



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**LIANA MARIA RAMOS MENDES**

**ISOLAMENTO BIOGUIADO DOS COMPOSTOS ADSTRINGENTES**  
**DO PEDÚNCULO DE CAJU**

**FORTALEZA**

**2019**

LIANA MARIA RAMOS MENDES

ISOLAMENTO BIOGUIADO DOS COMPOSTOS ADSTRINGENTES DO  
PEDÚNCULO DE CAJU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.  
Coorientadora: Profa. Dra. Deborah dos Santos Garruti.

FORTALEZA

2019

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)

---

- M491i Mendes, Liana Maria Ramos.  
Isolamento bioguiado dos compostos adstringentes do pedúnculo de caju. / Liana Maria Ramos Mendes. – 2019.  
60 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito. .  
Coorientação: Prof. Dr. Deborah dos Santos Garruti..
1. Fracionamento. 2. Sensorial. 3. Fenólicos. I. Título.

CDD 660

---

LIANA MARIA RAMOS MENDES

ISOLAMENTO BIOGUIADO DOS COMPOSTOS ADSTRINGENTES DO  
PEDÚNCULO DE CAJU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: 28/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Ana Paula Dionísio  
Embrapa Agroindústria Tropical

Aos meus pais,  
Francisco Lúcio e Maria Jacinta,  
Por todo amor e por serem meus exemplos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as graças concedidas, sempre iluminando e guiando meu caminho, dando-me sabedoria e força nessa jornada.

Aos meus pais, Lúcio e Jacinta, pelo amor e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. E por serem meu porto seguro em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Luciana, Lúcio Filho, Vitor e Luana, pelo amor e companheirismo de toda a vida e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus sobrinhos, João Miguel, Ana Laura e Maria Luísa, e meu primo Gustavo, por trazerem leveza e alegria com seus sorrisos até mesmo nos dias mais difíceis.

Ao meu orientador, Dr. Edy Sousa de Brito, pela confiança em meu trabalho, paciência, amizade e conhecimentos compartilhados, de grande importância para minha vida acadêmica.

À minha coorientadora, Dra. Deborah dos Santos Garruti, pela confiança em meu trabalho, paciência, amizade e conhecimentos compartilhados, de grande importância para minha vida acadêmica.

À Dra. Ana Paula Dionísio e ao Dr. Ivanildo José da Silva Júnior por aceitarem participar da banca de defesa de dissertação e por todas as contribuições durante a qualificação.

À Embrapa Agroindústria Tropical por ter disponibilizado espaço e infraestrutura para o desenvolvimento desta pesquisa.

A toda equipe do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN), em especial aos analistas Lorena Mara e Paulo Riceli, pelo apoio e orientação durante as análises e todos os conhecimentos compartilhados.

Ao pesquisador Dr. Guilherme Zocolo pela amizade, ajuda e conhecimentos compartilhados.

A toda equipe do Laboratório de Análise Sensorial, em especial à técnica Idila Araújo, pelo apoio e orientação durante as análises e todos os conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos do LMQN, Bruno, Camila, Carol, Fátima, Jhony, Kaline, Lícia, Marcelo, Oiram, Régis, Thais e Yuri, por me acolherem tão bem, por toda troca de ensinamentos, o companheirismo, a disponibilidade e prontidão em sempre ajudar e por todos os cafés na copa. Em especial a Carol, que não só leu e releu essa dissertação várias vezes, mas também foi uma influência direta no meu aprendizado.

A minha turma de mestrado, em especial aos amigos que a pós-graduação me presenteou, Darlyson, Jorge, Karol, Renata, Renato, Raquel e VÍrgínia, pelo carinho, incentivo e companheirismo em todos os momentos desde as disciplinas até a conclusão da nossa jornada.

Aos meus amigos do Grupinho da Alana por todo apoio, amor e amizade, Alana, Ana LÍvia, Isabelle, Débora, RaÍssa, Thaís, Victor e em especial à Bia por sempre incentivar, acreditar em mim e ser um exemplo de foco e determinação.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e a todos os professores, pela oportunidade de realização do mestrado e pelos ensinamentos transmitidos.

À Funcap, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível o cumprimento de mais esta etapa em minha vida.

“Você nunca sabe os resultados que virão da sua ação.  
Mas se você não fizer nada, não existirão.”

Mahatma Gandhi



## RESUMO

Apesar da sua riqueza nutricional e elevada atividade funcional, o pedúnculo do caju ainda apresenta baixo consumo, devido ao seu sabor adstringente presente tanto na sua polpa como no suco. Visando solucionar tal problemática faz-se necessário identificar quais são os compostos responsáveis por essa adstringência. Uma ferramenta atrativa para identificar e isolar compostos é a cromatografia líquida, a combinação desta análise instrumental com a resposta biológica (bioguiada) levou à descoberta de vários compostos responsáveis pelas características sensoriais dos alimentos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar os componentes do pedúnculo de caju responsáveis por sua adstringência por meio do isolamento bioguiado. O clone utilizado no presente estudo foi o CCP09, proveniente do campo experimental da EMBRAPA de Pacajus. Os pedúnculos, após serem higienizados, foram liofilizados e moídos. A amostra moída passou por um processo de extração metanólica assistida por ultrassom de banho, tendo como produto o extrato metanólico do pedúnculo de caju. Foi realizada a precipitação protéica com o extrato metanólico do pedúnculo de caju (EC), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) para precipitar os compostos adstringentes presentes no extrato. Após a precipitação, os fenólicos presentes no precipitado foram extraídos com metanol, utilizando o ultrassom, tendo como produto o extrato do precipitado protéico de caju (EP). A identificação dos compostos foi realizada por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>. Nos testes sensoriais foram analisados os extratos EC e EP, com o objetivo de medir a intensidade de adstringência nas amostras. A adstringência foi mensurada através de uma escala de 5 pontos (0: não adstringente e 5: extremamente adstringente), onde foram analisadas as amostras de EC, EP, mistura de ácidos anacárdicos e suas frações isoladas em CLAE-UV/VIS. A identificação dos compostos revelou a presença de flavonóides e ácidos anacárdicos tanto no EC como no EP, sendo os ácidos anacárdicos os compostos em maior concentração em EP. Nos testes sensoriais EP apresentou como resultado uma média de 2,5, considerado de *adstringente a muito adstringente* na escala de 5 pontos. A mistura de ácidos anacárdicos, apresentaram uma média de 1,76, considerado *adstringente* na escala de 5 pontos. Com a resposta sensorial (bioguiada) positiva para a percepção de adstringência nos ácidos anacárdicos, suas frações foram analisadas sensorialmente. Diante dos resultados é possível concluir que os ácidos anacárdicos contribuem para a adstringência no pedúnculo de caju, sendo o ácido anacárdico 15:3 mais adstringente quando comparado ao 15:1.

**Palavras-chave:** Fracionamento. Sensorial. Fenólicos.

## ABSTRACT

Despite its nutritional richness and high functional activity, the cashew still presents a low consumption due to the astringent flavor present in its pulp. To solve the problem of astringency, it is necessary to identify the compounds present in the cashew apple that are responsible for this characteristic. An attractive tool to identify and isolate compounds is liquid chromatography, the combination of this instrumental analysis with the biological (bioguided) response led to the discovery of several compounds responsible for the sensorial characteristics of foods. This work had as objective to isolate and identify the components of the cashew apple responsible for its astringency. The clone used was the CCP09 from the experimental field of the EMBRAPA of Pacajus. The cashew apples were sanitized, freeze-dried and ground. The ground sample underwent a methanolic extraction in bath ultrasound, taking the methanolic extract of cashew apple (EC) as the product. Protein precipitation was performed with the EC and BSA to obtain the astringent compounds. After precipitation, the phenolics present in the precipitate were extracted with methanol in bath ultrasound, taking the protein precipitate extract of cashew (EP) as the product. The identification of the compounds was performed by UPLC-QTOF MS<sup>E</sup>. The sensorial test was carried out with the objective of measuring the astringency intensity in the analyzed samples. This attribute was measured on a 5-point scale (0: non astringent and 4: extremely astringent), where the samples of EC, EP, anacardic acid mixture and their fractions isolated in HPLC-UV / VIS were analyzed. The identification of the compounds revealed the presence of flavonoids and anacardic acids in both the EC and EP. In the sensorial tests EP resulted in an average of 2.5, considered astringent- very astringent in the scale of 5 points. A mixture of anacardic acids, had an average of 1.76, considered astringent in the scale of 5 points. With a positive (bioguided) sensory response to the astringency perception in anacardic acids, their fractions were analyzed sensorially. Given the results it is possible to conclude that the anacardic acids contribute to the astringency in the cashew apple, being the anacardic acid 15:3 more astringent when compared to the 15:1.

**Keywords:** Fractionation. Sensory. Phenolics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pseudofruto e fruto do cajueiro. ....	16
Figura 2. Estrutura química dos flavonóides. ....	20
Figura 3. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b). ....	20
Figura 4. Estrutura química dos ácidos anacárdicos. ....	21
Figura 5. Estrutura molecular dos ácidos anacárdicos cadeia 15 trieno, dieno e monoeno. ....	22
Figura 6. Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. ....	22
Figura 7. Etapas gerais da identificação dos compostos marcadores da adstringência do pedúnculo de caju, desde o tratamento da matéria-prima, à obtenção do extrato, seguido da precipitação proteica, com as análises cromatográficas necessárias e teste sensorial de adstringência. ....	28
Figura 8. (a) Caju do clone CCP09, (b) Pedúnculos liofilizados, (c) Pedúnculos moídos. ....	29
Figura 9. Sistema CLAE-UV/VIS utilizado no trabalho. ....	33
Figura 10. Quantificação de fenólicos no extrato metanólico de caju, sobrenadante 2 e precipitado. ....	38
Figura 11. Cromatogramas em BPI obtidos no sistema UPLC-QTOF em modo negativo (ESI) do (a) Extrato metanólico pedúnculo de caju; (b) Sobrenadante 2; (c) Extrato do precipitado proteico de caju. ....	40
Figura 12. Razão entre o sinal dos compostos e do padrão interno. ....	43
Figura 13. Cromatograma HPLC-DAD (a) ácido anacárdico 15:3; (b) ácido anacárdico 15:2 e (c) ácido anacárdico 15:1. ....	45
Figura 14. Gráfico da intensidade de adstringência. ....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas .....	19
Tabela 2. Parâmetros das frações coletadas em CLAE- UV/VIS.....	32
Tabela 3. Concentração das soluções aquosas dos gostos básicos .....	34
Tabela 4. Concentrações das amostras analisadas sensorialmente.....	36
Tabela 5. Identificação dos compostos presentes no extrato, sobrenadante e precipitado do pedúnculo de caju por UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup> .....	41
Tabela 6. Resultados da ANOVA para a intensidade de adstringência de extratos do pedúnculo de caju e suas frações.....	46
Tabela 7. Média sensorial da adstringência nas amostras .....	47

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1	Caju .....	16
2.2	Adstringência.....	17
2.3	Compostos fenólicos.....	18
2.4	Cromatografia líquida .....	23
2.4.1	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	23
2.4.2	<i>Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC – ultra performance liquid chromatography)</i> .....	24
2.5	Metodologia de decomposição sensorialmente guiada .....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1	Materiais .....	27
3.1.1	<i>Pedúnculos de caju</i> .....	27
3.1.2	<i>Líquido da castanha de caju (LCC)</i> .....	27
3.2	Testes preliminares .....	27
3.3	Etapas gerais do estudo .....	28
3.4	Preparo do pedúnculo de caju .....	29
3.5	Obtenção do extrato metanólico do pedúnculo de caju .....	29
3.6	Precipitação Proteica .....	30
3.7	Quantificação de fenólicos .....	30
3.8	Análises Cromatográficas .....	31
3.8.1	<i>Identificação por UPLC-QTOF MS<sup>E</sup></i> .....	31
3.8.2	<i>Fracionamento dos Ácidos Anacárdicos em CLAE-UV/VIS</i> .....	31
3.8.3	<i>Pureza dos ácidos anacárdicos em CLAE-DAD analítico</i> .....	33
3.9	Análise Sensorial .....	34
3.9.1	<i>Seleção de provadores</i> .....	34
3.9.2	<i>Treinamento de provadores para adstringência</i> .....	34
3.9.3	<i>Teste de adstringência</i> .....	35
3.10	Análises Estatísticas .....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38

<b>4.1</b>	<b>Quantificação de fenólicos por precipitação proteica .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Identificação dos compostos fenólicos em UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Fracionamento dos ácidos anacárdicos .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise sensorial da adstringência .....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
	<b>APÊNDICE A- CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS OBTIDO EM HPLC-UV/VIS EM 280 NM .....</b>	<b>57</b>
	<b>APÊNDICE B- FICHA UTILIZADA NO TESTE SENSORIAL DE GOSTOS BÁSICOS .....</b>	<b>58</b>
	<b>APÊNDICE C- FICHAS UTILIZADAS NO TREINAMENTO SENSORIAL DE PROVADORES PARA ADSTRINGÊNCIA (A) TESTE TRIANGULAR (B) TESTE PAREADO .....</b>	<b>59</b>
	<b>APÊNDICE D- FICHA UTILIZADA NO TESTE SENSORIAL DE ADSTRINGÊNCIA .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O cajueiro é uma espécie tropical nativa no Brasil, típica da região nordeste. Em 2016, a produção de caju no Brasil foi de, aproximadamente, 1,5 milhões de toneladas, correspondendo a 75% (setenta e cinco por cento) da produção mundial (FAO, 2016). O pedúnculo de caju, que sustenta a verdadeira fruta do cajueiro, a castanha, tem considerável relevância comercial devido a vários derivados, como sucos e conservas. Os principais bioativos presentes no pedúnculo do caju são os carotenoides, a vitamina C e uma grande variedade de fenólicos (CUNHA et al., 2017).

