

Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae

Mariana H. Chaves*, Antônia Maria das Graças Lopes Citó, José Arimatéia Dantas Lopes, Danielly Albuquerque da Costa, Carlos Antônio A. de Oliveira, Ana Flávia Costa e Francisco Eleodoro M. Brito Júnior

Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550
Teresina-PI, Brasil.

RESUMO: O presente artigo relata o isolamento e identificação do palmitato, oleato e linoleato de sitosterila, sitosterol, estigmasterol, 3-O-β-D-galactopiranosídeo do sitosterol, 3-O-β-D-galactopiranosídeo do estigmasterol, 3-O-β-D-glicopiranosídeo do sitosterol e uma mistura de ácidos anacárdicos (monoeno e dieno) do extrato etanólico de cascas do caule de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae, bem como do sitosterol, estigmasterol, lupeol, β-amirina, catequina e epicatequina do extrato etanólico do tegumento da castanha de caju *in natura*. Os extratos EtOH da casca e do tegumento foram avaliados quanto ao conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante. O extrato etanólico das cascas do caule apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos e percentual de atividade antioxidante.

Unitermos: *Anacardium occidentale*, catequinas, esteroides, fenóis totais, atividade antioxidante.

ABSTRACT: "Total phenolics, antioxidant activity and chemical constituents from extracts of *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae". This paper describes the isolation and identification of a mixture of sitosteryl ester derivatives of fatty acids (palmitic, oleic and linoleic), sitosterol, stigmasterol, sitosterol-3-O-β-galactopyranoside, stigmasterol-3-O-β-galactopyranoside, sitosterol-3-O-β-glucopyranoside and a mixture of anacardic acids (monoene and diene) from stem bark of *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae, as well as sitosterol, stigmasterol, lupeol, β-amyrin, catechin and epicatechin from *in natura* cashew nut testa. Ethanol extracts from stem bark and testa were analyzed for antioxidant activity and total phenol content. The ethanol extract from stem bark exhibited the maximum of antioxidant activity and phenol content.

Keywords: *Anacardium occidentale*, catequins, esterooids, total phenol, antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

Anacardium occidentale L., Anacardiaceae, conhecida popularmente como cajueiro, é uma planta nativa do Brasil e característica dos campos e das regiões costeiras do Norte e Nordeste. Foi introduzida na África e Índia, pelos portugueses no século XVI e hoje está disseminada por todas as regiões tropicais do globo (Pio Corrêa, 1926). A Índia é atualmente o principal produtor e exportador mundial da castanha-de-caju, seguido pelo Vietnã e Brasil. Os Estados brasileiros que se destacam são o Ceará, como maior produtor, seguido pelo Rio Grande do Norte e Piauí (Moura, 2007).

O cajueiro é uma árvore de grande porte em bons terrenos, atingindo até 20 m de altura. Em terras secas e arenosas do sertão torna-se uma árvore baixa, esgalhada e às vezes quase rasteira. A casca é adstringente, com ação antidiabética e usada popularmente em loções e gargarejos contra aftas e infecções da garganta, dela

exsuda por incisão uma goma-resina amarela e dura com propriedades depurativa e expectorante. O suco das folhas novas é antiescorbútico e eficiente para combater aftas e cólicas intestinais. As flores, muito visitadas pelas abelhas são tônicas e até afrodisíacas (Pio Corrêa, 1926; Agra et al., 2007). A raiz é purgativa e os frutos ou cotilédones, seu principal produto, conhecido como castanha de caju ou noz de caju são comestíveis depois de assados e muito apreciados no exterior como tira-gosto ou na manufatura de doces. Em alguns países a castanha é consumida até mesmo crua e exerce uma grande competitividade com a produção de nozes, amendoins, avelãs, pistaches, entre outras. A elas são atribuídas propriedades tônico-excitantes, úteis contra a impotência e na debilidade decorrente de grandes enfermidades (Pio Corrêa, 1926; Agra et al., 2007).

Depois da castanha, o segundo produto principal do cajueiro é o LCC (líquido da casca da castanha de caju) conhecido internacionalmente por CNSL (cashew nut-shell liquid), seguido pelo suco da polpa do pseudofruto ou

pedúnculo, denominado caju (Mothé & Milfont Jr, 1994).

