



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

RAYSSA GABRIELA LIMA PORTO LUZ

**BIOACESSIBILIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO SUCO DE  
CAJU (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.) CLARIFICADO (CAJUÍNA).**

**TERESINA – PI  
2019**

**RAYSSA GABRIELA LIMA PORTO LUZ**

**BIOACCESSIBILIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO SUCO DE  
CAJU (*ANACARDIUM OCCIDENTALE*) CLARIFICADO (CAJUÍNA).**

Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição. Linha de Pesquisa: Química, Bioquímica e Qualidade de Alimentos.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Titular Dr.<sup>a</sup> Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo

**TERESINA – PI  
2019**

RAYSSA GABRIELA LIMA PORTO LUZ

**Bioacessibilidade, identificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) clarificado (cajuína).**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>a</sup>. Titular Dr<sup>a</sup>. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo (DN/PPGAN/UFPI)  
(Orientadora-Presidente)

---

Prof<sup>a</sup>. Titular Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Pastore (PPGCA/FEA/UNICAMP)  
(Membro Externo- 1<sup>a</sup> Examinadora)

---

Prof. Titular Dr. Alessandro de Lima (CG/IFPI)  
(Membro Externo- 2<sup>o</sup> Examinador)

---

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Marques (CTAL/IFMA/PPGAN)  
(Membro Interno - 3<sup>o</sup> Examinador)

---

Prof. Dr. Robson Alves da Silva (CTAL/IFPI/PPGAN)  
(Membro Interno - 4<sup>o</sup> Examinador)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana de Moraes Sousa (CG/IFPI)  
(Membro Externo - Suplente 1)

---

Prof. Dr. Maurisrael de Moura Rocha (EMBRAPA/PPGAN)  
Membro Interno - Suplente 2

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Deus infinitamente bom, humildemente agradeço a vida e a todo crescimento que esta existência tem me proporcionado.

À minha base, meus pais (Augusto e Lívia), irmão (Eduardo) ao meu esposo George, pela convivência marcada por união, carinho e amor.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo, uma verdadeira mentora, agradeço não somente pela orientação desta tese, mas por me conduzir na trajetória acadêmica e profissional. Durante os onze anos de convivência, da iniciação científica ao doutorado, foi essencial para a realização dos meus sonhos e conquistas, guardarei seus ensinamentos para a vida e muitos deles já estão intrínsecos à minha personalidade profissional. Agradeço pela confiança depositada em mim durante todos esses anos, pelo carinho e disponibilidade e por não me deixar desistir diante das dificuldades. Sou muito grata por fazer parte do grupo LabromBioq-Lasa.

À Universidade Federal do Piauí – UFPI e ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN) por ter me proporcionado crescimento, profissional e, dessa forma, minha titulação.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição pelo apoio, ensino e incentivo.

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Ao Estatístico Marcos Araújo agradeço a disponibilidade e todas as palavras de apoio e energia positiva a mim emanada.

À Professora Roseane Fett por disponibilizar sua Orientanda Bibiana, para ministrar o curso de aperfeiçoamento em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

À Bibiana agradeço a disponibilidade e atenção mesmo após o curso. Muito obrigada pelo apoio, você foi fundamental.

Às Minhas amigas Ana Karine e Amanda Jéssica agradeço pelo apoio e companheirismo nos momentos mais difíceis que enfrentei durante esta jornada. Obrigada pelas palavras sinceras e pela ajuda nas análises, sem vocês teria sido bem mais difícil.

À minha amiga Fabrícia, obrigada pela amizade, companheirismo e disponibilidade em ajudar sempre.

Aos meus Amigos de Turma, em especial à Nara e Rodrigo pela convivência e amizade.

A todo o Grupo LabromBioq-Lasa agradeço pelo companheirismo, pelo espírito de grupo e união, obrigada Fabrícia, Marylya, Bruna, Thalita, Anne, Rayanne, Thanya e demais colegas pela amizade.

Ao Instituto Federal do Maranhão Campus - São João dos Patos por me conceder afastamento necessário para realização desta pesquisa e por todo o apoio que recebi desde que cheguei ao Campus, em especial aos amigos Cristina Zita, Andreza Gonçalves, Reginaldo Leal, Marcos Vivian e Elisângela Tavares.

À Secretária do PPGAN, Luana Silva por toda atenção, disponibilidade e carinho com que me tratou durante o curso.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição, Dona Máisa, Sr. Osvaldo, Sr. Gilson, Thiago e Carol, agradeço a disponibilidade sempre que precisei.

*“E outros obstáculos sobrevirão, até que o discípulo aprenda a: dominar-se, educar-se, vencer serenamente, com a lições recebidas”.*

*Emmanuel*

## RESUMO GERAL

PORTO-LUZ, R. G. L. Bioacessibilidade, identificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) clarificado (cajuína) [tese] Universidade Federal do Piauí, Teresina- Piauí, 2019.