O pedúnculo do cajueiro pode ser consumido *in natura*, mas também possui boas características para processamento devido à sua polpa suculenta, ausência de casca e sementes, alto teor de açúcar e sabor exótico (VERGARA, et al., 2010). Apesar da sua riqueza nutricional e seu potencial funcional, o pedúnculo ainda apresenta baixo consumo quando comparado às demais frutas. Isso se dá em decorrência do sabor adstringente presente na sua polpa, assim como em seu suco (TALASILIA, et al., 2012).

Existe uma grande variedade de clones de cajueiro, que apresentam diferentes intensidades de adstringência. Em um estudo de análise descritiva de suco de pedúnculos de diferentes clones de cajueiro anão precoce, provenientes do campo experimental da Embrapa em Pacajus-CE, observou-se que a variedade CCP09 apresenta alto teor de acidez e adstringência, tornando seus efeitos, na língua e na garganta, bastante perceptíveis (GARRUTI et al., 1999). Principalmente no mercado externo, a aceitação do suco integral de caju é comprometida em função da elevada adstringência, sendo um dos maiores obstáculos contra a expansão do mercado (TALASILIA, et al., 2012).

A adstringência é definida como um conjunto de sensações de enrugamento do epitélio bucal após a exposição a substâncias como alumínio ou taninos (GARCIA-ESTEVEZ et al., 2018). Essa sensação pode ser percebida pelos consumidores como um gosto “travoso” do suco ou, principalmente, do próprio pedúnculo *in natura*. Apesar da importância da adstringência para alguns produtos, os mecanismos desse atributo não são bem conhecidos, por isso se faz necessário o aprofundamento das metodologias de estudo da adstringência (GARCIA-ESTEVEZ et al., 2018).

Novas técnicas sensoriais e analíticas vêm sendo desenvolvidas e utilizadas conjuntamente em um procedimento eficaz para a triagem de compostos não voláteis importantes para o sabor dos alimentos. Essa abordagem, combinando a análise instrumental e

a resposta humana (bioguiada) levou à descoberta de vários compostos anteriormente desconhecidos como os compostos amargos e adstringentes de diferentes produtos (CZEPA; HOFMANN, 2003; SCHARBERT et al., 2004; STARK; HOFMANN, 2005).

Para solucionar o problema da adstringência, é necessário identificar os compostos presentes no pedúnculo de caju que são responsáveis por essa característica e, assim, desenvolver metodologias, sistemas de extração ou até mesmo modificações genéticas em clones de caju, visando diminuir ou eliminar os compostos adstringentes. Uma vez resolvido este problema, o produto apresentará grande potencial de mercado, atendendo a diversas tendências mundiais na área da alimentação.

Diante do exposto, o objetivo geral deste trabalho foi identificar os componentes do pedúnculo de caju responsáveis por sua adstringência utilizando a análise instrumental e a resposta humana (bioguiada). Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver metodologias analíticas para determinar os compostos responsáveis pela adstringência do pedúnculo do cajueiro, utilizando o clone CCP09.
- Isolar os compostos responsáveis pela adstringência do pedúnculo do cajueiro por cromatografia líquida preparativa.
- Avaliar sensorialmente a adstringência nos extratos do pedúnculo do caju e nas frações isoladas por cromatografia líquida preparativa.
- Determinar os compostos químicos responsáveis pela adstringência do pedúnculo do cajueiro (marcadores químicos) por meio da técnica de fracionamento sensorialmente guiado.

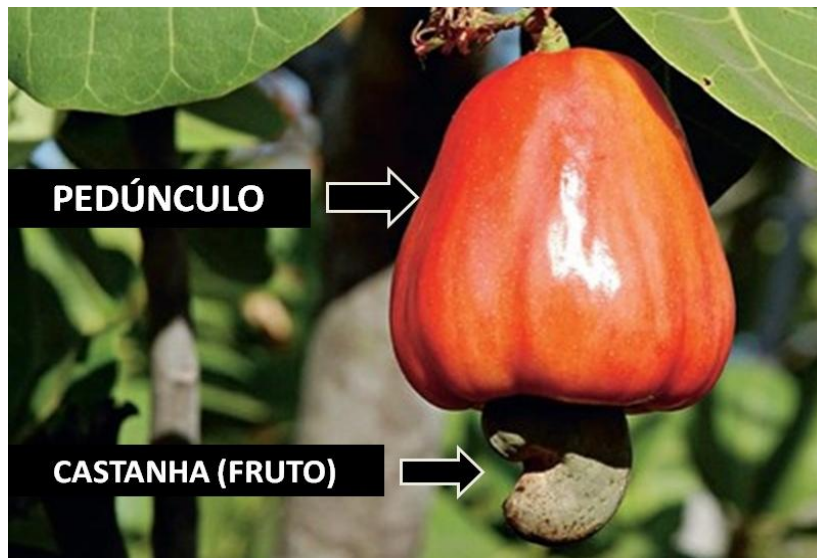


## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Caju

Caju (*Anacardium occidentale L*) é um fruto pertencente à família Anacardiaceae. Nativo da América tropical, Brasil, encontra-se amplamente disponível em vários países da Ásia, África e América Central como uma cultura agrícola economicamente importante (DARAMOLA, 2013). O caju constitui-se de duas partes: pedúnculo (pseudofruto) e castanha (fruto), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Pseudofruto e fruto do cajueiro.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A castanha de caju comestível é extremamente importante para o comércio de produtos agrícolas (LEITE et al., 2002). No Brasil, cerca de 96% (noventa e seis por cento) do cultivo do caju está localizado na região Nordeste. Sua produção é de grande importância social e econômica para muitos países (ASSUNÇÃO et al., 2003). Aproximadamente 10 (dez) a 15 (quinze) toneladas de pedúnculo de caju são obtidas como subproduto por cada tonelada de castanha de caju produzida (TALASIL; SHAIK, 2015).

Visando aumentar a lucratividade do setor produtivo da agroindústria do caju, as plantas do cajueiro foram introduzidas no melhoramento genético, sendo a principal fonte de

obtenção de materiais mais adequados à exploração comercial. Essa metodologia, apesar de simples e de ganhos genéticos esperados reduzidos, permitiu o lançamento comercial dos clones CCP 06 e CCP 76, em 1983, e CCP 09 e CCP 1001, em 1987, considerados os principais clones comerciais disponíveis. Posteriormente, novos procedimentos metodológicos resultaram nos clones EMBRAPA 50, EMBRAPA 51, BRS 189 e BRS 226 (DE PAIVA, 2004).

Os clones diferem entre si em diversos fatores, como, por exemplo, a cor do pedúnculo, peso da castanha e produtividade. Estudos também relatam diferenças em relação ao pH, teor de sólidos solúveis e qualidade sensorial, como por exemplo sabor doce, adstringência, aspereza na língua, cor amarela, entre outros descritores sensoriais (GARRUTI et al., 1999).

O pedúnculo de caju totalmente maduro é firme e succulento com alto teor de açúcar, sabor exótico forte, baixa acidez e alta adstringência (FIGUEIREDO et al., 2002). Pesquisadores relataram que o suco do pedúnculo contém uma quantidade significativa de polifenóis (principalmente flavonóides, ácido anacárdico e taninos) (BRITO et al., 2007), ácidos orgânicos e vitaminas (SILVA et al., 2000; CAMPOS et al., 2002; AZEVEDO; RODRIGUES, 2005; CAVALCANTE et al., 2005; TREVISAN et al., 2006; CARVALHO et al., 2007; HONORATO; RODRIGUES, 2010), com destaque para a vitamina C, que é de três a seis vezes maior do que o suco de laranja e cerca de dez vezes maior do que o suco de abacaxi (MICHODJEHOUN-MESTRES et al., 2009; MARC et al., 2011).

Mesmo com sua riqueza nutricional, apenas no Brasil se verifica o hábito de consumir o pedúnculo *in natura* e seus subprodutos, o que torna a busca por novos mercados um desafio devido à alta adstringência presente no pseudofruto (AGOSTINI-COSTA, 1999).

## 2.2 Adstringência

Adstringência é definida como um grupo de sensações táteis na boca de longa duração, percebidas como aspereza, secura e enrugamento do epitélio oral. Pode ser dividida em diferentes sub-qualidades, além de ser frequentemente acompanhada por gosto amargo, ácido ou ambos. A origem do termo vem do latim "ad stringere" que significa "ligar", pois, embora os mecanismos exatos não sejam bem compreendidos, se acreditava que essas sensações resultavam da interação de compostos fenólicos, principalmente taninos, com

proteínas da saliva e das mucosas da boca, ricas em prolina, sendo percebidas pelos receptores do nervo trigeminal. A precipitação dos complexos resultantes reduz a ação lubrificante da saliva, aumentando a fricção entre as superfícies bucais, o que explicaria a adstringência (FRANK et al., 2001; OTTINGER et al., 2001).

O mecanismo mais aceito para explicar como ocorre a adstringência foi proposto por Siebert et al. (1996), no qual a proteína tem um número fixo de lados aos quais os taninos podem se ligar, enquanto cada polifenol também tem seu número fixo de ligações. Quando o número total de ligações do polifenol e das proteínas são iguais, o maior complexo e a máxima precipitação serão produzidos. Então, dependendo da proporção de polifenol e proteína utilizada, diferentes complexos serão formados (GARCÍA-ESTÉVEZ et al., 2018).

Apesar das várias tentativas que têm sido realizadas para encontrar uma correlação entre os resultados obtidos a partir de uma equipe sensorial e as espécies químicas que conferem a sensação adstringente em alimentos e bebidas, os dados descritos na literatura são escassos ou contraditórios (QUIJADA-MORÍN et al., 2012; CHEYNIER, 2005). Em geral, os polifenóis são tidos como os principais contribuintes para a adstringência dos frutos (HASLAM, 2007; TAIRA et al., 1997), entretanto, essa sensação sensorial pode ser induzida por uma ampla gama de compostos fenólicos e também alguns compostos não fenólicos, como ácidos orgânicos (LAWLESS et al., 1996).

Muitos elagitaninos ou compostos de cadeia ainda menores contribuem para propriedades adstringentes (GLABASNIA; HOFMANN, 2007), apesar de não interagirem com proteínas salivares, e podem ser percebidos diretamente por receptores específicos (BENNICK, 2002). Em geral, o grau mais elevado de polimerização dos taninos pode ser associado à adstringência mais intensa, contudo, as propriedades adstringentes de compostos fenólicos não podem ser diretamente previstas a partir da sua estrutura (BAJEC; PICKERING, 2008).

### **2.3 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. São originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e

reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

O termo "polifenol" é amplamente utilizado para descrever todos os compostos fenólicos, no entanto, a definição exata exigiria uma estrutura polimérica de fenóis (um grupo fenila ligado a um OH), o que não é encontrado em compostos fenólicos menores, com apenas um ou dois grupos fenila. Possuem estrutura variável e, por isso, são multifuncionais (SHAHIDI et al., 1995). Devido à diversidade estrutural dos compostos fenólicos, existem várias classes desses compostos, como mostradas na Tabela 1. Dentre os polifenóis, pode-se destacar os ácidos fenólicos, os tocoferóis, os taninos e os flavonóides como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural (ANGELO, 2007).

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas.

<b>Classe</b>	<b>Estrutura</b>
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6-C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6-C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6-C3
Nafitoquinonas	C6-C4
Xantonas	C6-C1-C6
Estilbenos, antoquinonas	C6-C2-C6
Flavonóides, isoflavonóides	C6-C3-C6
Lignananas, neolignananas	(C6-C3) <sub>2</sub>
Biflavonóides	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>
Ligninas	(C6-C3) <sub>n</sub>
Taninos condensados	(C6-C3-C6) <sub>n</sub>

Fonte: ANGELO, 2007.

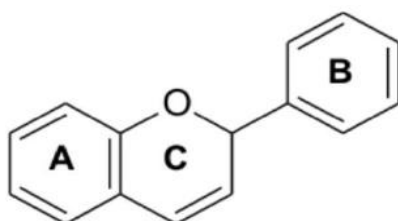
Largamente encontrados em plantas, esses compostos são um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina. Os fenólicos, em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (PELEG et al., 1998).

Os flavonóides são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, encontrados em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos

ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (HARBONE; et al., 1999).

A estrutura química dos flavonóides, representada na Figura 2, consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (BALASUNDRAM et al., 2006).

