que o uso de embalagens âmbar ajudasse a proteger os carotenoides da degradação e consequentemente a cor do ECC, pois segundo Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan, (2008) os carotenoides são degradados principalmente pela oxidação enzimática e não enzimática, as quais dependem da disponibilidade do oxigênio e da estrutura do carotenoide, sendo estimuladas, entre outras coisas, pela presença de luz.

4.3.1.2 Carotenoides totais (CT)

Na Tabela 13 são apresentados os dados da estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia (tempo 1), 45 dias (tempo 2) e 90 dias (tempo 3) de armazenamento para os carotenoides totais.

Após o primeiro dia de armazenamento ocorreu efeito positivo, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), do tempo de processo, o que significa dizer que quando o tempo de

tratamento térmico foi maior (60 minutos) observou-se menor conteúdo de carotenoides totais. A partir do segundo tempo (45 dias) até o final do estudo esse efeito não foi mais observado. Esse resultado está de acordo com as conclusões que Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008) descrevem, ou seja, independentemente do método de processamento, a perda de carotenoides é maior quanto maior for o tempo e temperatura do tratamento térmico.

Tabela 13 - Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1, 45 e 90 dias para os carotenoides totais

Fator	Tempo (dias)	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	1	13,14	0,06	238,25	0,0000
	45	12,61	0,13	98,47	0,0000
	90	13,00	0,76	17,17	0,0004
Tempo de processo	1	0,42	0,11	3,78	0,0325
	45	0,24	0,26	0,94	0,4178
	90	-0,60	1,51	-0,39	0,7198
Temperatura de armazenamento	1	-0,33	0,11	-2,96	0,0595
	45	-0,31	0,26	-1,20	0,3171
	90	0,86	1,51	0,57	0,6084
pH	1	0,24	0,11	2,18	0,1178
	45	0,95	0,26	3,71	0,0340
	90	1,63	1,51	1,08	0,3596
Carboximetilcelulose	1	-0,06	0,11	-0,51	0,6429
	45	0,29	0,26	1,13	0,3398
	90	1,31	1,51	0,87	0,4495
Tipo de embalagem	1	0,18	0,11	1,60	0,2076
	45	0,05	0,26	0,21	0,8484
	90	-0,02	1,51	-0,01	0,9919
Cor da embalagem	1	0,10	0,11	0,94	0,4180
	45	0,03	0,26	0,12	0,9141
	90	0,45	1,51	0,30	0,7857
Goma de cajueiro	1	-0,17	0,11	-1,57	0,2141
	45	-0,21	0,26	-0,81	0,4787
	90	0,97	1,51	0,64	0,5673
Lecitina	1	-0,01	0,11	-0,09	0,9335
	45	-0,12	0,26	-0,46	0,6797
	90	-1,11	1,51	-0,74	0,5154

Fonte: dados da pesquisa.

Parâmetros em negrito são estatisticamente significativos para a resposta ($p < 0,05$).

Jaeschke, Marczak e Mercali (2016) avaliaram a degradação de carotenoides na polpa de acerola durante aquecimento ôhmico e aquecimento convencional. A degradação dos carotenoides foi avaliada a 90 e 95 °C após 50 min de tratamento. As diferentes temperaturas avaliadas mostraram o mesmo efeito nas taxas de degradação (0-1,8%). Para investigar a influência da concentração de oxigênio no processo de degradação, o aquecimento ôhmico também foi realizado sob atmosfera modificada rica e pobre em oxigênio a 90 °C. A degradação

dos carotenoides foi maior sob uma atmosfera rica em oxigênio, indicando que o oxigênio é o reagente limitante da reação de degradação. A degradação dos carotenoides foi semelhante para ambas as tecnologias de aquecimento.

Efeito positivo, estatisticamente significativo, do pH ocorreu com 45 dias de armazenamento, o que significa dizer que em pH 7 observou-se maior teor de carotenoides totais. No entanto, esse efeito não foi observado nos demais tempos de estudo. Isso pode ocorrer devido ao fato de os carotenoides sofrerem reações de decomposição, desidratação ou isomerização quando entram em contato com ácido (RODRIGUEZ-AMAYA, 2000). Segundo Oliveira *et al.* (2014), as informações a respeito de carotenoides adicionados a uma matriz alimentícia exposta a diferentes valores de pH são escassas. Por isso, avaliaram a estabilidade dos carotenoides de um purê de pêssego a diferentes valores de pH (2,5, 3,0, 3,5, 4,0 e 4,5) durante 90 dias de armazenamento a 4 e 23 °C. Concluíram que a degradação dos carotenoides foi maior no pH de 4,0 e 4,5 e a maior retenção foi obtida no pH 3,0 e 3,5. A zeaxantina foi o carotenoide mais afetado com perdas de 60 a 68 % a 4 °C e 56 a 75 % a 23 °C.

Qian *et al.* (2012) estudaram a influência da temperatura e do pH na estabilidade físico-química de nano emulsões enriquecidas com β -caroteno. Observaram que a taxa de desvanecimento da cor, devido à degradação de β -caroteno, aumentou com o aumento da temperatura de armazenamento (5–55 °C) e foi mais rápida em pH 3 do que 4–8.

Foi possível observar, também, que a temperatura de armazenamento, a adição de estabilizantes, o tipo e a cor da embalagem não causaram nenhum efeito estatisticamente significativo nos teores de carotenoides totais. Entretanto, Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008) afirmam que a degradação dos carotenoides, conseqüentemente a perda de cor, é estimulada, entre outras coisas, pela presença de luz. Portanto, esperava-se que a utilização de embalagens de cor âmbar fosse um parâmetro significativo ($p < 0,05$) para a preservação dos carotenoides e da cor do ECC.

Resultados diferentes dos obtidos foram encontrados na literatura. Freitas *et al.* (2006), que estudaram a estabilidade dos carotenoides totais em suco tropical de acerola, durante 350 dias de armazenamento em condições similares às de comercialização (28 °C \pm 2 °C), observaram que os valores de carotenoides totais permaneceram inalterados nas amostras do processo asséptico (embalagens cartonadas), enquanto nas do hot fill (garrafas de vidro) houve redução de 12,5%. Nesse caso, a proteção contra a luz foi significativa para a retenção dos carotenoides.

Oliveira *et al.* (2010) avaliaram a estabilidade de β -caroteno em suco de manga “Ubá” comercializado em embalagem tetra pak, em cinco tempos de estocagem (1 a 5 meses) e em

embalagem de vidro, em três tempos de estocagem (após 3, 4 e 5 meses de armazenamento). Com relação aos teores de β -caroteno, encontrados nos sucos comercializados em embalagem de vidro, não foram observadas diferenças estatísticas entre os três tempos de estocagem. Entretanto, apesar de os valores de β -caroteno encontrados serem maiores no suco em embalagem de vidro em relação à embalagem tetra pak, foi possível observar redução, em números absolutos, com o aumento do tempo de estocagem (15 a 25%). Os autores atribuíram essa redução, principalmente, à incidência de luz pela embalagem transparente e pela permanência em temperatura ambiente, uma vez que os sucos foram armazenados em condições semelhantes às de comercialização.

4.3.1.3 Potencial zeta (PZ)

Segundo Rezvani, Schileining e Taherian (2012), para que uma emulsão seja considerada estável, o potencial zeta deve ser $> |25|$ mV. Assim, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas de London, logo o sistema fica disperso. Quando o potencial zeta é relativamente baixo, menor que 25 mV (valor absoluto), as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, as partículas se aproximam, floculando, podendo levar à separação de fases. Quanto maior for o potencial zeta, mais estável será a emulsão, pois as partículas carregadas (força repulsiva) são maiores do que a força atrativa (força de Van Der Waals), assim repelindo as partículas e evitando a floculação (SILVA, 2014).

Na Tabela 11, podemos observar que a maioria dos valores de potencial zeta (PZ) obtidos foram maiores que 25 mV e, portanto, de uma maneira geral é possível dizer que a maioria das amostras, dos diferentes ensaios, se mostraram estáveis. Somente após 90 dias de armazenamento é que verificamos uma maior quantidade de amostras não estáveis.

Na Tabela 14 estão os dados da estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia (tempo 1), 45 dias (tempo 2) e 90 (tempo 3) de armazenamento para o potencial zeta.

Após 90 dias de armazenamento, observou-se efeito negativo do pH sobre o PZ, o que significa dizer que quando o pH foi 7, o valor em módulo do potencial zeta diminuiu, tornando o extrato menos estável. O pH é um dos parâmetros que mais influencia as medidas de PZ, especialmente em dispersões aquosas. O PZ varia com o pH e se torna mais positivo e negativo com pH ácido e básico, respectivamente (USKOKOVIĆ *et al.*, 2010).

Observa-se também que nos tempos 45 e 90 dias a adição de CMC causou efeito negativo no PZ, o que significa dizer que sua presença diminuiu a estabilidade do extrato. Pois o valor em módulo do potencial zeta diminuiu tornando o extrato menos estável.

A carboximetilcelulose (CMC) apresenta estabilidade em pH ácido (CALEGUER; BENASSI, 2007) e é indicada em aplicações com colóides hidrofílicos. Suas propriedades básicas que reforçam seu valor comercial são sua habilidade de espessar a água, suspender sólidos em meio aquoso, estabilizar emulsões, absorver umidade da atmosfera e formar filmes. Essas propriedades têm sido usadas nas mais diferentes aplicações (HIRATA *et al.*, 1991). No entanto, o ECC pode ser considerado um colóide hidrofóbico, pois gotículas de óleo (concentração relativamente alta de carotenoides) estão dispersas em água. Provavelmente por isso não tenhamos tido bom resultado com relação a adição de CMC ao ECC, com o intuito de torná-lo mais estável.

Tabela 14 - Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia, 45 dias e 90 dias para o potencial zeta

Fator	Tempo (dias)	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	1	-35,84	1,48	-24,14	0,0002
	45	-34,10	1,33	-25,62	0,0001
	90	-30,46	0,74	-41,03	0,0000
Tempo de processo	1	7,15	2,97	2,41	0,0952
	45	-1,67	2,66	-0,63	0,5757
	90	-1,09	1,48	-0,73	0,5171
Temperatura de armazenamento	1	5,08	2,97	1,71	0,1854
	45	0,53	2,66	0,20	0,8549
	90	-0,88	1,48	-0,59	0,5950
pH	1	-0,58	2,97	-0,20	0,8568
	45	-0,37	2,66	-0,14	0,8992
	90	-22,39	1,48	-15,09	0,0006
Carboximetilcelulose	1	-7,85	2,97	-2,64	0,0774
	45	-12,10	2,66	-4,55	0,0199
	90	-5,19	1,48	-3,49	0,0397
Tipo de embalagem	1	5,92	2,97	1,99	0,1403
	45	-4,23	2,66	-1,59	0,2106
	90	-0,17	1,48	-0,11	0,9177
Cor da embalagem	1	-2,02	2,97	-0,68	0,5457
	45	3,83	2,66	1,44	0,2456
	90	-1,83	1,48	-1,24	0,3047
Goma de cajueiro	1	-5,62	2,97	-1,89	0,1549
	45	2,19	2,66	0,82	0,4717
	90	0,55	1,48	0,37	0,7341
Lecitina	1	-0,45	2,97	-0,15	0,8892
	45	-3,20	2,66	-1,20	0,3152
	90	-0,06	1,48	-0,04	0,9703

Fonte: dados da pesquisa.

Parâmetros em negrito são estatisticamente significativos para a resposta ($p < 0,05$).

4.3.1.4 Ácidos anacárdicos (AA)

Na Tabela 15 são apresentados os dados da estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia (tempo 1), 45 dias (tempo 2) e 90 dias (tempo 3) de armazenamento para os teores de ácidos anacárdicos: trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1). Para os três tempos estudados, bem como para os três ácidos anacárdicos identificados e quantificados não foram observados efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Esses resultados demonstram que os ácidos anacárdicos se mostraram estáveis ao tratamento térmico empregado, pH ácido e foram indiferentes as temperaturas de armazenamento avaliadas, bem como aos tipos de embalagens utilizadas, mostrando estabilidade frente à luz.

Durante o processamento de castanhas de caju, perdas de até 82%, nos teores de ácidos anacárdicos, ocorreram após processamento térmico severo (200 °C por 3 minutos), necessário para romper a casca externa e liberar os alquifenóis presentes na casca porosa (mesocarpo) (MATTISON *et al.*, 2018). Entretanto, o tratamento térmico empregado no presente trabalho (primeiramente 85 °C/30 seg e posteriormente 90 °C/30 ou 60 min) não foi tão severo quanto o necessário para causar degradação desses compostos. Isso pode explicar a estabilidade observada após o tratamento térmico empregado.

Tabela 15 - Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 1 dia, 45 dias e 90 dias para os teores de ácidos anacárdicos: trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1)

Fator	Tempo (dias)	Efeito			Erro padrão			t calculado			p-valor		
		Trieno	Dieno	Monoeno	Trieno	Dieno	Monoeno	Trieno	Dieno	Monoeno	Trieno	Dieno	Monoeno
Média	1	0,90	1,06	1,55	0,01	0,01	0,02	73,48	83,48	67,71	0,0000	0,0000	0,0000
	45	0,87	0,99	1,45	0,01	0,01	0,03	59,85	86,65	51,69	0,0000	0,0000	0,0000
	90	0,89	1,02	1,51	0,01	0,01	0,02	102,96	131,62	71,61	0,0000	0,0000	0,0000
Tempo processo	1	-0,20	-0,02	-0,04	0,02	0,03	0,05	-0,95	-0,86	-0,95	0,4111	0,4547	0,4137
	45	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,06	0,69	0,22	0,15	0,5424	0,8407	0,8913
	90	0,00	0,02	0,03	0,02	0,02	0,04	0,19	1,18	0,79	0,8597	0,3217	0,4857
Temperatura de armazenamento	1	0,00	-0,01	0,00	0,02	0,03	0,05	-0,14	-0,33	0,07	0,9004	0,7635	0,9465
	45	-0,02	-0,02	0,00	0,03	0,02	0,06	-0,69	-0,95	-0,03	0,5424	0,4126	0,9782
	90	0,00	0,00	-0,02	0,02	0,02	0,04	0,00	0,11	-0,40	1,0000	0,9211	0,7182
pH	1	-0,02	-0,02	-0,01	0,02	0,03	0,05	-0,82	-0,72	-0,29	0,4740	0,5210	0,7899
	45	-0,02	-0,04	-0,04	0,03	0,02	0,06	-0,57	-1,68	-0,80	0,6079	0,1918	0,4809
	90	-0,02	-0,03	-0,09	0,02	0,02	0,04	-0,96	-2,26	-2,06	0,4069	0,1089	0,1313
CMC	1	-0,01	-0,02	0,00	0,02	0,03	0,05	-0,27	-0,59	0,00	0,8032	0,5949	1,0000
	45	0,03	0,02	0,01	0,03	0,02	0,06	0,91	0,95	0,21	0,4283	0,4126	0,8485
	90	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,96	0,32	0,48	0,4069	0,7680	0,6667
Tipo de embalagem	1	0,01	0,01	0,04	0,02	0,03	0,05	0,27	0,20	0,87	0,8032	0,8559	0,4466
	45	-0,01	0,00	-0,03	0,03	0,02	0,06	-0,46	-0,22	-0,51	0,6788	0,8407	0,6481
	90	-0,02	0,01	-0,01	0,02	0,02	0,04	-0,96	0,32	-0,16	0,4069	0,7680	0,8841
Cor da embalagem	1	0,03	0,02	0,08	0,02	0,03	0,05	1,09	0,90	1,82	0,3559	0,3958	0,1663
	45	-0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,06	-0,34	0,51	0,21	0,7545	0,6446	0,8485
	90	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,58	0,54	0,56	0,6042	0,6279	0,6175
Goma de Cajueiro	1	0,03	0,04	0,07	0,02	0,03	0,05	1,22	1,38	1,53	0,3081	0,2604	0,2238
	45	0,01	-0,02	0,01	0,03	0,02	0,06	0,34	-0,80	0,21	0,7545	0,4807	0,8485
	90	0,03	0,02	0,05	0,02	0,02	0,04	1,92	1,61	1,19	0,1500	0,2049	0,3198
Lecitina	1	-0,04	-0,05	-0,08	0,02	0,03	0,05	-1,50	-0,04	-1,75	0,2313	0,1337	0,1789
	45	-0,03	-0,03	-0,05	0,03	0,02	0,06	-1,03	-1,39	-0,98	0,3796	0,2595	0,3989
	90	-0,01	-0,01	0,00	0,02	0,02	0,04	-0,58	-0,54	0,08	0,6042	0,6279	0,9418

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: CMC = Carboximetilcelulose.

Parâmetros em negrito são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

4.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2²)

A cor é definida como o impacto dos comprimentos de onda da luz no espectro visível (390-760 nm) que pode ser detectado pelos olhos humanos (FRANCIS, 1995), sendo um dos principais atributos que está fortemente associado ao conceito de qualidade. Embora a cor possa ser avaliada através da análise visual é pertinente determinar a cor objetivamente, uma vez que a avaliação visual é subjetiva e pode ser tendenciosa. Além disso, as medidas de cores são valiosas para estimar a degradação da cor, portanto, prevenindo mudanças químicas e de qualidade dos alimentos (VAN BOEKEL, 2008). No presente estudo, a mudança de cor durante o processamento térmico e o armazenamento foi caracterizada através do espaço de cores CIELAB.

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros L^* , a^* , b^* e ΔE do extrato concentrado de carotenoides (ECC) submetido a diversas condições de processamento (pH e temperatura), para cada tempo de análise (1, 7, 21 e 42 dias). Os parâmetros de L^* , a^* e b^* foram avaliados estatisticamente, e são discutidos nos tópicos 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3. Para o cálculo de ΔE , todas as amostras foram comparadas ao controle (amostra sem ajuste de pH, e sem tratamento térmico adicional).

De uma forma geral, pode-se observar que os valores obtidos para as amostras são superiores a 5 em 73% dos ensaios do DCCR, indicando que as pessoas observam facilmente diferenças de cores entre as amostras. Isso ocorre, principalmente, nos ensaios onde foram utilizadas condições mais drásticas de temperatura (ensaio 8) e em condições mais alcalinas (ensaio 6). Essas considerações estão de acordo com a literatura, uma vez que SAMPAIO *et al.* (2013), que avaliaram a degradação térmica de carotenoides em óleo de palma (170 a 230 °C), observaram que para todos os tratamentos de aquecimento fornecidos ao óleo de palma, a concentração de carotenoides diminuiu em função do tempo de aquecimento. Este desaparecimento, visível macroscopicamente por uma perda de cor, foi mais rápido à medida que a temperatura aumentava. Adicionalmente, QIAN *et al.* (2012), avaliando a estabilidade física e química de uma nanoemulsão enriquecida com β -caroteno frente a distintas condições

Tabela 16 - Resultados experimentais dos parâmetros L^* , a^* , b^* e ΔE de cor do extrato concentrado de caju (ECC) submetido a diferentes condições de processamento

Ensaio	L^*				a^*				b^*				ΔE^*			
	Tempo (dias)															
	1	7	21	42	1	7	21	42	1	7	21	42	1	7	21	42
1	62,37	61,62	60,89	61,97	1,67	0,62	0,03	1,06	56,05	53,01	50,61	53,86	1,97	0,52	5,14	0,93
2	59,50	59,11	59,03	59,26	6,00	4,59	5,15	4,59	53,93	50,25	49,82	48,85	7,12	5,85	7,77	6,87
3	61,58	60,93	60,25	61,08	2,35	1,10	0,16	0,52	54,28	51,90	49,09	50,62	4,04	1,90	6,73	3,07
4	59,64	58,16	58,04	57,20	6,60	4,88	5,46	4,18	52,23	48,14	48,10	45,05	8,49	7,79	9,64	10,49
5	66,68	64,04	63,83	64,08	3,86	2,38	1,79	1,24	63,60	57,59	56,38	55,91	7,35	5,02	1,77	3,15
6	58,38	58,09	57,91	57,05	6,61	6,06	6,88	5,31	51,51	49,20	48,31	45,56	9,52	7,92	10,28	10,62
7	60,18	59,99	59,79	59,24	1,69	1,30	1,33	0,58	51,17	50,91	50,28	47,36	7,25	3,26	5,81	6,79
8	58,32	57,91	57,59	57,70	2,74	2,34	2,03	1,87	48,01	47,05	46,45	45,76	10,99	7,73	10,26	9,05
9	59,22	59,20	58,87	58,69	2,17	2,15	2,03	1,44	50,01	50,14	48,97	47,61	8,75	4,55	7,46	6,92
10	59,28	59,27	59,31	59,13	2,06	2,21	2,51	1,48	50,13	49,94	50,21	48,07	8,60	4,68	6,28	6,31
11	59,39	58,98	58,56	58,96	2,55	1,87	1,37	1,18	50,30	49,76	47,25	47,43	8,47	4,87	9,06	6,90
C	63,00	61,93	62,63	62,33	1,19	0,56	1,04	0,48	57,85	53,41	55,33	53,41	-	-	-	-

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: C = Controle e (-) = ΔE não calculado.

Valores médios de análises realizadas em triplicata.

Valores em negrito significam que o $\Delta E > 3,5$ (as diferenças são claramente observadas).

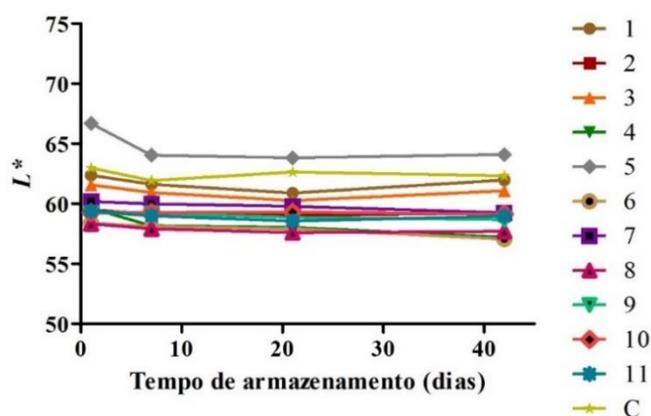
(incluindo pH e temperatura de armazenamento), relataram que as maiores alterações de cor ocorreram quando se utilizaram temperaturas mais elevadas de armazenamento, que variaram de 5 a 55°C. Porém, com relação ao pH, o efeito reportado por esses autores foi diferente do encontrado no presente trabalho: as maiores diferenças de cor entre as amostras (ΔE) ocorreram quando em condições de pH 3, sendo a faixa de pH estudada entre 3 e 8. Isso pode ser explicado pela composição de carotenoides no ECC, uma vez que os diferentes carotenoides podem apresentar diferentes resistências a degradação, como por exemplo, algumas xantofilas que são instáveis em meio alcalino e os 15 epóxi-carotenoides, que são instáveis em meio ácido (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Embora o ΔE nos forneça importantes informações sobre a diferença de cor do ECC, a discussão do efeito das condições de processamento em cada um dos parâmetros de L^* , a^* e b^* , são discutidos nos tópicos a seguir.

4.3.2.1 Parâmetro L^*

Os resultados do parâmetro L^* de cor, em todos os tempos de análise (1, 7, 21 e 42 dias) são encontrados na Tabela 16 e representados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Valores de L^* obtidos em cada tempo de armazenamento (dias) para todos os ensaios do delineamento e controle



Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados de todos os ensaios foram analisados estatisticamente. Os coeficientes de regressão e a ANOVA para o parâmetro L^* dos diferentes tempos de armazenamento do ECC encontram-se nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17 - Coeficientes de regressão para o parâmetro L^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura

Tempo (dias)	Variável	Coefficiente	Erro padrão	t-calculado	p-valor
1	Media	59,29	0,42	140,08	0,0000
	pH (L)	-2,07	0,36	-5,81	0,0004
	pH (Q)	1,60	0,40	3,96	0,0042
7	Media	59,04	0,20	295,80	0,0000
	pH (L)	-1,71	0,17	-10,19	0,0000
	pH (Q)	0,98	0,19	5,12	0,0014
	Temperatura (L)	-0,57	0,17	-3,41	0,0113
21	Media	58,75	0,28	207,96	0,0000
	pH (L)	-1,56	0,24	-6,54	0,0003
	pH (Q)	0,97	0,27	3,59	0,0089
	Temperatura (L)	-0,59	0,24	-2,49	0,0415
42	Media	58,92	0,34	168,4	0,0000
	pH (L)	-2,06	0,21	-9,64	0,0002
	pH (Q)	0,9	0,25	3,56	0,0161
	Temperatura (L)	-0,64	0,21	-2,99	0,0303
	Temperatura (Q)	-0,13	0,25	-0,54	0,6108
	pH (L).Temperatura (L)	-0,29	0,3	-0,97	0,3788

Fonte: dados da pesquisa.

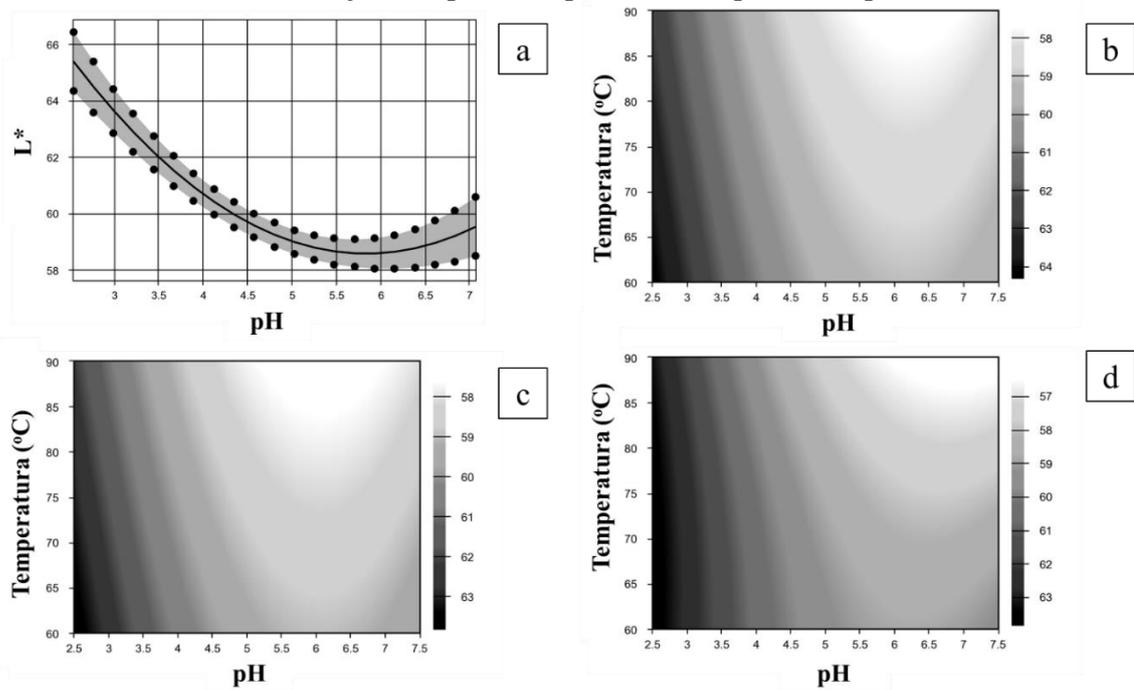
Tabela 18 - ANOVA para o parâmetro L^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura

Tempo (dias)	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
1	Regressão	50,1	2	25,1	24,7	0,00038
	Resíduos	8,1	8	1		
	Falta de ajuste	8,1	6	1,3	181,5	0,00549
	Erro puro	0	2	0		
	Total	58,2	10			
7	Regressão	32	3	10,7	47,2	0,00005
	Resíduos	1,6	7	0,2		
	Falta de ajuste	1,5	5	0,3	13,4	0,07088
	Erro puro	0	2	0		
	Total	33,6	10			
21	Regressão	28	3	9,3	20,6	0,00075
	Resíduos	3,2	7	0,5		
	Falta de ajuste	2,9	5	0,6	4,1	0,20942
	Erro puro	0,3	2	0,1		
	Total	31,2	10			
42	Regressão	43,5	5	8,7	23,7	0,00172
	Resíduos	1,8	5	0,4		
	Falta de ajuste	1,7	3	0,6	11,8	0,07933
	Erro puro	0,1	2	0		
	Total	45,3	10			

Fonte: dados da pesquisa.

De uma forma geral, pode-se observar que os valores de R^2 são satisfatórios, uma vez que foram superiores a 85%, e que o F-calculado foi superior ao F-tabelado. Desta forma, foi possível obter um modelo, e gerar a curva de contorno para cada tempo avaliado (FIGURA 11).

Figura 11 - Curvas de contorno para o parâmetro L^* do extrato concentrado de carotenoides (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura em quatro tempos de estudo



Fonte: dados da pesquisa.

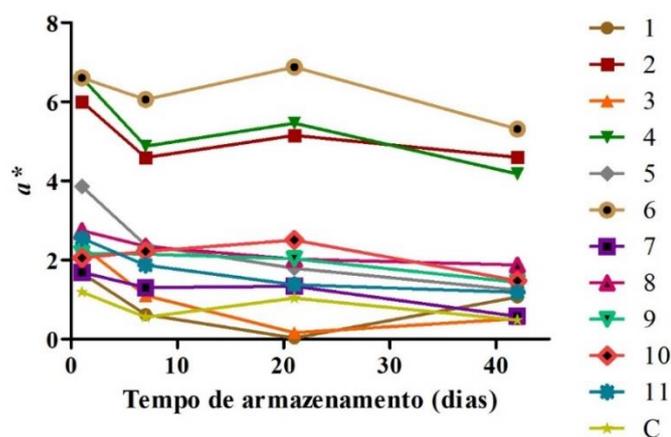
Legenda: (a) = 1 dia, (b) = 7 dias, (c) = 21 dias e (d) = 42 dias.