O Caju (*Anacardium occidentale* L.) apresenta grande potencial de exploração devido às características sensoriais atrativas, elevado valor nutritivo e presença de substâncias bioativas. Por meio do processo de clarificação do suco, obtém-se a cajuína, bebida não diluída e não fermentada, advinda da parte comestível do pseudofruto. Pesquisas anteriores verificaram elevados teores de compostos fenólicos em caju e propriedades antioxidante e antimutagênica na cajuína. Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a bioacessibilidade, identificação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante total de duas marcas comerciais de suco de caju clarificado (cajuína) produzidos no Piauí. Utilizou-se o método espectrofotométrico para determinação de fenólicos totais (reagente *Folin-Ciocalteu*), flavonoides totais e atividade antioxidante (métodos DPPH e ABTS). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por HPLC-UV, e a bioacessibilidade dos compostos por meio de digestão gastrointestinal simulada *in vitro*. As médias das variáveis foram comparadas pelo teste *t* de *Student*, utilizando o programa Statistical Package for Social Science (SPSS) versão, 22. Como principais resultados, pode-se destacar o aumento no teor dos quatro compostos fenólicos identificados após a digestão simulada *in vitro*. O ácido elágico da Marca A foi o composto obtido em maior quantidade ( $1.062,81 \pm 5,70$  antes e  $1.898,14 \pm 31,42 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  após a digestão simulada) com uma fração bioacessível de 178,59 %, indicando a ocorrência de hidrólise durante o processo de digestão *in vitro*, liberando ácido elágico a partir dos elagitaninos. Foram identificados em menor quantidade em ordem decrescente pós digestão o ácido gálico ( $5,91 \pm 2,95 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), epicatequina ( $3,23 \pm 0,83 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), e *p*-cumárico ( $0,65 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ). Houve uma redução no teor de fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante após a digestão simulada, mas todos mantiveram uma fração bioacessível acima de 40%. A marca A foi a que apresentou os melhores resultados para todas as análises, estando em conformidade com todos os parâmetros exigidos pela legislação brasileira. Sendo assim, pode-se concluir que após a digestão simulada houve um aumento no teor dos compostos identificados, que juntamente com o elevado teor de vitamina C, contribuem de forma positiva para a porcentagem bioacessível da atividade antioxidante total.

**Palavras-chave:** *Anacardium occidentale* L, atividade antioxidante, compostos fenólicos; suco de caju clarificado, cajuína.



## GENERAL ABSTRACT

PORTO-LUZ, R. G. L. Bioaccessibility, identification of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of clarified cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice (cajuína) [thesis]. Federal University of Piauí, Teresina-Piauí, 2019.

Cashew (*Anacardium occidentale* L.) has great potential for exploitation due to its attractive sensory characteristics, high nutritional value and the presence of bioactive substances. By means of the juice clarification process, the cashew, undiluted and unfermented drink, is obtained from the edible part it's pseudo fruit. Previous studies have verified high levels of phenolic compounds in cashew apple and antioxidant and antimutagenic properties in cashew apple juice. This work was carried out with the objective determining the bioaccessibility, identification of phenolic compounds and total antioxidant activity of two commercial brands of clarified cashew apple juice (cajuína) produced in Piauí. A spectrophotometric method was used to determine total phenolics (Folin-Ciocalteu reagent), total flavonoids and antioxidant activity (DPPH and ABTS methods). Identification of the phenolic compounds was performed by HPLC-UV, and the bioaccessibility of the compounds by means of simulated gastrointestinal digestion *in vitro*. The variables were compared by Student's t-test, using the program Statistical Package for Social Science (SPSS) version, 22. As main results, it is possible to highlight the increase in the content of the four phenolic compounds identified after simulated *in vitro* digestion. The ellagic acid of brand A was the compound obtained in greater quantity ( $1062.81 \pm 5.70$  before and  $1898.14 \pm 31.42$   $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  after simulated digestion) with a bioaccessible fraction of 178.59 %, indicating the occurrence of hydrolysis during the *in vitro* digestion process, releasing ellagic acid from the ellagitannins. Gallic acid ( $5.91 \pm 2.95$   $\mu\text{g} 100\text{g}^{-1}$ ), epicatechin ( $3.23 \pm 0.83$   $\mu\text{g} 100\text{g}^{-1}$ ), and *p*-Coumaric acid ( $0.65 \pm 0.1$   $\mu\text{g} 100\text{g}^{-1}$ ) were identified in decreasing order after digestion. There was a reduction in total phenolic, total flavonoids and antioxidant activity after simulated digestion, but all maintained a bioaccessible fraction above 40%. Brand A was the one that presented the best results for all the analyzes, complying with all the parameters required by the Brazilian legislation. Thus, it can be concluded that the simulated digestion positively affected the release of the identified phenolic compounds that together with the high vitamin C content contribute positively to the bioaccessible percentage of the total antioxidant activity in cajuína.

Keywords: *Anacardium occidentale* L, antioxidant activity, phenolic compounds; clarified cashew juice, cashew.

## LISTA DE FIGURAS

1. <i>Anacardium occidentale</i> L. (Caju) com respectiva identificação da castanha e do pseudofruto	21
2. Suco de caju clarificado (cajuína)	22
3. Fluxograma do processo de produção da cajuína	24
4. Colheita do caju ( <i>Anacardium occidentale</i> L.)	25
5. Descastanhamento com fio de <i>nylon</i>	25
6. Extração do suco com prensa <i>expeller</i>	26
7. Adição de gelatina ao suco de caju	27
8. Processo de filtração artesanal	27
9. Fechamento das garrafas	28
10. Aquecimento em banho-maria em forno à lenha	28
11. Refriamento natural em pátio	29
12. Representação gráfica das principais classes de compostos fenólicos	33
13. Estrutura geral dos ácidos fenólicos: (A) ácidos hidroxibenzóicos e (B) ácidos hidroxicinâmicos	34
14. Estrutura química dos ácidos fenólicos, gálico (a), <i>p</i> -cumárico (b) e elágico (c)	36
15. Estrutura química do flavonoide epicatequina	36
16. Características estruturais definem a ação antioxidante dos compostos fenólicos.	37
17. Cromatograma de separação dos padrões fenólicos em testes iniciais.	93
18. Cromatograma de separação dos padrões fenólicos após acidificação da fase móvel.	94
19. Cromatogramas de separação dos padrões fenólicos em 280 e 320 nm	95
20. Determinação gráfica da curva de linearidade através da curva analítica clássica para o padrão ácido gálico	97