O LCC é viscoso, castanho escuro, acre e caústico, que impregna o mesocarpo da castanha sendo liberado no processamento para obtenção da amêndoa, constitui uma fonte natural de compostos fenólicos e sua composição química é bem estabelecida. Seus constituintes são ácidos anacárdicos, cardóis, cardanóis e 2-metilcardóis. Estes compostos apresentam uma cadeia lateral alifática de quinze carbonos na posição meta em relação à hidroxila, contendo de zero a três insaturações localizadas em C-8' (monoeno), C-8' e C-11' (dieno) e C-8', C-11' e C-14' (trieno) (Tyman et al., 1989; Kubo et al., 1986; Shobba et al., 1992).

A composição do LCC varia de acordo com sua origem e também com o processo de extração (Gedam & Sampathkumaran, 1986). Se a extração é realizada a temperaturas entre 180-200 °C, como adotada no processo industrial, resulta na descarboxilação do ácido anacárdico, conduzindo ao cardanol (Tychopoulos & Tyman, 1990). A Tabela 1 mostra a variação da composição dos constituintes fenólicos do LCC, de acordo com a cadeia lateral, obtida por diversas técnicas (Gedam & Sampathkumaran, 1986).

Tabela 1. Variação da composição dos constituintes fenólicos do LCC (Gedam & Sampathkumaran, 1986)

Constituintes	Ácido anacárdico (%)	Cardanol (%)	Cardol (%)	2-metilcardol (%)
C15:0	2,2-3,0	3,9-4,4	0,2-2,7	0,9-1,3
C15:1	25,0-33,3	21,6-32,2	8,4-15,2	16,3-25,3
C15:2	17,8-32,1	15,4-18,2	24,2-28,9	20,6-24,4
C15:3	36,3-50,4	45,2-59,0	36,5-67,2	49,8-62,2

O óleo da amêndoa (46,5%, em média) apresenta em sua composição, os ácidos: palmítico, C16:0 (11,6%), palmitoléico, C16:1 (0,3%), heptadecanóico, C17:0 (0,1%), esteárico, C18:0 (8,9%), oléico, C18:1 (61,5%), linoléico, C18:2 (17,1%), araquídico, C20:0 (0,5%) e linolênico, C18:3 (traços), determinados como ésteres metílicos, por cromatografia gasosa (Toschi et al., 1993). Além dos triacilgliceróis, componentes majoritários, o óleo contém lipídios fenólicos (derivados de ácidos anacárdicos, cardóis e 2-metilcardóis), tocoferóis (α , γ e δ) (Kubo et al., 1986; Shobba et al., 1992; Toschi et al., 1993) e outros constituintes menos abundantes, determinados na fração insaponificável do óleo (1,4%), tais como: esteroides (colesterol, campesterol, 24-metilenocolesterol, estigmasterol, sitosterol, fucosterol e Δ^5 -avenasterol), 4-metil-esteroides (obtusifoliol, diidroobtusifoliol, ciclolaudenol, gramiesterol e citrostadienol) e triterpenos (cicloartanol, β -amirina, cicloartenol, ciclolaudenol e 24-metilenocicloartanol) (Toschi et al., 1993).

Além dos lipídios fenólicos destacam-se outros constituintes químicos isolados e identificados nas diversas partes do cajueiro como os flavonóides apigenina, kanferol, quercetina, quercetina-3-O-glicopiranosila, quercetina-

3-O-ranminopiranosila, miricetina, agatisflavona, robustoflavona e amentoflavona nas folhas (Arya et al., 1989); naringenina, naringenina-7-O-(6''-O-p-cumaroil)- β -D-glicosila (Rahman et al., 1978), naringenina-5 β -glicosila (Murthy et al., 1982) occidentosideo, também conhecido como (-)-salipurposideo (Murthy et al., 1981; Murthy et al., 1982) nas cascas da castanha; (+)-catequina e (-)-epicatequina no tegumento (Subrahmanian & Nair, 1969). Além destes foram isolados galato de etila das flores (Subrahmanian et al., 1969); sitosterol das cascas da castanha (Murthy et al., 1982); ácido gálico, como produto de hidrólise de taninos, mioinositol, colesterol, campesterol, estigmasterol e sitosterol das cascas do caule (Mota, 1982; Dinda et al., 1987).

Diversas atividades farmacológicas têm sido testadas em extratos de *A. occidentale*, porém atenção especial foi dada aos lipídios fenólicos, sobretudo por suas propriedades antioxidantes (Kubo et al., 2006; Kamath & Rajini, 2007). A cadeia alquílica presente nestes compostos exercem influência significativa na atividade biológica, podendo está relacionada com o aumento da solubilidade das porções fenólicas a qual é responsável pela proteção contra a degradação biológica ou oxidação química. A influência da cadeia alquílica no mecanismo de proteção é semelhante ao efeito proposto para a cadeia isoprênica do tocoferol (Correia et al., 2006). O ácido anacárdico exibe propriedades moluscicida (Kubo et al., 1986), antitumoral (Itokawa et al., 1987; Kubo et al., 1993), antimicrobiana (Himejima & Kubo, 1991), inibidor de prostaglandina sintase (Kubo et al., 1987) e lipooxigenase (Grazzini et al., 1991).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, determinar os fenóis totais, isolar e identificar constituintes químicos de extratos etanólicos da casca do caule e do tegumento da castanha de caju *in natura*.