Os resultados das curvas de contorno demonstram que, após o processamento, a única variável que afetou o parâmetro L^* foi o pH (parâmetro linear), onde com o aumento de pH houve uma diminuição da luminosidade do produto (Figura 10a). A partir da 1ª semana de estocagem já pode-se observar que houve uma influência também da temperatura (Figura 10b, 10c e 10d), mostrando que em pH mais alcalino, e temperatura mais elevada, os valores de L^* são inferiores, indicando que o ECC se torna mais escuro. Entretanto, considerando que o ECC é uma mistura de amarelo e vermelho, os parâmetros a^* e b^* foram considerados como os principais parâmetros físicos que descrevem a alteração visual de cor durante os processos térmicos. Estas considerações também foram realizadas por Ahmed, Shivhare e Sandhu (2002), que avaliaram o efeito do processamento em purê de mamão papaia, e consideraram os parâmetros a^* e b^* como aqueles que descreveriam as alterações do purê, quando submetidos a diferentes temperaturas, que variaram de 70 a 105 °C, por 3 horas.

4.3.2.2 Parâmetro a^*

Os resultados do parâmetro a^* , em todos os tempos de análise (1, 7, 21 e 42 dias) e no controle são apresentados no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Valores de a^* obtidos em cada tempo de armazenamento (dias) para todos os ensaios do delineamento e controle



Fonte: dados da pesquisa.

Os coeficientes de regressão e a ANOVA para o parâmetro a^* dos diferentes tempos de armazenamento do ECC encontra-se na Tabela 19 e 20, respectivamente.

Tabela 19 - Coeficientes de regressão para o parâmetro a^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura

Tempo (dias)	Fator	Coefficiente	Erro padrão	t-calculado	p-valor
1	Media	2,34	0,31	7,64	0,0001
	pH (L)	1,56	0,26	6,04	0,0003
	pH (Q)	1,57	0,29	5,35	0,0007
7	Media	1,90	0,20	9,39	0,0000
	pH (L)	1,62	0,17	9,49	0,0000
	pH (Q)	1,07	0,19	5,51	0,0006
21	Media	1,76	0,25	7,19	0,0001
	pH (L)	2,20	0,21	10,68	0,0000
	pH (Q)	1,17	0,23	4,99	0,0011
42	Media	1,36	0,31	4,32	0,0075
	pH (L)	1,61	0,19	8,35	0,0004
	pH (Q)	1,03	0,23	4,5	0,0063
	Temperatura (L)	0,1	0,19	0,56	0,5968
	Temperatura (Q)	0,01	0,23	0,05	0,9554
	pH (L).Temperatura (L)	0,03	0,27	0,12	0,9102

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 20 - ANOVA para o parâmetro a^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura

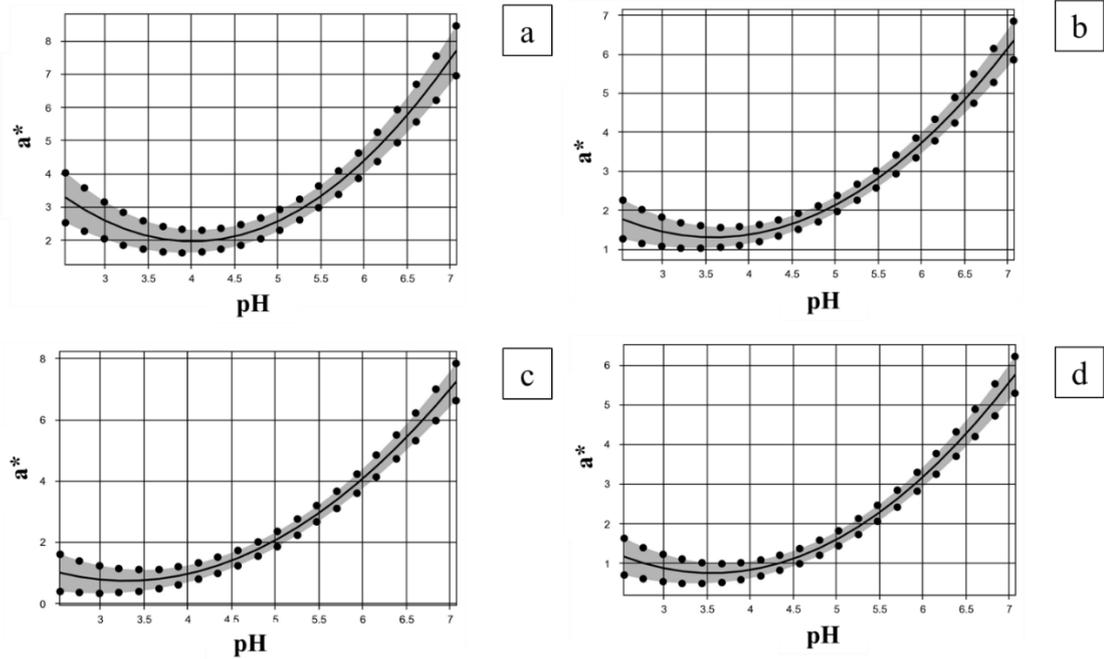
Tempo (dias)	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
1	Regressão	34,7	2	17,3	32,6	0,00014
	Resíduos	4,3	8	0,5		
	Falta de ajuste	4,1	6	0,7	10,4	0,0932
	Erro puro	0,1	2	0,1		
	Total	38,9	10	R² = 89,07%		
7	Regressão	28,1	2	14	60,2	0,00002
	Resíduos	1,9	8	0,2		
	Falta de ajuste	1,8	6	0,3	9,1	0,1023
	Erro puro	0,1	2	0		
	Total	29,9	10	R² = 93,77%		
21	Regressão	47,3	2	23,6	69,5	0,00001
	Resíduos	2,7	8	0,3		
	Falta de ajuste	2,1	6	0,3	1,1	0,56237
	Erro puro	0,7	2	0,3		
	Total	50	10	R² = 94,56%		
42	Regressão	27,7	5	5,5	18,4	0,00308
	Resíduos	1,5	5	0,3		
	Falta de ajuste	1,4	3	0,5	18,2	0,05259
	Erro puro	0,1	2	0		
	Total	29,2	10	R² = 94,86%		

Fonte: dados da pesquisa.

De uma forma geral, pode-se observar que os valores de R^2 são satisfatórios, uma vez que são superiores a 80%, e que o F-calculado foi superior ao F-tabelado. Desta forma, foi possível obter um modelo, e gerar a curva de contorno para cada tempo avaliado (FIGURA 12).

Os resultados mostram, para todos os tempos avaliados, que o pH (parâmetro linear) foi a única variável que exerceu efeito no parâmetro a^* de cor, que varia do verde (-) ao vermelho (+). Além disso, os menores valores de a^* ocorreram em menores valores de pH. Assim, menores valores de pH fizeram com que o ECC se distanciasse da cor vermelha, quando comparado ao ECC em condições mais alcalinas. Oliveira *et al.* (2014) avaliaram a estabilidade de carotenoides em purê de pêssego com diferentes valores de pH (2,5, 3,0, 3,5, 4,0 e 4,5) e observaram que, assim como no presente estudo, os maiores valores de a^* foram obtidos em pHs mais elevados (pH 4,5).

Figura 12 - Parâmetro a^* do extrato concentrado de carotenoides (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura em quatro tempos de estudo



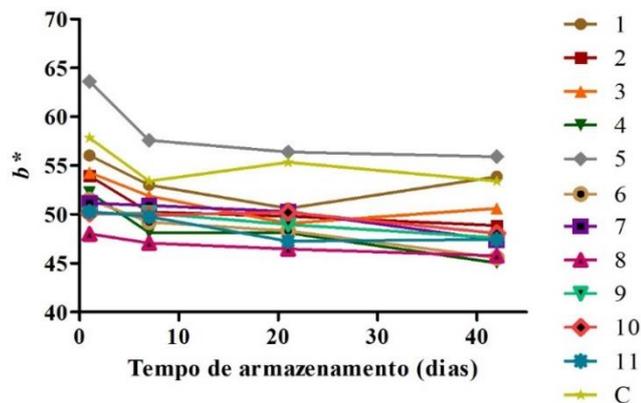
Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: (a) = 1 dia, (b) = 7 dias, (c) = 21 dias e (d) = 42 dias.

4.3.2.3 Parâmetro b^*

Os resultados do parâmetro b^* , em todos os tempos de análise (1, 7, 21 e 42 dias) e controle são encontrados no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Valores de b^* de acordo com o tempo de armazenamento (dias) para todos os ensaios do delineamento e controle



Fonte: dados da pesquisa.

Os coeficientes de regressão e a ANOVA para o parâmetro b^* dos diferentes tempos de armazenamento do ECC encontram-se nas Tabelas 21 e 22, respectivamente.

Tabela 21 - Coeficientes de regressão para o parâmetro b^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura

Tempo (dias)	Fator	Coeficiente	Erro padrão	t-calculado	p-valor
1	Media	50,14	1,20	41,73	0,0000
	pH (L)	-2,66	0,74	-3,61	0,0153
	pH (Q)	3,84	0,88	4,39	0,0071
	Temperatura (L)	-0,99	0,74	-1,35	0,2354
	Temperatura (Q)	-0,14	0,88	-0,16	0,8786
	pH (L).Temperatura (L)	0,02	1,04	0,02	0,9872
7	Media	49,95	0,55	90,85	0,0000
	pH (L)	-2,30	0,34	-6,83	0,0010
	pH (Q)	1,63	0,40	4,08	0,0096
	Temperatura (L)	-1,08	0,34	-3,22	0,0234
	Temperatura (Q)	-0,57	0,40	-1,43	0,2114
	pH (L).Temperatura (L)	-0,25	0,48	-0,53	0,6219
21	Media	48,8	0,80	60,50	0,0000
	pH (L)	-1,65	0,67	-2,45	0,0399
	pH(Q)	1,67	0,77	2,18	0,0613
42	Media	47,39	0,44	108,01	0,0000
	pH (L)	-3,15	0,37	-8,54	0,0001
	pH (Q)	1,85	0,42	4,41	0,0031
	Temperatura (L)	-1,16	0,37	-3,15	0,0162

Fonte: dados da pesquisa.

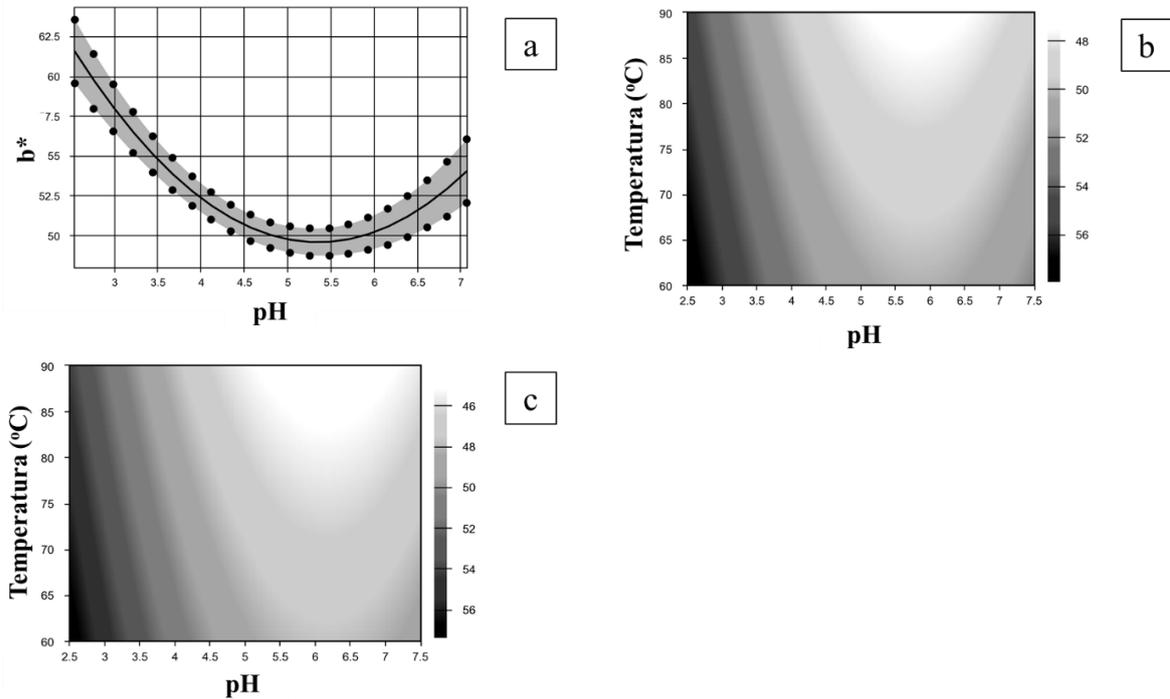
Tabela 22 - ANOVA para o parâmetro b^* do extrato concentrado de caju (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura

Tempo (dias)	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
1	Regressão	157,7	5	31,5	7,3	0,02405
	Resíduos	21,7	5	4,3		
	Falta de ajuste	21,6	3	7,2	339,4	0,00294
	Erro puro	0	2	0		
	Total	179,6	10			
7	Regressão	73,9	5	14,8	16,3	0,0041
	Resíduos	4,5	5	0,9		
	Falta de ajuste	4,5	3	1,5	41,2	0,02382
	Erro puro	0,1	2	0		
	Total	78,4	10			
21	Regressão	38,9	2	19,4	5,4	0,03324
	Resíduos	29	8	3,6		
	Falta de ajuste	24,6	6	4,1	1,9	0,39118
	Erro puro	4,4	2	2,2		
	Total	67,9	10			
42	Regressão	11,5	3	37,2	34,1	0,00015
	Resíduos	7,6	7	1,1		
	Falta de ajuste	7,4	5	1,5	13,6	0,06982
	Erro puro	0,2	2	0,1		
	Total	119,1	10			

Fonte: dados da pesquisa.

Diferentemente dos resultados obtidos nos parâmetros L^* e a^* , não foi possível obter um modelo válido para todos os tempos avaliados. Embora para os tempos de 1, 7 e 42 dias tenha apresentado valores de R^2 elevados (87,93; 94,22 e 93,59%, respectivamente), para 21 dias de armazenamento, o R^2 explicou somente 57,32% das respostas. Desta forma, foi possível obter um modelo válido e gerar a curva de contorno somente para os tempos 1, 7 e 42 dias (FIGURA 13).

Figura 13 - Parâmetro b^* do extrato concentrado de carotenoides (ECC) frente a distintas condições de pH e temperatura em três tempos de estudo



Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: (a) = 1 dia, (b) = 7 dias e (c) = 42 dias.

A curva de contorno do tempo 3 (21 dias) não foi gerada, pois não foi possível obter modelo válido para este tempo ($R^2 = 55,21\%$).

Os dados mostram resultados semelhantes ao que ocorreu com a luminosidade do ECC (L^*). O parâmetro b^* , que varia do azul (-) ao amarelo (+), foi afetado somente pelo pH no tempo inicial, onde valores maiores de b^* ocorreram em valores de pH inferiores. A partir da 1ª semana de armazenamento, a temperatura (parâmetro linear) também influenciou significativamente a cor da amostra, onde os menores valores de b^* ocorreram quando se utilizou maiores temperaturas, em pH mais alcalino. Em um trabalho realizado por Ahmed, Shivhare e Sandhu (2002) foi estudada a cinética de degradação dos carotenoides e a cor visual de um purê de papaia. Observou-se que, da mesma forma como ocorreu no presente trabalho,

os valores de b^* diminuíram com o processamento térmico do purê, sendo correlacionados com a diminuição da concentração de seus carotenoides.

4.4 Conclusão

O emprego do menor tempo (30 minutos) para o tratamento térmico e a ausência dos estabilizantes carboximetilcelulose, goma de cajueiro e lecitina são melhores para a estabilidade do ECC. Além disso, o ECC pode ser armazenado sem refrigeração, preferencialmente em embalagens de vidro, sendo sua cor indiferente, e é mais compatível com matrizes ácidas. A cor do ECC é afetada por condições de pH (2,5 a 7,0) e temperatura (60 a 90°C), sendo os maiores efeitos causados por condições mais alcalinas de pH e temperaturas mais elevadas. Isso limita a aplicação do ECC, como corante natural, em algumas matrizes alimentares, especialmente aquelas que possuem pH em torno da neutralidade e utilizam em seu processamento temperaturas mais elevadas. Por outro lado, pode ser empregado, sem perdas significativas de suas características, em uma ampla gama de produtos alimentícios, principalmente os de alta acidez, a base de frutas ou bebidas lácteas, e submetidos a tratamento térmico brando.

Referências

- ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M; DIONISIO, A. P; CARAIL, M; CARIS-VEYRAT, C; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 25-31, 2013a.
- ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M.; PALLET, D.; REYNES, M.; VAILLANT, F.; FURLANI, F. C. T. **Processo de concentração e purificação de extrato obtido a partir de resíduos de pseudofruto de caju e produto de elevado teor de carotenoides**. Pedido Internacional no PCT/BR2013/000130. Instituição promotora/financiadora: Embrapa/CIRAD, 2013b.
- AHMED, J; SHIVHARE, U. S.; SANDHU, K. S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. **Food Engineering and Physical Properties**, [s.l.], v. 67, n. 7, 2002.
- ANASTÁCIO, L. de B.; OLIVEIRA, D. A.; DELMASCHIO, C. R.; ANTUNES, L. M. G.; CHEQUER, F. M. D. Corantes alimentícios amaranço, eritrosina B e tartrazina, e seus possíveis efeitos maléficos à saúde humana. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 16-30, 2016.
- AROCAS, A.; VARELA, P.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; SALVADOR, A.; HEREDIA, F. J.; FISZMAN, S. M. Differences in colour gamut obtained with three synthetic red food

colourants compared with three natural ones: pH and heat stability. **International Journal of Food Properties**, [s.l.], v. 16, p. 766-777, 2013.

AYHAN, Z.; YEOM, H. W.; ZHANG, Q. H.; MIN, D. B. Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 2, p. 669–674, 2001.

CALEGUER, V. F.; BENASSI, M. T. Efeito da adição de polpa, carboximetilcelulose e goma arábica nas características sensoriais e aceitação de preparados em pó para refresco sabor laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 270-277, 2007.

CARVALHO, A. L. N. **Efeitos dos ácidos anacárdicos no sistema respiratório de camundongos submetidos a instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel**. 2011. 74p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

CHEN, B. H.; PENG, H. Y.; CHEN, H. E. Changes of carotenoids, colour, and vitamin A contents during processing of carrot juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 43, p. 1912–1918, 1995.

DIONISIO, A. P.; ABREU, F. A. P. de; BRITO, E. S. de; WURLITZER, N. J.; RIBEIRO, P. R. V.; GOES, T. de S.; SOUSA, J. M. S.; IUNES, M. F.; LIMA, A. C. V. de; OIRAM FILHO, F. Extrato concentrado de carotenoides obtido da fibra do pedúnculo de caju: avaliação da toxicidade com uso do bioensaio de *Artemia salina*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 162, 2018.

FERREIRA, J. E. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Degradation of lycopene and beta-carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: Kinetics, structure, and matrix effects. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 78, p. C589-C594, 2008.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Estabilizantes**. Food Ingredients Brasil, n. 14, p. 42-48, 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/145.pdf>>. Acesso em: 28/08/18.

FRANCIS, F. J. Quality as influenced by color. **Food Quality and Preference**, [s.l.], v. 6, p. 149-155, 1995.

FREITAS, C.; A. S.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M.; FERNANDES, A. G. Estabilidade dos carotenoides, antocianinas e vitamin C presentes no suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) adoçado envasado pelos processos hot-fill e asséptico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 942-949, 2006.

GOES, T. de S. **Extrato concentrado de carotenoides obtido a partir da fibra do pedúnculo de caju: caracterização, estabilidade durante o período de armazenamento e aplicações em produtos lácteos**. 2017. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 8569–8590, 2015.

HIRATA, R.; SOUZA, W. V.; PESSOAL, L. Anais do Simpósio sobre hidrocolóides. Campinas, Brasil, 1991.

HOLLANDS, A.; CORRIDEN, R.; GYSLER, G.; DAHESH, S.; OLSON, J.; ALI, S. R.; KUNKEL, M. T.; LIN, A. E.; FORLI, S.; NEWTON, A. C.; KUMAR, G. B.; NAIR, B. G.; PERRY, J. J. P.; NIZET, V. Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates neutrophil extracellular trap production and bactericidal activity. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 291, n. 27, p. 13964–13973, 2016.

HSIEH, C.-C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; LUMEN, B. O. de. Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 125, p. 630-636, 2011.

HUNDT, J.; ZHUBING, L.; LIU, O. The inhibitory effects of anacardic acid on hepatitis C virus life cycle. **PloS One**, [s.l.], DOI:10.1371/journal.pone.011751, p. 1-11, 2015.

JAESCHKE, D. P.; MARCZAK, L. D. F.; MERCALI, G. D. Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 199, p. 128-134, 2016.

JESPERSEN, L.; STROMDAHL, L. D.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. **European Food Research and Technology**, [s.l.], v. 220, p. 261-266, 2005.

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-helicobacter pylori agents from the cashew apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 47, p. 533–537, 1999.

MATTISON, C. P.; CAVALCANTE, J.M.; GALLÃO, M. I.; DE BRITO, E. S. Effects of industrial cashew nut processing on anacardic acid content and allergen recognition by IgE. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 240, p. 370-376, 2018.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los pigmentos carotenóides em los alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.54, n. 2, p.209-215, 2004. Disponível em: <<https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/26409/Estabilidad%20de%20los%20pigmentos%20carotenoides%20en%20los%20alimentos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 15/12/17.

MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. **Color difference Delta E: a survey**. **Machine Graphics and Vision**, Warszawa, v. 20, n. 4, p. 383-411, 2011. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/236023905_Color_difference_Delta_E_-_A_survey>. Acesso em: 15/12/17.

MUROI, H.; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, [s.l.], v. 80, p. 387–394, 1996.

MUZAFFAR, S.; BOSE, C.; BANERJI, A.; NAIR, B. G.; CHATTOO, B. B. Anacardic acid induces apoptosis-like cell death in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 100, p.323–335, 2016.

NARASIMHAN, B.; PANGHAL, A.; SINGH, N.; DHAKE, A. S. Efficiency of anacardic acid as preservative in tomato products. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.l.], v. 32, p. 600–609, 2008.

OLIVEIRA, A.; GOMES, M. H.; ALEXANDRE, E. M. C.; ALMEIDA, D. P. F.; PINTADO, M. Impact of pH on the phytochemical profile of pasteurized peach puré e during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, p. 12075–12081, 2014.

OLIVEIRA, D. da S.; MATA, G. M. S. C.; LUCIA, C. M. D.; CAMPOS, F. M.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Influência da embalagem e estocagem no conteúdo de beta-caroteno e ácido ascórbico em suco de manga “Ubá” industrializado. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 191-198, 2010.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; McCLEMENTS, D. J. Physical and chemical stability of b-carotene-enriched nanoemulsions: influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 132, p. 1221-1229, 2012.

RAMOS, A. M.; QUINTERO, A. C. F.; FARAONI, A. S.; SOARES, N. F. F.; PEREIRA, J. A. M. Efeito do tipo de embalagem e do tempo de armazenamento nas qualidades físico-química e microbiológica de abacaxi desidratado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n.3, p. 259-269, 2008.

REZVANI, E.; SCHLEINING, G.; TAHERIAN, A. R. Assessment of physical and mechanical properties of orange oil-in-water beverage emulsions using response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, [s.l.], v. 48, p. 82-88, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 641-647, 2000.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFÁN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008, 100p.

SAMPAIO, K. A.; AYALA, J. V.; SILVA, S. M.; CERIANI, R.; VERHÉ, R.; MEIRELLES, A. J. A. Thermal degradation kinetics of carotenoids in palm oil. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, [s.l.], v.90, p. 191–198. 2013.

SHARMA, R.; KISHORE, N.; HUSSEIN, A.; LALL, N. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. **BMC Complementary Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 292, p. 1-10, 2013.

SHOBHA, S. V.; KRISHNASWAMY, P. R.; RAVINDRANATH, B. Phenolics lipid composition during development os cashew. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 31, n. 7, p. 2295-2297, 1992.

SILVA, B. C. **Estudo físico-químico das propriedades emulsificantes dos polissacarídeos de goma de acácia-negra oriunda de plantas brasileiras.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

TAN, J.; CHEN, B.; HE, L.; TANG, Y.; JIANG, Z.; YIN, G.; WANG, J.; JIANG, X. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. **Chinese Journal of Cancer Research**, [s.l.], 2012, v. 24, n. 4, p. 275-283, 2012.

USKOKOVIĆ, V.; CASTIGLIONE, Z.; CUBAS, P.; ZHU, L.; LI, W.; HABELITZ, S. Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenins. **Journal of Dental Research**, [s.l.], v. 89, p. 149-153, 2010.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Kinetic modeling of food quality: A critical review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s.l.], 7, 144–158, 2008.

WIBOWO, S.; VERVOOT, L.; TOMIC, J.; SANTIAGO, J. S.; LEMMENS, L.; PANOZZO, A.; GRAUWET, T.; MENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 171, p. 330-340, 2015.

WU, Y.; HE, L.; ZHANG, L.; CHEN, J.; YI, Z.; ZHANG, J.; LIU, M.; PANG, X. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 339, n. 2, 2011.

5 EXTRATO CONCENTRADO DE CAJU: SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PÓ

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Brazilian Journal of Food Technology (ISSN 1981-6723).

RESUMO

O extrato concentrado de caju (ECC) é um produto obtido a partir das fibras residuais do do pedúnculo de caju. Esse extrato possui intensa coloração amarela, devido ao alto teor de carotenoides, com potencial de uso como corante alimentar natural. Entretanto, nenhum estudo acerca de sua secagem e encapsulamento havia sido realizado, o que além de evitar a degradação dos carotenoides, possibilita a dispersão desses compostos em água, diversificando sua aplicação em alimentos. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar a secagem do ECC por atomização, utilizando goma de cajueiro (GC) ou maltodextrina (M) como agentes encapsulantes e avaliar as microcápsulas utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, empregou-se dois delineamentos do tipo composto central rotacional (DCCR), nos quais avaliou-se o efeito da concentração de encapsulante (2-5%) e da temperatura de entrada no atomizador (130-170 °C), sobre as seguintes respostas: rendimento (R), higroscopicidade, umidade, solubilidade (S), reconstituição de cor, fluidez e retenção de carotenoides (RCA). A análise estatística dos resultados com nível de significância de 5% mostrou que, quando se utilizou GC apenas a S foi adequada ao modelo obtido, com valor de R^2 de 0,93. Já quando se utilizou M, o R e a RCT foram adequados aos modelos obtidos com valores de R^2 de 0,90 e 0,78, respectivamente. A partir das superfícies de respostas visualizou-se que o ponto do processo correspondente a 150 °C e 5% de GC apresentou a melhor característica para a resposta solubilidade e o ponto central do processo referente a 150 °C e 3,5% de M apresentou os maiores valores para a retenção de carotenoides. Os pós obtidos nos pontos ótimos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e observou-se que as microcápsulas apresentaram paredes sem rachaduras e formas arredondadas. Entretanto, a microcápsula de GC apresentou diâmetros maiores e maior quantidade de pontos de retração da superfície. Portanto, foi possível encapsular o ECC com os dois agentes encapsulantes empregados.

Palavras-chave: Fibras do pedúnculo de caju. Corante natural. Atomização. Maltodextrina. Goma de cajueiro.

ABSTRACT

The residual cashew fiber presents remaining carotenoids. Previous studies have reported the use of these fibers as a source of a concentrated cashew extract (CCE). This extract has intense yellow coloration, due to the high content of carotenoids, with potential of use as food coloring. However, no studies on its drying and encapsulation had been carried out, which, in addition to avoiding the degradation of carotenoids, facilitates the dispersion of these compounds in water, facilitating their application in food. Thus, the objective of this work was to optimize drying of CCE by atomization, using cashew gum (CG) or maltodextrin (M) as encapsulating agents. For this, two rotational central composite (DCCR) designs were used, in which the effect of the encapsulant concentration (2-5%) and the inlet temperature in the atomizer (130-170°C) were evaluated on the following responses: yield (R), hygroscopicity, moisture, solubility (S), color reconstitution, fluidity and retention of carotenoids (RCA). Statistical analysis of the results with a significance level of 5% showed that when CG was used only S was adequate to the obtained model, with R^2 value of 0.929. When M was used, R and RCA were adequate for the models obtained with R^2 values of 0.899 and 0.782, respectively. From the response surfaces it was observed that the process point corresponding to 150°C and 5% CG presented the best characteristic for the S response (87.48%) and the process center point of 150°C and 3.5% of M presented the highest values for the RCA response (83.47%). The obtained powders at the optimal points were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and it was observed that the microcapsules presented walls without cracks and rounded forms. However, the CG microcapsule presented larger diameters and greater amount of surface retraction points. Therefore, it was possible to encapsulate the CCE with the two encapsulating agents employed, and CG provided a smaller overall color difference after reconstitution of the powders.