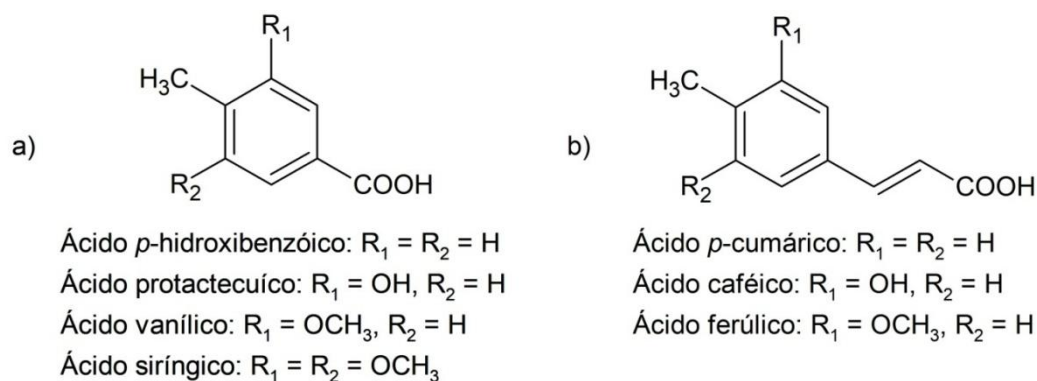
Figura 2. Estrutura química dos flavonóides.



Fonte: ANGELO, 2007.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, como mostrado na Figura 3, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos como os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sináptico (ANGELO, 2007).

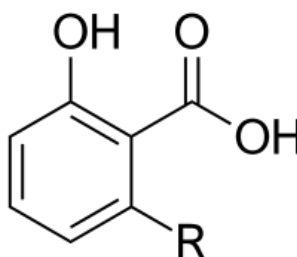
Figura 3. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).



Fonte: ANGELO, 2007.

Os ácidos anacárdicos são compostos fenólicos derivados do ácido salicílico, com caráter lipídico resultado de sua cadeia lateral alifática. São encontrados em grande parte no cajueiro e em seu fruto, possuem nomenclatura como ácido 2-hidroxi-6-pentadecil-benzoico (SEONG et al, 2014). São compostos apolares, que apresentam em sua estrutura (Figura 4) um anel fenólico ligado a uma longa cadeia lateral (variando de 2 a 17 o número de carbonos), cadeias longas compostas por 15 carbonos são majoritárias no líquido da castanha de caju e em outras partes do fruto, que pode ter várias ou nenhuma insaturação, além disso, um grupo metil pode ser encontrado no anel fenólico (NETO et al., 2014).

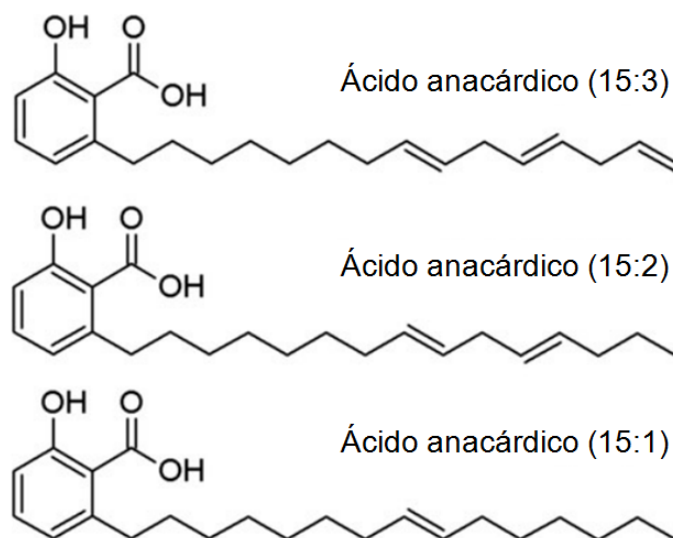
Figura 4. Estrutura química dos ácidos anacárdicos.



Fonte: OIRAM FILHO et al., 2017.

O grau de insaturação da cadeia carbônica é uma característica estrutural importante dos ácidos anacárdicos, podendo variar de nenhuma (saturado) até 3 insaturações (mono, di e trieno) como demonstrado na Figura 5, essas diferenças nas cadeias laterais também refletem no grau de polaridade das moléculas (TREVISAN et al., 2006). A variação das insaturações e do tamanho da cadeia lateral influenciam diretamente na atividade biológica dos ácidos anacárdicos.

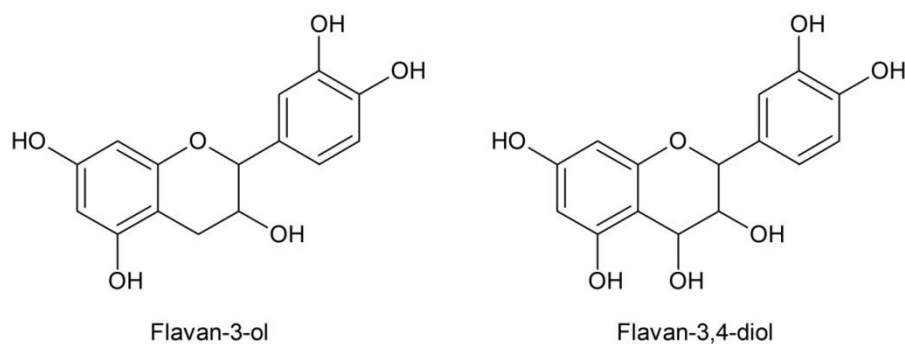
Figura 5. Estrutura molecular dos ácidos anacárdicos cadeia 15 trieno, dieno e monoeno.



Fonte: OIRAM FILHO et al., 2017.

Os taninos possuem o peso molecular relativamente alto e, segundo a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e ácido elágico glicosilados (galotaninos e elagitaninos, respectivamente), formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos condensados, denominados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina), e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), cujas estruturas estão representadas na Figura 6, produtos do metabolismo do fenilpropanol (MONTEIRO et al., 2005).

Figura 6. Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.



Fonte: ANGELO, 2007.

Os taninos são capazes de formar complexos insolúveis com proteínas. Essa complexação entre taninos e proteínas tem sido estudada por diversos pesquisadores, os quais propõem diferentes tipos de interação que podem ser afetadas por fatores estruturais e pelas condições do meio (CARVALHO et al., 2007).

O núcleo polifenólico possui uma estrutura molecular favorável à interação com as proteínas devido à presença de zonas apolares, com o anel benzóico, que podem ligar-se às zonas apolares das proteínas. E zonas hidrofílicas com os grupos hidroxila que participam de ligações de hidrogênio com os grupos carbonila e amina das proteínas (CARVALHO et al., 2007). Os complexos taninos-proteína podem ser de dois tipos: reversíveis ou irreversível. Os irreversíveis ocorrem devido às ligações covalentes em condições oxidativas, enquanto os reversíveis são formados por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (ZUANAZZI, 2000).

Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas com ênfase em identificar e purificar novos compostos bioativos com atividade antioxidante e, provenientes de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e restringir a utilização dos antioxidantes sintéticos (SHAHID et al, 2007). Para a identificação e purificação de compostos é necessário o uso de técnicas analíticas de separação.

## **2.4 Cromatografia líquida**

### ***2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)***

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos (TONHI et al, 2002). Essa técnica é utilizada em várias áreas da ciência para separar e determinar espécies em uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Na cromatografia líquida, os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial, fase estacionária, e outra, denominada fase móvel, um fluido que percola através da fase estacionária (LANÇAS, 2009; SKOOG et al., 2004).



De acordo com a finalidade da técnica, a CLAE pode ser analítica ou preparativa. A cromatografia líquida preparativa é utilizada para a purificação e/ou fracionamento de substâncias, já a analítica tem como objetivo a quantificação e/ou identificação de compostos. A escala analítica também é considerada uma etapa preliminar para melhor adequação dos parâmetros cromatográficos visando melhor resolução e desenvolvimento de métodos mais adequados para posteriormente serem utilizados em maiores escalas de isolamento. Neste caso, o enfoque é denominado separação preparativa e, geralmente, envolve maiores quantidades de amostras do que aquelas utilizadas nas separações analíticas (LANÇAS, 2009).

Apesar de ser uma excelente técnica de separação, a CLAE necessita de uma técnica confirmatória quando a análise qualitativa (confirmação da identidade química) é também necessária (LANÇAS et al., 2009).

#### ***2.4.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC – ultra performance liquid chromatography)***

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC – ultra performance liquid chromatography) desenvolveu-se a partir da introdução das partículas de fase estacionária (FE) porosa de 2  $\mu\text{m}$ , em resposta à busca contínua por análises mais rápidas e eficientes. A UPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da CLAE, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária (FE)  $\leq 2 \mu\text{m}$ , as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo das análises, porém geram um aumento significativo na pressão cromatográfica. Em vista disso, um equipamento adequado, capaz de operar a altas pressões, acima de 1000 bar (15000 psi), é empregado para extrair um desempenho cromatográfico máximo dessa técnica (MALDANER, 2012).

O UPLC MS/MS é uma técnica química que combina as capacidades de separação física da cromatografia líquida com as capacidades de identificação dos compostos por espectrometria de massa. Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão  $m/z$ . As características de construção e operação diferem de um analisador para outro, assim como seus benefícios e

limitações (LANÇAS et al., 2009). Esta técnica é utilizada para análises com sensibilidade e seletividade muito altas. Geralmente, sua aplicação objetiva a detecção geral e potencial identificação de compostos na presença de outros produtos químicos em uma mistura complexa.

## 2.5 Metodologia de decomposição sensorialmente guiada

Novas técnicas sensoriais e analíticas vêm sendo desenvolvidas e utilizadas conjuntamente em um procedimento eficaz para a triagem de compostos não voláteis importantes para o sabor dos alimentos. Essa abordagem, combinando a análise instrumental e a resposta humana, recentemente levou à descoberta de vários compostos anteriormente desconhecidos, como os compostos amargos e adstringentes de diferentes produtos (CZEPA; HOFMANN, 2003; SCHARBERT et al., 2004; STARK; HOFMANN, 2005).

Schwarz e Hofmann (2007), utilizando cromatografia de permeação de gel e CLAE preparativa em combinação com testes sensoriais de adstringência das frações obtidas, descobriram a estrutura de 25 compostos marcadores para a adstringência da groselha. Além de vários flavonóis glicosídeos, em particular 3-carboximetil-indol-1-N- $\beta$ -D glucopiranosídeo e 3-metilcarboximetil-indol-1-N- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, uma família de compostos anteriormente não identificados, denominada dehidrorubrumina, foram identificados. Os dados sensoriais obtidos para esses compostos demonstraram, claramente, que os limiares de adstringência não podem ser previstos a partir de suas estruturas químicas, mas têm de ser investigados com base nos estudos sistemáticos sensoriais com compostos puros de referência.

A metodologia de decomposição sensorialmente guiada também foi utilizada para avaliar a relação entre o perfil de proantocianidinas (PAs) e a adstringência em 13 vinhos tintos Tempranillo comerciais, combinando a determinação do perfil de fenólicos por UPLC MS/MS e análise sensorial com provadores treinados (QUIJADA- MORÍN et al., 2012). Ao contrário do que é geralmente esperado, a concentração total de PAs não apresentou correlação estatística com a adstringência percebida. Somente as características estruturais dos PAs (composição das subunidades separadamente) apresentaram correlações significativas com a intensidade global da adstringência. Maiores proporções de subunidades de epicatequina (EC) em posições de extensão e subunidades de galocatequina (GC), em

posições terminais, aumentam a adstringência. Pelo contrário, a quantidade de epigallocatequina (EGC), em ambas as posições, extensão e terminal, foi negativamente correlacionada com a percepção da adstringência.

Os compostos responsáveis pela adstringência do chá preto também foram determinados a partir da abordagem bioguiada (SCHABERT et. al., 2004). Foi observado que nem os polifenóis como a tearubigina, de elevado peso molecular, nem as catequinas e teoflavinas são os principais contribuintes para o sabor adstringente do chá preto, mas sim uma série de 14 flavon-3-ol glicosídeos. Entre esses, a apigenina-8-*C*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, que foi identificada pela primeira vez em infusões de chá. Observou-se, ainda, que, além do tipo de aglicona flavon-3-ol, o tipo e a sequência dos monossacarídeos individuais na cadeia glicosídica são fatores chave para a percepção da adstringência.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 *Pedúnculos de caju*

Para a extração dos compostos fenólicos foram utilizados pedúnculos do clone CCP 09, proveniente do Campo Experimental da Embrapa localizado na cidade de Pacajus-CE, com latitude 4°11'26,62" S e longitude 38°29'50,78" O, colhidos na safra de 2017 (setembro a novembro).

#### 3.1.2 *Líquido da castanha de caju (LCC)*

O LCC natural foi obtido por meio de prensagem das cascas das castanhas, fornecidas pela mini-fábrica de beneficiamento de castanhas de caju do Campo Experimental Pacajus/CE da Embrapa Agroindústria Tropical.