## LISTA DE TABELAS

1. Padrões de Identidade e Qualidade fixados para a cajuína. 23
2. Physical-chemical characterization and vitamin C of two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína'. 61
3. Determination of total phenolic compounds, total flavonoids, and antioxidant activity of two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína.' 62
4. Phenolic compound content in two liters of clarified cashew apple juice 'cajuína.' 64
5. Determination of total phenolics and flavonoids in two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína' before and after simulated gastrointestinal digestion. 79
6. Determination of the total antioxidant activity of two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína' before and after simulated gastrointestinal digestion. 80
7. Phenolic compounds content in two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína' before and after simulated gastrointestinal digestion as determined by HPLC-UV. 82
8. Avaliação da precisão (repetibilidade) do método para os padrões fenólicos 96
9. Parâmetros das curvas de calibração dos compostos avaliados ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) e verificação da linearidade para validação de método analítico HPLC-UV. 96
10. Verificação dos limites de detecção e quantificação (LD e LQ) para validação de método analítico em HPLC-UV. 97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DCV	Doenças Cardiovasculares
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DN	Departamento de Nutrição
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilidrazil
EQ	Equivalente a Quercetina
EC	Equivalente a Catequina
GAE	Equivalente a Ácido Gálico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
INPI	Instituto Nacional da Propriedade
LABROMBIOQ	Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV	Radiações Ultravioletas

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 Gerais.....	19
2.2 Específicos.....	19
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>20</b>
3.1 Caju ( <i>Anacardium occidentale</i> L.).....	20
3.2- Suco de caju clarificado (cajuína).....	22
3.3 Estresse Oxidativo e Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs).....	29
3.4- Compostos bioativos de natureza fenólica.....	32
3.5 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos.....	37
3.6 Validação de métodos analíticos.....	40
3.7 Importância da identificação e bioacessibilidade de compostos fenólicos na cajuína.....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO II – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>54</b>
Identification and Quantification of Antioxidant Compounds in Clarified Cashew Apple Juice ‘Cajuína’.....	55
Abstract.....	55
1 Introduction.....	55
2. Materials and Method.....	57
2.1 Chemicals.....	57
2.2 Samples.....	57
2.3 Chemical and physical characterization of cashew.....	57
2.4 Determination of vitamin C content.....	58
2.5 Extraction procedure.....	58
2.6 Determination of total phenolic compounds.....	58
2.7 Determination of total flavonoids.....	58
2.8 Antioxidant activity.....	59
2.8.1 ABTS method.....	59
2.8.2 DPPH method.....	59
2.9 Identification of phenolic compounds by HPLC-UV.....	60
2.10 Statistical analysis.....	60

3. Results and Discussions .....	60
4. Conclusion.....	65
Conflict of interest.....	65
Acknowledgements .....	65
References .....	65
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>71</b>
<i>In vitro</i> bioaccessibility and identification of antioxidant compounds in clarified cashew juice “cajuína” .....	72
Abstract .....	72
1 Introduction.....	73
2 Material and Methods .....	74
2.1 Chemicals.....	74
2.2 Samples .....	75
2.3 Sample Preparation.....	75
2.4 Determination of total phenolic compounds.....	75
2.5 Determination of total flavonoids .....	75
2.6 Antioxidant activity.....	76
2.6.1 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method.....	76
2.6.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method.....	76
2.8 Bioaccessibility .....	77
2.9 Identification of phenolic compounds by HPLC-UV .....	77
2.10 Statistical analysis .....	78
3 Results and Discussion .....	78
4 Conclusion.....	83
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>83</b>
<b>References .....</b>	<b>83</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>88</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>103</b>
<b>SUGESTÕES.....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNCIDES .....</b>	<b>105</b>
<b>Apêndice A – Curva padrão de Epicatequina HPLC - UV .....</b>	<b>106</b>
<b>Apêndice C – Curva padrão de ácido elágico HPLC-UV .....</b>	<b>107</b>
<b>Apêndice D – Curva padrão de ácido gálico HPLC-UV .....</b>	<b>108</b>
<b>Apêndice E – Curva padrão de ácido <i>p</i>-cumárico HPLC-UV .....</b>	<b>109</b>
<b>Apêndice F – Curva padrão de Trolox - Método DPPH .....</b>	<b>110</b>

<b>Apêndice G – Curva padrão de Trolox - Método ABTS.....</b>	<b>111</b>
<b>Apêndice H – Curva padrão de quercetina – Determinação de flavonoides....</b>	<b>112</b>
<b>Apêndice I – Curva padrão de ácido gálico – Determinação de fenólicos totais. .....</b>	<b>113</b>
<b>Apêndice J – Cromatogramas de separação dos padrões fenólicos disponíveis - HPLC-UV. ....</b>	<b>114</b>
<b>Apêndice L – Cromatograma de separação dos compostos fenólicos da cajuína (marca A) por HPLC-UV. ....</b>	<b>115</b>
<b>Apêndice M – Outros artigos Publicados.....</b>	<b>116</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>116</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>133</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>149</b>

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta nativa da América tropical, originária do Brasil, sendo também encontrado na Ásia e em alguns países da África (ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003; PETINARI; TARSITANO, 2002). Pertencente à família Anacardiaceae, é considerado uma das culturas de maior importância econômica do Nordeste do Brasil. Segundo dados do IBGE (2016), a área ocupada com cajueiro no Brasil foi estimada em 619 mil hectares, desse total, 99,4% está localizado no Nordeste, sendo 62,9% no estado do Ceará (389.358 ha), 15,5% no Rio Grande do Norte (96.120 ha) e 14,1% (87.474 ha) no Piauí, estado que ocupa o terceiro lugar no ranking nacional.