Key words: Cashew peduncle fibers. Natural coloring. Atomization. Maltodextrin. Cashew gum.

5.1 Introdução

A fibra residual do processamento do pedúnculo de caju é considerada como um subproduto e têm recebido grande atenção por apresentar nutrientes e compostos bioativos remanescentes, com destaque para os carotenoides e compostos fenólicos (ASSUNÇÃO; MERCADANTE., 2003; AGOSTINI-COSTA, *et al.*, 2004; RABELO *et al.*, 2009; MICHODJEHOUN-MESTRE *et al.*, 2009; RUFINO *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2011). Assim, pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de promover o aproveitamento dessas fibras para obtenção de produtos com valor agregado, como por exemplo o extrato concentrado de caju (ECC). O processo para obtenção do ECC foi inicialmente reportado por Abreu *et al.* (2013 a e b) e contempla diversas etapas tecnológicas que resultam em um produto de intensa coloração amarela com grande potencial de uso como corante alimentício.

O ECC apresentou um perfil com 11 carotenoides, a maioria deles sendo xantofilas presentes sob uma forma esterificada. A auroxantina e a β -criptoxantina representaram cerca de 50% do total de carotenoides e juntas foram responsáveis pela coloração amarelo brilhante do extrato (ABREU *et al.*, 2013a). Partindo dessas informações e sabendo que os carotenoides são muito susceptíveis a oxidação e isomerização, o que resulta em perda de cor, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que envolvam a conservação desses pigmentos. Uma das formas mais interessantes para conservação de pigmentos é a encapsulação, que além de evitar a degradação, possibilita ainda a dispersão dos carotenoides em água, facilitando sua aplicação em alimentos (DEL-VALLE, 2004; AZEREDO, 2005; SANTOS, FÁVARO-TRINDADE & GROSSO, 2005; MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA 2003), e ampliando as possibilidades de emprego em diferentes matrizes alimentícias.

A secagem por atomização tem sido muito empregada em processos de microencapsulação devido à sua facilidade de operação e boa relação custo-benefício (MURUGESAN; ORSAT, 2012). Dentre os materiais de revestimento utilizados, a maltodextrina é o mais comum. Esse polissacarídeo é obtido a partir da hidrólise ácida do amido de milho, e apresenta alta solubilidade em água e baixa viscosidade (mesmo em altas concentrações de sólidos) formando soluções incolores (BAKOWSKA-BARCZAK; KOLODZIEJCZYK, 2011). As maltodextrinas com graus de equivalência de dextrose (DE) entre 10 e 20 são amplamente empregadas no encapsulamento de pigmentos (VALDUGA *et al.*, 2008; KOBORI, 2010; SILVA *et al.*, 2013; OTÁLORA *et al.*, 2015). Por outro lado, a goma de cajueiro, exsudado extraído da árvore *Anacardium occidentale*, tem sido apontada como um material bastante promissor em processos de encapsulação (OLIVEIRA *et al.*, 2009;

MOREIRA *et al.*, 2009; BOTREL *et al.*, 2017), devido à sua similaridade estrutural com a goma arábica, porém, com menor custo e maior disponibilidade. Além disso, muitos trabalhos indicam a goma de cajueiro como detentora de funções biológicas tais como atividade anti-inflamatória (SCHIRATO *et al.*, 2006), efeitos gastroprotetores (CARVALHO *et al.*, 2015), atividade antibacteriana (TORQUATO *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2012; QUELEMES *et al.*, 2013) e antidiarreica (ARAÚJO *et al.*, 2015). Ademais, a padronização comercial e consolidação do uso da goma de cajueiro no meio industrial poderia gerar lucros no período da entressafra do caju, tornando o Brasil exportador, no mercado internacional, de um produto altamente competitivo (ANDRADE *et al.*, 2013).

Apesar do processo de obtenção do ECC e sua composição em carotenoides já ter sido relatada, nenhum estudo envolvendo sua secagem e encapsulamento havia sido realizado. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar a secagem do ECC por atomização, utilizando goma de cajueiro (GC) ou maltodextrina (M) como agentes encapsulantes, para obtenção de dois extratos em pó (ECC–GC e ECC–M) com potencial de uso como corante alimentício. Para tanto, foram realizados dois delineamentos do tipo composto central rotacional (DCCR) , nos quais avaliou-se o efeito das variáveis independentes, concentração de encapsulante (2-5%) e temperatura de entrada no atomizador (130-170°C), sobre as seguintes respostas: higroscopicidade, umidade, solubilidade, reconstituição de cor, fluidez e retenção de carotenoides. Ademais, os pós obtidos nos pontos considerados ótimos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Matéria-prima e obtenção do extrato concentrado de caju (ECC)

A matéria-prima e o processo de obtenção do ECC, a ser utilizado nos delineamentos experimentais de secagem, estão descritos nos subitens 3.2.1 e 3.2.2 do tópico 3 desta tese de doutorado.

5.2.2 Agentes encapsulantes

A resina bruta foi obtida dos cajueiros do campo experimental de Pacajus-CE e para a sua purificação adotou-se metodologia descrita por Torquato *et al.* (2004) com algumas modificações. Inicialmente, a resina bruta foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar a 45 °C. Após secagem a resina bruta foi moída e dissolvida em água destilada (10 g/100 mL). Essa solução foi deixada sob agitação por 2 horas e filtrada a vácuo. Em seguida,

adicionou-se etanol ao filtrado, na proporção de 3:1 (etanol:filtrado), para precipitação do polissacarídeo, e deixou-se em repouso, sob refrigeração, por 12 horas, até decantação. O sobrenadante foi drenado e o precipitado centrifugado a 3600 rpm por 5 min. Em seguida, o precipitado resultante da centrifugação foi disposto em bandeja de aço inoxidável e levado a uma estufa com circulação de ar a 45 °C até total evaporação do etanol. O material seco foi moído (Moinho Analítico IKA A-11 Basic) e peneirado (300 µm) para obtenção da goma de cajueiro purificada (GC). Já a maltodextrina DE10 (M) foi obtida comercialmente (Cargill).

5.2.3 Preparação da microcápsula

Soluções dos encapsulantes a 10% (GC ou M) foram adicionadas ao extrato concentrado em carotenoides (ECC) de acordo com o delineamento experimental. As duas misturas resultantes foram homogeneizadas por 2 minutos em um homogeneizador TE 102 Turratec (Tecnal), filtradas em peneira de aço inoxidável (malha 0,3 mm), de modo a evitar o entupimento do bico do atomizador.

5.2.4 Atomizador e condições do processo

Os pós foram obtidos usando um secador do tipo spray-dryer (modelo LM MSD 1.0, Labmaq do Brasil), com câmara de secagem de aço inox, com a utilização de um bico atomizador de 0,7 mm de diâmetro. Foram mantidos constantes os parâmetros de vazão do ar comprimido (3,0 L/min), vazão de alimentação (0,4 L/h) e vazão do ar de secagem (3,5 m³/min). Após as secagens, os pós foram pesados para cálculo do rendimento, acondicionados em embalagens laminadas a vácuo utilizando uma seladora (marca Fun Kitchen, modelo BR2205) e mantidos sob temperatura ambiente (25 °C ± 2) sem a presença de luz.

5.2.5 Delineamento experimental

Para este estudo, dois delineamentos do tipo composto central rotacional (DCCR) com quatro ensaios nas condições axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, foram realizados. As variáveis independentes avaliadas foram temperatura do ar de entrada (°C) e concentração de encapsulante (%) (GC ou M). O efeito dessas variáveis foi avaliado sobre as funções de resposta: rendimento (R), umidade (U), higroscopicidade (H), solubilidade (S), teste de fluidez (TF), reconstituição da cor (RC) e retenção de carotenoides totais (RCT). Para a condução dos ensaios, as amostras foram submetidas as condições definidas na matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (TABELA 23).

Tabela 23 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com os valores reais e codificados das variáveis independentes

Ensaio	Variáveis Independentes			
	Temperatura de entrada		Encapsulante:Extrato	
	Codificado	Reais (°C)	Codificado	Reais (%)
1	-1	136	-1	2,4
2	1	164	-1	2,4
3	-1	136	1	4,6
4	1	164	1	4,6
5	-1,41	130	0	3,5
6	1,41	170	0	3,5
7	0	150	-1,41	2
8	0	150	1,41	5
9	0	150	0	3,5
10	0	150	0	3,5
11	0	150	0	3,5

Fonte: autor.

Para obtenção dos coeficientes de regressão foi realizada uma análise de variância (ANOVA) utilizando o programa *Protimiza Experimental Design* (Versão 2014). Apenas variáveis com um nível de confiança superior a 95% ($p \leq 0,05$) foram consideradas significativas e utilizadas para elaboração da superfície de resposta. A partir do ponto ótimo de cada delineamento foi realizada a validação do modelo.

5.2.6 Métodos analíticos

5.2.6.1 Rendimento (R)

O rendimento do processo de secagem do extrato foi determinado por meio da equação 3:

$$R(\%) = A/B * 100 \quad (3)$$

sendo:

A = Massa de extrato em pó obtido após secagem (g)

B = Massa de sólidos totais presente na mistura antes do processo de secagem (g)

5.2.6.2 Umidade (U)

Foi determinada com auxílio de uma balança de umidade (Marconi ID50), que consiste na perda de água por desidratação com o emprego de calor (105 °C), baseando-se na perda de massa das amostras submetidas ao aquecimento.

5.2.6.3 Higroscopicidade (H)

A higroscopicidade da amostra em pó foi determinada de acordo com Cai e Corke (2000) e Tonon *et al.* (2008) com modificações.

Amostras de cada pó (2 gramas) foram mantidas a temperatura ambiente em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio (umidade relativa de 75%; $A_w = 0,75$). As amostras foram pesadas depois de uma 1 semana, e a higroscopicidade foi expressa em gramas de umidade absorvida por 100 g de sólidos secos.

Os pós foram classificados de acordo com GEA Niro Research Laboratory (2018). Essa classificação foi criada para soro em pó, mas pode ser aplicada para outros produtos desidratados (TABELA 24):

Tabela 24 – Classificação dos pós de acordo com sua higroscopicidade

Classificação	Higroscopicidade (%)
Não higroscópico	<10
Ligeiramente higroscópico	10,1 a 15
Higroscópico	15,1 a 20
Muito higroscópico	20,1 a 25
Extremamente higroscópico	>25

Fonte: GEA Niro Research Laboratory (2018).

5.2.6.4 Solubilidade (S)

A solubilidade foi determinada segundo Cano-Chauca *et al.* (2005). Adicionou-se 1,0 g da amostra em 100,0 mL de água destilada sob agitação de 2000 rpm em agitador magnético durante 5 min. Em seguida, a solução foi colocada em tubos e centrifugada a 3000 rpm durante 5 min. Após esse período, uma alíquota de 25,0 mL do sobrenadante foi transferida para uma placa de Petri e imediatamente seca em estufa a 105 °C durante 5 horas. A solubilidade (%) foi calculada por diferença de peso.

5.2.6.5 Teste de fluidez (TF)

Foi realizado com base na medição do ângulo de repouso formado entre a superfície lateral e a base de um cone obtido quando 10 g do pó é despejado a partir de uma altura fixa (10 cm) através de um funil sobre uma superfície plana horizontal, de acordo com o método descrito por Bhandari *et al.* (1998).

5.2.6.6 Reconstituição da cor (RC)

As análises de cor foram realizadas por leitura direta da reflectância do sistema de coordenadas retangulares (L^* , luminosidade; a^* , intensidade de vermelho e verde; e b^* , intensidade de amarelo e azul), aplicando a escala de cor CIELAB com o uso de colorímetro Konica Minolta, modelo CR-410.

A perda de cor resultante a partir do processo de secagem foi calculada pela equação 4 (SANTIPANICHWONG; SUPHANTHARIKA, 2007):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (4)$$

Onde: ΔE é a diferença de cor global; ΔL é a variação da coordenada L^* ; Δa representa a variação da coordenada a^* ; e Δb é a variação da coordenada b^* .

As medições dos parâmetros de cor, nas misturas de extrato com solução encapsulante, foram realizadas antes da secagem. Após a secagem, os pós foram reconstituídos com água para a condição inicial de entrada no atomizador, de acordo com os teores de sólidos totais, e as leituras correspondentes para L^* , a^* e b^* foram novamente realizadas. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

5.2.6.7 Carotenoides totais (CT) e Retenção de Carotenoides totais (RCT)

A análise de carotenoides totais foi realizada conforme metodologia descrita no subitem 3.2.3.2 do tópico 3 desta tese de doutorado. Essa análise foi realizada na mistura de ECC com encapsulante antes e após o processo de secagem por atomização para viabilizar o cálculo do percentual de retenção dos carotenoides totais (RCT) após secagem, por meio da equação 5:

$$RCT (\%) = (CT_i / CT_f) * 100 \quad (5)$$

Onde: CT_i = carotenoides totais (mg/100g) da mistura de ECC com encapsulante antes do processo de secagem inicial; e CT_f = carotenoides totais (mg/100g) da mistura de ECC com encapsulante após o processo de secagem final.

5.2.7 Validação do modelo e caracterização das microcápsulas

A validação do modelo foi realizada repetindo-se por três vezes, em diferentes dias, o processo de secagem do ECC no ponto considerado ótimo de cada DCCR. Logo após as secagens, realizaram-se análises para obtenção das respostas que se mostraram significativas ($p < 0,05$) ao modelo encontrado. Os valores médios dessas respostas foram comparados aos valores preditos pelo modelo.

Os pós obtidos no processo de validação (ECC–GC e ECC–M) foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), da seguinte forma: as amostras foram montadas em stubs com o auxílio de fita adesiva condutora, e recobertas com ouro em metalizadora Emitech; Em seguida, foram levadas ao MEV TESCAN, modelo VEGA 3 SBU, sob uma voltagem de aceleração de 15 Kv, para visualização e obtenção das imagens. O tamanho de partículas foi determinado conforme Otálora *et al.* (2015) com modificações: a imagem obtida por MEV foi dividida em 4 partes, nas quais mediu-se o diâmetro de 25 micropartículas, totalizando 100 micropartículas.

Para verificar se realmente ocorreu encapsulamento do ECC utilizou-se a microscopia óptica da seguinte forma: as microcápsulas foram depositadas no centro de lâminas de microscopia e dispersas em glicerina. A seguir, foram depositadas lamínulas sobre as preparações e as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico Axioplan (Carl Zeiss). Foram utilizadas objetivas de 20 e 40x de aumento e as imagens foram registradas pelo programa Zen.

5.3 Resultados e discussão

Para a obtenção de pós com características desejáveis, utilizando secagem por atomização para microencapsulação, alguns parâmetros precisam ser otimizados. Para isso, é necessário o uso de metodologias estatísticas que manipulem múltiplas respostas simultaneamente com objetivo de obter o melhor equilíbrio entre as várias respostas (SILVA *et al.*, 2013). O delineamento composto central rotacional (DCCR) é uma metodologia que atende esses requisitos e tem sido empregada em muitos trabalhos envolvendo encapsulamento por atomização (KOBORI, 2010; MOREIRA *et al.*, 2010; VARDIN; YASAR, 2012; ROCHA *et al.*, 2014; AVILA, RODRÍGUEZ; VELÁSQUEZ, 2015; SANTANA *et al.*, 2018). Portanto, neste trabalho, aplicaram-se dois delineamentos experimentais do tipo composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes, temperatura de entrada e proporção de

encapsulante, sendo que em um o encapsulante usado foi goma de cajueiro (GC) e, no outro, maltodextrina (M).

Segundo Silva *et al.* (2013), quando a taxa de fluxo de alimentação é constante e varia-se a temperatura de entrada do secador por atomização, a temperatura de saída também varia. Geralmente, quanto maior a temperatura de entrada, maior a temperatura do ar de saída e do produto de saída. Dependendo da amplitude, a temperatura de saída influencia de forma significativa nas características do pó. Esse mesmo comportamento foi observado no presente estudo, entretanto, apesar da importância da temperatura de saída nas características do pó foi decidido avaliar apenas o efeito da temperatura do ar de entrada e a concentração de encapsulante.

O efeito das variáveis independentes (temperatura e concentração de encapsulante – goma de cajueiro ou maltodextrina) sobre as funções de resposta (rendimento, higroscopicidade, umidade, solubilidade, reconstituição da cor, teste de fluidez e retenção de carotenoides) foram obtidos através dos resultados experimentais apresentados na Tabela 25.

Para a avaliação estatística dos resultados obtidos foram determinados os coeficientes de regressão para todos os parâmetros e a qualidade de ajuste do modelo foi verificada através da análise de variância (ANOVA). Na Tabela 26 são mostrados os coeficientes de regressão, erro padrão, o valor T_{calc} , e os limites de confiança das variáveis que se mostraram estatisticamente significativas aos modelos: “solubilidade” (DCCR – GC), “rendimento” e “retenção de carotenoides” (DCCR - M).

A ANOVA para cada uma das respostas indicou que apenas a “solubilidade” foi adequada para o modelo GC e o “rendimento” e a “retenção de carotenoides” foram adequados para o modelo M. Portanto, aqui só será mostrada a análise de variância para essas respostas, devido à relevância dos resultados, com valores de R^2 de 0,93, 0,90 e 0,71, respectivamente. Quanto mais próximo o valor R^2 for da unidade, melhor o modelo empírico se ajusta aos dados reais. Além disso, o valor de $F_{calculado}$ foi maior do que o respectivo valor de $F_{tabelado}$ para todas as respostas; enquanto que o valor P do modelo foi inferior a 0,05 conforme a Tabela 27.

Tabela 25 – Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) com temperatura de entrada e concentração de encapsulante (GC ou M) e dados experimentais obtidos para as variáveis respostas estudadas.

E	T	CE	R_{GC}	R_M	H_{GC}	H_M	U_{GC}	U_M	S_{GC}	S_M	RC_{GC}	RC_M	F_{GC}	F_M	RCA_{GC}	RCA_M
1	136	2,4	33,71	32,90	11,46	10,79	4,16	3,19	78,72	94,85	1,92	3,31	39,69	36,87	69,28	74,04
2	164	2,4	41,73	47,93	9,17	10,88	6,43	3,11	80,52	96,22	7,04	5,63	40,63	35,24	66,68	69,86
3	136	4,6	59,24	33,15	12,72	12,98	4,51	3,81	84,39	96,77	1,70	8,62	36,25	36,48	76,32	71,61
4	164	4,6	39,40	47,52	13,65	11,43	5,39	2,71	86,86	98,20	1,18	8,78	37,23	39,69	57,95	68,89
5	130	3,5	34,97	31,02	12,14	11,46	4,42	3,13	83,94	97,30	2,70	9,11	37,82	37,83	64,22	79,29
6	170	3,5	53,60	46,92	13,65	11,51	4,04	3,03	83,71	98,92	5,15	8,69	37,95	38,53	62,72	76,82
7	150	2,0	53,22	34,55	11,57	11,24	4,46	3,03	78,72	96,75	1,06	8,57	37,22	39,35	80,84	70,77
8	150	5,0	44,68	33,56	13,37	12,97	4,49	3,00	87,48	98,01	3,17	9,36	41,88	39,23	82,89	77,21
9	150	3,5	33,32	39,82	11,84	12,88	4,73	2,76	85,85	97,11	2,83	10,64	38,99	40,47	63,50	85,10
10	150	3,5	43,24	39,65	12,83	12,14	5,17	3,48	83,12	97,02	3,88	7,35	38,73	39,12	63,77	84,15
11	150	3,5	49,23	42,50	12,91	10,73	4,95	2,92	83,93	97,51	2,57	7,30	38,04	39,21	67,46	81,15

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: E = Ensaio, T = Temperatura (°C), CE = Concentração de encapsulante (%), GC subscrito = DCCR no qual goma de cajueiro foi utilizada como encapsulante e M subscrito = DCCR no qual maltodextrina foi utilizada como encapsulante, R = Rendimento (%), H = higroscopicidade (g de umidade absorvida / 100 g de amostra seca), U = umidade (%), S = solubilidade (%), RC = reconstituição da cor (ΔE), F = fluidez ($^{\circ}$), RCA = Retenção de carotenoides (%).

Os níveis de cada variável estão descritos na Tabela 24.

Os resultados são médias de três determinações.

Tabela 26 - Coeficientes de regressão para as respostas solubilidade, rendimento e retenção de carotenoides.

	Fator	Coefficiente	Erro padrão	t-calculado	p-valor
<i>Solubilidade</i>					
DCCR - GC	Média	85,84	0,58	149,13	0,0000
	Temperatura (Q)	-1,22	0,42	-2,9	0,0229
	Goma de cajueiro (L)	3,05	0,35	8,65	0,0001
	Goma de cajueiro (Q)	-1,58	0,42	-3,77	0,0070
<i>Rendimento</i>					
DCCR - M	Média	40,77	0,96	42,55	0,0000
	Temperatura (L)	6,49	0,81	8,04	0,0000
	Maltodextrina (Q)	-2,37	0,92	-2,58	0,0324
	<i>Retenção de carotenoides</i>				
	Média	83,47	2	41,72	0,0000
	Temperatura (Q)	-3,94	1,46	-2,7	0,0271
	Maltodextrina (Q)	-5,97	1,46	-4,09	0,0035

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: DCCR - GC = Delineamento compostos central rotacional em que se utilizou goma de cajueiro como encapsulante e DCCR - M = Delineamento composto central rotacional em que se utilizou maltodextrina como encapsulante.

Fatores estatisticamente significativos a 5% ($p < 0,05$).

Tabela 27 - Análise de variância do modelo quadrático para as variáveis solubilidade, rendimento e retenção de carotenoides.

	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calculado	F-tabelado	p-valor
<i>Solubilidade</i>							
DCCR - GC	Regressão	92	3	30,7	30,9	3,07	0,0002
	Resíduos	7	7	1			
	Falta de ajuste	6,1	5	1,2	2,9	9,29	0,2727
	Erro puro	0,8	2	0,4			
	Total	99	10			R = 92,97%	
<i>Rendimento</i>							
DCCR - M	Regressão	371,3	2	185,6	35,7	3,11	0,0001
	Resíduos	41,6	8	5,2			
	Falta de ajuste	36,5	6	6,1	2,4	9,33	0,3251
	Erro puro	5,1	2	2,6			
	Total	412,9	10			R = 89,90%	
<i>Retenção de carotenoides</i>							
	Regressão	230,6	2	115,3	9,6	3,11	0,0075
	Resíduos	96,1	8	12			
	Falta de ajuste	87,6	6	14,6	3,4	9,33	0,2427
	Erro puro	8,5	2	4,3			
	Total	326,7	10			R = 70,60%	

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: DCCR - GC = Delineamento composto central rotacional em que se utilizou goma de cajueiro como encapsulante e DCCR - M = Delineamento composto central rotacional em que se utilizou maltodextrina como encapsulante.

Conseqüentemente, foi possível definir um modelo estatisticamente válido ($p < 0,05$), dado pelas equações 6, 7 e 8:

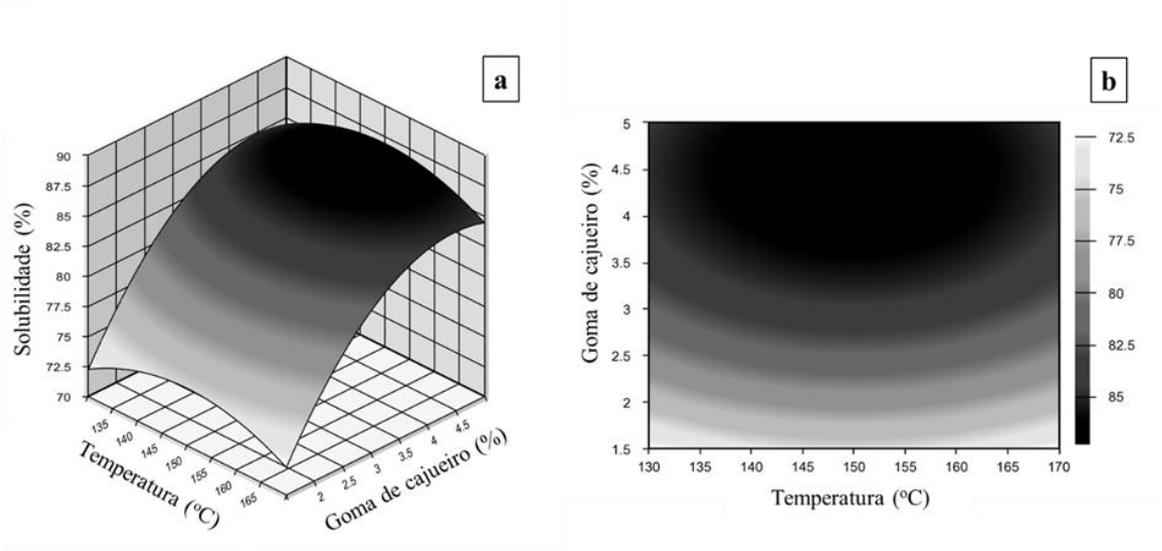
$$Y_1 = 85,84 - 1,22.X_1^2 + 3,05.X_2 - 1,58.X_2^2 \quad (6)$$

$$Y_2 = 40,77 + 6,49.X_1 - 2,37.X_2^2 \quad (7)$$

$$Y_3 = 83,47 - 3,94.X_1^2 - 5,97.X_2^2 \quad (8)$$

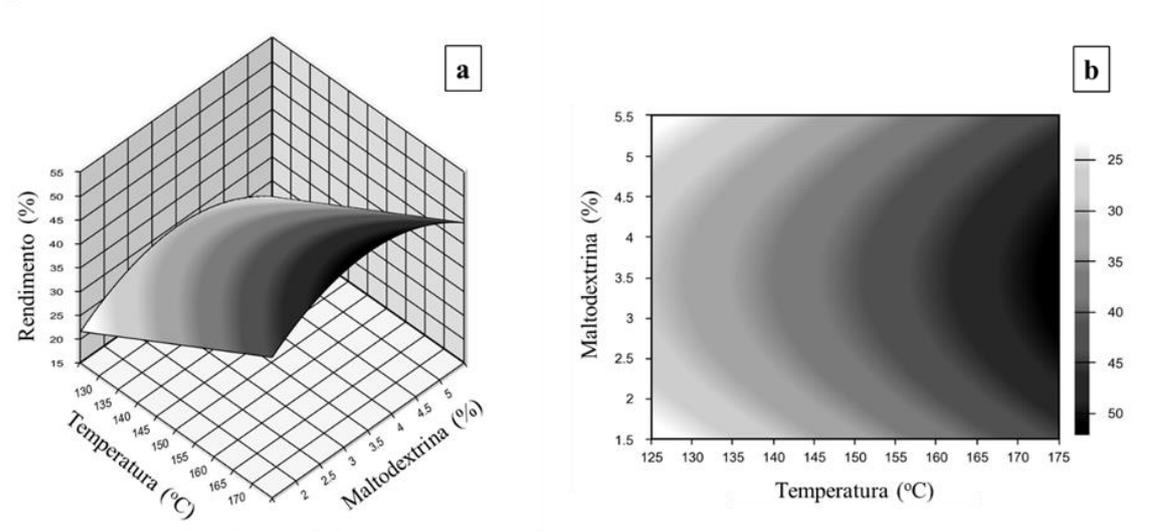
Onde: Y_1 = solubilidade, Y_2 = rendimento, Y_3 = retenção de carotenoides, X_1 = temperatura e X_2 = concentração de maltodextrina. Essas equações são graficamente representadas nas Figuras 14, 15 e 16.

Figura 14 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de goma de cajueiro e a temperatura de secagem na entrada do atomizador para a solubilidade



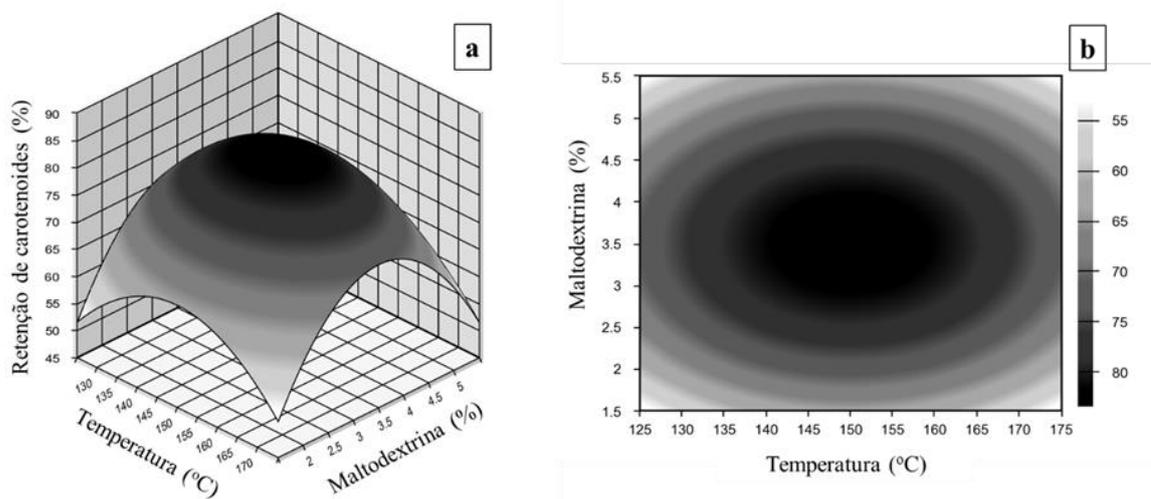
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 15 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de maltodextrina e a temperatura de secagem na entrada do atomizador para o rendimento



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 16 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de maltodextrina e temperatura de secagem na entrada do atomizador para a retenção de carotenoides



Fonte: dados da pesquisa.