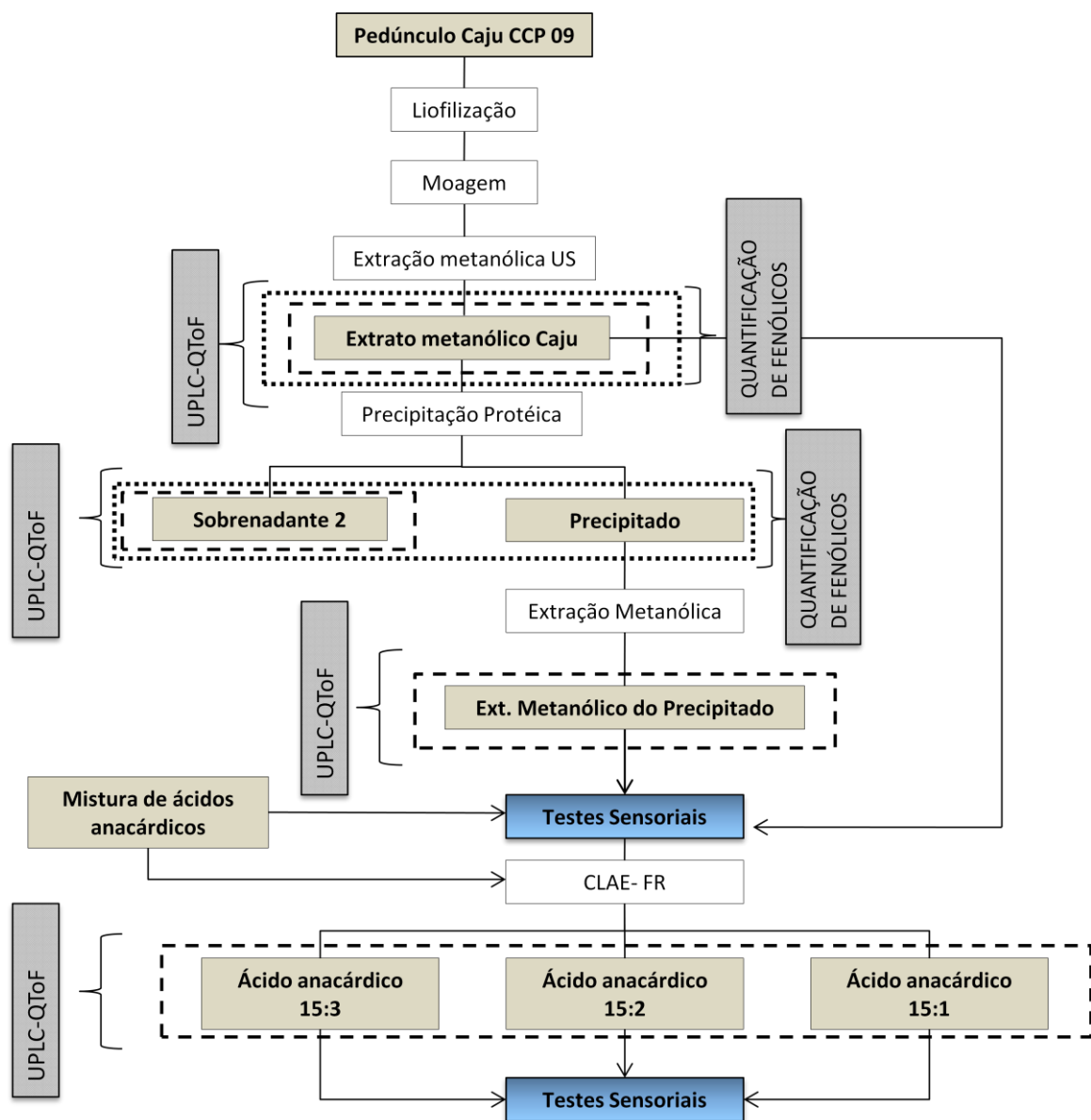
### 3.2 Testes preliminares

Previamente foram testadas diferentes metodologias para a análise sensorial da adstringência nos extratos obtidos. O teste '*half-tongue*' (SCHARBERT et al., 2004), que consiste na análise de uma alíquota (1 mL) da amostra em um lado da língua juntamente com água no outro lado para a percepção da adstringência em um dos lados após 30 s, foi realizado com o primeiro extrato fenólico obtido, porém não foi possível detectar a adstringência, mesmo com concentrações elevadas. Essa metodologia de reconhecimento da adstringência é muito sensível e utiliza pequenos volumes de amostra, possivelmente os provadores não reconheceram o atributo devido serem habituados à altos teores de adstringência, como a do pedúnculo de caju *in natura*. Tentou-se concentrar o extrato fenólico após uma extração em fase sólida (SPE), porém também não foi possível perceber o atributo, ocasionando até mesmo mudanças sensoriais na amostra. Assim, optou-se por utilizar maiores volumes nos testes sensoriais de adstringência, assim como uma nova metodologia, descrita nas sessões posteriores, com uma escala de 5 pontos para mensurar a percepção do atributo na amostra.

### 3.3 Etapas gerais do estudo

A figura 7 representa o fluxograma geral do presente estudo. As etapas envolvidas serão detalhadas nas próximas seções.

Figura 7. Etapas gerais da identificação dos compostos marcadores da adstringência do pedúnculo de caju, desde o tratamento da matéria-prima, à obtenção do extrato, seguido da precipitação proteica, com as análises cromatográficas necessárias e teste sensorial de adstringência.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

### 3.4 Preparo do pedúnculo de caju

Após serem lavados e sanitizados, os pedúnculos foram cortados em rodelas com espessura de aproximadamente 0,5 cm. Em seguida, os pedúnculos foram congelados em ultra-freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , liofilizados em liofilizador de bandeja, moídos em moinhos de facas, tipo willye Start FT 80 com peneira de diâmetro de 0,841mm, embalados a vácuo e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Figura 8. (a) Caju do clone CCP09, (b) Pedúnculos liofilizados, (c) Pedúnculos moídos.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

### 3.5 Obtenção do extrato metanólico do pedúnculo de caju

Separou-se 50 g do pedúnculo de caju liofilizado, para serem extraídas com metanol-água 60:40 (v/v). Em seguida, a amostra foi exposta a ondas ultrassônicas, utilizando o Sonicador Ultrasonic Cleaner 1400 (THORNTON/UNIQUE), a 40 kHz, 100W por 30 min. à temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . A relação massa volume utilizada foi de 1:10 (m/v), sendo a extração realizada com dez repetições.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, centrífuga KC5 Kindly a 4000 rpm, sendo coletado o sobrenadante 1 (extrato). O extrato foi seco, utilizando o evaporador rotativo da marca IKA® modelo RV10, a  $40^{\circ}\text{C}$  sob pressão reduzida (20 mbar) e rotação de 80 rpm até a remoção total de metanol e então liofilizado, por 50 horas, para remoção da água.

### 3.6 Precipitação Protéica

Foi realizada a precipitação proteica no extrato metanólico do pedúnculo de caju com albumina do soro bovino (BSA), segundo a metodologia descrita por Hagerman e Butler (1978), com ajustes. A solução aquosa do extrato metanólico do pedúnculo de caju (1,0 mL) foi adicionada a 2,0 mL da solução padrão de proteína (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>) em tubo de centrífuga de 15 mL. Deixou-se em repouso para precipitação por 24 h sob refrigeração. Após a precipitação, o complexo foi centrifugado (2944 g por 15 min) obtendo-se o sobrenadante 2 e o precipitado.

O precipitado obtido passou por uma nova extração metanólica, iniciando com a adição de 10 mL de H<sub>2</sub>O para a lavagem do precipitado, seguido de centrifugação (2944 g. 10 min<sup>-1</sup>). O sobrenadante 3 foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 10 mL de metanol 100%, submetido à ultrassom de banho por 5 minutos e centrifugado (2944 g. 5 min<sup>-1</sup>). O sobrenadante 4 foi rotaevaporado e liofilizado tendo como produto o extrato do precipitado proteico de caju. O processo de extração foi repetido por 4 vezes.

Para obtenção de massa de extrato do precipitado protéico suficiente para a análise sensorial, o processo de precipitação protéica foi realizado em maior escala, respeitando as proporções de extrato metanólico do pedúnculo de caju e proteína, tendo como solução padrão de proteína uma solução aquosa de gelatina comercial.

### 3.7 Quantificação de fenólicos

Para a quantificação de fenólicos, foram utilizadas seis concentrações do extrato metanólico do pedúnculo de caju (1; 5; 10; 15; 20 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>). Foram quantificados o extrato metanólico do pedúnculo de caju antes da precipitação, o precipitado e o sobrenadante 2. Para a curva padrão, utilizou-se solução de quercetina nas concentrações: 5, 10, 20, 40, 60 e 100 µg.mL<sup>-1</sup>, com R<sup>2</sup>=0,980. A quantificação foi realizada em triplicata, seguindo os parâmetros de absorvância e utilizando o indicador descrito no método de Hagerman e Butler (1978).

### 3.8 Análises Cromatográficas

#### 3.8.1 Identificação por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>

A identificação dos compostos foi realizada em um sistema cromatográfico *Acquity UPLC (Waters)*, acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QTOF, *Waters*) pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna cromatográfica *Waters Acquity UPLC BEH* (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fase móvel: água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (21 min), fluxo de 0,4 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 5 µl.

Condições do Massas de Alta resolução - XEVO-QToF: O modo negativo (ESI<sup>-</sup>) foi adquirido na faixa de 110-1180 Da temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L. h<sup>-1</sup>, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo positivo (ESI<sup>+</sup>) foi adquirido na faixa de 110-1180 Da temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L. h<sup>-1</sup> e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como *lockmass*. O modo de aquisição foi MS<sup>E</sup>. O instrumento foi controlado pelo software *Masslynx 4.1 (Waters Corporation)*.

Para análise em UPLC-QTOF, as amostras (extrato metanólico do pedúnculo de caju, sobrenadante 2 e extrato do precipitado protéico de caju) foram dopadas com padrão interno de Genesteína de concentração conhecida (1ppm). Uma isoflavona de fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, massa 270.0450 Da e t<sub>r</sub> de 5,40 min. Utilizou-se o método do padrão interno para compensar certos tipos de erros que influenciam tanto o analito como a espécie de referência na mesma proporção. Para quantificar os compostos presentes nas amostras, baseou-se na razão entre o sinal do analito e o do padrão interno.

#### 3.8.2 Obtenção e fracionamento dos Ácidos Anacárdicos em CLAE-UV/VIS a partir do líquido da castanha de caju (LCC)

Os ácidos anacárdicos foram obtidos a partir do fracionamento do Líquido da Castanha de Caju (LCC) como descrito por Oiram Filho et al. (2017).



Utilizou-se 100 g de LCC dissolvidos em etanol 95 % (600 mL) com adição controlada de hidróxido de cálcio (50 g) sob agitação. Após a adição do hidróxido, o béquer contendo a mistura foi mantido sob agitação por 3 (três) horas a uma temperatura de 50 °C. Ao final da reação, o precipitado formado, chamado de anacardato de cálcio, contendo apenas os ácidos anacárdicos em forma de sal básico, foi filtrado a vácuo e lavado com etanol 95 % (200 mL). Ao final do procedimento, a fração contendo o sobrenadante etanólico continha apenas cardol e cardanol (FARIAS et al., 2009).

Para a regeneração dos ácidos anacárdicos, o anacardato de cálcio obtido na etapa anterior foi dissolvido em solução ácida contendo água destilada (440 ml), HCl P.A. (60 mL) e mantido sob agitação por 1 hora a uma temperatura de 50 °C. Em seguida, foi realizada uma partição líquido – líquido com acetato de etila (2x 150 mL), obtendo uma fase orgânica rica em ácidos anacárdicos, que foi posteriormente lavada com água Mili – Q (200 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O extrato foi rotaevaporado para eliminação do solvente e obtenção de uma fração contendo apenas os ácidos anacárdicos (mistura de ácidos anacárdicos) (PARAMASHIVAPPA et al., 2001).

Os compostos presentes na mistura de ácidos anacárdicos foram isolados em uma coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFirePrep C18 OBD (100 x 19 mm x 5 µm), o sistema utilizado está representado na Figura 9. A fase móvel foi usada de maneira isocrática utilizando como solventes, metanol, água e ácido acético, na proporção (90:10:1) (V/V/V), tempo de corrida de 40 min, fluxo de 3 mL.min<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 °C, volume de injeção de 1 mL e concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup>. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm (OIRAM FILHO et al., 2017). As frações obtidas e os tempos de coletas estão representados na tabela. Foi realizado o total de 23 injeções com o intuito de obter massa suficiente para a análise sensorial. O sistema utilizado no estudo está representado na Figura 9.

Tabela 2. Parâmetros das frações coletadas em CLAE- UV/VIS.

Fração	Composto	Tempo de coleta (min)
F1	Ácido anacárdico 15:3	18-22
F2	Ácido anacárdico 15:2	23,5-27
F3	Ácido anacárdico 15:1	28,5-37

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 9. Sistema CLAE-UV/VIS utilizado no trabalho.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

### ***3.8.3 Pureza dos ácidos anacárdicos em CLAE-DAD analítico***

As amostras foram analisadas segundo método de Oiram Filho et al. (2017), em uma coluna cromatográfica de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS(M) C18 (150 x 4.6 mm x 5  $\mu$ m). A fase móvel utilizada foi composta de acetonitrila, água e ácido acético numa proporção (80:20:1), em modo isocrático. O tempo de corrida foi de 30 minutos, com fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, à temperatura de 30 °C e com volume de injeção da amostra de 20  $\mu$ L. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm e a aquisição dos espectros UV foi realizada na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

A pureza foi avaliada de acordo com as áreas dos picos cromatográficos obtidos via HPLC-DAD (analítico). Todos os picos presentes foram integrados e seus percentuais de áreas foram utilizados para o cálculo de pureza. Picos com concentrações abaixo do limite de detecção não foram contabilizados.