O caju é constituído por duas partes: a castanha, que é o fruto propriamente dito, e o pedúnculo floral ou pseudofruto. O pedúnculo é a parte comestível *in natura* do caju e representa cerca de 90 % da massa total. Os 10 % restantes correspondem ao fruto, de onde se extraem a amêndoa da castanha de caju (LIMA et al., 2011; PAIVA; GARRUTI; SILVA NETO, 2011).

O suco de caju tem um sabor agradável e é rico em vitamina C (138,7 mg/100g), entretanto, sua aceitação por novos consumidores é limitada devido a sua adstringência (TACO, 2011). Por meio do processo de clarificação do suco obtém-se a cajuína, definido pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) como uma bebida não diluída e não fermentada, advinda da parte comestível do pseudofruto, sendo obtida por meio de processo tecnológico adequado e submetida a um processo físico de clarificação. Nas regiões produtoras de caju é um produto bastante apreciado por ser uma bebida refrescante que deve ser consumida de preferência gelada (ABREU, 2013).

Os novos hábitos alimentares, bem como o novo estilo de vida, expõem o homem a uma variedade de fatores de risco para as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Entre esses fatores de risco destacam-se o consumo de dietas desequilibradas, estilo de vida, estresse, tabagismo, alcoolismo e uso de contraceptivos. Isso ocasionou a mudanças no perfil epidemiológico dos países, em que se observa número crescente de doenças, como obesidade, diabetes,



hipertensão, doenças cardiovasculares, osteoporose e vários tipos de cânceres (WHO, 2014).

Nos últimos anos, estudos como os realizados por Firdaus, et al. (2018); Pisoschi; Pop (2015); Verma, Singh; Mishra (2013) e Zhao et al. (2013) revelaram que a dieta é um fator extremamente importante, em termos de indução ou prevenção de doenças. Já é estabelecido que algumas substâncias bioativas, como compostos fenólicos, ácido ascórbico, minerais (selênio e zinco) e carotenoides, dentre outros, podem desempenhar papel importante na modulação ou na prevenção do desenvolvimento de doenças como o câncer. Nesse contexto, a ênfase na busca por alimentos que contribuam para a obtenção de saúde adequada tem crescido significativamente em todo o mundo. Em face disso, o interesse pelo estudo e consumo de vegetais tem aumentado, dadas as propriedades benéficas que estes apresentam devido a presença dos compostos supracitados.

Dentre os vegetais, as frutas merecem destaque pela diversidade sensorial, diferentes formas de consumo, além da presença de nutrientes e compostos bioativos. A fruticultura no nordeste brasileiro constitui-se em uma atividade econômica bastante promissora, devido ao sabor e aroma exótico de suas frutas e à sua enorme diversificação (SILVA et al., 2014). Essas espécies são de grande interesse para as agroindústrias e representam uma possível fonte de renda para a população local (RUFINO et al., 2010).

Pesquisas anteriores (BATAGLION et al 2015; LIMA et al 2014) verificaram elevados teores de compostos fenólicos em caju e propriedades antioxidante (SOUSA et al., 2018) e antimutagênica (MELO-CAVALCANTE et al. 2003; MELO-CAVALCANTE et al. 2008) na cajuína. Os compostos fenólicos tem atraído a atenção de pesquisadores devido a sua atividade antioxidante, que reduz o estresse oxidativo, moderando a oxidação por eliminação de radicais livres (BATAGLION; DA SILVA; EBERLIN; KOOLEN, 2014; PLAZA et al., 2014). O uso de antioxidantes derivados de recursos naturais está ganhando atenção devido a seus benefícios à saúde, que incluem a redução do risco de doenças cardiovasculares, inflamações e distúrbios relacionados ao envelhecimento (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

No entanto, em termos nutricionais, não basta apenas determinar o teor total de nutrientes ou compostos bioativos em alimentos, é necessário conhecer a bioacessibilidade, ou seja, a quantidade de composto liberado da matriz durante a digestão gastrointestinal que se torna disponível para absorção no intestino. Na

literatura pesquisada, nenhum estudo relatou a bioacessibilidade do suco de caju clarificado (cajuína). Portanto, a determinação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos da cajuína é importante porque apenas os constituintes bioacessíveis podem estar disponíveis para absorção e capazes de exercer seus efeitos benéficos (biodisponibilidade). Neste contexto, visou-se determinar as características físico-químicas, identificação e quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante antes e após o processo de digestão simulada em suco de caju clarificado (cajuína).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

- Avaliar a bioacessibilidade, identificar os compostos fenólicos e determinar a atividade antioxidante *in vitro* da cajuína.

### 2.2 Específicos

- Determinar as características físico-químicas, sólidos solúveis, acidez total titulável e potencial hidrogeniônico (pH), nas amostras de cajuína.
- Analisar o teor de compostos fenólicos totais na cajuína antes e após o processo de digestão simulada.
- Verificar a atividade antioxidante *in vitro* antes e após digestão simulada.
- Padronizar a metodologia de identificação de compostos fenólicos na cajuína.
- Identificar e quantificar os principais compostos fenólicos presentes antes e após processo de digestão simulada.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Caju (*Anacardium occidentale* L.)

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical, originária do Brasil, e encontra-se distribuído em diversas regiões tropicais do mundo, entre as quais se destacam: Moçambique, Tanzânia, Quênia, Guiné Bissau, Indonésia, Tailândia, Vietnã, Nigéria e Índia (DAS, SREELATHA, GANESH, 2004; OLIVEIRA et al., 2002; PARAMASHIVAPPA et al., 2001).