5.3.1 Rendimento (R)

O rendimento do processo corresponde à recuperação do produto e é determinado, principalmente, pela eficiência de coleta. No entanto, mudanças nas condições de secagem do atomizador a fim de diminuir a aderência de partículas na superfície da câmara de secagem pode melhorar o rendimento do processo (SANTANA *et al.*, 2018). Nos processos de secagem por atomização, a perda de material se deve, principalmente, à aderência do pó na parede do equipamento e a ciclones com pouca eficiência na coleta de partículas finas (WANG; LANGRISH, 2009). A retenção do produto na parede da câmara é indesejável porque, primeiro, não é rentável, devido a necessidade de paradas mais frequentes para limpeza do secador, e, segundo, porque afeta a qualidade do produto. Os materiais depositados na parede da câmara de secagem podem ser submetidos à tratamento térmico mais intenso, o que os fazem apresentar características como umidade, cor e solubilidade bastante diferentes. Assim, se forem desalojados podem contaminar todo o produto. Além disso, esses depósitos influenciam o volume de secagem e o processo de transferência de calor entre a parede da câmara e os fluidos em movimento (SANTANA *et al.*, 2018).

Quando se utilizou GC como agente encapsulante, o rendimento não foi afetado pelas variáveis independentes. Já quando M foi utilizada verificou-se que o rendimento foi afetado pelas variáveis temperatura de entrada no atomizador (°C) e concentração de maltodextrina (%). Analisando a Figura 15, uma tendência pode ser percebida, ou seja, quando as condições de temperatura foram mais elevadas (próximas a 175 °C) e as concentrações de maltodextrina mais

próximas do ponto central (3,5%) maior foi o rendimento do processo. O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo encontrado foi 89,90%. Entretanto, os valores calculados para o rendimento de cada processo, seja no DCCR com GC seja no DCCR com M, se mostraram muito próximos, com variações entre 33,30-53,60% e 31-47,93%, respectivamente.

No trabalho realizado por Valduga *et al.* (2008), no qual o objetivo foi obter um corante natural (antocianina) na forma de pó a partir do bagaço de uva da cultivar “Isabel” (*Vitis labrusca*) observou-se, da mesma forma que no presente trabalho, que o maior rendimento foi obtido quando utilizou-se uma porcentagem de encapsulante (maltodextrina associada à goma arábica) intermediária. No entanto, Magalhães Netto (1997) afirma que a presença de carboidratos de peso molecular mais alto, como a maltodextrina, gomas e outros materiais encapsulantes, contribuem para auxiliar na estabilidade do sistema aumentando sua temperatura de transição vítrea.

Rocha *et al.* (2014) estudando a obtenção de suco de caju em pó pelo processo de spray-dryer, utilizando um delineamento composto central rotacional e maltodextrina como agente encapsulante, observaram que, apesar do modelo encontrado não ter sido significativo, a temperatura (linear) apresentou efeito positivo no rendimento, ou seja, um aumento qualquer nesse parâmetro pode acarretar um aumento no rendimento do suco de caju em pó. Os pesquisadores explicam esse resultado pela maior eficiência no processo de transferência de calor e massa que ocorre quando maiores temperaturas de secagem são utilizadas, ou seja, as taxas de secagem aumentam resultando em partículas mais secas ao colidirem com a parede interna da câmara de secagem do spray-dryer, acarretando em menor aderência do produto no interior do equipamento levando a maiores rendimentos do pó. No entanto, altas temperaturas (> 170 °C) promovem mudanças tanto na estrutura quanto na fase termoplástica dos materiais, aumentando os depósitos nas paredes do secador (LEÓN-MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

Santana *et al.* (2018) otimizaram a secagem, por atomização, de polpa de juçara (*Euterpe edulis*) usando misturas de amido modificado (AM) com concentrado proteico de soro (CPS) ou proteína isolada de soja (PIS) como agentes carreadores e encontraram rendimentos, semelhantes ao do presente trabalho, que variaram de 33,22-55,45% para AM:CPS e 49,93-78,50% para AM:PIS. Analisando a superfície de resposta obtida verificaram uma tendência entre o agente carreador e a proporção de AM:CPS ou AM:PIS, ou seja, um aumento do rendimento para maiores concentrações de agentes carreadores e proporção AM:CPS ou AM:PIS.

5.3.2 Higroscopicidade (H) e Teste de fluidez (TF)

A higroscopicidade e a fluidez podem ser tomadas como propriedades que se correlacionam porque pós mais higroscópicos, provavelmente, terão mais problemas de fluxo relacionados à água absorvida (FITZPATRICK, 2005)

Em ambos DCCRs (GC e M) verificou-se que a higroscopicidade não foi afetada pelas variáveis temperatura de entrada no atomizador (°C) e concentração de maltodextrina (%). Segundo a classificação de GEA Niro Research Laboratory (2018), todos os pós produzidos, em ambos delineamentos, se mostraram ligeiramente higroscópicos (higroscopicidades entre 10,1 e 15%), resultado satisfatório, e por isso considerado um fator não limitante à qualidade do produto.

Resultado diferente foi encontrado por Ferrari, Ribeiro e Aguirre (2012), que estudaram a secagem por atomização de polpa de amora-preta usando maltodextrina como agente carreador e observaram valores de higroscopicidade variando entre 18,77 e 29,51%. Os valores de higroscopicidade foram significativamente ($p \leq 0,05$) maiores quando os pós foram produzidos a 180 °C. Tonon *et al.* (2008) afirmaram que temperaturas de secagem mais altas resultam em pós com umidades mais baixas e mais higroscópicos, e relaciona esse fato ao maior gradiente de concentração de água existente entre o produto e o ambiente. Além disso, Ferrari, Ribeiro e Aguirre (2012) concluíram que o aumento da concentração de agente encapsulante (maltodextrina) resultou na formação de partículas com menor umidade e higroscopicidade. Esse resultado foi explicado pelo fato de a maltodextrina ser um material com baixa higroscopicidade, o que reduz a capacidade de adsorção de água dos produtos desidratados por spray drying. Dessa mesma forma, Oliveira *et al.* (2009) estudando a adição de goma de cajueiro a carreadores à base de maltodextrina para secagem por atomização de suco de caju encontraram como resultado que maiores concentrações dos auxiliares de secagem (maltodextrina e goma de cajueiro) diminuíram a higroscopicidade.

Já Moreira *et al.* (2009), avaliando o extrato do bagaço de acerola submetido à secagem por spray-dryer usando maltodextrina e goma de cajueiro como auxiliares de secagem observaram que o aumento da temperatura de entrada (170-200 °C) resultou na diminuição da higroscopicidade do pó e aumento da fluidez (diminuição do ângulo de repouso).

Com relação a fluidez, todos os onze ensaios dos dois planejamentos produziram pós sem problemas significativos de fluxo, de acordo com a classificação apresentada por Bhandari *et al.* (1998), que propuseram que pós com ângulos de repouso inferiores a 45° são fluxo-livre e assim a fluidez foi considerada um fator não limitante à qualidade do produto.

5.3.3 Umidade (U)

O teor de umidade é uma propriedade importante para pós e está relacionada à eficiência de secagem. Além disso, menores valores de umidade limitam a capacidade de a água atuar como um plastificante, o que reduz a temperatura de transição vítrea (SANTANA *et al.*, 2018). O teor de umidade dos pós produzidos por secagem por pulverização é largamente influenciado pela umidade e temperatura do processo de secagem, mas também pode ser influenciado pela afinidade do material de parede e a difusividade da água através da matriz polimérica (BOTREL *et al.*, 2017).

O conteúdo de umidade nos pós obtidos com o DCCR que utilizou GC e o DCCR que utilizou M como encapsulante variou entre 4,0-6,4% e 2,7-3,8%, respectivamente. Dessa forma, os teores de umidade encontrados estão de acordo com o estabelecido pela legislação para produtos de frutas secos ou desidratados, que devem apresentar o máximo de 25% de umidade (BRASIL, 2005). O teor de umidade desempenha um papel significativo no estabelecimento do prazo de validade de pós. Teores de umidade elevados podem levar ao crescimento microbiano e aglomeração, o que afeta a estabilidade física e química e a aceitabilidade total (GOYAL *et al.*, 2015).

Por outro lado, nenhuma das variáveis independentes estudadas (temperatura de entrada no atomizador e concentração de encapsulante) apresentou significância ao nível de 5% em relação à resposta umidade, indicando que não é possível obter um modelo válido para essa variável.

Diferente do presente estudo Moreira *et al.* (2009), avaliando o extrato do bagaço de acerola submetido à secagem por spray-dryer usando maltodextrina e goma de cajueiro como auxiliares de secagem, observaram que a umidade dos pós foram significativamente reduzidas pelo aumento da temperatura de entrada no secador (170-200 °C), da proporção do auxiliar de secagem/acerola sólida (2:1-5:1) e do percentual de substituição de maltodextrina por goma de cajueiro (0-100%). Da mesma forma, Ferrari, Ribeiro e Aguirre (2012), que estudaram a secagem por atomização de polpa de amora-preta usando maltodextrina como agente carreador, observaram que o aumento da temperatura do ar de secagem (160-180 °C) e da concentração de maltodextrina (5-25%) resultou na diminuição da umidade das amostras.

5.3.4 Solubilidade (S)

Quando se utilizou GC como agente encapsulante verificou-se que a solubilidade foi afetada pelas variáveis temperatura de entrada no atomizador (°C) e concentração de maltodextrina (%). Analisando a superfície de resposta (FIGURA 14) observa-se que

temperaturas na faixa de 135 a 165°C e concentrações de goma de cajueiro entre 3,5 e 5% são melhores para obter pós mais solúveis. O coeficiente de determinação para o modelo encontrado foi altamente satisfatório 92,97%. Por outro lado, quando se utilizou M como agente encapsulante a solubilidade não foi afetada por ambas variáveis. Entretanto, todos os ensaios, de ambos DCCRs, produziram pós com alta solubilidade em água (acima de 78%).

Os valores obtidos no presente estudo foram similares ao encontrado por Santana *et al.* (2018), que estudaram a atomização de polpa de juçara (*Euterpe edulis*) usando misturas de amido modificado com concentrado protéico de soro de leite ou amido modificado com isolado protéico de soja como agentes carreadores. Os valores de solubilidade variaram entre 77,99-92,86% e 78,87-83,78%, respectivamente. Os resultados obtidos por Alves (2014), que estudaram a obtenção de extrato de carotenoides de polpa de pequi encapsulado pelo método de secagem por atomização, também são similares (variação entre 93,14 e 96,52%). Já os valores obtidos por Vardin & Yasar (2012), em seu estudo sobre a atomização de suco de romã, foram bem inferiores ao presente estudo (variação entre 21,4 e 45,2%).

5.3.5 Reconstituição da cor (RC)

Verificou-se que em ambos os delineamentos a reconstituição de cor não foi afetada pelas variáveis temperatura de entrada no atomizador (°C) e proporção de encapsulante (%), ou seja, para qualquer temperatura de entrada no atomizador e concentração de encapsulante, dentro das faixas estudadas e para cada delineamento individualmente, não se observa nenhuma alteração no padrão de valores de ΔE obtidos.

A M produziu pós com maiores valores de ΔE em comparação a GC (TABELA 25). Apenas dois dos pós produzidos com GC tiveram ΔE acima de 5, enquanto que dez dos onze pós produzidos com M apresentaram ΔE acima de 5. Isso demonstra que a GC promoveu uma melhor retenção da cor após processo de secagem, sendo esse um ponto positivo ao uso de GC como agente encapsulante. Essa discussão baseia-se nas faixas definidas por Mokrzycki e Tatol (2011), onde:

- $0 < \Delta E < 1$ - não são observadas diferenças entre as amostras;
- $1 < \Delta E < 2$ - somente pessoas treinadas observam as diferenças;
- $2 < \Delta E < 3,5$ - pessoas sem treinamento também observam as diferenças;
- $3,5 < \Delta E < 5,0$ - as diferenças são claramente observadas e
- $\Delta E > 5$ - as pessoas observam duas cores entre as amostras.

Portanto, baixos valores de ΔE são altamente desejáveis para a diferença global de cor, pois indicam que o pigmento em pó mantém a cor do extrato do qual se originou após a reconstituição.

Valores aproximados aos encontrados no presente estudo foram encontrados por Silva *et al.* (2013), que estudaram a microencapsulação por spray-drying de extratos de casca de jabuticaba usando uma solução de 30% de maltodextrina, uma mistura de 25% de goma arábica com 5% de maltodextrina e uma mistura de 25% de CapsulTM com 5% de maltodextrina como encapsulantes, encontrando valores de ΔE entre 3,80-4,60, 12,15-14,28 e 9,44-12,99, respectivamente. Já Rocha *et al.* (2014) estudando a obtenção de suco de caju atomizado através do controle das condições de secagem (vazão de ar quente e temperatura de entrada do ar), utilizando maltodextrina como agente encapsulante, obtiveram como resultado grande diferença de cor global entre o pó de suco de caju e o suco in natura ($\Delta E = 22,58$).

5.3.6 Retenção de carotenoides totais (RCT)

Quando se utilizou GC como agente encapsulante a retenção de carotenoides não foi afetada pelas variáveis temperatura de entrada no atomizador (°C) e concentração de encapsulante (%). Já quando se utilizou M verificou-se que a retenção de carotenoides foi afetada por ambas variáveis. Analisando a superfície de resposta obtida (FIGURA 16) uma tendência pode ser percebida, ou seja, quando as condições de temperatura de entrada e concentração de maltodextrina estiveram mais próximas do ponto central (150°C e 3,5%, respectivamente) melhor foi a retenção de carotenoides e portanto esse foi considerado o ponto ótimo do processo, pois essa é uma das respostas mais importantes uma vez que são os carotenoides os compostos responsáveis pela cor do ECC.

Kobori (2010) estudou a microencapsulação de polpa de acerola por atomização utilizando maltodextrina 20 DE, goma arábica ou amido modificado (Capsul®) como encapsulante. Para a maltodextrina, a superfície de resposta mostrou que quanto maior a temperatura, menor a retenção de β -caroteno, coerente com o efeito esperado da temperatura na degradação dos carotenoides, sendo as condições próximas ao ponto central (temperatura de 175 °C e 20% de encapsulante) melhores para a retenção de β -caroteno. Já para a goma arábica, polissacarídeo estruturalmente parecido com a goma de cajueiro, observou-se que a temperatura não teve muito efeito na retenção de β -caroteno, assim como ocorreu no presente estudo. Com relação a concentração de encapsulante, o intervalo ótimo foi entre 10 e 20% (região próxima ao ponto central).

De acordo com Quek *et al.* (2007), quando temperaturas mais baixas são empregadas para secagem e obtenção de pós, esses apresentam tendência à aglomeração, em razão do maior teor de umidade, principalmente se as amostras forem ricas em açúcar. Essa aglomeração entre as partículas gera menor superfície de contato, diminuindo a exposição dos pós ao oxigênio e protegendo os pigmentos contra degradação. Esses mesmos autores verificaram em seu estudo, que envolvia suco de melancia, uma redução de 30% no teor de licopeno após secagem por spray-drying, ao aumentar a temperatura de secagem de 145 para 175 °C.

No trabalho realizado por Ferrari, Ribeiro e Aguirre (2012), onde foi realizada secagem por atomização de polpa de amora-preta usando maltodextrina como agente carreador, observou-se que o aumento da temperatura do ar de secagem (160-180°C) e da concentração de maltodextrina (5-25%) levou à diminuição da concentração de antocianinas presente no suco de amora-preta em pó. A retenção de antocianinas foi cerca de 80% apenas para as amostras produzidas com 5% de maltodextrina e temperatura de secagem de 160 °C, mostrando o efeito sinérgico dessas duas variáveis na manutenção do teor de antocianinas da amora-preta. Já nos ensaios que utilizaram 15 e 25% de maltodextrina, e temperatura de 180 °C, constatou-se uma retenção em torno de apenas 69% dos pigmentos da amora-preta após secagem, uma vez que antocianinas são pigmentos termossensíveis.

5.3.7 Validação do modelo e caracterização das microcápsulas

Os resultados preditos pelo modelo e os experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo, para os dois DCCRs, são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 – Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo do processo

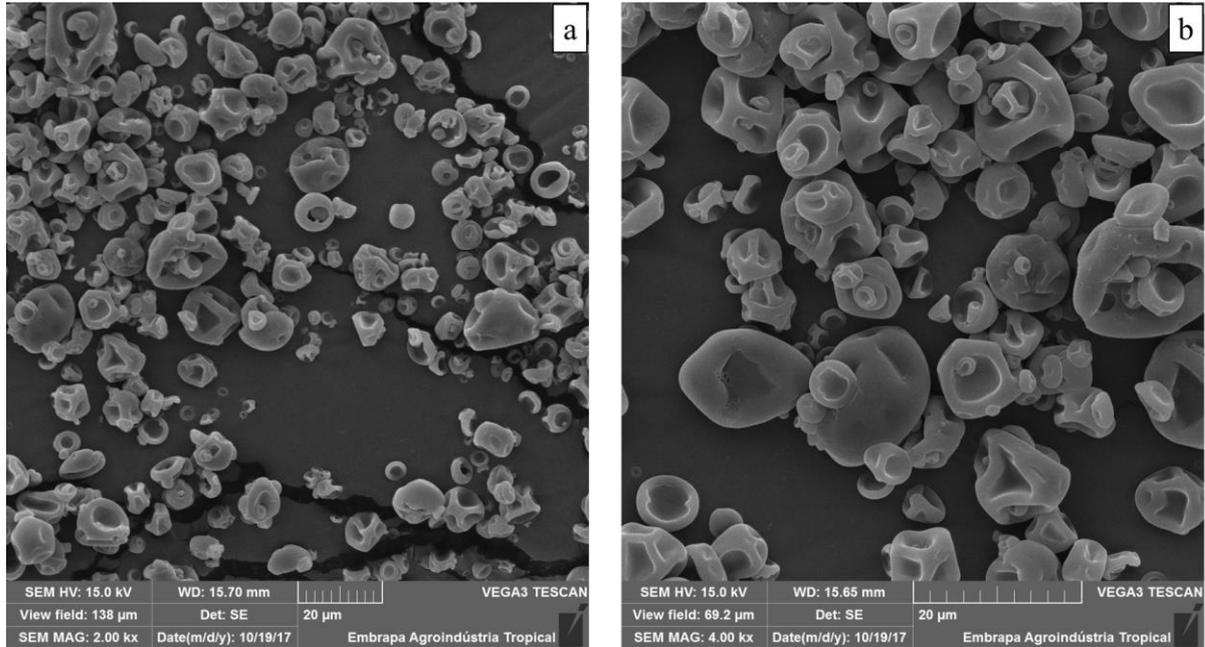
	Variável resposta	Resultado predito *	Resultado experimental **
DCCR - GC	Solubilidade (Y ₁)	86,99%	84,75%
DCCR - M	Rendimento (Y ₂)	40,77%	45,92%
DCCR - M	Retenção de carotenoides (Y ₃)	83,47%	66,64%

Fonte: dados da pesquisa. Legenda: DCCR - GC = Delineamento composto central rotacional em que se utilizou goma de cajueiro como encapsulante DCCR - M = Delineamento composto central rotacional em que se utilizou maltodextrina como encapsulante. * Modelos reparametrizados, constituídos apenas dos parâmetros estatisticamente significativos. ** Valores são médias de triplicatas.

Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos, pode-se considerar que os resultados obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios.

A caracterização morfológica do ECC microencapsulado com goma de cajueiro (ECC – GC) ou maltodextrina (ECC – M), obtidos nos pontos considerados ótimos de cada DCCR, foi realizada por meio da análise das imagens geradas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas nas Figuras 17, 18 e 19.

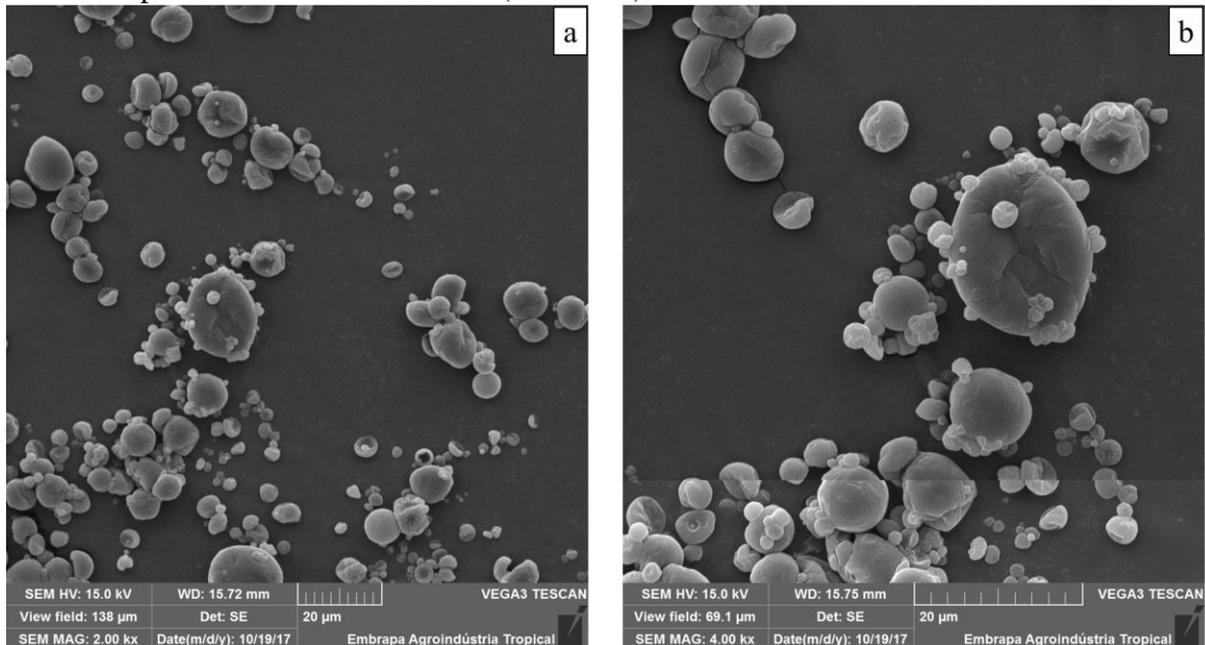
Figura 17 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato em pó microencapsulado com goma de cajueiro (ECC – GC)



Fonte: autor.

Legenda: (a) = Magnificação de 2000X e (b) = Magnificação de 4000X.

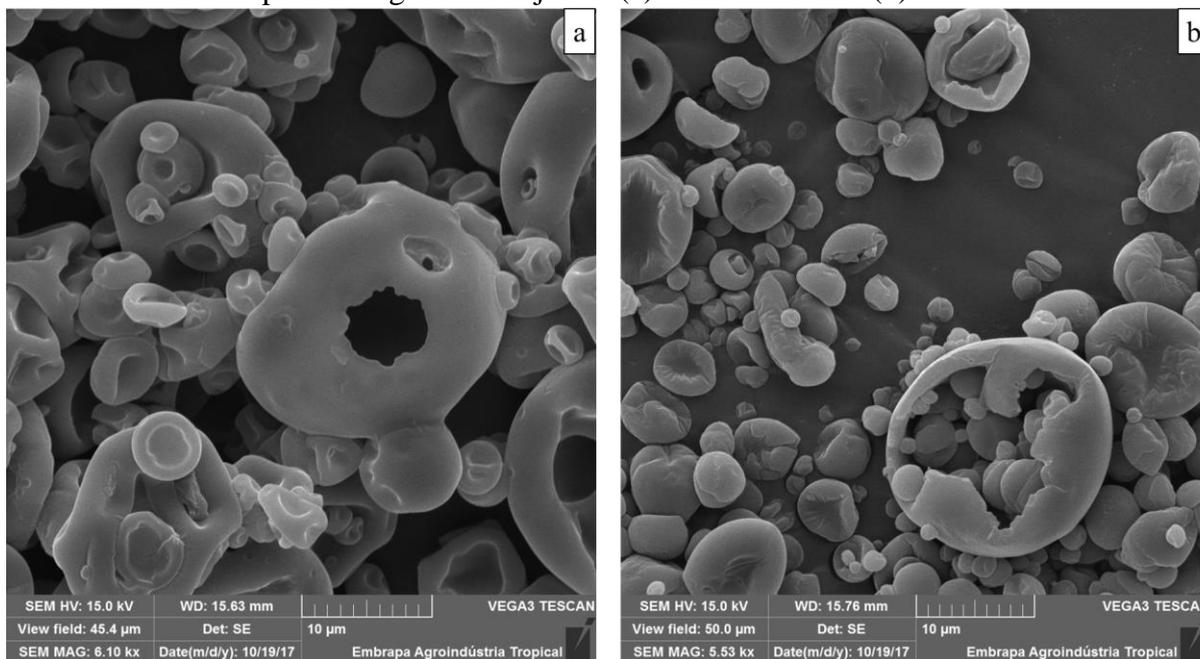
Figura 18 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato em pó microencapsulado com maltodextrina (ECC – M)



Fonte: autor.

Legenda: (a) = Magnificação de 2000X e (b) = Magnificação de 4000X.

Figura 19 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando o interior das microcápsulas de goma de cajueiro (a) e maltodextrina (b)



Fonte: autor.

Legenda: (a) = Magnificação de 6100X e (b) = Magnificação de 5530X.

As micropartículas apresentaram paredes contínuas, arredondadas (típico do processo de secagem por atomização), sem fissuras, rachaduras ou rompimentos e formato esférico. Fatores esses considerados fundamentais para garantir uma menor permeabilidade a gases, maior proteção e retenção do recheio, que são características desejáveis a estabilidade do material (SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005; OSORIO *et al.*, 2010). A maioria das microcápsulas apresentam em diversos pontos uma retração da superfície (presença de concavidades ou achatamentos), entretanto esse efeito foi mais pronunciado nas microcápsulas de goma de cajueiro. Essas retrações são características das microcápsulas produzidas por atomização e se dão devido a rápida evaporação da água e consequente contração das partículas durante o processo de secagem ou ao vácuo aplicado durante a análise de MEV (SILVA *et al.*, 2013; OSORIO *et al.*, 2010), além, é claro, das características individuais de cada encapsulante. De acordo com Tonon (2009), partículas com muitas depressões na superfície podem ter problemas em suas propriedades de fluxo e por possuírem áreas de contato maiores do que aquelas com superfícies lisas pode tornar-se mais suscetíveis a reações de degradação, como a oxidação. Esse conceito é fundamental para o microencapsulamento de ingredientes alimentares porque pode melhorar a eficácia dos aditivos alimentares (GOUIN, 2004). Com base nessas informações as microcápsulas de maltodextrina

parecem proteger melhor os carotenoides presentes, porém estudos de estabilidade, avaliando o teor de carotenoides totais, não foram realizados.

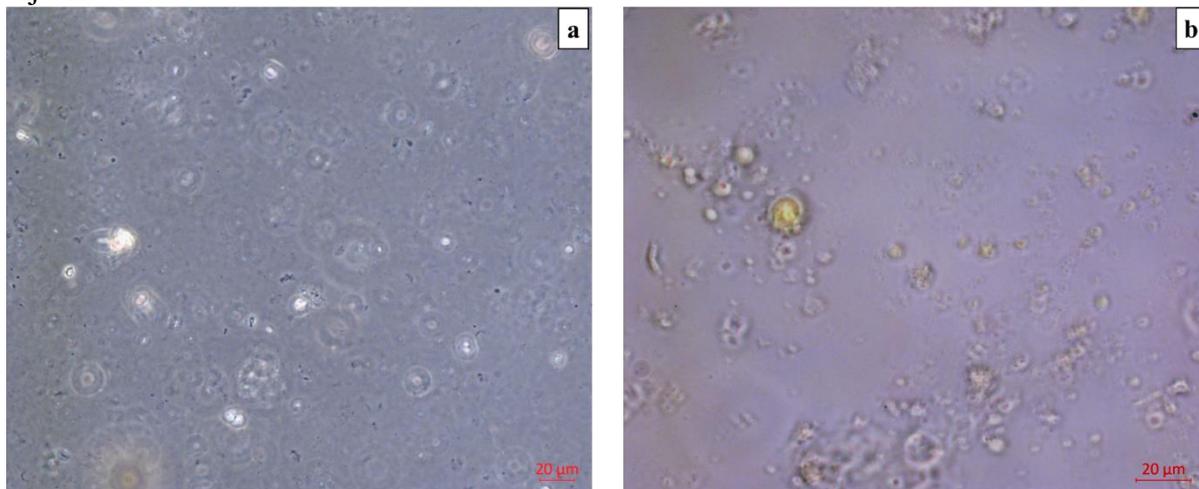
A aderência de pequenas partículas à superfície de partículas maiores foi observada, assim como uma grande heterogeneidade no tamanho das partículas. O diâmetro médio do ECC – GC foi 6,16 μm , variando entre 1,82 e 16,83 μm . Já o ECC – M teve diâmetro médio de 4,45 μm , variando entre 0,89 e 15,87 μm . No entanto, presença de partículas maiores, assim como a deposição de partículas umas sobre as outras pode ser atribuída a processos de aglomeração, nos quais a formação de ligações irreversíveis leva à formação de partículas maiores (KOBORI, 2010). Esses diâmetros estão dentro da faixa de tamanhos para partículas produzidas por spray-drying, que variam de 5 a 150 μm (CHANG *et al.*, 1988; SOUTHWEST RESEARCH INSTITUTE, 1991; ONWULATA *et al.*, 1994).