### 3.9 Análise Sensorial

#### 3.9.1 Seleção de provadores

Um teste de reconhecimento de gostos básicos foi realizado com 15 (quinze) candidatos para verificar a capacidade dos provadores em distinguir entre os diferentes gostos (doce, amargo, ácido ou salgado). Para tanto, 30 mL de cada amostra foi servida em copinhos descartáveis codificados e apresentados de forma balanceada. Foram apresentadas 05 (cinco) soluções (Tabela 3), sendo que, entre elas, poderia conter uma amostra repetida ou uma amostra de água. Foi solicitado que o candidato provasse as amostras da esquerda para a direita e descrevesse na ficha o gosto que estava sentindo. Foi fornecido um copo de água para a lavagem da boca entre as amostras.

Tabela 3. Concentração das soluções aquosas dos gostos básicos

<b>Gosto Básico</b>	<b>Substância *</b>	<b>Concentração (%)</b> <b>(m/v)</b>
<b>Doce</b>	Sacarose	0,05
<b>Amargo</b>	Cafeína	0,05
<b>Ácido</b>	Ácido cítrico	0,05
<b>Salgado</b>	Cloreto de Sódio	0,05

\*Substâncias de uso alimentar

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

#### 3.9.2 Treinamento de provadores para adstringência

Os 11 (onze) provadores que obtiveram de 4 a 5 acertos no teste de reconhecimento dos gostos básicos foram selecionados para o treinamento da adstringência, o qual consistiu em uma série de testes triangulares para adstringência, tendo como amostras solução de ácido tânico e água. O teste triangular consiste na apresentação simultânea, aos provadores, de duas amostras iguais e uma diferente, solicitando-se ao provador que identifique a amostra diferente. Foram avaliadas seis concentrações da solução de ácido tânico (50, 75, 100, 125, 150 e 200 mg.mL<sup>-1</sup>), todas com repetição, em intervalo mínimo de 15 minutos entre cada sessão.

Dando continuidade ao treinamento da adstringência, foi realizado uma série de testes pareados com sulfato de alumínio nas concentrações de 0,1 e 0,2 g.L<sup>-1</sup>, ácido tânico na concentração de 1,5 g.L<sup>-1</sup> e água. No teste pareado, as amostras são apresentadas aos pares, para comparação e detecção de diferenças ou preferência. No caso do treinamento, foram apresentadas aos provadores uma amostra com a solução analisada e uma de água, sendo solicitado aos provadores que indicassem qual amostra era adstringente. Os 5 (cinco) provadores que obtiveram melhor desempenho no treinamento foram selecionados para compor o painel de provadores treinados para adstringência.

### ***3.9.3 Teste de adstringência***

O teste sensorial foi realizado com provadores previamente selecionados e treinados, utilizando protocolos de testes previamente aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa sob Parecer nº 147.279. Antes da execução dos testes, foi solicitado aos provadores que assinassem um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As amostras analisadas foram: extrato metanólico do pedúnculo de caju (EC), extrato do precipitado proteico de caju (EP), mistura de ácidos anacárdicos e as frações obtidas pelo isolamento dos ácidos anacárdicos em escala preparativa. As amostras foram solubilizadas em água potável, nas concentrações descritas na Tabela 4, com °Brix e pH corrigidos para os valores do pseudofruto in natura (7.1 e 4.15 respectivamente). As concentrações foram definidas de acordo com os valores de concentração de fenólicos encontrados na literatura para o pedúnculo de caju, na faixa de 1-2 mg.mL<sup>-1</sup> (DAS; ARORA, 2017). Todas as amostras foram analisadas com repetição e o intervalo mínimo entre as sessões foi de 10 minutos.

Tabela 4. Concentrações das amostras analisadas sensorialmente

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>
Extrato metanólico do pedúnculo de caju (EC1)	2
Extrato metanólico do pedúnculo de caju (EC2)	5
Extrato do precipitado proteico de caju (EP1)	1
Extrato do precipitado proteico de caju (EP2)	2
Mistura de ácidos anacárdicos (AcAn1)	1
Ácido anacárdico 15:3 (F1)	1
Ácido anacárdico 15:2 (F2)	1
Ácido anacárdico 15:1 (F3)	1

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Foram servidos 5 mL de amostra em copinhos descartáveis de 50 mL, de forma monádica (uma amostra por sessão). Os provadores foram orientados a colocar todo o conteúdo do recipiente na boca e deixá-lo repousar por 10 segundos, rolar a solução pela boca, expondo-o a todas as papilas gustativas e mucosa bucal (ao menos 3 rotações) e depois cuspir a solução em um recipiente fornecido. Após 15 segundos de espera, os indivíduos marcavam a intensidade da adstringência percebida na amostra em uma escala de 5 pontos (0 a 4):

0 = não adstringente

1 = pouco adstringente

2 = adstringente

3 = muito adstringente

4 = extremamente adstringente.

Os extremos de mínimo e de máximo da escala foram previamente determinados em treinamento. Os testes foram realizados em duplicata.

### **3.10 Análises Estatísticas**

Os resultados obtidos nos testes sensoriais de adstringência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com as seguintes fontes de variação: amostra (AMOS), provador (PROV) e a interação AMOS X PROV, sendo o provador considerado como bloco. Diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch and Quiot (REGWQ) com intervalo de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ). As análises foram realizadas por meio do programa estatístico XLSTAT v. 18.1 (Addinsoft).

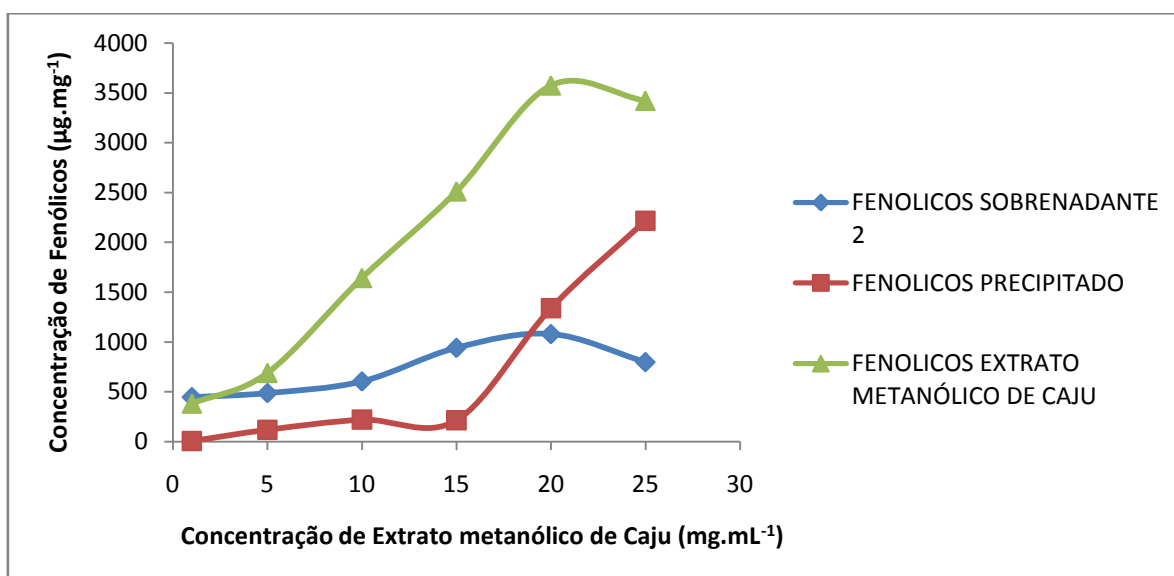
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Quantificação de fenólicos por precipitação protéica

Estudos apontam que os compostos fenólicos reduzem a lubrificação da saliva após a precipitação de proteínas salivares, em consequência dessa diminuição, a adstringência é percebida como a fricção de duas superfícies enrugadas (SCHARBERT et al., 2004) (GARCÍA-ESTÉVEZ et al., 2018). Visando esse mecanismo de percepção da adstringência na mucosa humana, foi realizada a precipitação proteica com o extrato metanólico do pedúnculo de caju com o intuito de concentrar os compostos responsáveis pela adstringência no precipitado.

A partir da precipitação, foi realizada a quantificação de fenólicos no extrato, precipitado e sobrenadante. A Figura 10 apresenta os valores obtidos. Percebemos que o extrato apresenta uma maior concentração de fenólicos quando comparado ao sobrenadante 2 e precipitado, chegando ser maior em média de 3 a 16 vezes, respectivamente.

Figura 10. Quantificação de fenólicos no extrato metanólico de caju (antes da precipitação), sobrenadante 2 (após a precipitação) e precipitado (após a precipitação).



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

É possível perceber que, a partir da concentração de extrato de caju de 20 mg.mL<sup>-1</sup>, a concentração de fenólicos no precipitado passou a ser maior que no sobrenadante, chegando a triplicar o valor dessa diferença na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup>. Apesar de uma maior diferença não se pode garantir a precipitação apenas dos compostos adstringentes com a concentração de extrato do pedúnculo de caju de 25 mg.mL<sup>-1</sup>, visto que a proteína tem um número fixo de ligações com os compostos fenólicos, assim com o aumento da concentração do extrato, sem o aumento da concentração da solução proteica, todos os sítios de ligação da proteína seriam ocupados podendo outros compostos fenólicos precipitar devido a uma possível interação fenol-fenol (SIEBERT et al., 1996).

Os fenólicos migraram para o precipitado devido à interação apolar do anel benzóico com as zonas apolares de alguns aminoácidos formadores das proteínas, e também devido às ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas dos compostos com os grupos carbonila e amina das proteínas (CARVALHO et. al., 2007).

Com base nos valores obtidos na quantificação, optou-se por utilizar a concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup> para realizar as análises em UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> e os testes sensoriais, visto que nessa concentração os fenólicos estavam mais presentes no precipitado e uma maior seletividade para os compostos adstringentes.

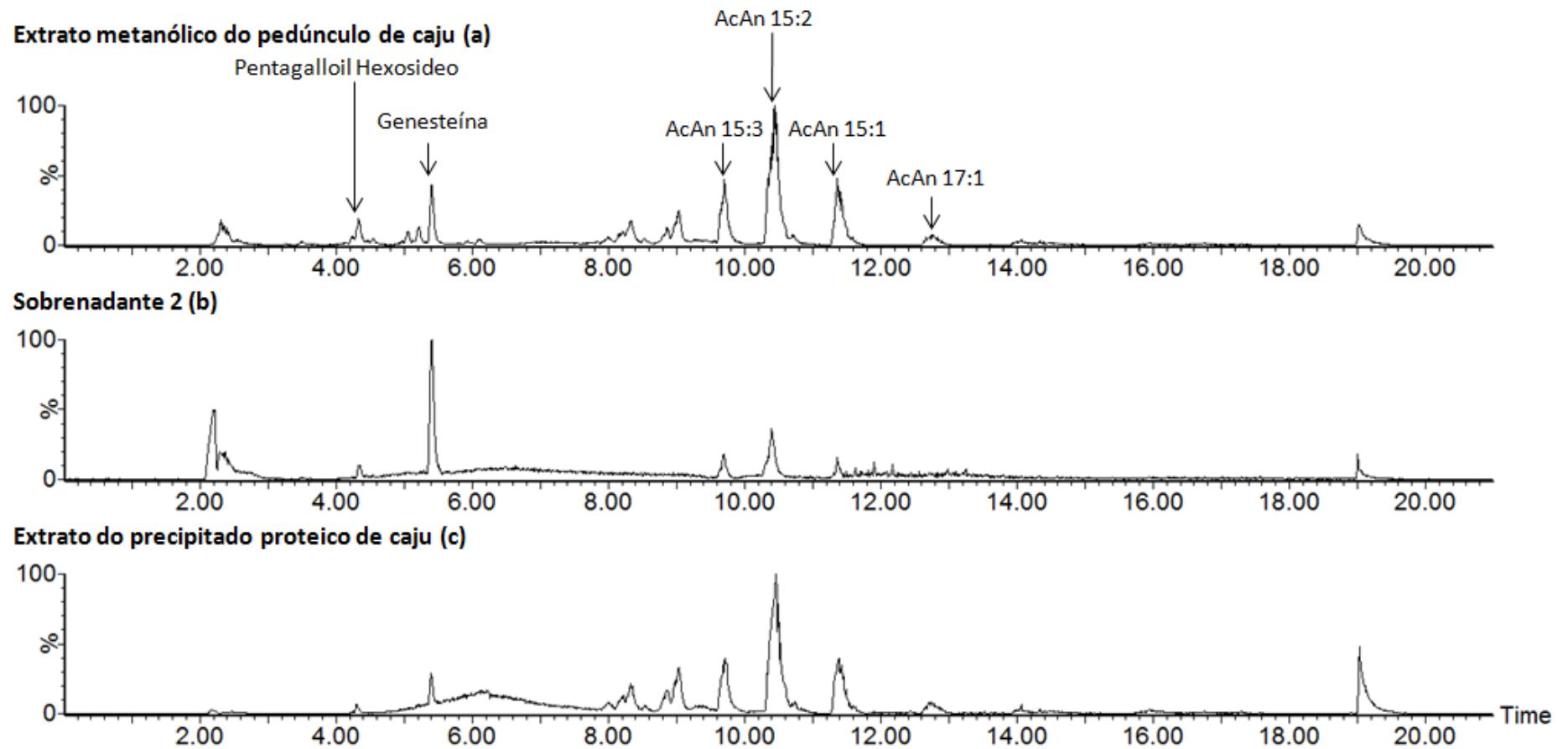
#### 4.2 Identificação dos compostos fenólicos em UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>

A partir da metodologia de extração descrita na seção 3.2 foi possível obter o extrato metanólico do pedúnculo de caju que foi analisado posteriormente por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>. O sobrenadante 2 e o extrato do precipitado proteico de caju também foram analisados. Todas as amostras analisadas por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> foram dopadas com o padrão interno de genesteína na concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> com o intuito de mensurar a relação das áreas dos compostos em cada uma das amostras.