MATERIAL E MÉTODOS

Métodos gerais

As separações cromatográficas em coluna à pressão atmosférica, foram realizadas em gel de sílica 60 (0,063-0,20 mm) da Merck e Sephadex LH-20 da Sigma. As placas para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram preparadas com 0,25 mm de espessura, usando como fase estacionária, gel de sílica 60 GF₂₅₄ da Merck e 60 G Vetec. As revelações das cromatoplacas foram feitas por borrifamento com solução de sulfato cérico. O reagente Folin-Ciocalteu foi adquirido da Merck, o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) da Aldrich Co e o ácido gálico da Vetec.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Brüker, modelo Avance DRX-500, operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e a 125 MHz na frequência do carbono-

13. O sinal do solvente residual, não deuterado, ou do TMS foi usado como referência interna. Os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram CDCl_3 e CD_3OD (Isotec-INC). As análises dos ésteres metílicos por CG/EM foram feitas com o uso de um cromatógrafo gasoso CG 17-A com detector de massas Shimadzu, modelo GC/MS-QP 5050A, gerenciado pelo software Class-5000, usando-se coluna capilar de sílica fundida DB-5 (95% de metilpolisiloxano e 5% de fenilpolisiloxano) de 50 m de comprimento, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme. As condições de operação foram as seguintes: temperatura programada da coluna de 100 °C por 1 min, taxa de aquecimento a 4 °C/min até 200 °C permanecendo por 7 min, taxa de aquecimento a 10 °C/min até 280 °C permanecendo por 4 min; a temperatura do injetor foi 200 °C e da interface, 250 °C; o gás de arraste foi o hélio, com fluxo de 0,6 mL/min. A corrida com detector de massa foi feita no modo scan, com tempo de aquisição de 42:50 min e corte do solvente em 5 min; faixa de massas: 40 a 400 D. Os compostos foram identificados através de comparação com os espectros de massas da biblioteca Wiley229.

Material vegetal

Cascas do caule e castanha *in natura* de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae, foram coletadas no Campus da Universidade Federal do Piauí nos meses de março e julho de 2003, respectivamente. Uma excisada do espécime coletado (TEPB 674) encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso, UFPI.

Preparação e fracionamento do extrato da casca do caule

As cascas foram secas ao ar e trituradas em moinho de facas fornecendo 718 g de pó, o qual foi submetido à extração com etanol por três vezes consecutivas à temperatura ambiente. O extrato etanólico foi parcialmente concentrado a um volume de 1032 mL e determinado o peso seco que correspondeu a 99 g (14% em relação ao material vegetal seco). O extrato foi novamente concentrado até o volume de 200 mL, adicionado 400 mL de água e submetido à partição com éter etílico (4x 200 mL). A fase etérea foi concentrada, suspensa em MeOH- H_2O (9:1) e extraída com hexano, fornecendo as fases hexânica (2,3 g) e hidroalcoólica (2 g). A fase hexânica foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 eluída com hexano- CH_2Cl_2 1:4 (frações 1-28), CH_2Cl_2 -acetona 3:2 (frações 29-34), CH_2Cl_2 -acetona 4:1 (frações 35-52) e MeOH (frações 53-55). As frações foram reunidas em dez grupos, após análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). O grupo A2 (1,45 g, frações 2-13) foi novamente submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica eluída com hexano-AcOEt em ordem crescente de polaridade fornecendo A2-7 (321 mg,

hexano-AcOEt 97:3), correspondente à mistura de ésteres de ácidos graxos e sitosterol (**1a+1b+1c**), e A2-25 (485 mg, hexano-AcOEt 9:1), que depois de recristalizada em MeOH forneceu 400 mg da mistura de sitosterol (**2**) e estimasterol (**3**). O grupo A21 (257 mg, frações 21-28) foi novamente submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com CH_2Cl_2 -MeOH em ordem crescente de polaridade fornecendo 15 mg da mistura dos esteroides sitosterol e estimasterol galactosilados (**2a+3a**). Os grupos A30 (133 mg, frações 30-33) e A44 (40 mg, frações 44-45) corresponderam à mistura de ácidos anacárdicos com cadeia insaturada (**4a+4b**) e ao 3-O- β -D-glicopiranosídeo do sitosterol (**2b**), respectivamente.