Santos, Fávaro-Trindade e Grosso (2005) estudaram a obtenção de microcápsulas de oleoresina por atomização, utilizando goma arábica como material encapsulante, e através das imagens obtidas por MEV verificaram, assim como no presente estudo, que as microcápsulas apresentavam paredes contínuas, arredondas, sem fissuras, rachaduras ou rompimentos. A goma de cajueiro é estruturalmente similar a goma arábica e isso pode explicar a similaridade entre as micropartículas obtidas nos dois trabalhos. Observou-se, também, grande variação do tamanho das partículas, sendo essa variação de 2 a 50 μm , variação maior comparada a do presente trabalho. Variações entre 6 e 51 μm , nos tamanhos de microcápsulas de maltodextrina, também foram observadas por Otálora *et al.* (2015), que estudaram a microencapsulação de betalaínas, obtidas de frutos de cactos (*Opuntia ficus-indica*), por atomização.

As microcápsulas foram submetidas ao corte com um bisturi para avaliar a parede e o interior das cápsulas. Na Figura 19 podemos observar que as microcápsulas não apresentaram rachaduras ou porosidade e que cápsulas maiores englobam cápsulas menores.

A formação das microcápsulas após o processo de secagem por atomização foi confirmada por comparação de microfotografias entre cápsulas formadas apenas pelos agentes de encapsulação (goma de cajueiro ou maltodextrina em solução a 10%), ou seja, sem preenchimento, e cápsulas formadas pelo encapsulante adicionado do ECC, ou seja, com preenchimento. Nessas microfotografias (FIGURAS 20 e 21) é possível visualizar o ECC, de coloração amarela, no interior das microcápsulas e não impregnado em gotículas de tamanhos diversos distribuídas uniformemente ao longo de toda a parede.

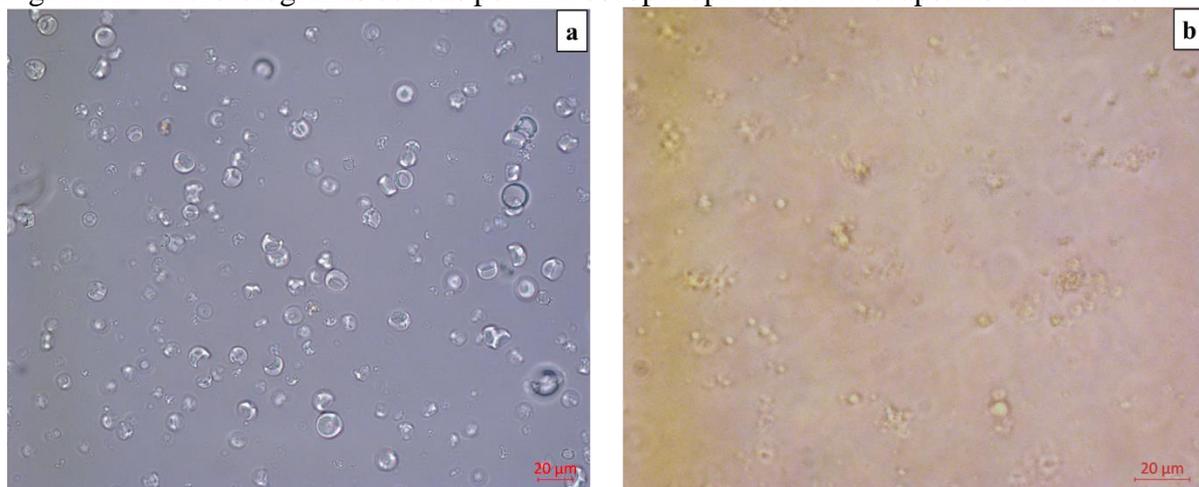
Figura 20 - Microfotografias obtidas por microscopia óptica de microcápsulas de goma de cajueiro



Fonte: autor.

Legenda: (a) = Cápsulas de goma de cajueiro sem preenchimento e (b) = Cápsulas de goma de cajueiro com preenchimento.

Figura 21 - Microfotografias obtidas por microscopia óptica de microcápsulas de maltodextrina



Fonte: autor.

Legenda: (a) = Cápsulas de maltodextrina sem preenchimento e (b) = Cápsulas de maltodextrina com preenchimento.

5.4 Conclusão

Foi possível encapsular e otimizar o processo de encapsulação utilizando GC e M com condições ótimas de processo em 150 °C e 5% de goma de cajueiro e em 150 °C e 3,5% de maltodextrina. Utilizando esses parâmetros, as microcápsulas dos pós obtidos apresentaram paredes contínuas, arredondadas, sem fissuras e rachaduras. Entretanto, a microcápsula de GC apresentou diâmetros maiores e maior quantidade de pontos de retração da superfície.

Referências

- ABREU, F. A. P. DE; DORNIER, M; DIONISIO, A. P; CARAIL, M; CARIS-VEYRAT, C; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 25-31, 2013a.
- ABREU, F. A. P.; DORNIER, M.; PALLET, D.; REYNES, M.; VAILLANT, F.; FURLANI, F. C. T. **Processo de concentração e purificação de extrato obtido a partir de resíduos de pseudofruto de caju e produto de elevado teor de carotenoides**. Pedido Internacional no PCT/BR2013/000130. Instituição promotora/financiadora: Embrapa/CIRAD, 2013b.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A.; GARRUTI, D. S.; PADILHA, V. A.; LIMA, J. B.; AGUIAR, M. J.; PAIVA, J. R. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1075-1080, 2004.
- ALVES, I. A. **Obtenção de extrato de carotenoides de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) encapsulado pelo método de secagem por atomização**. 2014. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- ANDRADE, K. C. S.; DE CARVALHO, C. W. P.; TAKEITI, C. Y.; DE AZEREDO, H. M. C.; CORRÊA, J. da S.; CALDAS, C. M. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): Avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros**, [s.l.], v. 23, n. 5, p. 667-671, 2013.
- ARAÚJO, T. S. L.; COSTA, D. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K. M.; DE ARAÚJO, S.; OLIVEIRA, A. P.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 174, p. 299-307, 2015.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 81, p. 495-502, 2003.
- ÁVILA, E. L.; RODRÍGUEZ, M. C.; VELÁSQUEZ, H. J. C. Influence of maltodextrin and spray drying process conditions on sugarcane juice powder quality. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 7509-7520, 2015.
- AZEREDO, H. M. C. de. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- BAKOWSKA-BARCZAK, A. M.; KOŁODZIEJCZYK, P. P. Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 1301-1309, 2011.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; D'ARCY, B. R.; RINTOUL, G. B. Co-crystallization of honey with sucrose. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 31, n. 2, P. 138-142, 1998.

BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.; FERNANDES, R. V. DE B.; ANTONIASSI, R.; DE FARIA-MACHADO, A. F.; FEITOSA, J. P. DE A.; DE PAULA, R. C. M. Application of cashew tree gum on the production and stability of spray-dried fish oil. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 221, p. 1522–1529, 2017.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 272 – ANVISA/MS, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o “**Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis**”. Diário Oficial da União, Brasília: ANVS, 2005.

CAI, Y.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 2000.

CAMPOS, D. A.; RIBEIRO, A. C.; COSTA, E. M.; FERNANDES, J. C.; TAVARIA, F. K.; ARARUNA, F. B.; EIRAS, C.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. M. Study of Antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 90, p. 270–274, 2012.

CARVALHO, N. S.; SILVA, M. M.; SILVA, R. O.; NICOLAU, L. A. D.; SOUSA, F. B. M.; DAMASCENO, S. R. B.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A. MEDEIROS, J. V. R. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, [s.l.], v. 76, p. 143-151, 2015.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s.l.], v. 6, p. 420-428, 2005.

CHANG, Y. I.; SCIRE, J.; JACOBS, B. **Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated Orange oil**. In: Flavor encapsulation. Nova Iorque, Fritzsche Dodge & Olcott, v. 370, 1988.

DEL-VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 39, p. 1033-1046, 2004.

FERRARI, C. C.; RIBEIRO, C. P.; AGUIRRE, J. M. Secagem por atomização de polpa de amora-preta usando maltodextrina como agente carreador. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 157-165, 2012.

FITZPATRICK, J. J. (2005). Food powder flowability. In: **Encapsulated and Powdered Foods** (edited by C. Onwulata). Pp 247-260. Boca Raton, USA: Taylor & Francis.

GEA Niro Research Laboratory. GEA Niro analytical methods. Disponível em: <<http://www.niro.com/methods>>. Acesso em: 23 de maio de 2018.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends Food Science Technology**, [s.l.], v. 15, p. 330–347, 2004.

- GOYAL, A.; SHARMA, V.; SIHAG, M. K.; TOMAR, S. K.; ARORA, S.; SABIKHI, L.; SINGH, A. K. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated flaxseed oil powder: a functional ingredient for omega-3 fortification. **Powder Technology**, [s.l.], v. 286, p. 527-537, 2015.
- KOBORI, C. N. **Composição e estabilidade de carotenoides em alimentos**. 2010. 217 f. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- LEÓN-MARTÍNEZ, F. M.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J.; MEDINA-TORRES, L. L.; MÉNDEZ-LAGUNAS, L. L.; BERNAD-BERNAD, M. J. Effects of drying conditions on the rheological properties of reconstituted mucilage solutions (*Opuntia ficus-indica*). **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 84, p. 439-445, 2011.
- MAGALHÃES NETTO, F. Influência da atividade de água na temperatura vítrea. In: JARDIM, D. C. P., GERMER, S. P. M. **Atividade de água em alimentos**. Campinas: ITAL, p. 4-14, 1997.
- MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclo dextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (Supl), p. 102-105, 2003.
- MICHODJEHOUN-MESTRE, L.; SOUQUET, J.-M.; FULCRAND, H.; BOUCHUT, C.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.-M. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 112, n. 4, p. 851-857, 2009.
- MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. **Color difference Delta E: a survey**. **Machine Graphics and Vision**, Warszawa, v. 20, n. 4, p. 383-411, 2011. Disponível em: http://www.researchgate.net/publication/236023905_Color_difference_Delta_E_-_A_survey. Acesso em: 15/12/17.
- MOREIRA, G. E. G.; COSTA, M. G. M.; DE SOUSA, A. C. R.; DE BRITO, E. S.; DE MEDEIROS, M. DE F. D.; DE AZEREDO, H. M. C. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. **LWT – Food Science and Technology**, [s.l.], v. 42, p. 641-645, 2009.
- MURUGESAN, R.; ORSAT, V. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients – A review. **Food and Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 5, n1, p. 3-14, 2012.
- OLIVEIRA, M. A. DE O.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; DE SOUZA, A. C. R.; DE BRITO, E. S.; DE AZEREDO, H. M. C. Addition of cashew tree gum to maltodextrin-based carriers for spray drying of cashew apple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 44, p. 641-645, 2009.
- ONWULATA, C.; SWITH, P. W.; CRAIG, J. C.; HOLSINGER, V. H. Physical properties of encapsulated spray-dried milk fat. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 316-320, 1994.
- OSORIO, C.; ACEVEDO, B.; HILLEBRAND, S.; CARRIAZO, J.; WINTERHALTER, P.; MORALES, A. L. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 11, p. 6977-6985, 2010.

OTÁLORA, M. C.; CARRIAZO, J. G.; ITURRIAGA, L.; NAZARENO, M. A.; OSORIO, C. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 187, p. 174-181, 2015.

QUEIROZ, C.; SILVA, A. J. R.; LOPEZ, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and Browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 125, n. 1, p. 128-132, 2011.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 386-392, 2007.

QUELEMES, P. V.; ARARUNA, F. B.; DE FARIA, B. E. F.; KUCKELHAUS, S. A. S.; DA SILVA, D. A.; MENDONÇA, R. Z.; EIRAS, C.; SOARES, M. J. dos S.; LEITE, J. R. S. A. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 4969-4981, 2013.

RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L. & RODRIGUEZ, S. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 23, p. 5574-5580, 2009.

ROCHA, É. M. F. F.; SOUSA, S. L.; DA COSTA, J. DE P.; RODRIGUES, S.; AFONSO, M. R. A.; DA COSTA, J. M. C. Obtenção de suco de caju atomizado através do controle das condições de secagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p. 646-651, 2014.

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., PEREZ-JIMENEZ, E.S.J., SAURA-CALIXTO, F., MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 121, p. 996-1002, 2010.

SANTANA, A. A.; PAIXÃO, L. C.; DE OLIVEIRA, R. A.; TELIS, V. R. N. Influence of process conditions on the physicochemical properties of jussara pulp (*Euterpe edulis*) powder produced by spray drying. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s.l.], v. 21, e2015085, 2018.

SANTIPANICHWONG, R.; SUPHANTHARIKA, M. Carotenoids as colorants in reduced fat mayonnaise containing spent brewer's yeast β -glucan as a fat replacer. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 21, p. 565-574, 2007.

SANTOS, A. B. DOS; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F.; Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 322-326, 2005.

SCHIRATO, G. V.; MPNTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. de O.; LIMA FILHO, J. L. de; LEÃO, A. M. dos A. C.; PORTO, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 149-154, 2006.

SILVA, P. I.; STRINGHETA, P. C.; TEÓFILO, R. F.; DE OLIVEIRA, I. R. N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 117, p. 538-544, 2013.

SOUTHWEST RESEARCH INSTITUTE. **A capability statement for microencapsulation**. San Antonio, 1991, 31p.

TONON, R. V.; BRABET, C.; RUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae*, Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 88, p. 411-418, 2008.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 20, p. 505-507, 2004.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; DO PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva “Isabel” (*Vitis labrusca*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008

VARDIN, H.; YASAR, M. Optimisation of pomegranate (*Punica Granatum* L.) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrin content. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 167-176, 2012.

WANG, S.; LANGRISH, T. A review of process simulations and the use of additives in spray drying. **Food Research International**, [s.l.], v. 42, n. 1, p. 3-25, 2009.

6 EXTRATO CONCENTRADO DE CAJU: UMA ABORDAGEM BIOLÓGICA DESSE POTENCIAL ADITIVO ALIMENTAR

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Food Research International (ISSN 0963-9969).

RESUMO

O extrato concentrado de caju (ECC) é obtido a partir das fibras residuais do processamento do pedúnculo e apresenta elevada concentração de carotenoides, exibindo grande potencial para uso como aditivo alimentar. Porém, para sua aplicação alimentar, há a necessidade de avaliar sua toxicidade, uma vez que nele são encontrados ácidos anacárdicos, que embora sejam relacionados a efeitos biológicos benéficos, também têm sido relatados como tóxicos. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi caracterizar o ECC quanto a cor e teores de compostos bioativos, avaliar a sua toxicidade e atividades antiproliferativa e antimicrobiana. Para isso, empregou-se um processo, que contempla tratamento enzimático, prensagens sequenciais, microfiltração e pasteurização, para obtenção do ECC a partir das fibras residuais do pedúnculo. Uma vez obtido, o ECC foi liofilizado (ECC-L), sem adição de encapsulantes, e atomizado, utilizando-se goma de cajueiro (ECC-GC) ou maltodextrina (ECC-M) como agentes encapsulantes, sendo então caracterizados e utilizados nos ensaios biológicos. A caracterização foi feita por meio dos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), teores de carotenoides totais (CT) (espectrofotometria) e ácidos anacárdicos (AA) (HPLC-DAD). Os ensaios biológicos contemplaram teste de toxicidade aguda *in vivo*, realizado pelo bioensaio frente ao modelo zebrafish (*Danio rerio*); atividade antiproliferativa contra sete células tumorais humanas [U251 (glioma), MCF7 (mama), NCI/ADR-RES (carcinoma do ovário multirresistente), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário) e HT29 (cólon)] e uma célula não tumoral [HaCaT (queratinócitos humanos)]; e atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar, contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 51812), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Por fim, microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada para confirmação dos danos celulares causados às bactérias. Os resultados mostram que o ECC-L apresentou os maiores teores de compostos bioativos (CT – 96,28 mg/mL e AA – 41,74 mg/mL) e uma cor mais escura. Os teores de compostos bioativos entre o ECC-GC e o ECC-M são semelhantes ($p < 0,05$), enquanto diferenças estatísticas são observadas nos valores das coordenadas L^* , a^*

e b *. O ECC não se mostrou tóxico até 96 horas de análise e não apresentou atividade antiproliferativa significativa ($IC_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) frente as linhagens tumorais e não tumorais testadas. Contudo, exibiu atividade antimicrobiana com halos de inibição de 13 e 11 mm (100 e 50 mg/mL, respectivamente) contra *L. monocytogenes*. As imagens obtidas por MET mostram os danos causados à parede celular dessa bactéria. Portanto, o ECC representa uma fonte potencial de compostos bioativos para uso como aditivo pela indústria de alimentos, apresentando atividade antibacteriana e sem risco de toxicidade.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L. Carotenoides. Ácido anacárdico. Zebrafish adulto. Antitumoral. Antimicrobiana.

ABSTRACT

The concentrated cashew extract (CCE) is obtained from the residual fibers of the peduncle processing and presents a high concentration of carotenoids, exhibiting great potential for use as a food additive. However, for its food application, it is necessary to evaluate its toxicity, since anacardic acids are found there, which, although related to beneficial biological effects, have also been reported as toxic. In this sense, the objective of the study was to characterize the CCE regarding the color and contents of bioactive compounds, to evaluate its toxicity and antiproliferative and antimicrobial activities. For this, a process was used, which includes enzymatic treatment, sequential pressing, microfiltration and pasteurization, to obtain the CCE from the residual fibers of the peduncle. Once CCE-L was obtained, the CCE was lyophilized (CCE-L), without addition of encapsulants, and atomized, using cashew gum (CCE-CG) or maltodextrin (CCE-M) as encapsulating agents and then characterized and used in biological assays. The characterization was performed using color parameters (L^* , a^* and b^*), total carotenoids (TC) (spectrophotometry) and anacardic acids (AA) (HPLC-DAD). Biological assays included an in vivo acute toxicity test performed by the zebrafish model (*Danio rerio*); anti-proliferative activity against seven human tumor cells [U251 (glioma), MCF7 (breast), NCI/ADR-RES (multidrug resistant carcinoma), NCI-H460 (lung), PC-3 and HT29 (colon)] and a non-tumor cell [HaCaT (human keratinocytes)]; and antimicrobial activity by agar diffusion method against *Escherichia coli* (ATCC 259222), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 51812), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Finally, transmission electron microscopy (TEM) was performed to confirm the cellular damage caused to the bacteria. The results showed that CCE-L presented the highest levels of bioactive compounds (TC - 96.28 mg/mL and AA - 41.74 mg/mL) and a darker color. The bioactive compounds contents between CCE-CG and CCE-M are similar ($p < 0.05$), while statistical differences are observed in the values of the coordinates L^* , a^* and b^* . CCE was not toxic up to 96 hours of analysis and showed no significant antiproliferative activity ($IC_{50} > 250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) against the tumor and non-tumor lines tested. However, it exhibited inhibition halos of 13 and 11 mm (100 and 50 mg/mL, respectively) against *L. monocytogenes*. The images obtained by TEM show the damage caused to the cell wall of this bacterium. Therefore, CCE represents a potential source of bioactive compounds for use as an additive by the food industry, exhibiting antibacterial activity and without risk of toxicity.

Key words: *Anacardium occidentale* L. Carotenoids. Anacardic acid. Adult zebrafish. Antitumor. Antimicrobial.

6.1 Introdução

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma fruta tropical originária do Brasil, onde é amplamente cultivada e explorada comercialmente. O principal produto do cajueiro é a castanha de caju (fruta verdadeira), rica em gordura e proteína. Depois de retirar a noz do pedúnculo (pseudo-fruto do caju), os pseudo- frutos se tornam resíduos (BHAKYARAJ; SINGARAVADIVE, 2012) ou são processados na indústria, principalmente, para produzir suco de caju. No final, aproximadamente 20% a 25% dos pseudo- frutos usados na indústria de processamento permanecem como fibras residuais sendo quase inteiramente descartadas ou usadas como suplemento de ração animal (ABREU *et al.*, 2013).

No entanto, nos últimos anos, estudos envolvendo a utilização mais eficiente desse resíduo agroindustrial estão aumentando. Abreu *et al.* (2013) relatam um processo para obter um extrato concentrado de caju (ECC), que compreende um tratamento enzimático das fibras do pedúnculo de caju, seguido de prensagem sequencial e microfiltração de fluxo cruzado. O produto resultante contém ácidos anacárdicos (DIONISIO *et al.*, 2018), que são reconhecidos pela sua atividade antibacteriana, atividade antitumoral e propriedades antioxidantes (HAMAD; MUBOFU, 2015). O ECC tem também uma coloração amarela intensa, pois é rico em carotenoides, onde a auroxantina e a β -criptoxantina representam cerca de 50% do total de carotenoides (ABREU *et al.*, 2013). Embora o ECC seja uma fonte interessante desses pigmentos, esses compostos são suscetíveis à degradação quando isolados (BOON *et al.*, 2010); e métodos de processamento com boa relação custo-benefício precisam ser empregados para preservar os carotenoides e outros compostos bioativos (SAINI; NILE; PARK, 2015). Com o objetivo de melhorar a estabilidade desses carotenoides, o uso de carreadores - como a maltodextrina ou a goma de cajueiro - é capaz de estabilizar esses compostos bioativos, altamente associados a potenciais benefícios à saúde humana (SAINI; NILE; PARK, 2015; FIEDOR; BURDA, 2014; BOWEN *et al.*, 2015). No entanto, as propriedades biológicas desses extratos contendo bioativos (não encapsulados e encapsulados) nunca foram avaliadas. Esta elucidação é necessária, devido à sua possível aplicação, particularmente na indústria alimentar, pela sua coloração e/ou propriedades biológicas.

As propriedades biológicas dos produtos naturais têm atraído a atenção dos cientistas desde muito tempo e as investigações de atividades biológicas particulares *in vivo* e *in vitro* têm sido exploradas usando células e diversos modelos animais (KANG *et al.*, 2012). Com o propósito de estudar processos, efeitos e mecanismos biológicos específicos, um organismo modelo deve ter vantagens técnicas e práticas (KANG *et al.*, 2013). Recentemente, o sistema

modelo de zebrafish (*Danio rerio*) emergiu como um organismo modelo de vertebrado altamente útil para estudar genética, desenvolvimento, toxicologia ambiental, farmacologia, reparo de danos no DNA, câncer e outras doenças (DAI *et al.*, 2014). Estudos envolvendo zebrafish adulto, especificamente para carotenoides, foram relatados por Saidi, Davey e Cameron (2015), que avaliaram o efeito da zeaxantina na acuidade visual do zebrafish. Mais recentemente, o embrião de zebrafish foi utilizado como modelo de desenvolvimento de vertebrados para identificar e, subsequentemente, isolar e caracterizar os metabólitos teratogênicos dos glicosídeos carotenoides produzidos por cianobactérias (JAJA-SHIMEDZA *et al.*, 2017). No entanto, os efeitos tóxicos dos ácidos anacárdicos ou outros carotenoides (ou materiais contendo níveis mais elevados desses constituintes) no zebrafish adulto ainda é inexplorado.

Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade aguda para indivíduos adultos maduros de zebrafish e o potencial antiproliferativo e antimicrobiano do extrato de caju (ECC) e seus materiais encapsulados (ECC-M e ECC-GC), usando maltodextrina ou goma de caju como portadores, respectivamente) a fim de propor novas aplicações para esses extratos contendo bioativos obtidos do subproduto do processamento de suco.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Amostras de extrato concentrado de caju (ECC)

A matéria-prima utilizada foi obtida de acordo com o que foi descrito no subitem 3.2.1 (capítulo 3 desta tese de doutorado) e o processamento aplicado para obtenção do extrato concentrado de caju (ECC) foi realizado de acordo com o que foi descrito no subitem 3.2.2 (capítulo 3 desta tese de doutorado). Em seguida, o ECC foi submetido ao processo de liofilização, sem uso de encapsulante, para obtenção da amostra denominada ECC-L. As amostras obtidas nos pontos considerados ótimos do delineamento composto central rotacional (DCCR), empregado no processo de secagem por atomização do capítulo 5 desta tese de doutorado, também foram estudadas no presente capítulo. Essas amostras foram denominadas como ECC-GC (encapsulada com goma de cajueiro) e ECC-M (encapsulada com maltodextrina).

6.2.2 Métodos de analíticos para caracterização das amostras

Os métodos analíticos para caracterização são descritos a seguir:

6.2.2.1 Cor

As análises de cor foram realizadas em triplicata por leitura direta da reflectância do sistema de coordenadas retangulares (L^* , Luminosidade; a^* , intensidade de vermelho e verde; e b^* , intensidade de amarelo e azul), aplicando a escala de cor CIELAB com o uso de colorímetro (modelo Chroma-Meter CR-410, Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão).

6.2.2.2 Carotenoides totais (CT)

A análise de carotenoides totais foi realizada conforme descrito no subitem 3.2.3.2 do tópico 3 desta tese de doutorado.

6.2.2.3 Identificação e quantificação de ácidos anacárdicos

Essas metodologias foram descritas nos subitens 3.2.3.4 e 3.2.3.5 do tópico 3 desta tese de doutorado.

A única diferença é que as amostras em pó, avaliadas no presente capítulo, foram solubilizadas em metanol à uma concentração de 1 mg.mL^{-1} antes de serem filtradas e injetadas no cromatógrafo.

6.2.3 Avaliação dos efeitos biológicos

6.2.3.1 Avaliação toxicológica frente ao zebrafish (*Danio rerio*)

6.2.3.1.1 Zebrafish (*Danio rerio*)

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), de ambos os sexos, com idade entre 60 e 90 dias, tamanhos de $3,5 \pm 0,5 \text{ cm}$ e peso $0,3 \pm 0,2 \text{ g}$ foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (30 x 15 x 20 cm), contendo água desclorada (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7,0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração *ad libitum* 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos, os peixes foram sacrificados com água gelada (2 a 4°C) por 10 minutos até perda dos movimentos operculares (CONCEA, 2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 7210149/2016.

6.2.3.1.2 Protocolo geral

Os testes com zebrafish adultos foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães et al. (2017), Ekambaram, Perumal e Pavadai (2017) e Collymore, Rasmussen e Tolwani (2013). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados aleatoriamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes (diluídas em água) ou controle (água destilada), via oral (v.o.). Após tratamento, foram acondicionados individualmente em copos de plástico (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via oral (v.o.) foi usada pipeta automática variável de 20 µL.

6.2.3.1.3 Teste de campo aberto

Os animais (n = 6 / grupo) foram tratados com 20 µL de ECC-L ou ECC-GC ou ECC-M, em três diferentes doses (2 ou 40 ou 200 mg/Kg), ou, no caso do controle, com água destilada e submetidos ao teste de campo aberto para avaliar se houve alguma alteração na coordenação motora dos peixes, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Um grupo Naive (que não recebeu tratamento) foi incluído. O número de cruzamentos de linha (CL) para cada peixe foi anotado durante 0-5 min. Considerando o valor de CL dos peixes Naive como linha de base (100%), expressamos, como valores médios \pm erro padrão, os cruzamentos de linhas em porcentagem (CL%) para cada grupo experimental (MAGALHÃES *et al.*, 2017). Após a confirmação da normalidade da distribuição e da homogeneidade dos dados, os resultados foram submetidos à análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey e o nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v 5.01.

6.2.3.1.4 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda foi realizada frente ao zebrafish adulto conforme metodologia proposta pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992). Os animais (n=6/grupo) foram tratados por via oral com a amostra (ECC-L ou ECC-GC ou ECC-M), em três diferentes doses (2 ou 40 ou 200 mg/Kg; 20 µL; v.o.), ou, no caso do controle, com água destilada. Após o tratamento, os animais foram observados diariamente por 96 h. O número de animais mortos em cada grupo foi anotado e a dose letal, capaz de matar 50 % dos animais (DL_{50}), foi determinada através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015).

6.2.3.2 Atividade antiproliferativa

6.2.3.2.1 Condições de cultura celular

Oito diferentes linhagens de células tumorais humanas [U251 (glioma), MCF7 (mama), NCI/ADR-RES (carcinoma do ovário multirresistente), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário) e HT-29 (cólon)] foram cedidos pelo Instituto Nacional do Câncer de Frederick (NCI-EUA), e uma linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foi cedida pelo professor Dr. Ricardo Della Coletta (Universidade de Campinas). Para manutenção e experimentos, todas as linhagens celulares foram mantidas em meio completo [RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado com 5% (v / v) de soro bovino fetal (FBS, Gibco) e 1% (v / v) de penicilina: estreptomicina (Nutricell, 1000 U/mL: 1000 g/mL)] em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, a 37 °C.

6.2.3.2.2 Preparação das amostras

As amostras (5 mg cada) de doxorubicina (Eurofarma®, 0,5 mg/5 mg), extrato concentrado de caju (ECC-L), cápsulas vazias de goma de cajueiro (GC) e maltodextrina (M) foram inicialmente diluídas em DMSO (50 µL) seguido da adição de 950 µL de meio completo (solução de trabalho). As concentrações finais foram obtidas por diluição seriada em meio completo. Além disso, as amostras ECC-GC e ECC-M foram diluídas em DMSO / meio completo, como já descrito, ajustando a massa das amostras para 5 mg.L⁻¹ de ECC.