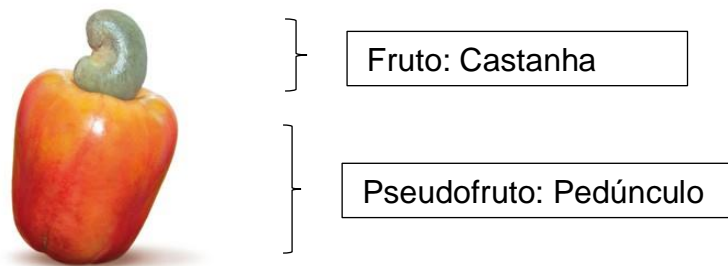
Pertencente à família *Anacardiaceae*, é considerado uma das culturas de maior importância econômica do Nordeste do Brasil. Segundo dados do IBGE (2016), a área ocupada com cajueiro no Brasil foi estimada em 619 mil hectares, desse total, 99,4% está localizado no Nordeste, sendo 62,9% no estado do Ceará (389.358 ha), 15,5% no Rio Grande do Norte (96.120 ha) e 14,1% (87.474 ha) no Piauí, estado que ocupa o terceiro lugar no ranking nacional.

O caju é constituído por duas partes: a castanha, que é o fruto propriamente dito, e o pedúnculo floral ou pseudofruto (Figura 1). O pedúnculo é a parte comestível *in natura* do caju e representa cerca de 90 % da massa total. Os 10 % restantes correspondem ao fruto, de onde se extraem a amêndoa da castanha de caju (PAIVA; GARRUTI; SILVA NETO, 2011). Este pedúnculo superdesenvolvido e muito apreciado pela suculência possui coloração variante entre o amarelo e o vermelho, é rico em ácido ascórbico (QUEIROZ et al., 2011), compostos fenólicos e minerais (LIMA et al 2014; SIVAGURUNATHAN, et al., 2010). O cajueiro apresenta um bom potencial de industrialização, devido à sua polpa carnosa, pele macia, alto teor de açúcar e sabor exótico (SIVAGURUNATHAN et al., 2010), sendo amplamente consumido na forma de suco, néctar, doces e geleia, entre outros.

O pseudofruto do cajueiro é considerado um fruto não climatérico, caracterizado pelo decréscimo contínuo na taxa respiratória que ocorre após a colheita, não havendo aumento na produção de etileno, nem alterações no amadurecimento. Desta maneira, frutos deste grupo não podem ser colhidos antes da sua maturação, sendo necessário que a colheita do fruto seja realizada após o amadurecimento do pseudofruto, para se evitar a ocorrência do amolecimento e perda da cor, o que torna o pseudofruto impróprio ao consumo (FBB, 2010). Esta característica fisiológica talvez explica, em parte, o baixo nível de aproveitamento

comercial do pseudofruto em relação à quantidade da matéria prima potencialmente disponível (SOARES et al., 2004).

**Figura 1-** *Anacardium occidentale* L. (Caju) com respectiva identificação da castanha e do pseudofruto.



Fonte: <http://www.fruteirodobrasil.com.br/frutas-tropicais-brasileiras/caju>

Uma opção para agregar valor e gerar renda para os produtos do caju no Nordeste do país é a industrialização do pseudofruto. Para a produção da cajuína, os pseudofrutos utilizados devem apresentar-se maduros e com boa qualidade, do tipo vermelho ou amarelo, com teor de sólidos solúveis totais entre 10,5 a 11,5°Brix, no entanto, não devem apresentar sabor ácido (SILVA NETO et al., 2003).

Mesmo considerando o pioneirismo brasileiro da industrialização do pedúnculo do caju, que tem o suco como principal produto, com uma produção na ordem de 70 mil toneladas/ano, esta economia absorve apenas 20 % da produção anual, devido aos desafios apresentados para conservação dos pseudofrutos, como alto grau de perecibilidade e dificuldades na colheita (SILVA NETO, 2011).

O potencial antioxidante do caju está relacionado com a presença de vitamina C, ácidos fenólicos, dentre eles o ácido anacárdico, composto encontrado também no Ginkgo biloba e associado ao tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares (AGOSTINI-COSTA et al., 2004; HAMAD; MUBOFU, 2015). Broinizi et al. (2007) identificaram oito ácidos fenólicos no pedúnculo do caju, sendo quatro derivados do ácido hidroxibenzoico (gálico, protocatecuico, gentíssico e salicílico) e quatro derivados do ácido hidroxicinâmico (caféico, ferúlico, cinâmico e p-cumárico). Neste estudo, o ácido salicílico foi o composto mais abundante em todas as frações, seguido do ácido p-cumárico.

Ao caracterizar duas diferentes variedades de caju provenientes da região de Yucatán, México, Moo-Huchin et al. (2014) obtiveram maiores teores para o caju

vermelho quando comparado ao amarelo, 54,2 % mais compostos fenólicos totais e 481,42 % mais flavonoides totais. Brito et al. (2007) também reportaram altos teores de flavonoides glicosilados quando quantificaram flavonoides em caju por cromatografia líquida com arranjo de diodo e espectrometria de massa e ionização por *electrospray*, com destaque para os açúcares: 3-*o*-galactosídeo, 3-*o*-glicosídeo, 3-*o*-ramnosídeo, 3-*o*-xilopiranosídeo, 3-*o*-arabinopiranosídeo e 3-*o*-arabinofuranosídeo, derivados da quercetina e da miricetina.