Hidrólise dos ésteres de ácidos graxos e sitosterol (1a+1b+1c)

Uma alíquota de 32 mg da mistura de ésteres de ácidos graxos e sitosterol (A2-7) foi refluxada por 1 h, com solução de KOH (32 mg) em metanol (7,5 mL). Terminada a reação, cerca de 80% do metanol foi evaporado, restabelecido o volume inicial com água e extraído com éter etílico, fornecendo, após concentração do solvente, 24 mg de sitosterol. A fase aquosa foi tratada com H_2SO_4 1% até pH 2 e extraída com éter etílico. A fase etérea depois de concentrada foi tratada com excesso de solução etérea de diazometano, sob refrigeração, obtendo-se uma mistura de ésteres metílicos, os quais foram identificados por CG/EM (Silva et al., 2007).

Preparação e fracionamento do extrato do tegumento

A castanha *in natura* foi coletada e separada em tegumento e amêndoa. O tegumento foi liofilizado (90 g) e extraído três vezes por maceração com etanol à temperatura ambiente. O extrato etanólico (19 g, 21%) foi submetido à partição fornecendo as fases hexânica (1,4 g) e acetato de etila (5,3 g). A fase hexânica foi saponificada com solução metanólica de KOH (0,5% m/v), por 1 h. Cerca de 90% do metanol foi removido da mistura reacional em evaporador rotativo e o volume inicial foi restabelecido com água e extraído com éter etílico (Chaves et al., 2004). A fase etérea contendo o material insaponificável (126 mg) foi aplicada em coluna cromatográfica de gel de sílica eluída com hexano-AcOEt 95:5 (frações 6-13), 9:1 (frações 14-36), 8:2 (frações 37-41) e AcOEt 100% (frações 42-59). Após análise por CCDA, as frações foram reunidas em quatro grupos. Os grupos f6 (frações 6-10) e f14 (frações 14-19) consistiram das misturas de lupeol e β -amirina (**5+6**, 15 mg) e sitosterol e estimasterol (**2+3**, 20 mg), respectivamente. Uma alíquota de 1,0 g da fase acetato de etila foi fracionada por duas vezes consecutivas em colunas de Sephadex LH-20, sendo a primeira eluída com MeOH- CHCl_3 (3:2) e a segunda com MeOH 100%, resultando na mistura de catequina e epicatequina (**7+8**, 15 mg).

Determinação dos fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais nos extratos EtOH do tegumento da castanha e de casca do caule foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (Sousa et al., 2007). O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg/mL) e expressa como miligramas de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 809,0200A + 5,0827$, com coeficiente de correlação $R = 0,999$, onde C é a concentração do ácido gálico e A é a absorvância a 750 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da atividade antioxidante

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita monitorando o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, por meio da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 516 nm, tendo como controle positivo o BHT. Soluções dos extratos EtOH (500 µg/mL) e do controle positivo em metanol foram diluídas nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL), foram feitas a 516 nm, no primeiro, quinto e décimo minuto, a cada 10 min até completar 30 min. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução metanólica do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco.

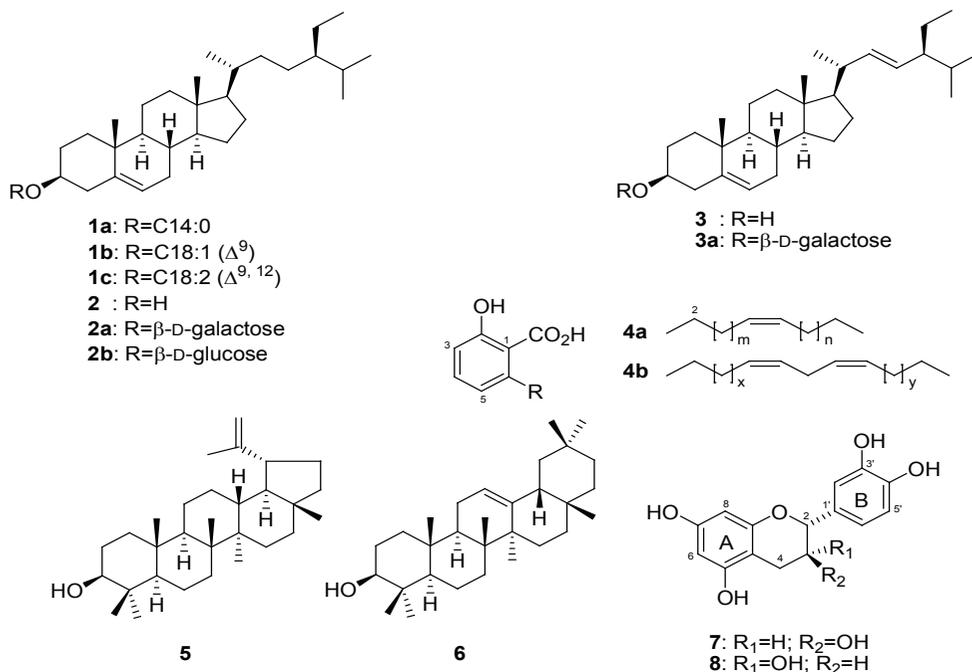
Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela seguinte equação:

$$\%AA = \{[Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{DPPH}$$

onde Abs_{DPPH} é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra) (Sousa et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento da fase hexânica da partição do extrato etanólico das cascas do caule de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae, em coluna de Sephadex LH-20 resultou no isolamento de três misturas de esteroides, uma composta de palmitato, oleato e linoleato de sitosterila (**1a+1b+1c**), outra constituída por sitosterol (**2**) e estigmasterol (**3**), e uma terceira formada por 3-*O*-β-D-galactopiranosídeo do sitosterol (**2a**) e 3-*O*-β-D-galactopiranosídeo do estigmasterol (**3a**). Adicionalmente foi também isolada uma mistura de ácidos anacárdicos com cadeia insaturada (**4a+4b**) e o 3-*O*-β-D-glicopiranosídeo do sitosterol (**2b**). O extrato etanólico do tegumento, após partição com solventes, resultou na fase hexânica e acetato de etila. A fração insaponificável da fase hexânica depois de submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica forneceu uma mistura dos triterpenoides lupeol (**5**) e β-amirina (**6**) e outra dos esteroides sitosterol e estigmasterol. O fracionamento da fase acetato de etila em coluna de Sephadex LH-20 resultou no isolamento da mistura de catequina (**7**) e epicatequina (**8**).



Todas as substâncias isoladas são comuns em outras espécies, portanto suas estruturas foram identificadas por comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos com os relatados na literatura.

A mistura de estigmasterol e sitosterol foi evidenciada no espectro de RMN ^1H pelos sinais em δ 3,54 (*m*, H-3) e 5,36 (*dl*, $J = 2$ Hz, H-6) característicos de esteróis Δ^5 , sendo confirmado pelos sinais em δ 71,8 (C-3), 140,8 (C-5) e 121,7 (C-6) do espectro de RMN ^{13}C . A presença do estigmasterol na mistura foi definida pelos sinais de menor intensidade em δ 5,00 e 5,19 (*dd*, $J = 8$ e 15 Hz) correspondentes a H-22 e H-23 da cadeia lateral e confirmado pelos sinais em δ 129,4 e 138,3 referentes a C-23 e C-22 respectivamente (De-Eknamkul & Potduang, 2003; Ayres et al., 2008). No espectro de RMN ^{13}C da mistura dos galactosídeos de sitosterol e estigmasterol e do 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo do sitosterol foi observado desblindagem de C-3 (δ 79,6) em comparação aos esteróides livres (δ 71,8), além de sinais característicos da unidade de açúcar (Ahmed et al., 1992; Matilda et al., 1996). Os ésteres de sitosterol apresentaram espectros de RMN nos quais os sinais de H-3 (δ 4,60) e C-3 (δ 73,7) encontraram-se na região de maior desblindagem em comparação aos do sitosterol (Parmar et al., 1998). Após hidrólise dos ésteres de sitosterol, a confirmação da estrutura da unidade esteroidal foi determinada por RMN. Os ácidos graxos foram metilados e os ésteres metílicos correspondentes foram analisados por CG/EM onde o cromatograma de íons totais apresentou três picos com tempo de retenção de 23,8; 27,5 e 27,6 min, correspondentes ao palmitato (38,4%), linoleato (8,7%) e oleato (52,9%) de metila respectivamente.