O perfil cromatográfico das amostras foi analisado mediante os cromatogramas do modo negativo (ESI<sup>-</sup>), ilustrado na Figura 11, em conjunto com os espectros de massa. Os picos exibidos nos cromatogramas foram enumerados consecutivamente de acordo com a ordem de eluição, como demonstrado na Tabela 5. Para a identificação dos compostos utilizou-se como base de dados antigos referentes a Família Anacardiaceae, gênero *Anacardium* e da espécie *A. occidentale*.



Figura 11. Cromatogramas em BPI obtidos no sistema UPLC-QTOF em modo negativo (ESI) do (a) Extrato metanólico pedúnculo de caju; (b) Sobrenadante 2; (c) Extrato do precipitado proteico de caju.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Tabela 5. Identificação dos compostos presentes no extrato, sobrenadante e precipitado do pedúnculo de caju por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.

Pico N°	Tr Min	[M-H] <sup>+</sup> Observado	[M-H] <sup>+</sup> Calculado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Tentativa de identificação	Extrato	Sobrenadante	Precipitado	Referências
1	4,31	939,1116	939,1104	617,0893; 769,0878	C <sub>41</sub> H <sub>32</sub> O <sub>26</sub>	4,7	PentagaloilHexosí deo	✓	✓	✓	Abu-reidah et al., 2015
2	8,00	397,1325	397,1346	-	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	-5,3	N.I	✓		✓	
3	9,03	531,3145	531,3169	-	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O <sub>10</sub>	-4,5	N.I	✓		✓	
4	9,81	341,2104	341,2117	297,2203; 119,0496	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	-3,8	Ácido Anacárdico (15:3)	✓	✓	✓	Cunha et al., 2017
5	10,56	343,2245	343,2273	299,2225; 106,0394	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	-2,8	Ácido Anacárdico (15:2)	✓	✓	✓	Cunha et al., 2017
6	11,47	345,2412	345,2430	301,2463; 106,0413	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	-5,2	Ácido Anacárdico (15:1)	✓	✓	✓	Oiram Filho et al., 2017
7	12,76	373,2734	373,2743	329,2870; 106,0439	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	-2,4	Ácido Anacárdico (17:1)	✓		✓	Oiram Filho et al., 2017

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O pico 1 ( $t_r= 4,31$  min) apresentou seu espectro de massas de primeira ordem MS o íon desprotonado 939,1116 Da  $[M-H]^-$  e verificou-se a presença dos fragmentos no espectro de segunda ordem, MS/MS, 617,0893 Da e 769,0878 Da, que de acordo com a literatura indica a presença de Pentagalolil Hexosídeo (ABU-REIDAH et al., 2015). O pentagalolil hexosídeo é um precursor para a formação de elagitaninos e galotaninos mais complexos (CARVALHO, 2010).

O pico 2 ( $t_r= 8,00$  min) trata-se de um composto não identificado,  $[M-H]^-$  em  $m/z$  397,1325 Da, cuja fórmula molecular obtida pelo software *Masslynx* é  $C_{15}H_{26}O_{12}$  com erro (PPM) de -5,3.

O pico 3 ( $t_r= 9,03$  min) também retrata um composto não identificado com massa de primeira ordem MS o íon desprotonado 531,3145 Da  $[M-H]^-$ . A fórmula molecular  $C_{27}H_{48}O_{10}$  foi obtida pelo software *Masslynx* com erro (PPM) de -4,5.

Três ácidos anacárdicos com cadeia alquílica  $C_{15}$  de comprimento e diferentes graus de insaturação (tri, di e mono-insaturados) foram identificados nos picos 4 ( $t_r= 9,81$  min) , 5 ( $t_r= 10,56$  min) e 6 ( $t_r= 11,47$  min). As massas apresentadas em seus espectros de massas MS foram 341,2104 Da, 343,2245 Da e 345,2412 Da  $[M-H]^-$ , respectivamente (CUNHA et al., 2017).

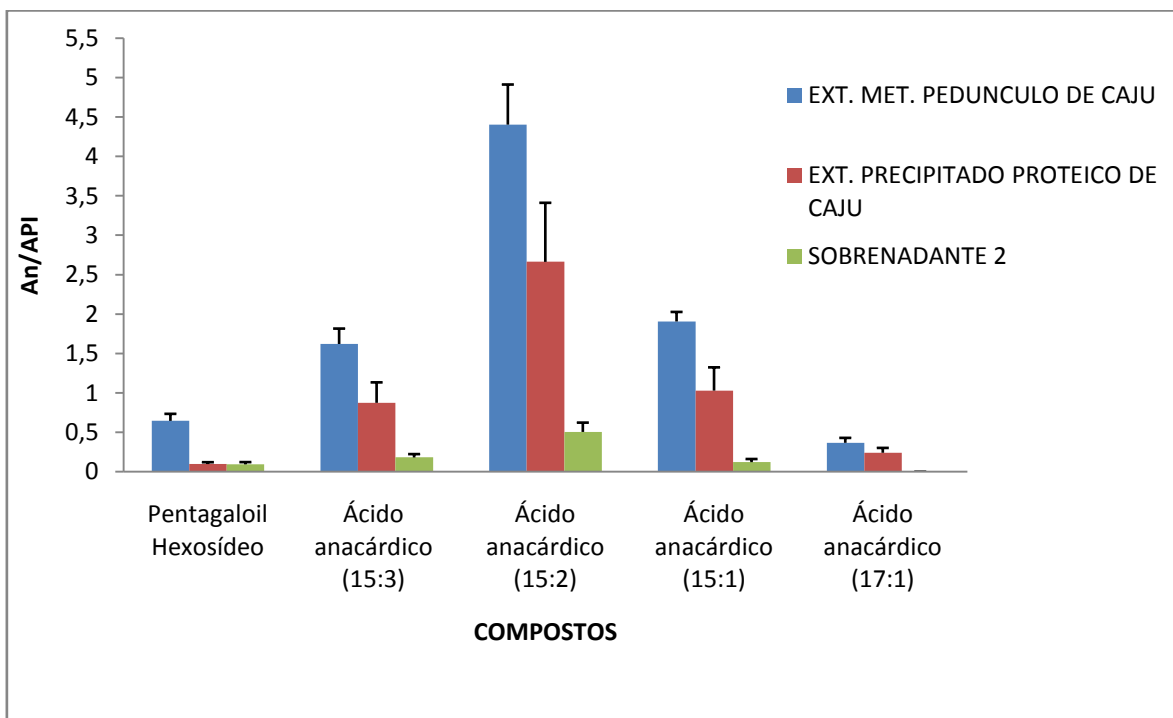
No pico 7 ( $t_r= 12,76$  min), foi possível observar no espectro de massas MS o íon desprotonado  $m/z$  373,2734 Da, esse íon correlacionado com os íons fragmentos, observados no MS/MS, 329,2870 Da e 106,0439 Da é identificado como Ácido anacárdico 17:1 (OIRAM FILHO et al., 2017).

Os ácidos anacárdicos são compostos fenólicos derivados do ácido salicílico e, devido a sua cadeia carbônica lateral, apresentam caráter lipídico, são encontrados em grande parte do cajueiro e em seu fruto (SEONG et al., 2014). Eles estão presentes em maior concentração no líquido que é extraído da casca da castanha de caju (LCC), aproximadamente 60 % (m/m), o que resulta em propriedades cáusticas e irritantes (OIRAM FILHO et al., 2017). No entanto, no pedúnculo a concentração desses compostos é menor, segundo Agostini-Costa (2004), essa concentração varia de 0,20 a 0,51 % (m/m).

Como demonstrado na Tabela 5, o precipitado apresentou os mesmos picos do extrato metanólico do caju, contudo, o sobrenadante não apresentou o composto do pico 7, ácido anacárdico 17:1. Ao analisarmos a razão entre o sinal dos analitos e do padrão interno obtivemos o gráfico representado na Figura 12. Podemos afirmar que a precipitação proteica concentrou os compostos fenólicos no precipitado, uma vez que a concentração é maior

quando comparada à do sobrenadante. Visto que a precipitação proteica foi eficiente para concentrar os fenólicos no precipitado, o extrato do precipitado proteico de caju foi analisado sensorialmente para mensurar sua adstringência.

Figura 12. Razão entre a área do sinal dos compostos (An) e a área do sinal do padrão interno (API) nas amostras extrato metanólico do pedúnculo de caju, sobrenadante 2 e extrato precipitado proteico de caju.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

### 4.3 Fracionamento dos ácidos anacárdicos

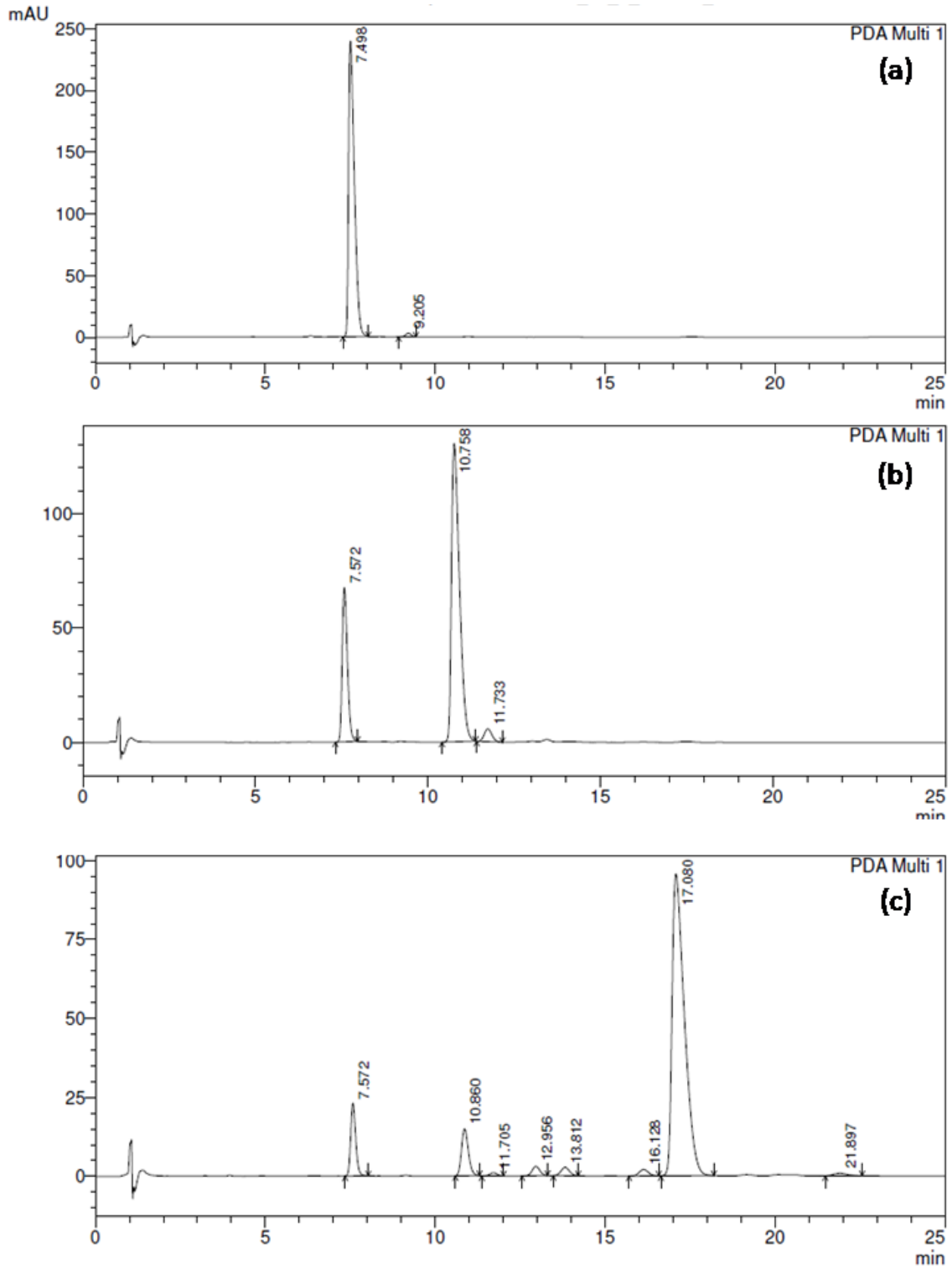
Devido à grande concentração de ácidos anacárdicos no extrato do precipitado protéico do caju, tornou-se necessário a análise sensorial de uma mistura de ácidos anacárdicos majoritários (com aproximadamente 50 % de 15:3, 20 % de 15:2 e 30 % de 15:1), bem como de suas frações isoladas. Os ácidos anacárdicos utilizados para o fracionamento foram provenientes de um estudo executado por Oiram Filho et al., 2017. Esta matéria prima foi escolhida devido à sua maior pureza e disponibilidade de massa, uma vez que, para a análise sensorial, é necessária uma grande quantidade de massa das frações isoladas.