### 3.2- Suco de caju clarificado (cajuína)

A cajuína (Figura 2) é uma bebida natural, feita a partir do suco do caju por meio da separação dos taninos condensados pela adição de um agente precipitador. Originalmente, este agente foi a própria resina do cajueiro, e durante várias décadas foi a cola de sapateiro. Atualmente, a gelatina em pó tem sido utilizada pelas indústrias. O rendimento é de aproximadamente 1 kg de caju para produzir 1 litro de cajuína. Estudos da Embrapa Agroindústria Tropical indicam que o rendimento, a partir dos pedúnculos, oscila entre 60% a 80%, mas recomenda trabalhar com rendimento em torno de 70% (IPHAN, 2009).

**Figura 2** Suco de caju clarificado (cajuína)



Fonte: <http://procajuina.simplesite.com/419908315>

No Estado do Piauí as duas principais cooperativas de produtores de cajuína são a CAJUESPI (Cooperativa dos Produtores de Cajuína do Piauí), localizada na capital Teresina, que atualmente possui 120 associados com apenas 65 destes ativos, que ainda acompanha 2700 produtores da agricultura familiar. A COCAJUPI, localizada no Município de Picos abrange não somente produtores de cajuína, como

também outros produtos regionais como o mel de abelha. Até pouco tempo, os produtores de cajuína do Piauí utilizavam métodos totalmente artesanais na elaboração do produto e a forma de produzir era passada de geração a geração. Atualmente, a produção de cajuína passa por mudanças, com adoção de novas tecnologias de produção, e várias marcas tem se destacado, oferecendo produtos de excelente qualidade. A agroindústria da cajuína esta caracterizada no estado do Piauí como uma atividade de administração familiar, que foi iniciada para atender ao consumo próprio, transformando-se posteriormente numa opção de negocio, representando uma importante fatia da renda familiar (COSTA, 2015).

A Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de frutas, define cajuína ou suco de caju clarificado como uma bebida não diluída e não fermentada, advinda da parte comestível do pseudofruto, sendo obtido por meio de processo tecnológico adequado e submetido a um processo físico de clarificação. Este suco deve apresentar características de variação da cor, entre incolor ao amarelo translúcido; sabor próprio, sendo levemente ácido e adstringente e aroma próprio. No processo físico de clarificação, a legislação preconiza o uso de coadjuvantes de tecnologia autorizados, e o produto obtido deve corresponder aos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) fixados para suco de fruta (Tabela 1).

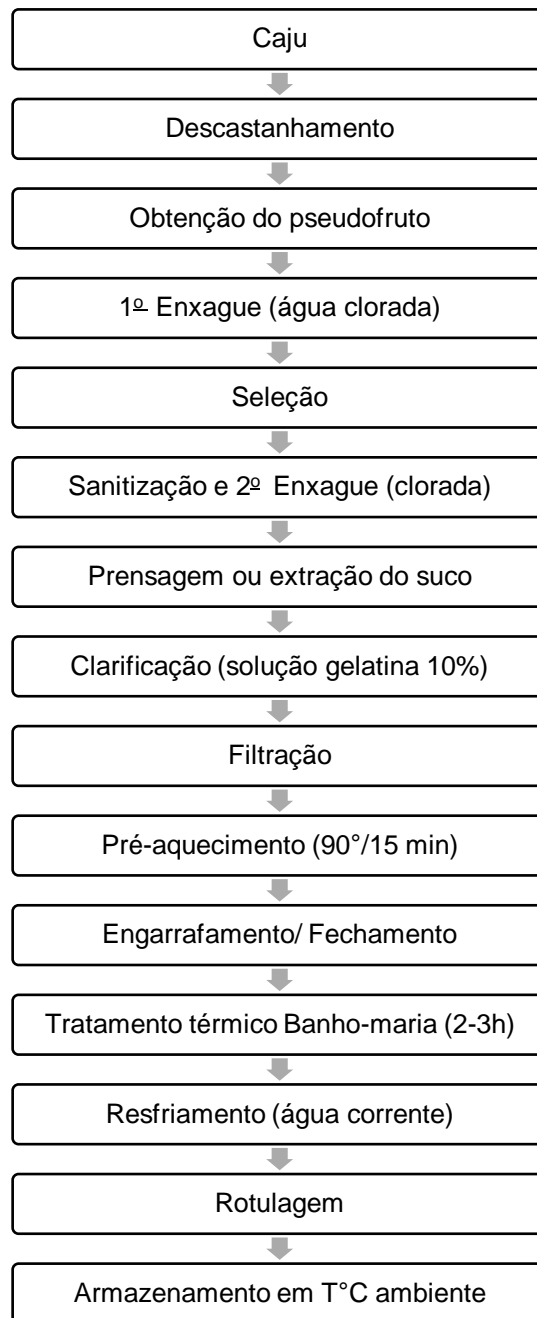
Tabela 1 Padrões de Identidade e Qualidade fixados para a cajuína.

<b>Discriminação</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Sólidos solúveis em ° Brix, a 20° C	10,00	-
Acidez total em acido cítrico (g/100g)	0,25	-
Acido ascórbico mg/100 g)	60,00	-
Açucares totais naturais do caju (g/100g)	-	15,00

Fonte: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)

As técnicas necessárias para a preparação da cajuína são bastante simples. O fluxograma do processo de produção (Figura 3) mostra as etapas envolvidas no seu processamento.

**Figura 3** Fluxograma do processo de produção da cajuína.



Fonte: modificado de Silva Neto et al. (2009).