6.2.3.2.3 Protocolo de atividade antiproliferativa

O ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* foi realizado como descrito por Monks *et al.* (1991). Resumidamente, após o ajuste da densidade de cada linhagem celular (material suplementar), as suspensões de células foram plaqueadas numa placa de 96 poços (100 µL/poço). Após 24 h, as células foram expostas às amostras (ECC-L, microcápsulas vazias de GC e M, ECC-GC e ECC-M) em diferentes concentrações de 0,25, 2,5; 25; 250 µg/mL (100 µL/poço) durante 48 h. Para a doxorubicina, as concentrações finais variaram de 0,025 a 25 µg / mL. Antes (placa T₀) e após (placa T₁) a exposição às amostras, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (50%, 50 µL / poço, Sigma®) e a quantificação de proteínas foi realizada com ensaio de sulforrodamina B ($\lambda = 540$ nm). Os resultados foram plotados como curva de resposta, correlacionando cada perfil de crescimento celular com cada concentração de amostra. A concentração efetiva, denominada IC₅₀ (concentração de amostra necessária para induzir 50%

de inibição do crescimento celular) foi determinada por análise de regressão linear usando o software ORIGIN 8.0 (Origin Lab Corporation) (SHOEMAKER, 2006).

6.2.3.3 Atividade antimicrobiana

6.2.3.3.1 Microrganismos

A atividade antimicrobiana foi avaliada em microrganismos Gram negativos (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 51812) e Gram positivos (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

6.2.3.3.2 Preparo do inóculo

A partir das culturas mantidas a 4 °C em ágar nutriente, uma alçada de cada bactéria foi removida e realizou-se estrias por esgotamento em meios sólidos, empregando-se placas de agar triptona de soja (TSA) para todos os microrganismos, exceto para *L. monocytogenes*, que foi utilizado o TSA enriquecido com extrato de levedura. As placas foram incubadas a 35 °C por 24h. Após esse período, observou-se a morfologia das colônias (aspecto e tamanho), a fim de verificar a pureza das cepas. Com auxílio de uma alça de inoculação, uma colônia de cada microrganismo foi removida da placa e transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo triptona de soja (TSB) para todos os microrganismos. Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 h, visando uma suspensão microbiana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O controle dos caldos foi realizado a fim de verificar sua esterilidade.

6.2.3.3.3 Método de difusão em ágar

O método de difusão em ágar foi conduzido de acordo com o Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI, 2012) e Machado *et al.* (2012), com modificações. Suspensões microbianas de todas as bactérias (10^8 UFC/mL) foram semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton (MH), com exceção da *L. monocytogenes* que foi semeada em ágar Mueller-Hinton enriquecido com extrato de levedura (MH-YE), em três direções, a fim de distribuir o inóculo uniformemente. As placas foram deixadas em repouso durante 5 a 15 minutos para a secagem do ágar. Em seguida, com um perfurador estéril, foram feitos poços de 5 mm de diâmetro interno, aos quais foram adicionados 50 µL da amostra (ECC-L ou ECC-GC ou ECC-M) em quatro concentrações (100, 50, 25 e 12,5 mg/mL), diluídas em Tween 80 (2%). As placas inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos, para permitir a difusão das amostras e, posteriormente, incubadas a 35 °C/24 horas. A atividade antimicrobiana foi

avaliada pela medida do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano em torno dos poços. Halos com diâmetros iguais ou superiores a 7 mm foram considerados indicativos de sensibilidade bacteriana ao antimicrobiano. Solução estéril de Tween 80 (2%) foi usada como controle negativo do experimento e como controle positivo foi utilizado benzilpenicilina da Eurofarma (300.000 U/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

6.2.3.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens foram obtidas de acordo com metodologia descrita por Hooton, Atterbury e Connerton (2011), com modificações. O inóculo de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 foi preparado conforme descrito no item 6.2.3.3.2. Após o período de incubação (35°C por 24h), diluição em série foi realizada usando 9 mL de água peptona a 0,1% (Difco, Sparks, EUA) como diluente para obter uma população bacteriana final de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Volumes equivalentes da amostra (100 µL), na concentração de 100 mg/mL, e do inóculo (100 µL) foram adicionados a um eppendorf estéril e homogeneizados. Após o período de incubação (35 °C/24 h), 100 µL da solução fixadora de Karnovsky em cacodilato foi adicionado, deixando agir por 4 horas. Em seguida, uma pequena gota dessa mistura (suspensão microbiana+amostra+solução fixadora) foi colocada em uma rede de malha de cobre revestida de carbono e deixada em repouso por 3 min. O excesso da mistura foi então removido com papel filtro. Para coloração negativa, uma gota de ácido fosfotúngstico [pH 7,4] foi adicionada a cada grade, e o excesso de corante foi removido 1 min depois com papel filtro. Cada grade foi então coberta e deixada secar por 15 min. As grades foram visualizadas no MEV-STEM TESCAN, usando uma aceleração de tensão adequada de 30 KV.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Caracterização das amostras

Os dados de caracterização das amostras (ECC-L, ECC-M e ECC-GC), referente a quantificação de compostos bioativos (ácidos anacárdicos e carotenoides totais) e análise de cor são apresentados na Tabela 29.

Os ácidos anacárdicos são formados por uma mistura de três compostos: ácido 6-[8'(Z), 11'(Z),14'-pentadecatrienil]-salicílico (1), que será referido como (C15: 3); ácido 6-[8'(Z), 11'(Z) -pentadecadienil]-salicílico (2), que será referido como (C15: 2) e ácido 6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecenil]-salicílico (3), que será referido como (C15: 1) (KUBO; MASUOKA;

TSUJIMOTO, 2006). As longas cadeias alquílicas dos ácidos anacárdicos provêm da condensação de ácidos graxos saturados ou insaturados e compostos fenólicos gerados através das vias derivadas do acetato-malonato (MORAIS *et al.*, 2017). Assim, C15: 3, C15: 2 e C15: 1 foram identificados no ECC líquido (Figura 8 do subitem 3.3.4.1 do tópico 3) e quantificados em todos os materiais testados no presente estudo.

Comparando os resultados entre as três amostras, o ECC-L apresenta os maiores níveis de compostos bioativos (carotenoides e ácidos anacárdicos), e uma cor mais escura (baseada nos valores das coordenadas de L^* , a^* e b^*), quando em comparação com os outros materiais encapsulados e cápsulas vazias. Entretanto, o encapsulamento do ECC é uma estratégia interessante para proteger os compostos bioativos, como relatado em outros estudos sobre microencapsulação, como a bixina (BARBOSA *et al.*, 2005); curcumina (CANO-HIGUITA *et al.*, 2015); betalainas (RAVICHANDRAN *et al.*, 2014); compostos fenólicos (NUNES *et al.*, 2015) e antocianinas (STOLL *et al.*, 2016). Comparando as amostras encapsuladas observa-se que os teores de carotenoides totais são semelhantes ($p < 0,05$), enquanto observa-se diferenças estatísticas nos teores de ácidos anacárdicos e valores das coordenadas L^* , a^* e b^* . A diferença na cor já era esperada, uma vez que a goma de cajueiro apresenta naturalmente uma cor marrom clara.

Como mencionado anteriormente, todos os materiais testados (ECC-L, ECC-M e ECC-CG) contêm ácidos anacárdicos em sua composição. A literatura relata que esses compostos são biologicamente ativos como gastroprotetores, inibidores da atividade de várias enzimas deletérias, possuem atividade antimicrobiana e atuam como agentes antitumorais e antioxidantes (CARVALHO *et al.*, 2011). Assim, foi realizado ensaio de atividade antimicrobiana e antiproliferativa para avaliar se a presença desses compostos no ECC é capaz de exercer tais atividades. Além disso, a literatura mostra que o líquido da casca da castanha de caju apresentou toxicidade moderada quando foi testado em ratos de forma aguda (HARLITA *et al.*, 2016). Embora a maior concentração desses compostos seja encontrada no líquido da castanha de caju esses compostos também são encontrados no pedúnculo (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, na fibra residual, que é a matéria-prima para produzir o ECC. Nesse sentido, a toxicidade aguda *in vivo* do ECC-L e seus materiais encapsulados (ECC-M e ECC-CG) também foi avaliada.

Tabela 29 – Caracterização das amostras ECC-L, ECC-M e ECC-GC

Amostras	CT (mg/100g)	Ácidos anacárdicos (mg/g)				Cor		
		Total	C 15:3	C 15:2	C 15:1	L*	a*	b*
ECC-L	96,28 ± 3,41a	41,74 ± 0,05a	9,42 ± 0,06a	10,84 ± 0,01a	21,48 ± 0,02a	36,87 ± 0,04e	8,28 ± 0,02a	36,52 ± 0,012c
ECC-M	25,95 ± 0,80b	7,80 ± 0,01b	2,04 ± 0,00b	2,21 ± 0,01b	3,55 ± 0,01b	81,69 ± 0,02c	-3,34 ± 0,02e	46,02 ± 0,03a
ECC-GC	24,59 ± 0,71b	7,12 ± 0,01c	1,86 ± 0,00c	2,03 ± 0,00c	3,23 ± 0,01c	78,67 ± 0,01d	-2,01 ± 0,01d	38,31 ± 0,01b
M	-	-	-	-	-	103,22 ± 0,01a	-0,25 ± 0,01c	2,88 ± 0,01e
GC	-	-	-	-	-	91,87 ± 0,01b	1,49 ± 0,01b	8,60 ± 0,01d

Fonte: autor.

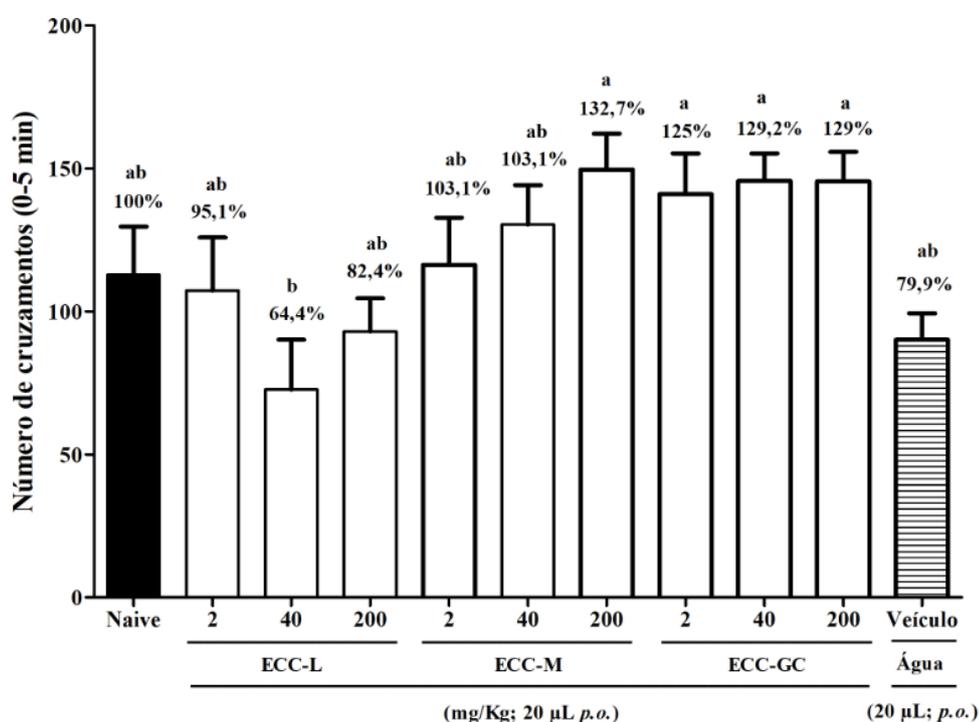
Legenda: CT = Carotenoides totais, ECC-L = Extrato concentrado de carotenoides liofilizado; ECC-M = Extrato concentrado de carotenoides encapsulado com maltodextrina; ECC-GC = Extrato concentrado de carotenoides encapsulado com goma de cajueiro; M = Cápsulas de maltodextrina vazias; GC = Cápsulas de goma de cajueiro vazias e (-) = Não determinado. Os valores são médias ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

As médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

6.3.2 Avaliação toxicológica frente ao zebrafish (*Danio rerio*)

A atividade locomotora é um dos parâmetros de análise comportamental que tem sido utilizado para avaliar a ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central do zebrafish adulto e causar comprometimento locomotor ou não (KURTA; PALESTIS, 2010; GEBAUER *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2017; BENNEH *et al.*, 2017). Recentemente, Magalhães *et al.* (2017) adaptou o teste de campo aberto, proposto por Ahmed e Richardson (2013), ao zebrafish para investigar a ação de drogas analgésicas. Neste trabalho, empregou-se o mesmo método às três amostras, para avaliar suas ações no sistema locomotor do zebrafish adulto. Os resultados mostraram que as amostras (ECC-L, ECC-M e ECC-GC) em suas diferentes doses (2 ou 40 ou 200 mg/Kg; v.o.) não alteraram a atividade locomotora ($p > 0,05$ vs. Naive ou Veículo) do *Danio rerio* (zebrafish) adulto no teste de campo aberto (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 – Efeito do ECC – L ou ECC – M ou ECC – GC (2 ou 40 ou 200 mg/Kg; v.o.) na atividade locomotora do zebrafish adulto, analisado individualmente durante 0-5 minutos no teste de campo aberto



Fonte: autor.

Legenda: Naive = Sem tratamento; ECC-L = Extrato concentrado de caju liofilizado; ECC-M = Extrato concentrado de caju encasulado com maltodextrina; ECC-GC = Extrato concentrado de caju encasulado com goma de cajueiro; Veículo = Tratamento com água destilada.

Cada coluna representa a média \pm erro padrão ($n = 6$ /grupo). Os números acima de cada barra indicam a porcentagem de atividade locomotora. ANOVA de 1 via seguida de teste de Tukey. Grupos com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O zebrafish adulto tem sido utilizado como modelo animal complementar ao uso de roedores em testes genéticos, biologia do desenvolvimento, neurobiológicos (RESENDE; SOCCOL, 2015), além de toxicológico (HILL *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2014; CABALLERO; CANDIRACI, 2018), por apresentar baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo reprodutivo curto, alta fecundidade e embriões transparentes (DAI *et al.*, 2014). Neste trabalho, utilizamos o zebrafish adulto como modelo alternativo ao uso de roedores para avaliar a toxicidade aguda do ECC-L; ECC-M e ECC-CG. As amostras mostraram-se seguras, uma vez que não foram tóxicas ao zebrafish adulto até 96 horas após os tratamentos (2,0 ou 40 ou 200 mg / kg; v.o.) (TABELA 30).

Tabela 30 – Toxicidade aguda de ECC-L, ECC-M e ECC-GC em zebrafish adulto

Amostra	Mortalidade				DL ₅₀ (mg/kg)/96 h
	C	D1	D2	D3	
ECC-L	1	1	3	2	>200
ECC-M	1	0	0	1	>200
ECC-GC	1	2	0	0	>200

Fonte: autor.

Legenda: N = 6 zebrafish por grupo; ECC-L = Extrato concentrado de caju liofilizado; ECC-M = Extrato concentrado de caju encasulado com maltodextrina; ECC-GC = Extrato concentrado de caju encasulado com goma de cajueiro; C = Controle negativo (água destilada; 20 µL; v.o.); D1 = 2 mg/Kg (v.o.); D2 = 40 mg/Kg (v.o.); D3 = 200 mg/Kg (v.o.) e LD₅₀ = Dose letal para matar 50% dos animais.

Os trabalhos encontrados na literatura, que envolvem alguma das variáveis aqui estudadas abrangem assuntos como: avaliação do extrato de *Searsia pyroides*, que apresenta em sua constituição compostos análogos aos ácidos anacárdicos, em um ensaio locomotor com a larva do zebrafish (MORADI-AFRAPOLI *et al.*, 2017); avaliação da toxicidade do extrato concentrado de caju (ECC) com o uso do bioensaio frente a *Artemia salina* (o ECC não foi tóxico) (DIONISIO *et al.*, 2018); estudo de toxicidade do líquido da castanha de caju, sendo os ácidos anacárdicos seus principais componentes (o líquido se mostrou tóxico), (LEITE *et al.*, 2015) e toxicidade individual de cada constituinte do líquido natural da casca da castanha de caju sobre *Artemia salina* (alguns constituintes se mostraram mais tóxicos que outros) (MORAIS *et al.*, 2017); estudo de toxicidade aguda e subaguda e efeitos mutagênicos dos ácidos anacárdicos do caju em camundongos (doses inferiores a 300 mg/kg não produziram alterações bioquímicas e hematológicas) (CARVALHO *et al.*, 2011); e Ácidos anacárdicos de castanha de caju na melhora de dano pulmonar induzido por partículas de exaustão de diesel em ratos (CARVALHO *et al.*, 2013). Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos semelhantes ao do presente estudo, em que o extrato concentrado de caju (ECC) tenha sido

testado, com relação a sua toxicidade, frente ao zebrafish. Assim, não foi possível uma comparação entre resultados. Por outro lado, o resultado obtido é o primeiro relato de avaliação toxicológica do ECC frente ao modelo emergente *zebrafish*, sendo um resultado positivo que mostra sua segurança de uso, encorajando trabalhos futuros que aprofundem os estudos relativos à sua toxicidade e aplicação.

6.3.3 Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa foi avaliada em sete linhagens de células tumorais humanas e em uma linhagem celular não tumoral. A Tabela 31 mostra a concentração necessária de doxorubicina, ECC-L, ECC-M, ECC-GC, M e GC para causar 50% de inibição do crescimento celular. Pode-se observar que grande parte das linhagens celulares são sensíveis à doxorubicina, que foi utilizada como controle positivo.

Tabela 31 – Concentração de doxorubicina, ECC-L, ECC-M, ECC-GC e micropartículas de GC e M vazias necessária para causar 50% de inibição do crescimento celular (valores de IC₅₀), em µg/ml, após 48 horas de tratamento

Linhagem celular	Amostras					
	Doxorrubicina	ECC-L	ECC-GC	ECC-M	GC	M
U251	0,026	>250	>250	>250	>250	>250
MCF-7	<0,025	>250	>250	>250	>250	>250
NCI-ADR/RES	0,16	>250	>250	>250	>250	>250
NCI-H460	<0,025	>250	>250	>250	>250	>250
PC-3	0,23	>250	>250	>250	>250	>250
OVCAR-03	0,14	>250	>250	>250	>250	>250
HT-29	0,26	>250	>250	>250	>250	>250
HaCaT	<0,025	>250	>250	>250	>250	>250

Fonte: autor.

Linhagens de células tumorais humanas: U251 = glioma, MCF7 = mama, NCI/ADR/RES = carcinoma do ovário multirresistente, NCI-H460 = pulmão, PC-3 = próstata, OVCAR-3 = ovário, HT-29 = cólon; Linhagem de célula não tumoral: HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados); Doxorubicina = quimioterápico de referência (controle positivo); ECC-L = Extrato concentrado de caju liofilizado; ECC-GC = Extrato concentrado de caju encapsulado com goma de cajueiro (GC); ECC-M = Extrato concentrado de caju encapsulado com maltodextrina.

Os resultados dos ensaios antiproliferativos mostraram que todas as amostras estavam inativas (IC₅₀ > 250 µg / mL), indicando que esses extratos não seriam usados como um agente antineoplásico. Por outro lado, não interfere na proliferação das células em tecidos normais, como a mucosa da pele. Os resultados obtidos com o modelo zebrafish corroboram com essa observação já que a dose letal foi avaliada como maior que a maior concentração testada e,

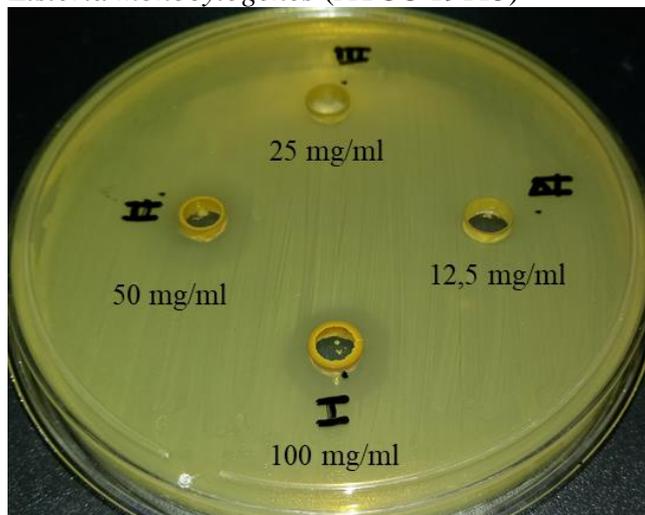
além disso, o extrato (liofilizado ou encapsulado) não promoveu alterações que sugerissem efeitos no sistema nervoso central ou neuromotor. Os resultados obtidos indicam que L-CAE, M-CAE e CG-CAE são seguros contra os modelos testados. Esse resultado é muito interessante, pois a percepção e a demanda do consumidor têm impulsionado a substituição de corantes sintéticos por corantes derivados de fontes naturais (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017). Além disso, muitos corantes alimentares sintéticos tornam-se tóxicos após uso prolongado e podem causar problemas de saúde, como reações alérgicas como asma e urticária, lesões patológicas no cérebro, rim e fígado, tumores e câncer (MOUTINHO; BERTGES; ASSIS, 2007; EL-WAHAB; MORAM, 2012). Nesse sentido, o uso de CAE (liofilizado ou encapsulado) como substituto de corantes artificiais amarelos é uma estratégia para colorir naturalmente os alimentos, e será necessário explorá-los exaustivamente.

6.3.4 Atividade antimicrobiana

As amostras encapsuladas com goma de cajueiro e maltodextrina (ECC-GC e ECC-M, respectivamente) não exibiram atividade contra nenhum dos microrganismos testados, pois não foi possível verificar a formação de halos de inibição. Torquato *et al.*, (2004) mostraram que a goma de cajueiro apresenta apenas uma atividade fraca contra *Saccharomyces cerevisiae* e nenhuma atividade foi observada contra todos os outros microrganismos testados. Os autores concluíram que a remoção dos ácidos anacárdicos presente na goma crua durante a purificação pode explicar esses resultados negativos.

Já a amostra de ECC liofilizada (ECC-L) apresentou halos de inibição de 11 e 13 mm contra *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), uma bactéria gram-positiva, nas concentrações de 50 e 100 mg/mL, respectivamente (FIGURA 22).

Figura 22 – Atividade antimicrobiana do extrato concentrado de caju (ECC) contra a bactéria *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115)



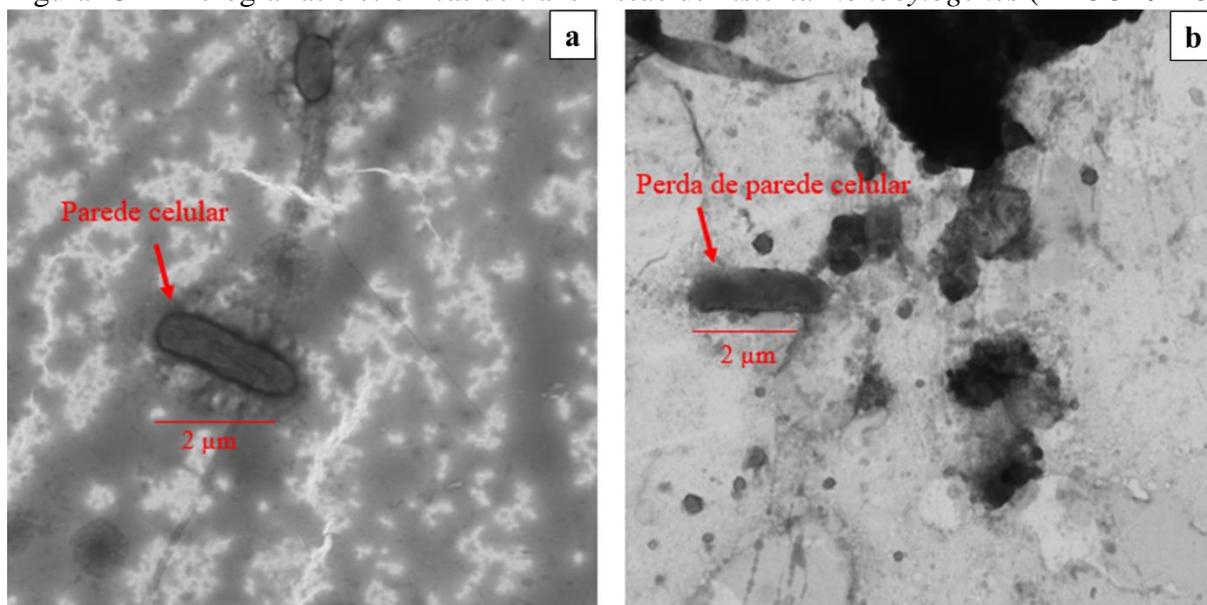
Fonte: autor.

O ECC-L, quando comparado aos materiais encapsulados (ECC-CG ou ECC-M) (TABELA 30), apresenta a maior concentração de ácidos anacárdicos (41,74 mg/g), e esse fato poderia explicar o resultado obtido. Muitos trabalhos têm associado atividades antimicrobianas a compostos fenólicos (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2001; LOU *et al.*, 2012; STOJKOVIĆ *et al.*, 2013a; STOJKOVIĆ *et al.*, 2013b; KOOLEN *et al.*, 2013; AMAN *et al.*, 2015). Os ácidos anacárdicos são compostos fenólicos biosintetizados a partir de ácidos graxos. Eles constituem cerca de 90% do líquido que é extraído da casca da castanha de caju, sendo que, em tais concentrações, apresentam propriedades cáusticas e irritantes (DIÓGENES *et al.*, 1996). Esses compostos têm sido encontrados, também, no pedúnculo de caju (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2004), que é a matéria-prima para a obtenção do ECC, apresentando teores bem inferiores aos encontrados na casca da castanha de caju, entretanto com a microfiltração, empregada para obtenção do ECC, ocorre concentração desses compostos.

Já foram relatados na literatura efeitos antimicrobianos dos ácidos anacárdicos contra o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MUROI; KUBO, 1996; KUBO; LEE; KUBO, 1999; KUBO; NIHEI; TSUJIMOTO, 2003; GREEN *et al.*, 2007) e microrganismos da cavidade bucal (*Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida utilis*), onde se verificou atividade antimicrobiana contra todos, sendo a maior atividade inibitória sobre a bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans* (LIMA; PASTORE; LIMA, 2000). Entretanto, ainda não havia sido relatada atividade antimicrobiana do ECC contra *Listeria monocytogenes*.

As observações de microscopia eletrônica são ferramentas poderosas para os pesquisadores entenderem melhor o impacto de um estressor nas células bacterianas (XING *et al.*, 2009). Análise morfológica, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi realizada para observar diretamente o dano induzido na bactéria *L. monocytogenes* após exposição ao ECC-L (24 horas de tratamento) (FIGURA 23). A célula não tratada de *L. monocytogenes* tinha uma parede externa lisa e bem definida (FIGURA 23a). Quando a célula foi exposta ao ECC-L, ocorreu desintegração de partes da parede celular (FIGURA 23b), sendo indicativa de morte microbiana.

Figura 23 – Micrografias eletrônicas de transmissão de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115)



Fonte: autor.

Legenda: (a) = célula controle não tratada em magnificação de 27400x; e (b) = célula após exposição ao ECC-L em magnificação de 23900x.

6.4 Conclusão

Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que ECC-L, ECC-M e ECC-GC são considerados seguros, uma vez que não alteraram a atividade locomotora do zebrafish adulto (*Danio rerio*) e não se mostraram tóxicos nem mesmo para 96h de análise. Em relação à atividade antiproliferativa, todas as amostras foram inativas ($IC_{50} > 250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e não interferiram na proliferação da célula em tecido normal (mucosa da pele). Além disso, os resultados deste estudo mostraram também que os extratos obtidos de caju (*Anacardium occidentale*) representam uma fonte potencial de compostos antimicrobianos. No entanto, esses

dados reforçam a importância de mais estudos para elucidar os mecanismos celulares envolvidos na atividade antimicrobiana desses produtos.

Referências

ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M.; DIONÍSIO, A. P.; CARAIL, M.; CARIS-VEYRAT, C.; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 25-31, 2013.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A.; GARRUTI, D. S.; PADILHA, V. A.; LIMA, J. B.; AGUIAR, M. J.; PAIVA, J. R. Anacardic acid content in cashew apples from *Anacardium microcarpum* and eight clones of *Anacardium occidentale* from Northeastern Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, 1075-1080, 2004.

AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, [s.l.], v. 92, p. 88-98, 2013.

AMAN, S.; NAIM, A.; SIDDIQI, R.; NAZ, S. Antimicrobial polyphenols from small tropical fruits, tea and spice oilseeds. **Food Science and Technology International**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 241-251, 2015.

ARELLANO-AGUIAR, O.; SOLIS-ANGELES, S.; SERRANO-GARCIA, L.; MORALES-SIERRA, E.; MENDEZ-SERRANO, A.; MONTERO-MONTOYA, R. (2015). Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheriesciences.com**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 52-62, 2015.

BARBOSA, M. I. M. J.; BORSARELLI, C. D.; MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Research International**, [s.l.], v. 38, n. 8-9, p. 989–994, 2005.