O perfil cromatográfico dos ácidos anacárdicos em CLAE-UV/VIS está ilustrado no apêndice A. O rendimento obtido para a fração 1 (trieno) foi de 22,14 %, para a fração 2 (dieno) foi de 13,34 % e de 17,45 % para a fração 3 (monoeno).

A pureza de cada ácido anacárdico isolado foi de 98,93 %, 72,67 % e 79,68 % para 15:3, 15:2 e 15:1, respectivamente. A pureza foi avaliada de acordo com as áreas dos picos cromatográficos obtidos via CLAE-DAD (analítico), conforme ilustrado na Figura 13. Todos os picos presentes foram integrados e seus percentuais de áreas foram utilizados para o cálculo de pureza. Picos com concentrações abaixo do limite de detecção não foram contabilizados.

Os valores de purezas dos compostos foram satisfatórios, visto que, na literatura, estudos com isolamento de compostos fenólicos reportam purezas entre 75 e 99% (FANG et al., 2017).

Figura 13. Cromatograma HPLC-DAD (a) ácido anacárdico 15:3; (b) ácido anacárdico 15:2 e (c) ácido anacárdico 15:1.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

#### 4.4 Análise sensorial da adstringência

A junção da análise sensorial com técnicas analíticas (isolamento bioguiado) têm sido de grande importância para o reconhecimento de diversos compostos que influenciam nas características sensoriais em produtos alimentícios. Com o intuito de identificar os marcadores químicos para a adstringência no pedúnculo do cajueiro, realizou-se o teste de adstringência com as amostras citadas nas seções anteriores.

Os resultados da análise de variância estão apresentados na Tabela 6. Foi observada uma diferença altamente significativa entre as amostras quanto à intensidade da adstringência percebida pela equipe sensorial. Apesar de treinados, os provadores apresentaram diferença significativa entre si. Esse fato é comum quando se utiliza escalas numéricas, pois os provadores utilizam porções diferentes da escala para expressar suas opiniões. A interação amostra X provador também foi testada e foi significativa. No entanto, analisando as respostas individuais observou-se que essa interação não foi importante. Dessa forma, procedeu-se à comparação das médias por meio do teste REGWQ, cujos resultados encontram-se expressos na Tabela 7 e ilustrados na Figura 14 para melhor visualização.

Tabela 6. Resultados da ANOVA para a intensidade de adstringência de extratos do pedúnculo de caju e suas frações.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>SQM</b>	<b>F</b>	<b>Valor de P</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Modelo</b>	31	57,643	1,859	4,269	<0,0001	0,81
<b>Amostra (AMOS)</b>	7	26,325	3,761	8,634	<0,0001	
<b>Provador (PROV)</b>	3	7,846	2,615	6,005	0,002	
<b>AMOST*PROV</b>	21	23,472	1,118	2,566	0,009	
<b>Erro</b>	30	13,067	0,436			
<b>Total</b>	61	70,710				

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

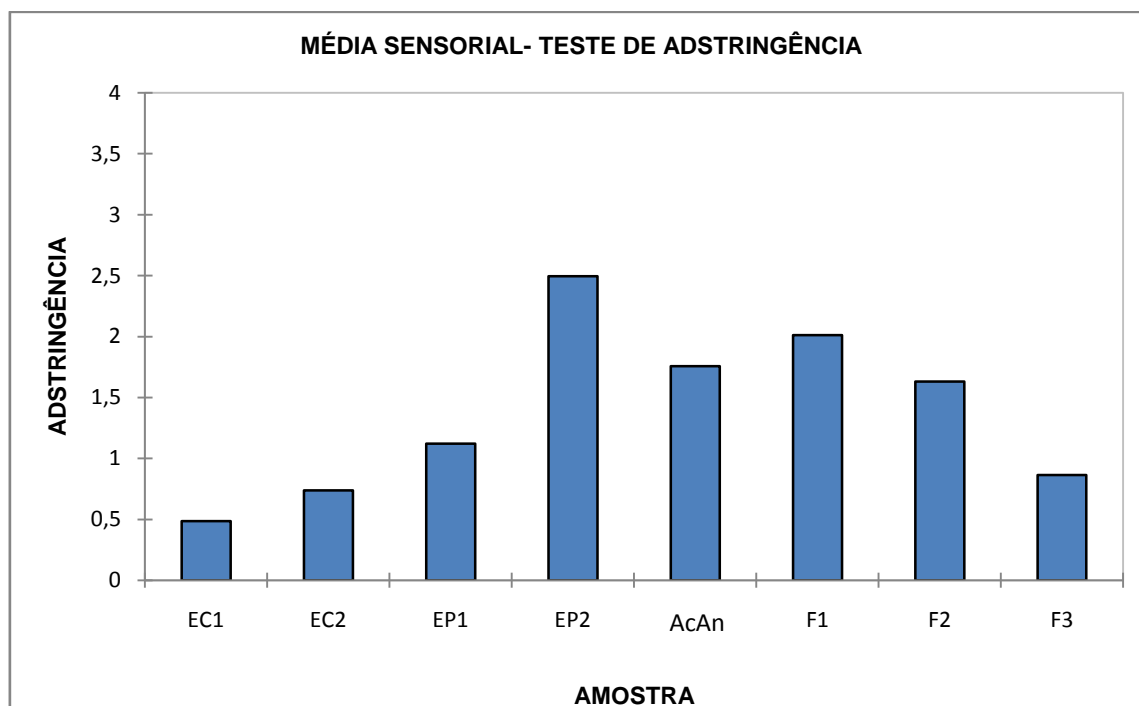
Tabela 7. Média sensorial da adstringência nas amostras

Amostra	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	Adstringência
Extrato metanólico do pedúnculo de caju (EC1)	2	0,48 <sup>e</sup>
Extrato metanólico do pedúnculo de caju (EC2)	5	0,74 <sup>de</sup>
Extrato do precipitado proteico de caju (EP1)	1	1,12 <sup>cde</sup>
Extrato do precipitado proteico de caju (EP2)	2	2,50 <sup>a</sup>
Mistura de ácidos anacárdicos (AcAn)	1	1,76 <sup>abc</sup>
Ácido anacárdico 15:3 (F1)	2	2,01 <sup>ab</sup>
Ácido anacárdico 15:2 (F2)	1	1,63 <sup>abcd</sup>
Ácido anacárdico 15:1 (F3)	1	0,86 <sup>cde</sup>

Escala de adstringência variando de 0 a 4, sendo: 0 = não adstringente; 1 = pouco adstringente; 2 = adstringente; 3 = muito adstringente; 4 = extremamente adstringente.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 14. Gráfico da intensidade de adstringência.



EC1= Extrato metanólico do pedúnculo de caju (2 mg.mL<sup>-1</sup>); EC2= Extrato metanólico do pedúnculo de caju (5 mg.mL<sup>-1</sup>); EP1= Extrato do precipitado proteico de caju (1 mg.mL<sup>-1</sup>); EP2= Extrato do precipitado proteico de caju (2 mg.mL<sup>-1</sup>); AcAn= Mistura de ácidos anacárdicos (1 mg.mL<sup>-1</sup>); F1= Ácido anacárdico 15:3 (1 mg.mL<sup>-1</sup>); F2= Ácido anacárdico 15:2 (1 mg.mL<sup>-1</sup>); F3= Ácido anacárdico 15:1 (1 mg.mL<sup>-1</sup>). Escala de adstringência variando de 0 a 4, sendo: 0 = não adstringente e 4 = extremamente adstringente.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).



O extrato metanólico do pedúnculo de caju (EC) apresentou médias de 0,48 e 0,74 nas concentrações de 2 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo considerado entre não adstringente e pouco adstringente na escala de 5 pontos.

Já o extrato metanólico do precipitado proteico de caju (EP) obteve médias de 1,12 para a concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo reconhecido como pouco adstringente na escala de 5 pontos. Ao dobrarmos sua concentração, a média sensorial para a adstringência passou a ser 2,50, considerado de adstringente a muito adstringente pelos provadores. Pode-se perceber que a precipitação proteica foi seletiva para concentrar os fenólicos adstringentes no precipitado, visto que a média sensorial de EP é maior que a de EC e difere estatisticamente.

Ao analisar o cromatograma obtido por UPLC-QTOF (ESI) do precipitado protéico de caju e a relação entre os sinais dos analitos e do padrão interno, verificou-se que os compostos em maior concentração foram os ácidos anacárdicos. Tendo em vista este fato, tais compostos foram analisados sensorialmente.

A mistura de ácidos anacárdicos obteve média sensorial em relação à adstringência de 1,75 para a concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, considerado de pouco adstringente a adstringente na escala avaliada. Devido ao resultado positivo quanto à percepção da adstringência para as amostras de ácidos anacárdicos, tornou-se necessário a análise sensorial das frações isoladas dos ácidos anacárdicos, com intuito de mensurar qual das frações possuiria maior caráter adstringente.

Ao analisar a adstringência das frações de ácidos anacárdicos, ácido trieno (F1) apresentou uma média sensorial de 2,01, considerada adstringente na escala de 5 pontos, e o dieno (F2) apresentou média sensorial de 1,63, encontrando-se entre pouco adstringente e adstringente. Já o ácido monoeno (F3) apresentou a menor média, 0,86, considerada uma amostra entre não adstringente e pouco adstringente. Apenas F1 e F3 apresentaram diferença estatística entre si.

A intensidade da adstringência percebida nas frações F2 e F3 pode ser correlacionada com os seus graus de pureza, uma vez que ambas ainda apresentaram percentuais de F1 no seu isolamento. F2 obteve 24% e F1 8%, como ilustrado nos cromatogramas da Figura 14, o que justificaria a maior média sensorial para o ácido dieno. Devido ao baixo limiar de detecção para adstringência (FERRER-GALLEGO et al., 2014), pequenas concentrações das substâncias relacionadas a este atributo podem interferir na percepção dos provadores.

Os provadores descreveram uma sensação de picância seguida de irritação na

garganta ao final da análise das frações de ácidos anacárdicos. Essas características são comuns na percepção da subqualidade da adstringência no paladar humano, irritação na garganta, definida como sensação de ardor e/ou coceira na garganta após a ingestão do produto (GARRUTI et al., 1999).

Os testes sensoriais revelaram que a precipitação proteica foi mais seletiva com relação ao extrato do pedúnculo de caju resultando em uma maior concentração dos compostos adstringentes no precipitado, aumentando a percepção dos provadores. Os ácidos anacárdicos contribuem para a adstringência no pseudofruto do cajueiro, apresentando diferença na percepção do atributo entre o ácido anacárdico 15:3 e o 15:1, sendo o trieno o mais adstringente quando comparado ao monoeno.

## 5 CONCLUSÃO

Os ácidos anacárdicos foram isolados e identificados como os componentes que contribuem para adstringência do pedúnculo de caju, sendo o ácido trieno mais adstringente quando comparado ao monoeno. O efeito adstringente desses compostos foi observado e descrito pela primeira vez.

O método de precipitação proteica foi seletivo para a concentração dos compostos adstringentes do pedúnculo de caju, tendo em vista que a concentração de fenólicos passou a ser maior no precipitado que no sobrenadante. A análise das amostras, extrato metanólico do pedúnculo de caju, sobrenadante 2 e extrato do precipitado protéico de caju, por meio de UPLC-ES-QTOF-MS<sup>E</sup> permitiu a identificação dos compostos responsáveis pela adstringência no pedúnculo de caju.

A técnica utilizada em HPLC-UV-VIS foi eficiente para o isolamento dos ácidos anacárdicos, compostos identificados como os marcadores químicos para a adstringência no pedúnculo de caju a partir da reposta de seu teste sensorial.

Portanto, o presente estudo contribuirá significativamente para o desenvolvimento de técnicas com o objetivo de reduzir e/ou eliminar os compostos adstringentes do pedúnculo de caju, o que influenciará na aceitabilidade do pseudofruto e seus derivados nos mercados internacionais.

## **6 PERSPECTIVAS FUTURAS**

A metodologia utilizada mostrou-se eficiente para isolar e identificar os compostos que contribuem para a adstringência no pedúnculo de caju, porém faz-se necessário o estudo da sinergia desses compostos assim como a relação de suas concentrações.

O desenvolvimento de um método analítico para quantificar esses compostos adstringentes faz-se necessário para verificar se os materiais que possuem maior concentração dos compostos marcadores realmente apresentam maior adstringência. Com a validação dos resultados, o estudo dará início ao desenvolvimento de tecnologias e processos visando reduzir a concentração dos compostos marcadores ou até mesmo inibir a percepção desses compostos no paladar humano.

O conhecimento dos compostos marcadores poderá ser a base para estudos de melhoramento genético visando desenvolver novos clones com menores concentrações de ácidos anacárdicos.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciencia Rural**, v. 34, n. 4, p. 1075-1080, 2004.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, p. 495–502, 2003.
- AZEVEDO, D. C. S.; RODRIGUES, A. Separation of fructose and glucose from cashew (*Anacardium occidentale* L.) apple juice by simulated moving-bed chromatography. **Science Technology**, v. 40, p. 1761, 2005.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BENNICK, A. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 184-196, 2002.
- BRITO, E. S. de et al. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) by LC-DAD-ESI/MS. **Food chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112-1118, 2007.
- CAMPOS, D. C. P. et al. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. **Desalination**, v. 148, n. 1-3, p. 61-65, 2002.
- CARVALHO, Elisabete Barros. **Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos**. 2007. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2007.
- CARVALHO, D. V. et al. Influence of low molecular weight compounds associated to cashew (*Anacardium occidentale* L.) fiber on lipid metabolism, glycemia and insulinemia of normal mice. **Bioactive carbohydrates and dietary fibre**, v. 13, p. 1-6, 2018.
- CARVALHO, M. R. **Estudos sobre a síntese de elagitaninos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências-Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- CARVALHO, J. M. de, MAIA, G. A.; DE FIGUEIREDO, R. W.; BRITO, E. S. de; RODRIGUES, S. Development of a blended non alcoholic beverage composed of coconut water and cashew apple juice containing caffeine. **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 5, p. 664-681, 2007.