A safra de caju no Piauí ocorre em períodos distintos e por regiões, iniciando primeiro no sul do estado ou na chamada região de Picos que inicia pelo mês de julho e na região norte tem início pelo mês de outubro, indo até final de dezembro. A colheita (Figura 4) é realizada quando o caju está totalmente desenvolvido, com tamanho e características definidas, caju verdes ou deteriorados podem alterar o sabor do produto. Para o transporte dos caju após a colheita, o produtor deve utilizar



vasilhames adequados, evitando desperdícios. Os vasilhames mais utilizados são caixas plásticas vazadas com capacidade para até 20 kg. O pedúnculo tem uma vida útil muito curta, portanto a demora no transporte do campo para a agroindústria, a exposição prolongada e a alta temperatura provocam perda de peso e, conseqüentemente, prejuízo para o produtor (COSTA, 2015).

Figura 4 Colheita do caju (*Anacardium occidentale* L.).



Fonte: Arquivo pessoal.

No descastanhamento (separação caju/castanha e pré-seleção), o ideal é que este processo seja feito com o uso de fio de *nylon*, transpassado na região de inserção da castanha com o pedúnculo, dando uma volta completa, tensão suficiente para separar a castanha do caju sem prejuízo do pedúnculo (Figura 5).

Figura 5 Descastanhamento com fio de *nylon*.



Fonte: Abreu e Silva-Neto (2007).

Na primeira lavagem é realizada por imersão em solução clorada por 10 minutos. Depois de selecionados e sanificados os cajuos passam pela segunda

lavagem ou enxague, realizada com água potável de boa qualidade que visa a eliminar resíduos do cloro nos pedúnculos, resultantes das primeiras lavagens (ABREU; SILVA-NETO, 2007).

Para a extração do suco, as agroindústrias piauienses utilizam prensas descontinuas, tipo parafuso, liquidificador industrial (não muito recomendado) e moinhos (tipo moedores de carne) fabricados de alumínio e adaptados com motor elétrico ou por acionamento manual. Nota-se, entretanto, que estes equipamentos vêm gradativamente sendo substituídos por prensas do tipo *Expeller*, com as quais se obtém um excelente rendimento final de suco (Figura 6).

Figura 6 Extração do suco com prensa *expeller*.



Fonte: Arquivo pessoal.

O suco integral, obtido pela prensagem do caju, passa por uma operação de grande importância dentro do processo de fabricação da cajuína: a clarificação. Nesta etapa, utilizou-se um agente clarificante, gelatina comercial de grau alimentício, em forma de solução aquosa a 10% (Figura 7). A desestabilização do suco de caju é favorecida pela interação de cargas elétricas, entre os taninos condensados presentes no suco e a cadeia proteica de gelatina. Por sedimentação, o fluído claro sobrenadante

é separado da parte polposa que é formada por elevada concentração de materiais sólidos, obtendo-se assim o suco clarificado (ABREU, 2006).

Figura 7 Adição de gelatina ao suco de caju.



Fonte: Arquivo pessoal.

O suco clarificado é filtrado sucessivamente utilizando como meio filtrante feltro ou tecidos de algodão, sendo instalados, em série, de três a quatro filtros até que o filtrado se apresente completamente límpido e livre de turbidez (SILVA NETO et al., 2003). No entanto, no processo artesanal a filtração ainda é realizada seguindo método tradicional, cuja prática comum é utilizar diversas vezes o meio filtrante, não seguindo os padrões de qualidade (Figura 8).

Figura 8 Processo de filtração artesanal.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após o processo de filtração o suco é engarrafado e em seguida, com o auxílio de uma encapsuladora, é realizado o fechamento (Figura 9). Para esta fase utilizam-se tampas metálicas. Tampas plásticas do tipo *pet* também podem ser utilizadas,

entretanto o produtor deve evitar mergulhar totalmente a garrafa quando do cozimento em banho-maria.

Figura 9 Fechamento das garrafas.



Fonte: Arquivo pessoal.

O tratamento térmico (Figura 10), é uma etapa do processo de fabricação da cajuína usada para a preservação e desenvolvimento da coloração característica. Trata-se de uma etapa crítica, uma vez que o tempo e a temperatura também influenciam no aspecto sensorial e nutricional do produto final. O conhecimento da dinâmica do processo térmico é fundamental no controle da coloração âmbar típica da cajuína, pois sabe-se que o tempo e a temperatura influenciam efetivamente na concentração de ácido ascórbico, açúcares, aldeídos furânicos e outros compostos constituintes dos produtos alimentícios (NASCIMENTO et al, 2003).

Figura 10 Aquecimento em banho-maria em forno à lenha.



Fonte: Arquivo pessoal.

Segundo Araújo (1999), a reação de Maillard é a principal causa do escurecimento desenvolvido durante o aquecimento e armazenamento prolongados da cajuína. Trata-se de uma reação envolvendo aldeído (açúcar redutor) e grupos

amina de aminoácidos, peptídeos e proteínas em seu estado inicial, seguida de várias etapas e culminando com a formação do pigmento escuro.

Estes produtos finais, melanoidinas, e alguns dos intermediários tais como 5-hidroxiacetilfurfural são considerados como parâmetros de qualidade para alimentos processados, já que a presença destes compostos ao final do processo pode indicar um tratamento térmico excessivo da cajuína. A formação de 5-hidroxiacetilfurfural depende de diversos fatores tais como pH, temperatura, duração do processamento e/ou do armazenamento, açúcares e do tipo de aminoácido (GOGUS et al., 1998).

Ao atingir a coloração ideal, o produtor com muito cuidado retira o lote da água quente e realiza o resfriamento naturalmente (Figura 11)

Figura 11 Resfriamento Natural em pátio.



Fonte: Arquivo pessoal.

Uma vez resfriado o produto, é rotulado, embalado, em caixa de papelão ou embalagem plástica termo aquecida e estocado onde aguardará a comercialização.