BENNEH, C. K.; BINEY, R. P.; MANTE, P. K.; TANDOH, A.; ADONGO, D. W.; WOODE, E. *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 207, p. 129-145, 2017.

BHAKYARAJ, R.; SINGARAVADIVE, K. Minerals and bioactive compounds in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Research Science**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 32-36, 2012.

BOON, C. S.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews and Food Science Nutrition**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 515-32, 2010.

BOWEN, P. E.; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; DIWADKAR-NAVSARIWALA, V. **Carotenoids in human nutrition**. In: Chen, C. (ed), *Pigments in fruits and vegetables: genomics and dietetics*. Springer Science+Business Media, New York, p. 31-67, 2015.

CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. **Journal of Unexplored Medical Data**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 1-14, 2018.

CANO-HIGUITA, D. M.; MALACRIDA, C. R.; TELIS, V. R. N. Stability of curcumin microencapsulated by spray and freeze drying in binary and ternary matrices of maltodextrin, gum arabic and modified starch. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.l.], v. 39, p. 2049 – 2060, 2015.

CARVALHO, A. L. N.; ANNONI, R.; SILVA, P. R. P.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; TREVISAN, M. T. S.; MAUAD, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.

CARVALHO, A. L. N.; ANNONI, R.; TORRES, L. H. L.; DURÃO, A. C. C. S.; SHIMADA, A. L. B.; ALMEIDA, F. M.; HEBEDA, C. B.; LOPES, F. D. T. Q. S. L.; DOLHNIKOFF, M.; MARTINS, M. A.; SILVA, L. F. F.; FARSKY, S. H. P.; SALDIVA, P. H. N.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W.; MARCOURAKIS, T.; TREVISAN, M. T. S.; MAUAD, T. Anacardic acids from cashew nuts ameliorate lung damage induced by exposure to diesel exhaust particles in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], p. 1-13, 2013.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. M02-A12, 12th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI, R. J. Gavaging adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, [s.l.], v. 78 (e50691), p. 1-5, 2013.

CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal): **Diretrizes da Prática de Eutanásia**. Resolução Normativa No 37, de 15 de fevereiro / 2018. www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf.

DAI, Y. -J.; JIA, Y. -F.; CHEN, N.; BIAN, W. -P.; LI, Q. -K.; MA, Y. -B.; CHEN, Y. -L.; PEI, D. -S. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 11–17, 2014.

DIOGENES, M. J. N.; MARAIS, S. M.; CARVALHO, F. F. Contact dermatitis among cashew nut workers. **Contact Dermatitis**, [s.l.], v.35, p.114-115, 1996.

DIONÍSIO, A. P.; ABREU, F. A. P. de; BRITO, E. S. de; WURLITZER, N. J.; RIBEIRO, P. R. V.; GOES, T. de S.; SOUSA, J. M. S.; IUNES, M. F.; LIMA, A. C. V. de; OIRAM FILHO, F. Extrato concentrado de carotenoides obtido da fibra do pedúnculo de caju: avaliação da toxicidade com uso do bioensaio de *Artemia salina*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 162, 2018.

EKAMBARAM, S. P.; PERUMAL, S. S.; PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 147-158, 2017.

EL-WAHAB, H. M. F. A.; MORAM, G. S. E-D. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. **Toxicology and Industrial Health**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 224-232, 2012.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A. L.; SCHAEFER, I. C.; BONAN, C. D.; LARA, D. R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, [s.l.], v. 99, p. 480-486, 2011.

GREEN, I. R.; TOCOLI, F. E.; LEE, S. H.; NIHEI, K.; KUBO, I. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, p. 6236-6241, 2007.

HAMAD, F. B.; MUBOFU, E. B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16 n. 4, p. 8569–8590, 2015.

HARLITA., N. H.; SATUTI, N.; SAGI, M.; ASTUTI, P. Acute toxicity of cashew nut shell extract (*Anacardium occidentale* L.) in albino rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout 1769). **Pakistan Journal of Biological Science**, [s.l.], v. 19, p. 89-94, 2016.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HOOTON, S. P. T.; ATTERBURY, R. J.; CONNERTON, I. F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 151, p. 157–163, 2011.

HUANG, Y.; ZHANG, J.; HAN, X.; HUANG, T. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 11, p. 3650-3660, 2014.

JAJA-CHIMEDZA, A.; SANCHEZ, K.; GANTAR, M.; GIBBS, P.; SCHMALE, M.; BERRY, J. P. Carotenoid glycosides from cyanobacteria are teratogenic in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. **Chemosphere**, [s.l.], v. 174, p. 478-489, 2017.

KANG, M. C.; AHN, G.; YANG, X.; KIM, K. N.; LEE, S. H.; KO, S. C. Hepatoprotective effects of dieckol-rich phlorotannins from *Ecklonia cava*, a brown seaweed, against ethanol induced liver damage in BALB/c mice. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 1986-1991, 2012.

KANG, M. C.; CHA, S. H.; WIJESINGHE, W. A.; KANG, S. M.; LEE, S. H.; KIM, E. A.; SONG, C. B.; JEON, Y. J. Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryo. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, n. 2-3, p. 950-955, 2013.

KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A. da; GOZZO, F. C.; SOUZA, A. Q. L. de; DE SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, [s.l.], v. 51, p. 467-473, 2013.

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

KUBO, I.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 51, p. 7624-7628, 2003.

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-Helicobacter pylori agents from the cashew apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 47, p. 533-537, 1999.

KURTA, A.; PALESTIS, B. G. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). **Dose-Response**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 527-533, 2010.

LEITE, A. de S.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L. da S. O.; GOMES JÚNIOR, A. L.; LIMA, S. G. de L.; CITÓ, A. M. das G. L.; FREITAS, R. M. de; MELO-CAVALCANTE, A. A. de C.; LOPES, J. A. D. L. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays.(Research Article)(Report). **BioMed Research International**, [s.l.], p. 1-16, 2015.

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

LOU, Z.; WANG, H.; RAO, S.; SUN, J.; MA, C.; LI, J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, [s.l.], v. 25, p. 550-554, 2012.

MACHADO, T. F.; NOGUEIRA, N. A. P.; PEREIRA, R. de C. A.; SOUSA, C. T. de; BBATISTA, V. C. V. Atividade antimicrobiana do óleo essencial da erva-cidreira. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 60, 2012.

MAGALHÃES, F. E. A.; SOUSA, C. A. P. B. de; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, A.O.; OLIVEIRA, M. V. de; MOURA, L. F. W. G.; RAPOSO, R. S.; CAMPOS, A. R. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, [s.l.], v. 4, n. 5, p. 422-429, 2017.

MONKS, A.; SCUDEIRO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 83, p. 757-766, 1991.

- MORADI-AFRAPOLI, F.; MERWE, H. V. D.; MIERI, M. D.; STADLER, A. W.; STADLER, S.; ZIETSMAN, P. C.; HERING, S.; SWART, K.; HAMBURGUER, M. HPLC-Based activity profiling for GABAA receptor modulators in *Searsia pyroides* using a larval zebrafish locomotor Assay*. **Planta Medica**, [s.l.], v. 83, p. 1169–1175, 2017.
- MORAIS, S. M.; SILVA, K. A.; ARAUJO, H.; VIEIRA, I. G. P.; ALVES, D. R.; FONTENELLE, R. O. S.; SILVA, A. M. S. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR Characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 10, n. 31, p. 1-10, 2017.
- MOUTINHO, I. L. D., BERTGES, L. C. & ASSIS, R. V. C. Prolonged use of the food dye tartrazine and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 141–145, 2007.
- MUROI, H.; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, [s.l.], v. 80, p. 387-394, 1996.
- NUNES, G. L.; BOAVENTURA, B. C. B.; PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. de M. C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 151, p. 60 – 68, 2015.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development): **Guideline for testing acute toxicity in fishes** No 203. 1992. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>>. Acessado em: 10/10/2018.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K. –M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 90, p. 494-507, 2001.
- RAVICHANDRAN, K.; PALANIRAJ, R.; SAW, N. M. M. T.; GABR, A. M. M.; AHMED, A. R.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 51, p. 2216–2221, 2014.
- RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. V.1: Blucher, São Paulo, 2015, p. 22.
- SAIDI, E. A.; DAVEY, P. G.; CAMERON, D. J. The effect of zeaxanthin on the visual acuity of zebrafish. **Plos One**, [s.l.], DOI: 10.1371/journal.pone.0135211, 2015.
- SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, [s.l.], v. 76, p. 735-750, 2015.
- SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 6, p. 813-826, 2006.

SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural Colorants: food colorants from natural sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 8, p. 261-280, 2017.

STOJKOVIĆ, D.; PETROVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; KUKIĆ-MARKOVIĆ, J.; PETROVIĆ, S. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal Science Food Agricultural**, [s.l.], v. 93, p. 3205-3208, 2013a.

STOJKOVIĆ, D. S.; ŽIVKOVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; FERREIRA, I. C. F. R.; JANKOVIĆ, T.; MAKSIMOVIĆ, Z. Antibacterial activity of Veronica Montana L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 55, p. 209-213, 2013b.

STOLL, L.; COSTA, T. M. H.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. de O. Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. **Food Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 9, p. 172 – 181, 2016.

TAYLOR, J. C.; DEWBERRY, L. S.; TOTSCH, S. K.; YESSICK, L. R.; DEBERRY, J. J.; WATTS, S. A.; SORGE, R. E. A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 174, p. 83-88, 2017.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 20, p. 505-507, 2004.

XING, K.; CHEN, X. G.; KONG, M.; LIU, C. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 76, n. 1, p. 17-22, 2009.

7 CONCLUSÃO GERAL

- A microfiltração foi efetiva para concentração dos carotenoides totais e ácidos anacárdicos (trieno, dieno e monoeno) no material retido, sendo esses compostos concentrados cerca de 13, 2 e 4 vezes, respectivamente. Além disso, todas as etapas do processo de obtenção do ECC causaram alterações nos parâmetros de cor e nos teores de carotenoides totais e polifenóis extraíveis totais. Porém, exceto para a etapa de microfiltração, os teores de AA não foram influenciados por nenhuma das etapas de obtenção do ECC. Os polifenóis, por sua vez, apresentaram maior afinidade na fração permeada, apresentando apenas traços no ECC.

- O emprego do menor tempo (30 minutos) para o tratamento térmico e a ausência dos estabilizantes carboximetilcelulose, goma de cajueiro e lecitina foram melhores para a estabilidade do ECC. Além disso, o ECC pode ser armazenado sem refrigeração, preferencialmente em embalagens de vidro, sendo sua cor indiferente, e é mais compatível com matrizes ácidas. A cor do ECC é afetada por condições de pH (2,5 a 7,0) e temperatura (60 a 90°C), sendo os maiores efeitos causados por condições mais alcalinas de pH e temperaturas mais elevadas. Isso limita a aplicação do ECC, como corante natural, em algumas matrizes alimentares, especialmente aquelas que possuem pH em torno da neutralidade e utilizam em seu processamento temperaturas mais elevadas. Por outro lado, pode ser empregado, sem perdas significativas de suas características, em uma ampla gama de produtos alimentícios, principalmente os de alta acidez, a base de frutas ou bebidas lácteas, e submetidos a tratamento térmico brando.

- Foi possível encapsular e otimizar o processo de encapsulação utilizando GC e M com condições ótimas de processo em 150 °C e 5% de goma de cajueiro e em 150 °C e 3,5% de maltodextrina. Utilizando esses parâmetros, as microcápsulas dos pós obtidos apresentaram paredes contínuas, arredondadas, sem fissuras e rachaduras. Entretanto, a microcápsula de GC apresentou diâmetros maiores e maior quantidade de pontos de retração da superfície.

- Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que ECC-L, ECC-M e ECC-GC são considerados seguros, uma vez que não alteraram a atividade locomotora do zebrafish adulto (*Danio rerio*) e não se mostraram tóxicos nem mesmo para 96h de análise. Em relação à atividade antiproliferativa, todas as amostras foram inativas ($IC_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e não interferiram na proliferação da célula em tecido normal (mucosa da pele). Além disso, os

resultados deste estudo mostraram também que os extratos obtidos de caju (*Anacardium occidentale*, L.) representam uma fonte potencial de compostos antimicrobianos. No entanto, esses dados reforçam a importância de mais estudos para elucidar os mecanismos celulares envolvidos na atividade antimicrobiana desses produtos.

8 SUGESTÕES FUTURAS

- Realizar estudo do fracionamento do ECC, através de cromatografia contracorrente, com relação aos carotenoides presentes, permitindo a obtenção de compostos purificados em grande escala.
- Testar outros estabilizantes como carragena, alginato, caseína, goma guar, goma Jataí e goma xantana no extrato concentrado de caju.
- Realizar secagem do extrato concentrado de caju (ECC) por liofilização com uso de agentes encapsulantes.
- Realizar estudos para elucidar os mecanismos celulares envolvidos na atividade antimicrobiana do ECC-L.
- Explorar outras potencialidades biológicas para uso do ECC como, por exemplo, atividade antiinflamatória e atividade gástrica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. A. P. de. **Etude d' un procede intégrant la microfiltration tangentielle pour la production d' extraits concentrés en caroténoïdes à partir de pomme de caju (*Anacardium occidentale L.*)**. Tese de Doutorado, Université Montpellier 2 Sciences et Techniques, França, 2012.
- ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M; DIONISIO, A. P; CARAIL, M; CARIS-VEYRAT, C; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) extract from by-product of juice processing: a focus on carotenoids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 25-31, 2013a.
- ABREU, F. A. P. de; DORNIER, M.; PALLET, D.; REYNES, M.; VAILLANT, F.; FURLANI, F. C. T. **Processo de concentração e purificação de extrato obtido a partir de resíduos de pseudofruto de caju e produto de elevado teor de carotenoides**. Pedido Internacional no PCT/BR2013/000130. Instituição promotora/financiadora: Embrapa/CIRAD, 2013b.
- ACHANATH, R.; SRINIVAS, M.; RAMADOS, C.S.; CANDADAL, S. **Antimicrobial derivatives of anacardic acid and process for preparing the same**. U.S, Patente n. 8, v. 338, p.638, 2012.
- ADITIVOS E INGREDIENTES. **Os corantes alimentícios**. Revista Aditivos e Ingredientes, n. 62, p. 7-20, 2009. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/edicoes_materias.php?id_edicao=39> Acesso em: 16 jul. 2018.
- ADITIVOS E INGREDIENTES. **Uso de corantes artificiais em alimentos: legislação brasileira**. Revista Aditivos e Ingredientes, n. 122, p. 32-37, 2015. Disponível em: <http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201601/2016010903353001453481886.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2018.
- AGOSTINI-COSTA, T.S.; JALES, K.A.; ABREU, L.N.; ROSSETTI, A.G.; SILVEIRA, E.R. Determinação de ácido anacárdicos em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 5, n. 2, p-77-81, 2003.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A.; GARRUTI, D. S.; PADILHA, V. A.; LIMA, J. B.; AGUIAR, M. J.; PAIVA, J. R. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale var. nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1075-1080, 2004.
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, [s.l.], v. 92, p. 88-98, 2013.
- AMAN, S.; NAIM, A.; SIDDIQI, R.; NAZ, S. Antimicrobial polyphenols from small tropical fruits, tea and spice oilseeds. **Food Science and Technology International**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 241-251, 2015.

- AHMED, J; SHIVHARE, U. S.; SANDHU, K. S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. **Food Engineering and Physical Properties**, [s.l.], v. 67, n. 7, 2002.
- AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 34, p. 206-213, 2017.
- ALVES, I. A. **Obtenção de extrato de carotenoides de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) encapsulado pelo método de secagem por atomização**. 2014. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- ANASTÁCIO, L. de B.; OLIVEIRA, D. A.; DELMASCHIO, C. R.; ANTUNES, L. M. G.; CHEQUER, F. M. D. Corantes alimentícios amarantho, eritrosina B e tartrazina, e seus possíveis efeitos maléficos à saúde humana. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 16-30, 2016.
- ANDRADE, K. C. S.; DE CARVALHO, C. W. P.; TAKEITI, C. Y.; DE AZEREDO, H. M. C.; CORRÊA, J. da S.; CALDAS, C. M. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): Avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros**, [s.l.], v. 23, n. 5, p. 667-671, 2013.
- ARAÚJO, T. S. L.; COSTA, D. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K. M.; DE ARAÚJO, S.; OLIVEIRA, A. P.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 174, p. 299-307, 2015.
- ARELLANO-AGUIAR, O.; SOLIS-ANGELES, S.; SERRANO-GARCIA, L.; MORALES-SIERRA, E.; MENDEZ-SERRANO, A.; MONTERO-MONTOYA, R. (2015). Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheriesciences.com**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 52-62, 2015.
- AREND, G. D. **Concentração de compostos fenólicos do suco de morango por nanofiltração**. 2016.119p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- AROCAS, A.; VARELA, P.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; SALVADOR, A.; HEREDIA, F. J.; FISZMAN, S. M. Differences in colour gamut obtained with three synthetic red food colourants compared with three natural ones: pH and heat stability. **International Journal of Food Properties**, [s.l.], v. 16, p. 766-777, 2013.
- ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 413-435, 1993.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 81, p. 495-502, 2003.

ÁVILA, E. L.; RODRÍGUEZ, M. C.; VELÁSQUEZ, H. J. C. Influence of maltodextrin and spray drying process conditions on sugarcane juice powder quality. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 7509-7520, 2015.

AYHAN, Z.; YEOM, H. W.; ZHANG, Q. H.; MIN, D. B. Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 2, p. 669–674, 2001.

AZEREDO, H. M. C. de. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BAKOWSKA-BARCZAK, A. M.; KOŁODZIEJCZYK, P. P. Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 1301-1309, 2011.

BARBOSA, M. I. M. J.; BORSARELLI, C. D.; MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Research International**, [s.l.], v. 38, n. 8-9, p. 989–994, 2005.

BARROS, A. A. de; BARROS, E. B. de P. **A química dos alimentos: produtos fermentados e corantes**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, Coleção Química no Cotidiano, v. 4, 2010. 88p. Disponível em:
<http://www.ciencias.seed.pr.gov.br/arquivos/File/sugestao_leitura/51quimica_alimentos.pdf
> Acesso em: 16/08/2018.

BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. **Avaliação da toxicidade**. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BEATTY, S.; KOH, H. H.; HENSON, D.; BOULTON, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Survey Ophthalmology**, [s.l.], v. 45, p. 115-134, 2000.

BECK-BROICHSITTER, M.; SCHMEHL, T.; SEEGER, W.; GESSLER, T. Evaluating the controlled release properties of inhaled nanoparticles using isolated, perfused, and ventilated lung models. **Journal of Nanomaterials**, [s.l.], p. 1-16, 2011.

BCC RESEARCH. **The global market for carotenoids**. BCC Research Report Overview. Disponível em:
<https://cdn2.hubspot.net/hubfs/308401/FOD%20Report%20Overviews/FOD025F%20Report%20Overview.pdf?t=1537182142888&utm_campaign=FOD025F&utm_source=hs_automation&utm_medium=email&utm_content=62915556&_hsenc=p2ANqtz-_sxnVnBG4OCFaqlFSA2hWloKao6uU-nSFmkcTyslhV3IRRxUQ1LqMoUZf2q_AQsvrjHQoiXQIIKRQhQeISjDWhYdEQQ&_hsmi=62915556>. Acesso em: 17/09/2018.

BELLEVILLE, M. –P.; PAOLUCCI-JEANJEAN, G.; RIOS, D. M. **Membrane bioreactors and the production of food ingredients**. In: Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2013. p. 314-337.

BENNEH, C. K.; BINEY, R. P.; MANTE, P. K.; TANDOH, A.; ADONGO, D. W.; WOODE, E. *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 207, p. 129-145, 2017.

BHAKYARAJ, R.; SINGARAVADIVE, K. Minerals and bioactive compounds in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Research Science**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 32-36, 2012.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; D'ARCY, B. R.; RINTOUL, G. B. Co-crystallization of honey with sucrose. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 31, n. 2, P. 138-142, 1998.

BOON, C. S.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews and Food Science Nutrition**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 515-32, 2010.

BONA, E. A. M. de; PINTO, F. G. da S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 126, n. 3, p. 369–381, 2006.

BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.; FERNANDES, R. V. DE B.; ANTONIASSI, R.; DE FARIA-MACHADO, A. F.; FEITOSA, J. P. DE A.; DE PAULA, R. C. M. Application of cashew tree gum on the production and stability of spray-dried fish oil. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 221, p. 1522–1529, 2017.

BOWEN, P. E.; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; DIWADKAR-NAVSARIWALA, V. **Carotenoids in human nutrition**. In: Chen, C. (ed), *Pigments in fruits and vegetables: genomics and dietetics*. Springer Science+Business Media, New York, p. 31-67, 2015.

BRASIL. Informe técnico N° 30, de 24 de julho de 2007. **Considerações sobre o corante amarelo tartrazina**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+30%2C+de+24+de+julho+de+2007/d47a1fea-fd03-4e94-8dff-fd87d3b1296a>>. Acesso em: 04/10/2018.

BRASIL. Decreto n° 50.040, de 24 de janeiro de 1961. Dispõe sobre as Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 de jan. 1961.

BRASIL. Resolução n° 44 - CNNPA, de 25 de novembro de 1977. Estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos (e bebidas). **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de fevereiro de 1978.

BRASIL. Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out. 1997.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 382 a 388 – ANVISA/MS, de 5 de agosto de 1999. Regulamentos Técnicos para o uso de Aditivos Alimentares. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 ago. 1999.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 259 - ANVISA/MS, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2002.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 340 – ANVISA/MS, de 13 de dezembro de 2002. As empresas fabricantes de alimentos que contenham na sua composição o corante tartrazina (INS 102) devem obrigatoriamente declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 dez. 2002.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 272 – ANVISA/MS, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o “**Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis**”. **Diário Oficial da União**, Brasília: ANVS, 2005.

BRIGGS, JP. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s.l.], v. 282, p. 3-9, 2002.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. de; SILVA, A. M. de O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. Ed. Porto Alegre: Artmed McGraw Hill Brasil, 2012. 2112p.

CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. **Journal of Unexplored Medical Data**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 1-14, 2018.

CAI, Y.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 2000.

CAMPOS, D. A.; RIBEIRO, A. C.; COSTA, E. M.; FERNANDES, J. C.; TAVARIA, F. K.; ARARUNA, F. B.; EIRAS, C.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. M. Study of Antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 90, p. 270–274, 2012.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional

characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s.l.], v. 6, p. 420-428, 2005.

CANO-HIGUITA, D. M.; MALACRIDA, C. R.; TELIS, V. R. N. Stability of curcumin microencapsulated by spray and freeze drying in binary and ternary matrices of maltodextrin, gum arabic and modified starch. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.l.], v. 39, p. 2049 – 2060, 2015.

CALEGUER, V. F.; BENASSI, M. T. Efeito da adição de polpa, carboximetilcelulose e goma arábica nas características sensoriais e aceitação de preparados em pó para refresco sabor laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 270-277, 2007.

CARVALHO, A. L.; ANNONI, R.; SILVA, P. R.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; TREVISAN, M. T.; MAUAD, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.

CARVALHO, A. L. N.; ANNONI, R.; TORRES, L. H. L.; DURÃO, A. C. C. S.; SHIMADA, A. L. B.; ALMEIDA, F. M.; HEBEDA, C. B.; LOPES, F. D. T. Q. S. L.; DOLHNIKOFF, M.; MARTINS, M. A.; SILVA, L. F. F.; FARSKY, S. H. P.; SALDIVA, P. H. N.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W.; MARCOURAKIS, T.; TREVISAN, M. T. S.; MAUAD, T. Anacardic acids from cashew nuts ameliorate lung damage induced by exposure to diesel exhaust particles in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], p. 1-13, 2013.

CARVALHO, A. L. N. **Efeitos dos ácidos anacárdicos no sistema respiratório de camundongos submetidos a instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel**. 2011. 74p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

CARVALHO, J. E. de. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. Divisão de Farmacologia e Toxicologia CPQBA/Unicamp. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, [s.l.], #7, 2006.

CARVALHO, N. S.; SILVA, M. M.; SILVA, R. O.; NICOLAU, L. A. D.; SOUSA, F. B. M.; DAMASCENO, S. R. B.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A. MEDEIROS, J. V. R. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, [s.l.], v. 76, p. 143-151, 2015.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁNVIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 113, p. 859-871, 2009.

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

CHANG, Y. I.; SCIRE, J.; JACOBS, B. **Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated Orange oil**. In: Flavor encapsulation. Nova Iorque, Fritzsche Dodge & Olcott, v. 370, 1988.

CHAPARRO, L.; DHUIQUE-MAYER, C.; CASTILLO, S.; VAILLANT, F.; SERVENT, A.; DORNIER, M. Concentration and purification of lycopene from watermelon juice by integrated microfiltration-based processes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s.l.], v. 37, p. 153-160, 2016.

CHAPARRO, L.; CASTILLO, S.; VAILLANT, F.; SERVENT, A.; DORNIER, M. Efecto de la microfiltración y diafiltración em el contenido de carotenoides y compuestos aromáticos del jugo de sandía (*Citrullus lanatus* L.). **Bioagro**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 185-196, 2017.

CHEN, B. H.; PENG, H. Y.; CHEN, H. E. Changes of carotenoids, colour, and vitamin A contents during processing of carrot juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 43, p. 1912–1918, 1995.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. M02-A12, 12th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI, R. J. Gavaging adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, [s.l.], v. 78 (e50691), p. 1-5, 2013.

CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal): **Diretrizes da Prática de Eutanásia**. Resolução Normativa No 37, de 15 de fevereiro / 2018. www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf.

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

CORREIA, J. A.C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P.; Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: study of parameters. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 139, p. 249–256, 2013.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agentes. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAI, Y. -J.; JIA, Y. -F.; CHEN, N.; BIAN, W. -P.; LI, Q. -K.; MA, Y. -B.; CHEN, Y. -L.; PEI, D. -S. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 11–17, 2014.

DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I.; MARRÍN-ARROYO, M. R. Optimization of a wall material formulation to microencapsulae a grape seed extract using a mixture design of experiments. **Food and Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 6, p. 941-951, 2013.

DEL-VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DIOGENES, M. J. N.; MARAIS, S. M.; CARVALHO, F. F. Contact dermatitis among cashew nut workers. **Contact Dermatitis**, [s.l.], v.35, p.114-115, 1996.

DIONISIO, A. P.; ABREU, F. A. P. de; BRITO, E. S. de; WURLITZER, N. J.; RIBEIRO, P. R. V.; GOES, T. de S.; SOUSA, J. M. S.; IUNES, M. F.; LIMA, A. C. V. de; OIRAM FILHO, F. Extrato concentrado de carotenoides obtido da fibra do pedúnculo de caju: avaliação da toxicidade com uso do bioensaio de *Artemia salina*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 162, 2018.

DORDEVIĆ, V; BALANČ, B; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A; LEVIĆ, S; TRIFKOVIĆ, K; KALUŠEVIĆ, A; KOSTIĆ, I; KOMES, D; BUGARSKI, B; NEDOVIĆ, V. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. **Food Engineering Reviews**, [s.l.], v. 7, p. 452-490, 2015.

DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 2, n. 19, p. 1-21, 2004.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Divisão de Microbiologia CPQBA/Unicamp. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, [s.l.], n. 7, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2018.

DUTRA, A. S.; FURTADO, A. A. L.; PACHECO, S.; OIANO NETO, J. Efeito do tratamento térmico na concentração de carotenoides, compostos fenólicos, ácido ascórbico e capacidade antioxidante do suco de tangerina murcote. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 198-207, 2012.

EKAMBARAM, S. P.; PERUMAL, S. S.; PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 147-158, 2017.

EL-WAHAB, H. M. F. A.; MORAM, G. S. E-D. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. **Toxicology and Industrial Health**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 224-232, 2012.

ERŞAN, S.; GÜÇLÜ ÜSTÜNDAĞ, O.; CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. M. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (Exo- and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS n. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 26, p. 5334-5344, 2016.

FERRARI, C. C.; RIBEIRO, C. P.; AGUIRRE, J. M. Secagem por atomização de polpa de amora-preta usando maltodextrina como agente carreador. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 157-165, 2012.

FERREIRA, J. E. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Degradation of lycopene and beta-carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: kinetics, structure, and matrix effects. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 78, p. C589-C594, 2008.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, p. 1800-1809, 2013.

FIGUEIREDO R. W. de; LAJOLO, F. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Physical-chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during development and maturation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 77, p. 343-347, 2002.

FITZPATRICK, J. J. (2005). Food powder flowability. In: **Encapsulated and Powdered Foods** (edited by C. Onwulata). Pp 247-260. Boca Raton, USA:Taylor & Francis.

FREITAS, A. S. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 65-72, 2012.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Corantes. Dossiê corantes**, n. 9, p. 40-59, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2015.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Estabilizantes**. Food Ingredients Brasil, n. 14, p. 42-48, 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/145.pdf>>. Acesso em: 28/08/18.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **A nova tendência no mercado de corantes**. Food Ingredientes Brasil, n. 18, p. 52-54, 2011. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/189.pdf>>. Acesso em: 16 de julho de 2018.

FRANCIS, F. J. Quality as influenced by color. **Food Quality and Preference**, [s.l.], v. 6, p. 149-155, 1995.

FRAZIER, J. M. **In vitro Toxicity testing. Applications to safety evaluation**, New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, p. 300.