CAVALCANTE, A. A. M. et al. Cashew (*Anacardium occidentale* L.) apple juice lowers mutagenicity of aflatoxin B1 in *S. typhimurium* TA102. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 328-333, 2005.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81 (suppl), p.223–229, 2005.

CZEPA, A.; HOFMANN, T. Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucuscarota* L.) and carrot puree. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.51, p.3865-3873, 2003.

DARAMOLA, B. Assessment of some aspects of phytonutrients of cashew apple juice of domestic origin in Nigeria. **African Journal of Food Science**, v. 7, n. 6, p. 107-12, 2013.

DAS, I.; ARORA, A. Post-harvest processing technology for cashew apple—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 194, p. 87-98, 2017.

DIOGENES, M. J. N.; MARAIS, S. M.; CARVALHO, F. F. Contact dermatitis among cashew nut workers. **Contact Dermatitis**, v.35, p.114-115, 1996.

FANG, Y. et al. Isolation and purification of phenolic acids from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds by pH-zone-refining counter-current chromatography and their antioxidant activity evaluation. **Food Analytical Methods**, p. 1-9, 2017.

FERRER-GALLEGO, R. et al. Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas. **Food research international**, v. 62, p. 1100-1107, 2014.

FIGUEIREDO, R. W. et al. Physical–chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during development and maturation. **Food chemistry**, v. 77, n. 3, p. 343-347, 2002.

FRANK, O.; OTTINGER, H.; HOFMANN, T. Characterization of an intense bitter-tasting 1H,4H-quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.231-238, 2001.

GARCÍA-ESTÉVEZ, I.; RAMOS-PINEDA, A. M.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception. **Food & function**, v. 9, n. 3, p. 1294-1309, 2018.

GARRUTI, Deborah dos Santos; ROSSETTI, Adroaldo; LIMA, Rosemeire do Carmo. Análise descritiva quantitativa de suco de pseudofruto de cajueiro anão precoce (*Anacardium Occidentale* L.). **Avanços em análise sensorial**, p. 227-242. São Paulo: Livraria Varela, 1999.

GLABASNIA, A.; HOFMANN, T. Identification and sensory evaluation of dehydro- and deoxyellagitannins formed upon toasting of oak wood (*Quercus alba* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p.4109–4118, 2007.

HAGERMAN, A. E., BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 28, n. 4, 1978.

HARBORNE J. B, BAXTER H., MOSS G. P., editores. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HASLAM, E. Vegetable tannins—Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2713-2721, 2007.

HONORATO, T. L.; RODRIGUES, S. Dextranase stability in cashew apple juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 1, p. 105, 2010.

LANÇAS, Fernando Mauro. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. **Campinas, SP: Editora Átomo**, 2009.

LANÇAS, F. M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LAWLESS, H. T.; HORNE, J.; GIASI, P. Astringency of organic acids is related to pH. **Chemical Senses**, v. 21, n. 4, p. 397-403, 1996.

LEITE, L. A. S. & Paula Pessoa, P. F. A. **Aspectos Socioeconômicos. In: L. M. Barros (Ed.), Caju. Produção: aspectos técnicos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (pp. 15–17). Brasília: Informação Tecnológica. (Frutas do Brasil, 30), 2002.

MALDANER, Liane et al. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química nova**, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MARC, A. et al. Minerals composition of the cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) of Yamoussoukro, Cote D'ivoire. **Pakistan Journal of Nutrition**, 2011.

MICHODJEHOUN-MESTRES, L. et al. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 851-857, 2009.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NETO, L. et al. Characterization of cytotoxic activity of compounds derived from anacardic acid, cardanol and cardol in oral squamous cell carcinoma. **In: BMC proceedings**. Bio Med Central, v. 8, n. 4, p. P30, 2014.

OIRAM FILHO, F. et al. Development and Validation of a Reversed Phase HPLC Method for

Determination of Anacardic Acids in Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. **Journal of chromatographic science**, v. 56, n. 4, p. 300-306, 2017.

OTTINGER, H.; BARETH, A.; HOFMANN, T.. Characterization of natural “cooling” compounds formed from glucose and L-proline in dark malt by application of taste dilution analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1336-1344, 2001.

PAIVA, J. R. de; BARROS, L. de M. Clones de cajueiro: obtenção, características e perspectivas. **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)**, 2004.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds. **Chemical senses**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

QUIJADA-MORÍN, N.; REGUEIRO, J.; SIMAL-GÁNDARA, J.; TOMÁS, E.; RIVAS-GONZALO, J.C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M.T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12355–12361, 2012.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Foods phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application. Tecnominc, Publishing CO. **Inc Eds. Lancaster, Pennsylvania, USA**, 1995.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1212-20, 2007.

SCHARBERT, S.; HOFMANN, T. Sensory-Guided Decomposition of Red Currant Juice (*Ribes rubrum*) and Structure Determination of Key Astringent Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 1394-1404, 2007.

SCHARBERT, S.; HOLZMANN, N.; HOFMANN, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3498-3508, 2004.

SEONG, Y. et al. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 2, p. 369-377, 2014.

SIEBERT, K. J.; TROUKHANOVA, N. V.; LYNN, P. Y. Nature of polyphenol– protein interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 80-85, 1996.

SILVA, K. D. P. da; COLLARES, F. P.; FINZER, J. R. D. A simple and rapid method for estimating the content of solids in industrialized cashew juice. **Food Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 247-250, 2000.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J; CROUCH, S. R.; **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. Tradução: Marco Grassi. São Paulo: Cengage Learning, 2000.

TAIRA, S.; ONO, M.; MATSUMOTO, N. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p. 265–



271, 1997.

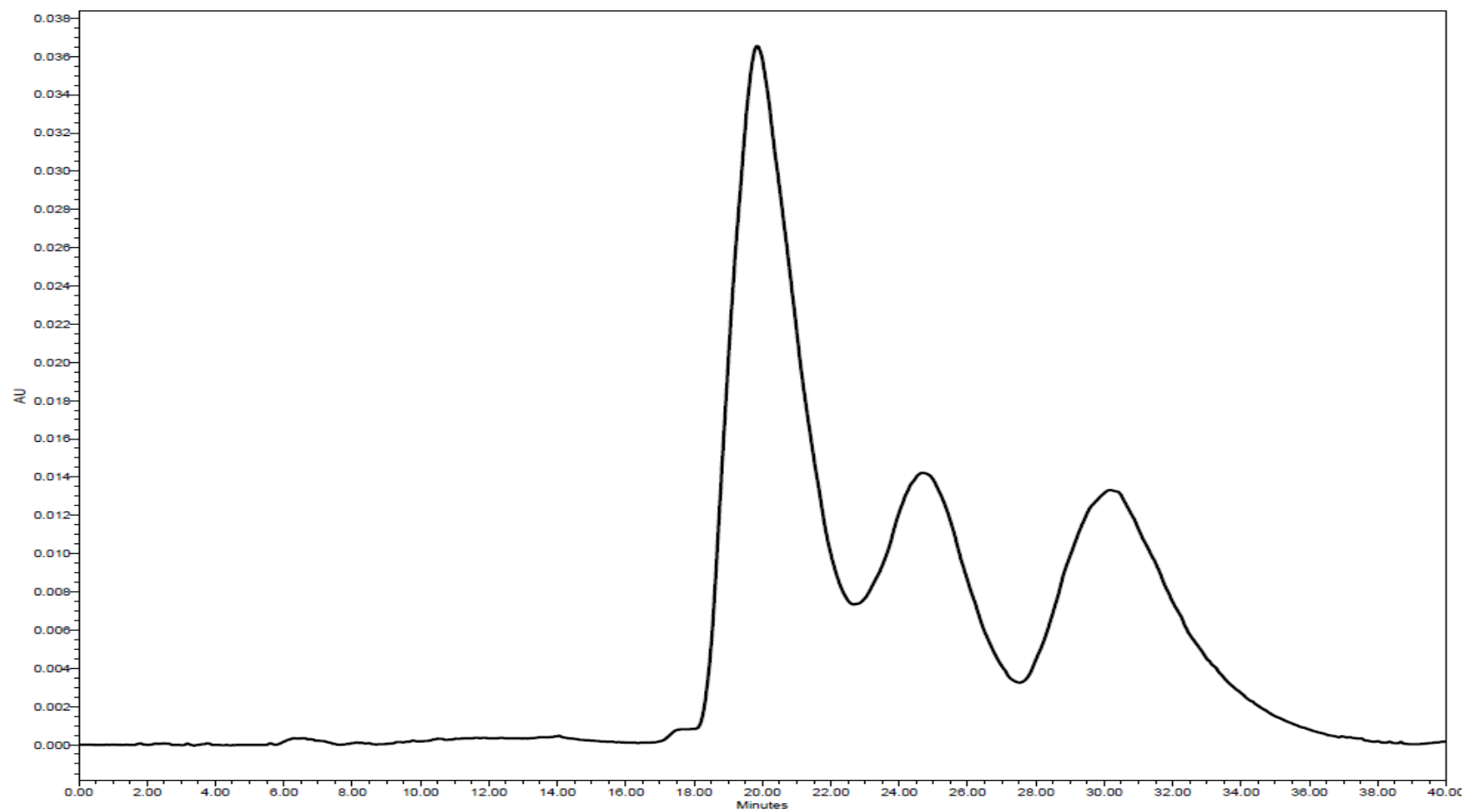
TALASILA, U., SHAIK, K. B., 2015. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: a review. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n.1, p. 54-62, 2015.

TALASILA, U.; VECHALAPU, R. R.; SHAIK, K. B. Clarification, preservation, and shelf life evaluation of cashew apple juice. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 709-714, 2012.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, 2002.

TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale* L.) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

VERGARA, C. M. de A. C. et al. Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 141-145, 2010.

**APÊNDICE A- CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS OBTIDO EM HPLC-UV/VIS EM 280NM.**

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

**APÊNCIE B- FICHA UTILIZADA NO TESTE SENSORIAL DE GOSTOS BÁSICOS**

RECONHECIMENTO DOS GOSTOS BÁSICOS					
Nome:	_____	Data	_____	Provador	_____
Você está recebendo 05 amostras codificadas, por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e reconheça se o gosto é doce, amargo, ácido ou salgado. Pode haver amostras contendo apenas água. Entre uma amostra e outra beba um pouco de água.					
AMOSTRA	_____	_____	_____	_____	_____
DESCRIÇÃO	_____	_____	_____	_____	_____

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

**APÊNDICE C- FICHAS UTILIZADAS NO TREINAMENTO SENSORIAL DE  
PROVADORES PARA ADSTRINGÊNCIA (A) TESTE TRIANGULAR (B) TESTE  
PAREADO**

(a)

---

**TESTE DE TRIANGULAR** **Sessão:** \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Provador: \_\_\_\_\_

Você está recebendo três amostras codificadas, onde duas amostras são iguais e uma é diferente. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e identifique, com um círculo, a amostra diferente. Entre a prova de uma amostra tome um pouco de água.

Comentários: \_\_\_\_\_

(b)

---

**TESTE DE COMPARAÇÃO PAREADA – ADSTRINGÊNCIA** **Provador:** \_\_\_\_\_ **SESSÃO** \_\_\_\_\_

**Nome:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Você está recebendo 02 amostras codificadas. Siga as orientações para execução do teste. O objetivo do teste é indicar a amostra adstringente.**

- 1) Prove as amostras na ordem que está sendo apresentada.
- 2) Beba todo o conteúdo do recipiente e deixe-o repousar na boca por 10 segundos. Role a solução pela boca, expondo-o a todas as suas papilas gustativas (ao menos 3 rotações).
- 3) Cuspa a solução no recipiente fornecido.
- 4) Aguarde 15 segundos... Beba água e prove a segunda amostra seguindo as mesmas orientações.

**Agora concentre-se e circule a amostra adstringente.** \_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_ Obrigada!

---

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

**APÊNDICE D- FICHA UTILIZADA NO TESTE SENSORIAL DE ADSTRINGÊNCIA****TESTE DE ADSTRINGÊNCIA****Provedor:** \_\_\_\_\_**Nome:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

Você está recebendo 01 amostra. Siga as orientações para a execução do teste. O objetivo do teste é indicar a intensidade da adstringência.

**Orientações:**

- Coloque todo o conteúdo do recipiente na boca e deixe-o repousar na boca por 10 segundos. Role a solução pela boca, expondo-o a todas as suas papilas gustativas e mucosas (ao menos 3 rotações).

- Cuspa a solução no recipiente fornecido.

- Aguarde 15 segundos e marque na escala a intensidade da adstringência na amostra.

( ) 0. Não adstringente

( ) 1. Pouco adstringente

( ) 2. Adstringente

( ) 3. Muito adstringente

( ) 4. Extremamente adstringente

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).