A mistura dos ácidos anacárdicos foi identificada pela presença no espectro de RMN ^1H de três sinais em δ 6,83 (*dl*, $J = 8,0$ Hz), 6,74 (*dl*, $J = 7,0$ Hz) e 7,33 (*t*, $J = 7,0$ Hz), característicos de anel aromático 1,2,3-trissubstituído juntamente com um tripleto em δ 2,94 ($J = 7,7$ Hz) referente ao grupo metilênico α ao anel. Adicionalmente o espectro apresentou, entre outros, um multipletto situado na região de δ 5,32-5,38 referente a hidrogênios olefinicos e dois outros multipletos em δ 2,01 e 2,75, característicos de grupos metilênicos alílico e *bis*-alílico respectivamente, confirmando a presença de insaturação na cadeia lateral. A comparação das áreas integradas destes sinais sugeriu a presença de ácidos anacárdicos monoeno e dieno, sendo confirmado no espectro de RMN ^{13}C pela presença de seis sinais de carbonos metínicos olefinicos (δ 128,0; 128,3; 129,9; 130,0; 130,2 e 130,3). A atribuição dos sinais de carbono do anel aromático foi feita aplicando-se o princípio da aditividade do substituinte (Silverstein et al., 2006), que mostrou uma perfeita correlação com os dados obtidos: δ 110,6 (C-1), 163,6 (C-2), 115,8 (C-3), 135,2 (C-4), 122,7 (C-5), 147,7 (C-6), 175,5 (C = O), 36,5 (C-1'). Todos os dados de RMN ^1H e ^{13}C observados foram consistentes com os relatados por Itokawa et al. (1987).

A mistura de β -amirina e lupeol apresentou

espectro de RMN ^1H com um duplo dupletto em δ 3,21 ($J = 4,3$ e 11,6 Hz, H-3), característico de triterpenóides 3β -OH, sendo confirmado pela presença do sinal em δ 79,0 (C-3) no espectro de RMN ^{13}C . A ocorrência do lupeol e β -amirina foi determinada de acordo com a metodologia descrita na literatura para análise de mistura de triterpenóides, devido a existência de dois pares de sinais em δ 109,5/151,2; 121,9/145,4 característicos dos carbonos olefinicos nos esqueletos triterpênicos lupano e oleanano, respectivamente (Olea & Roque, 1990; Mahato & Kundu, 1994).

O espectro de RMN ^1H da mistura de 7+8 apresentou sinais em δ 2,49 (*dd*, $J = 7,9$ e 16,0 Hz), 2,84 (*dd*, $J = 5,1$ e 16,0 Hz) 3,96 (*m*) e 4,55 (*d*, $J = 7,5$ Hz) indicativos de flavan-3-ol e atribuídos respectivamente a H-4_{ax}, H-4_{eq}, H-3 e H-2 da catequina (7). Adicionalmente apresentou dois dupletos em δ 5,84 ($J = 2,1$ Hz) e 5,92 ($J = 2,1$ Hz) atribuídos a H-8 e H-6 do anel A, juntamente com sinais referentes ao anel B: δ 6,82 (*sl*, H-2'), 6,75 (*d*, $J = 8,1$ Hz, H-5') e 6,70 (*dl*, $J = 8,1$ Hz, H-6'). A epicatequina foi evidenciada pela presença do simpleto largo em δ 4,64 (Shen et al., 1993) referente a H-4. O espectro de RMN ^{13}C apresentou dezesseis sinais, sendo quatorze referentes aos dois flavanóis, destes δ 28,5 (C-4) e 68,6 (C-3), juntamente com os sinais em δ 82,8 e 76,9, atribuídos a C-2 da catequina (7) e epicatequina (8), respectivamente confirmaram a existência das duas substâncias. Todos os dados de RMN observados foram consistentes com os relatados na literatura (Shen et al., 1993; Jung et al., 2008).

Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Sousa et al., 2007). Os compostos fenólicos naturais têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (Haslam, 1996). Um dos métodos mais utilizados para determinação dos fenóis totais utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu que consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se o molibdênio azul e o tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Nacz & Shahidi, 2004; Ikawa et al., 2003).

A avaliação dos extratos de *A. occidentale* pelo método de Folin-Ciocalteu mostrou que a casca do caule é mais rica em compostos fenólicos do que o tegumento

da castanha *in natura* apresentando $345,16 \pm 16,24$ e $185,44 \pm 12,04$ mg de equivalentes de ácido gálico, respectivamente.