FREITAS, C.; A. S.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M.; FERNANDES, A. G. Estabilidade dos carotenoides, antocianinas e vitamin C presentes no suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) adoçado envasado pelos processos hot-fill e asséptico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 942-949, 2006.

GEA Niro Research Laboratory. GEA Niro analytical methods. Disponível em: <<http://www.niro.com/methods>>. Acesso em: 23 de maio de 2018.

GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A. L.; SCHAEFER, I. C.; BONAN, C. D.; LARA, D. R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, [s.l.], v. 99, p. 480-486, 2011.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, [s.l.], v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GIBBS, B.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s.l.], v. 50, p. 213-224, 1999.

GOES, T. de S. **Extrato concentrado de carotenoides obtido a partir da fibra do pedúnculo de caju: caracterização, estabilidade durante o período de armazenamento e aplicações em produtos lácteos**. 2017. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11a Ed. Porto Alegre: AMGH, 2010, 1821p.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends Food Science Technology**, [s.l.], v. 15, p. 330–347, 2004.

GOYAL, A.; SHARMA, V.; SIHAG, M. K.; TOMAR, S. K.; ARORA, S.; SABIKHI, L.; SINGH, A. K. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated flaxseed oil powder: a functional ingredient for omega-3 fortification. **Powder Technology**, [s.l.], v. 286, p. 527-537, 2015.

GREEN, I. R.; TOCOLI, F. E.; LEE, S. H.; NIHEI, K.; KUBO, I. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, p. 6236-6241, 2007.

HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 8569–8590, 2015.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; SILVA, B. V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.

HAMMER, K. A; CARSON, C. F; RILEY, T. V; Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 86, p. 985-990, 1999.

HARLITA., N. H.; SATUTI, N.; SAGI, M.; ASTUTI, P. Acute toxicity of cashew nut shell extract (*Anacardium occidentale* L.) in albino rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout 1769). **Pakistan Journal of Biological Science**, [s.l.], v. 19, p. 89-94, 2016.

HEMSHEKHAR, M.; SANTHOSH, M. S.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s.l.], v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012.

HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natura and carotene – fortified orange juice. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 27, p. 42-49, 1962.

- HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.
- HIRATA, R.; SOUZA, W. V.; PESSOAL, L. Anais do Simpósio sobre hidrocolóides. Campinas, Brasil, 1991.
- HOLLANDS, A.; CORRIDEN, R.; GYSLER, G.; DAHESH, S.; OLSON, J.; ALI, S. R.; KUNKEL, M. T.; LIN, A. E.; FORLI, S.; NEWTON, A. C.; KUMAR, G. B.; NAIR, B. G.; PERRY, J. J. P.; NIZET, V. Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates neutrophil extracellular trap production and bactericidal activity. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 291, n. 27, p. 13964–13973, 2016.
- HOOTON, S. P. T.; ATTERBURY, R. J.; CONNERTON, I. F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 151, p. 157–163, 2011.
- HSIEH, C.-C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; LUMEN, B. O. de. Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 125, p. 630-636, 2011.
- HUANG, Y.; ZHANG, J.; HAN, X.; HUANG, T. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 11, p. 3650-3660, 2014.
- HUNDT, J.; ZHUBING, L.; LIU, O. The Inhibitory Effects of Anacardic Acid on Hepatitis C Virus Life Cycle. **PloS One**, [s.l.], DOI:10.1371/journal.pone.011751, p. 1-11, 2015.
- ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 90, p. 33-39, 2004.
- JAESCHKE, D. P.; MARCZAK, L. D. F.; MERCALI, G. D. Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 199, p. 128-134, 2016.
- JAJA-CHIMEDZA, A.; SANCHEZ, K.; GANTAR, M.; GIBBS, P.; SCHMALE, M.; BERRY, J. P. Carotenoid glycosides from cyanobacteria are teratogenic in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. **Chemosphere**, [s.l.], v. 174, p. 478-489, 2017.
- JERZ, G.; MURILLO-VELÁSQUEZ, J.A.; SKRJABIN, I.; GOK, R.; WINTERHALTER, P. (2012). **Anacardic acid profiling in cashew nuts by direct coupling of preparative High-Speed Countercurrent Chromatography and Mass Spectrometry (prep HSCCC-ESI-/APCI-MS/MS)**. In: Recent advances in the analysis of food and flavors. American Chemical Society, p. 145-165.
- JESPERSEN, L.; STROMDAHL, L. D.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. **European Food Research and Technology**, [s.l.], v. 220, p. 261-266, 2005.

JOHANN, S. **Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos**. 2003. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KANG, M. C.; AHN, G.; YANG, X.; KIM, K. N.; LEE, S. H.; KO, S. C. Hepatoprotective effects of dieckol-rich phlorotannins from *Ecklonia cava*, a brown seaweed, against ethanol induced liver damage in BALB/c mice. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 1986-1991, 2012.

KANG, M. C.; CHA, S. H.; WIJESINGHE, W. A.; KANG, S. M.; LEE, S. H.; KIM, E. A.; SONG, C. B.; JEON, Y. J. Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryo. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, n. 2-3, p. 950-955, 2013.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s.l.], v. 82, n.1. 2007.

KEY, T. J. Fruit and vegetables and cancer risk. **British Journal of Cancer**, [s.l.], v. 104, p. 6-11, 2011.

KING, T.; DYKES, G.; KRISTIANTI, R. Comparative evaluation methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. **Journal of AOAC International**, [s.l.], v. 91, n. 6, p. 1423-1429, 2008.

KOBORI, C. N. **Composição e estabilidade de carotenoides em alimentos**. 2010. 217 f. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A. da; GOZZO, F. C.; SOUZA, A. Q. L. de; DE SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, [s.l.], v. 51, p. 467-473, 2013.

KOUSHAN, K.; RUSOVICI, R.; LI, W.; FERGUSON, L. R.; CHALAM, K. V. The role of lutein in eye-related disease. **Nutrients**, [s.l.], v. 5, p. 1823-1839, 2013.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HÁ, T. J.; TSUJIMOTO, K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 99, n. 33, p. 555-562, 2006.

KUBO, I.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 51, p. 7624-7628, 2003.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 41, p. 1016-1019, 1993.

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-helicobacter pylori agentes from the cashew apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 47, p. 533-537, 1999.

KURTA, A.; PALESTIS, B. G. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). **Dose-Response**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 527-533, 2010.

LAPA, A. J. 1999. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Simões C. M. O. (Ed). Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, pp.181-196.

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

LEITE, A. de S.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L. da S. O.; GOMES JÚNIOR, A. L.; LIMA, S. G. de L.; CITÓ, A. M. das G. L.; FREITAS, R. M. de; MELO-CAVALCANTE, A. A. de C.; LOPES, J. A. D. L. Evaluation of toxic, cytotoxic, mutagenic, and antimutagenic activities of natural and technical cashew nut shell liquids using the *Allium cepa* and *Artemia salina* bioassays.(Research Article)(Report). **BioMed Research International**, [s.l.], p. 1-16, 2015.

LEÓN-MARTÍNEZ, F. M.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J.; MEDINA-TORRES, L. L.; MÉNDEZ-LAGUNAS, L. L.; BERNAD-BERNAD, M. J. Effects of drying conditions on the rheological properties of reconstituted mucilage solutions (*Opuntia ficus-indica*). **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 84, p. 439-445, 2011.

LIESCHKE, J. G.; CURRIE, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews-Genetics**, [s.l.], v. 8, n.5. 2007.

LIMA, C. A. de A. **Estudos dos ácidos anacárdicos do óleo da casca de castanha de caju (CNSL) (*Anacardium occidentale* L.) dos clones de cajueiro anão precoce CCP 076 e CCP 09 em cinco estágios de maturação**. 1999. 184f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

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

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: the büchi nano spray dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 147, n. 2, p. 304-310, 2010.

LOU, Z.; WANG, H.; RAO, S.; SUN, J.; MA, C.; LI, J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, [s.l.], v. 25, p. 550-554, 2012.

MACHADO, T. F.; NOGUEIRA, N. A. P.; PEREIRA, R. de C. A.; SOUSA, C. T. de; BBATISTA, V. C. V. Atividade antimicrobiana do óleo essencial da erva-cidreira. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. 60, 2012.

MAIANI, G.; CASTÓN, M. S.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I. G.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; VOLOTI, M.; BÖHM, V.; MAYER-HIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U.

Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition e Food Research**, [s.l.], v.53, n.2, p.194-218, 2009.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region. **Brazilian Journal Microbiology**, [s.l.], v.38, n.1, p. 65-70, 2007.

MAGALHÃES, F. E. A.; SOUSA, C. A. P. B. de; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, A.O.; OLIVEIRA, M. V. de; MOURA, L. F. W. G.; RAPOSO, R. S.; CAMPOS, A. R. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, [s.l.], v. 4, n. 5, p. 422-429, 2017.

MAGALHÃES NETTO, F. Influência da atividade de água na temperatura vítrea. In: JARDIM, D. C. P., GERMER, S. P. M. **Atividade de água em alimentos**. Campinas: ITAL, p. 4-14, 1997.

MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**, [s.l.], v. 457, p. 36-37, 2009.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclo dextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (Supl), p. 102-105, 2003.

MATTISON, C. P.; CAVALCANTE, J.M.; GALLÃO, M. I.; DE BRITO, E. S. Effects of industrial cashew nut processing on anacardic acid content and allergen recognition by IgE. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 240, p. 370-376, 2018.

MAYNE, S. T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 10, p. 690-701, 1996.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los pigmentos carotenóides em los alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.54, n. 2, p.209-215, 2004. Disponível em: <<https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/26409/Estabilidad%20de%20los%20pigmentos%20carotenoides%20en%20los%20alimentos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 15/12/17.

MICHODJEHOUN-MESTRE, L.; SOUQUET, J.-M.; FULCRAND, H.; BOUCHUT, C.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.-M. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 112, n. 4, p. 851-857, 2009.

MOKRZYCKI, W.; TATOL, M. **Color difference delta E: a survey. Machine Graphics and Vision**, Warszawa, v. 20, n. 4, p. 383-411, 2011. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/236023905_Color_difference_Delta_E_-_A_survey>. Acesso em: 15/12/17.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.;

- CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 83, p. 757-766, 1991.
- MORADI-AFRAPOLI, F.; MERWE, H. V. D.; MIERI, M. D.; STADLER, A. W.; STADLER, S.; ZIETSMAN, P. C.; HERING, S.; SWART, K.; HAMBURGUER, M. HPLC-Based activity profiling for GABAA receptor modulators in *Searsia pyroides* using a larval zebrafish locomotor Assay*. **Planta Medica**, [s.l.], v. 83, p. 1169–1175, 2017.
- MORAIS, S. M.; SILVA, K. A.; ARAUJO, H.; VIEIRA, I. G.; ALVES, D. R.; FONTENELLE, R. O.; SILVA, A. M. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 31, 2017.
- MOREIRA, G. E. G.; COSTA, M. G. M.; DE SOUSA, A. C. R.; DE BRITO, E. S.; DE MEDEIROS, M. DE F. D.; DE AZEREDO, H. M. C. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. **LWT – Food Science and Technology**, [s.l.], v. 42, p. 641-645, 2009.
- MOTTI, P. R.; PORTO, K. R. A.; ROEL, A. R. Toxicidade da formulação obtida a partir do líquido da castanha do caju *Anacardium occidentale* L. em *Artemia salina* Leach. **Multitemas**, Campo Grande, n. 47, p. 9-19, 2015.
- MOUTINHO, I. L. D., BERTGES, L. C. & ASSIS, R. V. C. Prolonged use of the food dye tartrazine and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 141–145, 2007.
- MUROI, H.; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, [s.l.], v. 80, p. 387–394, 1996.
- MURUGESAN, R.; ORSAT, V. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients – A review. **Food and Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 5, n1, p. 3-14, 2012.
- MUZAFFAR, S.; BOSE, C.; BANERJI, A.; NAIR, B. G.; CHATTOO, B. B. Anacardic acid induces apoptosis-like cell death in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 100, p.323–335, 2016.
- NARASIMHAN, B.; PANGHAL, A.; SINGH, N.; DHAKE, A. S. Efficiency of anacardic acid as preservative in tomato products. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.l.], v. 32, p. 600–609, 2008.
- NETO, L.; MATOS, N.; GONZAGA, W.; ROMEIRO, L.; SANTOS, M.; SANTOS, D.; MOTOYAMA, A. Characterization of cytotoxic activity of compounds derived from anacardic acid, cardanol and cardol in oral squamous cell carcinoma. **BioMed Central Proceedings**, [s.l.], v. 8 (suppl 4), p.30, 2014.
- NORBRILLINDA, M. T.; MAHANOH, H.; ELYANA, N. N.; FARINA, S. N. I. Optimization of spray drying process of *Sargassum muticum* color extract. **Drying Technology**, [s.l.], v. 34, n. 14, p. 1735-1744, 2016.

NORI, M. Ingredientes e aditivos microencapsulados na indústria de alimentos. **Engenharia de Alimentos**, [s.l.], n. 9, p. 33-35, 1996.

NUNES, G. L.; BOAVENTURA, B. C. B.; PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. de M. C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 151, p. 60 – 68, 2015.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development): **Guideline for testing acute toxicity in fishes** No 203. 1992. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>>. Acessado em: 10/10/2018.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guideline 423: **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**, 2001. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071001-en.pdf?expires=1534416411&id=id&accname=guest&checksum=83B9FF7DB1717DCAF9E9639E4BEAFBC7>>. Acesso em: 16/08/2018

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guideline 452: **Chronic Toxicity Studies**, 2018. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071209-en.pdf?expires=1534416128&id=id&accname=guest&checksum=C6BEDF7D32BBC28B3C27CC2818CB7E29>>. Acesso em: 16/08/2018.

ODRIOZOLA-SERRANO, G.; OMS-OLIU, R.; SOLIVA-FORTUNY, O.; MARTÍN-BELLOSO. **Carotenoids in Nonthermally Treated Fruit Juices**. In: Processing and impact on active components in food, p. 637-642, 2015.

OIRAM FILHO, F; ALCÂNTARA, D. B; RODRIGUES, T. H. S; SILVA, L. M. A; SILVA, E. O; ZOCOLO, G. J; BRITO, E. S. Development and validation of reversed phase HPLC method for determination of anacardic acids in cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Chromatographic Science**, [s.l.], v. 56, n.4, p. 300-306, 2018.

OLIVEIRA, A.; GOMES, M. H.; ALEXANDRE, E. M. C.; ALMEIDA, D. P. F.; PINTADO, M. Impact of pH on the phytochemical profile of pasteurized peach puré e during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, p. 12075–12081, 2014.

OLIVEIRA, D. A. de. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah**. 2010. 209p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

OLIVEIRA, D. da S.; MATA, G. M. S. C.; LUCIA, C. M. D.; CAMPOS, F. M.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Influência da embalagem e estocagem no conteúdo de beta-caroteno e ácido ascórbico em suco de manga “Ubá” industrializado. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 191-198, 2010.

OLIVEIRA, M. A. DE O.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; DE SOUZA, A. C. R.; DE BRITO, E. S.; DE AZEREDO, H. M. C. Addition of cashew tree gum to maltodextrin-based

carriers for spray drying of cashew apple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 44, p. 641-645, 2009.

OLIVEIRA, M. S. C.; MORAIS, S. M.; MAGALHÃES, D. V.; BATISTA, W. P.; VIEIRA, I. G. P.; CRAVEIRO, A. A.; MENEZES, J. E. S. A.; CARVALHO, A. F. U.; LIMA, G. P. G. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 117, p. 165–170, 2010.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

ONWULATA, C.; SWITH, P. W.; CRAIG, J. C.; HOLSINGER, V. H. Physical properties of encapsulated spray-dried milk fat. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 316-320, 1994.

OSORIO, C.; ACEVEDO, B.; HILLEBRAND, S.; CARRIAZO, J.; WINTERHALTER, P.; MORALES, A. L. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 11, p. 6977-6985, 2010.

OTÁLORA, M. C.; CARRIAZO, J. G.; ITURRIAGA, L.; NAZARENO, M. A.; OSORIO, C. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 187, p. 174-181, 2015.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OTÁLORA, M. C.; CARRIAZO, J. G.; ITURRIAGA, L.; NAZARENO, M. A.; OSORIO, C.; Microencapsulation os betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 187, p. 174-181, 2015.

OTHMAN, M.; LOH, H. S.; WIART, C.; KHOO, T. J.; LIM, K. H.; TING, K. N. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 84, p. 161-166, 2011.

PARASA, L. S.; SUNITA, T.; RAO, K. B.; RAO, A. H.; RAO, J. S.; KUMAR, L. C. A. Acetone extract pf cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts shell liquid against methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) by minimum inhibitory concentration (MIC). **Journal Chemical and Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 736-742, 2011.

PELTZER, P. M., LAJMANOVICH, R. C., SÁNCHEZ-HERNANDEZ, J. C., CABAGNA, C. C., ATTADEMO, A. M., BASSÓ, A. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 185-197, 2008.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal Ethnopharmacol**, [s.l.], v. 77, p. 37-40, 2001.

PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A. S. **Advances in the effective application of membrane technologies in the food industry**. 2011. p.180-201. In: Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries. 1. ed. Woodhead Publishing, 2011. 694p.

PLAZA, L.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; ANCOS, B.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O.; CANO, M. P. Carotenoid and flavone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 44, n. 4, p. 834-839, 2011.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T; Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 14, p. 237-250, 2003.

PRWEB, 2011. **Global carotenoids market to reach US\$ 1,3 bilion by 2017**. Disponível em: <http://www.prweb.com/pdfdownload/8849957.pdf>. Acesso em: 13 de dezembro de 2015.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K. –M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 90, p. 494-507, 2001.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; McCLEMENTS, D. J. Physical and chemical stability of b-carotene-enriched nanoemulsions: influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 132, p. 1221-1229, 2012.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 386-392, 2007.

QUELEMES, P. V.; ARARUNA, F B.; DE FARIA, B. E. F.; KUCKELHAUS, S. A. S.; DA SILVA, D. A.; MENDONÇA, R. Z.; EIRAS, C; SOARES, M. J. dos S.; LEITE, J. R. S. A. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 4969-4981, 2013.

QUEIROZ, C.; SILVA, A. J. R.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 125, n. 1, p. 128–132, 2011.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R. A new monothetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona spinesces*. **Natural Products Letters**, [s.l.], v. 13, p. 21, 1999.

RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; RODRIGUEZ, S. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 23, p. 5574-5580, 2009.

RADDE, B. N., ALIZADEH-RAD, N., PRICE, S. M., SCHULTZ, D. J., KLINGE, C. M. Anacardic acid, salicylic acid, and oleic acid differentially alter cellular bioenergetic function in breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 117, p. 2521–2532, 2016.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; MADHUSUDHAN, M. C.; HRISHIKESH T. A.; NIRANJAN, K. **Athermal membrane processes for the concentration of liquid foods and natural colors**. In: Emerging Technologies for Food Processing. 2 ed. Dublin: Academic Press-Elsevier, p. 213-237, 2014.

RAMEL, F.; BIRTIC, S.; CUINÉ, S.; TRIANTAPHYLIDÉS, R. J. L.; HAVAUX, M. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. **Plant Physiology Preview**, [s.l.], v. 158, p. 1267-1278, 2012.

RAMOS, A. M.; QUINTERO, A. C. F.; FARAONI, A. S.; SOARES, N. F. F.; PEREIRA, J. A. M. Efeito do tipo de embalagem e do tempo de armazenamento nas qualidades físico-química e microbiológica de abacaxi desidratado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n.3, p. 259-269, 2008.

RANKELL, A. S.; LIEBERMAN, H. A.; SCHIFFMAN, R. F.; 2001. **Secagem**. In: LACHMAN L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. v. 1. Lisboa: Calouste Gulbenkian, p. 83-112.

RAVICHANDRAN, K.; PALANIRAJ, R.; SAW, N. M. M. T.; GABR, A. M. M.; AHMED, A. R.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 51, p. 2216–2221, 2014.

RAYMOND, E. E.; LARISSA, B. P.; ANDREW, A. R.; DAVID, M. P. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007.

REIS, C. L. B.; SILVA, L. M. A.; RODRIGUES, T. H. S.; FÉLIX, A. K. N.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S. de; CANUTO, K. M.; ROCHA, M. V. P. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 224, p. 694–701, 2017.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, [s.l.], v. 16, p. 1195-1236, 1998.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. V.1: Blucher, São Paulo, 2015, p. 22.

REZVANI, E.; SCHLEINING, G.; TAHERIAN, A. R. Assessment of physical and mechanical properties of orange oil-in-water beverage emulsions using response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, [s.l.], v. 48, p. 82-88, 2012.

RIBEIRO, L. C. **Produção de acerola em pó: métodos de secagem e avaliação da estabilidade**. 2014. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

RIBEIRO, L. O.; PONTES, S. M.; RIBEIRO, A. P. O.; PACHECO, S.; FREITAS, S. P.; MATTA, V. M. Avaliação do armazenamento a frio sobre os compostos bioativos e as características físico-químicas e microbiológicas do suco de umbu pasteurizado. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 20, p. 1-8, 2017.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAW, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 2, p. 127-149, 1988.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. É. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. de; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 974-977, 2012.

ROCHA, É. M. F. F.; SOUSA, S. L.; DA COSTA, J. DE P.; RODRIGUES, S.; AFONSO, M. R. A.; DA COSTA, J. M. C. Obtenção de suco de caju atomizado através do controle das condições de secagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p. 646-651, 2014.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; DE ALBUQUERQUE, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; DE MACHADO, G. R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 243, p. 234-243, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 641-647, 2000.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008, 100p.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. The microstructure of spray-dried microcapsules. **Food Microstructure**, [s.l.], v. 7, p. 15-23, 1988.

RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; BOYD, M. R. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, [s.l.], v. 82, p. 1113-1118, 1990.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PEREZ-JIMENEZ, E. S. J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 121, p. 996-1002, 2010.

SACOMAN, J. L. **Atividade anticancer e mecanismo de morte celular dos extratos brutos e frações de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) e *Pothomorphe umbrellae***

(L.) **Miquel (Piperaceae)**. 2007. 110p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Departamento de Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

SAIDI, E. A.; DAVEY, P. G.; CAMERON, D. J. The effect of zeaxanthin on the visual acuity of zebrafish. **Plos One**, [s.l.], DOI: 10.1371/journal.pone.0135211, 2015.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, [s.l.], v. 76, p. 735-750, 2015.

SAMPAIO, K. A.; AYALA, J. V.; SILVA, S. M.; CERIANI, R.; VERHÉ, R.; MEIRELLES, A. J. A. Thermal degradation kinetics of carotenoids in palm oil. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, [s.l.], v.90, p. 191–198. 2013.

SANCHO, S. O.; MAIA, G. A.; DE FIGUEIREDO, R. W.; RODRIGUES, S.; DE SOUSA, P. H. M. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 878-882, 2007.

SANTANA, A. A.; PAIXÃO, L. C.; DE OLIVEIRA, R. A.; TELIS, V. R. N. Influence of process conditions on the physicochemical properties of jussara pulp (*Euterpe edulis*) poder produced by spray drying. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s.l.], v. 21, e2015085, 2018.

SANTIPANICHWONG, R.; SUPHANTHARIKA, M. Carotenoids as colorants in reduced fat mayonnaise containing spent brewer's yeast β -glucan as a fat replacer. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 21, p. 565-574, 2007.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; GEORGE, D. S.; SOMASUNDRAM, C. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Food and Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 94, p. 313-321, 2015.

SANTOS, A. B. **Encapsulação de oleoresina de páprica por atomização em goma arábica e em aglomerados porosos de amido/gelatina:Estabilidade e aplicação**. 2003. 173p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SANTOS, A. B. dos; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F.; Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 322-326, 2005.

SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, R. P.; FREIRE, V. N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 79, n. 4, p. 1432-1437, 2007.

SCHIRATO, G. V.; MPNTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. de O.; LIMA FILHO, J. L. de; LEÃO, A. M. dos A. C.; PORTO, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase

inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 149-154, 2006.

SCHULTZ, D. J.; WICKRAMASINGHE, N. S.; IVANOVA, M. M.; ISAACS, S. M.; DOUGHERTY, S. M.; IMBERT-FERNANDEZ, Y.; CUNNINGHAM, A. R.; CHEN, C.; KLINGE, C. M. Anacardic acid inhibits estrogen receptor alpha-DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 594–605, 2010.

SEONG, Y.-A.; SHIN, P.-G.; YOON, J.-S.; YADUNANDAM, A. K.; KIM, G.-D. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 68, n. 2, p. 369-377, 2014.

SHARMA, R.; KISHORE, N.; HUSSEIN, A.; LALL, N. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. **BMC Complementary Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 292, p. 1-10, 2013.

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

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 6, p. 813-826, 2006.

SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural Colorants: food colorants from natural sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 8, p. 261-280, 2017.

SILVA, B. C. **Estudo físico-químico das propriedades emulsificantes dos polissacarídeos de goma de acácia-negra oriunda de plantações brasileiras**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

SILVA, P. I.; STRINGHETA, P. C.; TEÓFILO, R. F.; DE OLIVEIRA, I. R. N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 117, p. 538-544, 2013.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: Modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 2, 2012.

SILVEIRA, A. A. B.; OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Beta-caroteno e astaxantina – características e importância: uma revisão. **Revista Eletrônica Interdisciplinar de Saúde e Educação – RISE**, [s.l.], v. 1, n. 1, 2014.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, [s.l.], v. 82, p. 1107- 1118, 1990.

SOUTHWEST RESEARCH INSTITUTE. **A capability statement for microencapsulation.** San Antonio, 1991, 31p.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, [s.l.], v. 43, p. 11-17, 2002.

STOJKOVIĆ, D.; PETROVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; KUKIĆ-MARKOVIĆ, J.; PETROVIĆ, S. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal Science Food Agricultural**, [s.l.], v. 93, p. 3205-3208, 2013a.

STOJKOVIĆ, D. S.; ŽIVKOVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; FERREIRA, I. C. F. R.; JANKOVIĆ, T.; MAKSIMOVIĆ, Z. Antibacterial activity of Veronica Montana L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 55, p. 209-213, 2013b.

STOLL, L.; COSTA, T. M. H.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. de O. Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. **Food Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 9, p. 172 – 181, 2016.

SUGGIT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 11, p. 971-981, 2005.

TAN, J.; CHEN, B.; HE, L.; TANG, Y.; JIANG, Z.; YIN, G.; WANG, J.; JIANG, X. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. **Chinese Journal of Cancer Research**, [s.l.], 2012, v. 24, n. 4, p. 275-283, 2012.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico.** 2a Ed. São Paulo: Atheneu, 2009, 599p.

TAYLOR, J. C.; DEWBERRY, L. S.; TOTSCH, S. K.; YESSICK, L. R.; DEBERRY, J. J.; WATTS, S. A.; SORGE, R. E. A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 174, p. 83-88, 2017.

TONON, R. V.; BRABET, C.; RUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae*, Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 88, p. 411-418, 2008.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 20, p. 505-507, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10a Ed. Editora Artmed, 2012, 934p.

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

THANE, C.; REDDY, S. Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. **Nutrition and Food Science**, [s.l.], v. 2, p. 58-65, 1997.

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

USKOKOVIĆ, V.; CASTIGLIONE, Z.; CUBAS, P.; ZHU, L.; LI, W.; HABELITZ, S. Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenins. **Journal of Dental Research**, [s.l.], v. 89, p. 149-153, 2010.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; DO PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva “Isabel” (*Vitis labrusca*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Kinetic modeling of food quality: A critical review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s.l.], 7, 144–158, 2008.

VARDIN, H.; YASAR, M. Optimisation of pomegranate (*Punica Granatum* L.) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrin content. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 167-176, 2012.

VERGARA, C.; CANCINO-MADARIAGA, B.; RAMÍREZ-SALVO, A.; SÁENZ, C.; ROBERT, P.; LUTZ, M. Clarification of purple cactus pear juice using microfiltration membranes to obtain a solution of betalain pigments. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 220-230, 2015.

VIEIRA, G. R. T. **Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. Visando a produção de substâncias antibacterianas**. 2005. 120 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T. H. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 83, p. 1265-1271, 2006.

WANDERLEY, M. C., de, A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G. J., de, M.; GOUVEIA, E. R. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 128, p. 448–453, 2013.

WANG, S.; LANGRISH, T. A review of process simulations and the use of additives in spray drying. **Food Research International**, [s.l.], v. 42, n. 1, p. 3-25, 2009.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*)**. Oregon: University of Oregon Press. Section 9, 1994, 388 p.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/detail/03-02-2017-early-cancer-diagnosis-saves-lives-cuts-treatment-costs>>. Acesso em agosto de 2018.

WIBOWO, S.; VERVOOT, L.; TOMIC, J.; SANTIAGO, J. S.; LEMMENS, L.; PANOZZO, A.; GRAUWET, T.; MENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 171, p. 330-340, 2015.

WIXON, J. Featured organism: danio rerio, the zebrafish. **Yeast**, [s.l.], v. 17, p. 225-231, 2000.

WU, Y.; HE, L.; ZHANG, L.; CHEN, J.; YI, Z.; ZHANG, J.; LIU, M.; PANG, X. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, [s.l.], v. 339, n. 2, 2011.

XING, K.; CHEN, X. G.; KONG, M.; LIU, C. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 76, n. 1, p. 17-22, 2009.