O DPPH é um radical livre estável que tem sido amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante de extratos e substâncias puras (Sousa et al., 2007; Jung et al., 2008). O efeito de antioxidantes no sequestro do DPPH é devido a capacidade doadora de hidrogênio destas substâncias as quais são geralmente compostos fenólicos. No presente estudo foi investigado o potencial dos extratos EtOH de cascas do caule e do tegumento da castanha *in natura* de *A. occidentale* para sequestrar o radical DPPH. Os resultados obtidos, expressos por meio da porcentagem de atividade antioxidante nas concentrações de 25 a 250 $\mu\text{g/mL}$ são apresentados na Figura 1. Os dois extratos apresentaram percentual de atividade antioxidante dependente da concentração, porém a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ o extrato das cascas do caule não apresentou variação significativa, sendo mais ativo, em todas as concentrações testadas, do que o extrato do tegumento e do que o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxitolueno) usado como controle positivo.

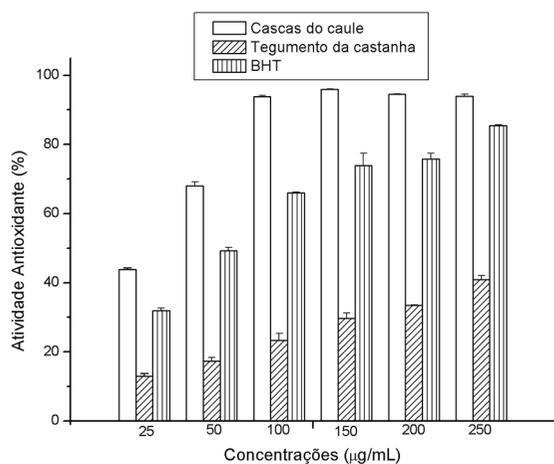


Figura 1. Percentual de atividade antioxidante de extratos EtOH de *A. occidentale* e do controle positivo BHT.

CONCLUSÃO

O fracionamento do extrato etanólico das cascas do caule de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae resultou no isolamento de uma mistura de ácidos anacárdicos com cadeia lateral insaturada (monoeno e dieno), esteroides livres, glicosilados e esterificados com ácidos graxos. O extrato etanólico do tegumento da castanha de caju *in natura* apresentou os esteroides sitosterol e estigmasterol, os triterpenoides pentacíclicos lupeol e β -amirina e os flavanóis catequinas e epicatequina, isolados em mistura.

O lupeol, os ésteres e os glicosídeos dos esteroides

estão sendo relatados pela primeira vez em *A. occidentale* e, além disto, os ácidos anacárdicos ainda não haviam sido isolados de cascas do caule.

O extrato etanólico das cascas do caule apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos, determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, e maior potencial antioxidante no ensaio do radical DPPH, provavelmente decorrente da presença de ácidos anacárdicos e de taninos hidrolisáveis e não hidrolisáveis, obtidos abundantemente em cascas do caule de *A. occidentale* (Mota, 1982; Mota et al., 1985). Entretanto a atividade antioxidante do extrato do tegumento da castanha deve ser atribuída pelo menos em parte à presença da catequina e epicatequina, pois são substâncias que têm sido relatadas por possuir excelente efeito inibidor do radical DPPH. Estes resultados sugerem que os extratos EtOH, sobretudo o da casca do caule de *A. occidentale* poderá ser uma alternativa como aditivo em alimentos e preparações farmacêuticas e cosméticas em substituição aos antioxidantes sintéticos tóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Ahmed W, Ahmad Z, Malik A 1992. Stigmasteryl galactoside from *Rhynchosia minima*. *Phytochemistry* 31: 4038-4039.
- Arya R, Babu V, Ilyas M 1989. Phytochemical examination of the leaves of *Anacardium occidentale*. *J Indian Chem Soc* 66: 67-68.
- Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH 2008. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev Bras Farmacogn* 18: 90-97.
- Chaves MH, Barbosa AS, Moita Neto JM, Aued-Pimentel S, Lago JHG 2004. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud. *Quim Nova* 27: 404-408.
- Correia SJ, David, JP, David JM 2006. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Quim Nova* 6: 1287-1300.
- De-Eknamkul W, Potduang B 2003. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* 62: 389-398.
- Dinda B, Chatterjee J, Banerjee J 1987. Sterol from *Anacardium occidentale*. *J Indian Chem Soc LXIV*: 647-648.
- Gedam PH, Sampathkumaran PS 1986. Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications. *Prog Org Coat* 14: 115-157.
- Grazzini R, Hesk D, Heining E, Hildenbrandt G, Reddy CC, Cox-Foster D, Medford J, Craig R, Mumma RO 1991. Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 775-780.
- Haslam E 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod* 59: 205-215.
- Himejima M, Kubo I 1991. Antibacterial agents from the cashew

- Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *J Agric Food Chem* 39: 418-421.
- Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J Agric Food Chem* 51: 1811-1815.
- Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Takeya K, Lepoittevin J-P, Asakawa Y 1987. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. *Chem Pharm Bull* 35: 3016-3020.
- Jung MJ, Heo, S, Wang M-H 2008. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chem* 108: 482-487.
- Kamath V, Rajini PS 2007. The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. *Food Chem* 103: 428-433.
- Kubo I, Komatsu S, Ochim M 1986. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. *J Agric Food Chem* 34: 970-973.
- Kubo I, Kim M, Naya K, Komatsu S, Yamagiwa Y, Ohashi K, Sakamoto Y, Hirakawa S, Kamikawa T 1987. Prostaglandin synthetase inhibitors from the African medicinal plant *Ozoroa mucronata*. *Chem Lett* 16: 1101-1104.
- Kubo I, Ochim M, Vieira PC, Komatsu S 1993. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *J Agric Food Chem* 41: 1012-1015.
- Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Tsujimoto K 2006. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chem* 99: 555-562.
- Mahato SB, Kundu AP 1994. ¹³C spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37: 1517-1575.
- Matilda AK, Rossi ME, Blumenthal EEA, Schuquel JTA, Malheiros A, Vidott GS 1996. Glucopyranosylsterol in species of Labiatae, Verbenaceae and Apocynaceae. *Anais Assoc Bras Quim* 43: 147-151.
- Mota MLR 1982. *Estudo antiinflamatório e análise química da casca do Anacardium occidentale* L. João Pessoa, 184 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.
- Mota MLR, Thomas G, Barbosa Filho JM 1985. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J Ethnopharmacol* 13: 289-300.
- Mothé CG, Milfont Jr WN 1994. Aplicações do LCC (Líquido da Casca da Castanha de Caju). *Rev Quim Ind* 695: 15-19.
- Moura D 2007. *Castanha de caju proposta de preço mínimo safra 2006/2007*. http://www.conab.gov.br/conabweb/download/precos_minimos/proposta_de_precos_minimos_safra_2006_07_castanha_de_caju.pdf, acesso em fevereiro 2008.
- Murthy SSN, Anjaneyulu ASR, Row LR 1981. Occidentoside-a new biflavonoid glycoside from the nut shells of *Anacardium occidentale* Linn. *Indian J Chem B* 20: 150-151.
- Murthy SSN, Anjaneyulu ASR, Row LR, Pelter A, Ward S 1982. Chemical examination of *Anacardium occidentale*-isolation and structure determination of a novel biflavonoid-C-glycoside. *Planta Med* 45: 3-10.
- Naczek M, Shahidi F 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*: 95-111.
- Olea RSG, Roque NF 1990. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. *Quim Nova* 13: 278-281.
- Parmar VS, Jain SC, Gupta S, Talwar S, Rajwanshi VK, Kumar R, Azim A, Malhotra S, Kumar N, Jain R, Sharma NK, Tyagi OD, Lawrie SJ, Errington W, Howarth OW, Olsen CE, Singh SK, Wengel J 1998. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry* 49: 1069-1078.
- Pio Corrêa M 1926. *Dicionário de plantas Úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Rahman W, Ishratullah K, Wagner H, Seligmann O, Chari VM, Österdahl B-G 1978. Prunin-6''-O-p-coumarate, a new acylated flavanone glycoside from *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry* 17: 1064-1065.
- Shen C-C, Chang Y-S, Ho L-K 1993. Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. *Phytochemistry* 34: 843-845.
- Shobba SV, Krishnaswamy PR, Ravindranath B 1992. Phenolic lipid composition during development of cashew. *Phytochemistry* 31: 2295-2297.
- Silva HR, Silva CCM, Caland Neto LB, Lopes JAD, Citó AMGL, Chaves MH 2007. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. *Quim Nova* 30: 1877-1881.
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ 2006. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC.
- Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova* 30: 351-355.
- Subramanian SS, Joseph KJ, Nair AGR 1969. Polyphenols of *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry* 8: 673-673.
- Subramanian SS, Nair AGR 1969. Catechins from cashewnut testa. *Curr Sci India* 38: 494-495.
- Toschi TG, Caboni MF, Penazzi G, Lercker G, Capella P 1993. A study on cashew nut oil composition. *J Am Oil Chem Soc* 70: 1017-1020.
- Tychopoulos V, Tyman JHP 1990. Long chain phenols-the thermal and oxidative deterioration of phenolic lipids from the cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell. *J Sci Food Agric* 52: 71-83.
- Tyman JHP, Johnson RA., Muir M, Rokhgar R 1989. The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium occidentale*). *J Am Oil Chem Soc* 66: 553-557.