### **3.3 Estresse Oxidativo e Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs)**

De acordo com a OMS (WHO 2014), observou-se uma mudança no perfil das doenças na população com redução das doenças infectocontagiosas e crescimento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Os novos hábitos alimentares, bem como o novo estilo de vida, expõem o homem a uma gama de fatores de risco para as DCNTs. Entre esses fatores de risco, destaca-se o consumo de dietas desequilibradas, estilo de vida, estresse, tabagismo, alcoolismo e uso de contraceptivos. Isso ocasionou a mudanças no perfil epidemiológico dos países, em

que se observa número crescente de doenças, como obesidade, diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, osteoporose e vários tipos de cânceres.

Dessa forma, como essas doenças são multicausais, ou seja, ocorrem devido a um grupo de fatores de risco associados, o combate a esses fatores é o alvo da prevenção. No entanto, nos últimos anos, a alimentação rica em alimentos de origem vegetal deu lugar a dietas com elevado teor em gorduras saturadas, açúcares e alimentos densamente energéticos. A inatividade física é resultado de mais uma mudança no estilo de vida da população, para hábitos de vida sedentários resultando na intensa produção de radicais livres (MATSUDO et al., 2002; WHO, 2008).

Sob condições aeróbias, mais de 90% do oxigênio consumido é reduzido diretamente à água pela enzima citocromo oxidase na Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE). No entanto, menos de 10% do oxigênio que se consome são convertidos em espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical peroxila ( $RO_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), subprodutos naturais do metabolismo mitocondrial (DAIBER, 2010; VENDITTI; DI STEFANO; DI MEO, 2013).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie capaz de manter existência independente possuindo um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência, sendo o elétron desemparelhado aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL et al., 2007). São formados continuamente durante os processos metabólicos, normais ou patogênicos, surgindo naturalmente durante o metabolismo, podendo igualmente ser provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. As espécies radicalares atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes para o metabolismo, encontrando-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (ALVES et al., 2010; HALLIWELL, 2011).

No entanto, conforme anteriormente referido, há diversos fatores que potencializam a formação de radicais livres, e de outras espécies reativas não radicalares. Entre esses fatores encontra-se o consumo de álcool ou de tabaco, uma dieta excessiva em gordura e hidratos de carbono e relativamente deficiente em vitaminas, a exposição à radiação ultravioleta, à temperatura elevada a determinados poluentes, tais como, herbicidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, a exposição

a diversos fármacos, e à radiação terapêutica (raio-x), condições de hipertermia e de inflamação (DE OLIVEIRA et al., 2009).

Sendo assim, o estresse oxidativo consiste em um estado de desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e defesa antioxidante. Ocorre quando há insuficiência das defesas antioxidantes do organismo, ou excesso de produção de EROs, resultando em danos oxidativos como aumento no nível de peroxidação lipídica de membranas, aumento da carbonilação de proteínas e danos ao DNA (HALLIWELL, 2011).

Pesquisas apontam que o estresse oxidativo está diretamente relacionado aos processos de envelhecimento, transformação e morte celulares, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, indução de câncer, bem como na fisiopatologia de uma ampla variedade de doenças de ordens degenerativas e metabólicas, tais como Alzheimer, Parkinson, diabetes, cardiopatias, dislipidemias e intoxicação por xenobióticos. Dados epidemiológicos em geral indicam benefícios em se manter dietas com maiores quantidades de antioxidantes, mais especificamente com elevadas quantidades de frutas e vegetais (ALVES et al., 2010; HALLIWELL, 2011; INDO et al., 2015; WILLCOX et al., 2004).

Para prevenir a sobrecarga de EROs o organismo possui mecanismos de defesa, os antioxidantes não enzimáticos ( $\beta$ -caroteno, selênio,  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C e compostos fenólicos), e os enzimáticos (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutathione peroxidase - GPX) (SIES et al., 2005; YU, 1994). Estudos epidemiológicos relatam que o aumento da ingestão de antioxidantes na dieta está associado à diminuição no risco de DCNT (HUNG et al., 2004).

O termo antioxidante pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas endógenas ou oriundas da dieta, que, quando em baixas concentrações, diminuem ou impedem os efeitos adversos das espécies reativas sobre a função fisiológica normal do organismo (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Essas substâncias exercem o seu efeito inibitório contra os processos de oxidação por meio de diferentes mecanismos, sendo amplamente classificados como antioxidantes primários e secundários. Os antioxidantes primários inibem a reação em cadeia da oxidação por meio da doação de elétrons e/ou hidrogênios, gerando espécies mais estáveis. Enquanto que, os secundários suprimem a ação de promotores de oxidação, que incluem íons metálicos, enzimas pró-oxidantes e outros oxidantes exógenos (SHAHIDI; ZHONG, 2015). A partir dessas assertivas, é possível inferir que,

investigações mais apropriadas a respeito do papel dos antioxidantes na prevenção de doenças estão baseadas na quantificação e na avaliação *in vivo* de substâncias fitoquímicas presentes nos produtos de origem vegetal. Dessa forma, os antioxidantes naturais, presentes em plantas e alimentos, são alvo de pesquisas para investigar seu possível uso na prevenção das doenças citadas (MOON; SHIBAMOTO, 2009; PELLEGRINI et al., 2006).

### **3.4- Compostos bioativos de natureza fenólica**

A importância dos macronutrientes e dos micronutrientes para a saúde humana está bem definida. No entanto, os alimentos fornecem não somente nutrientes essenciais necessários para a vida, crescentes evidências científicas comprovam que outros componentes, os denominados compostos bioativos de alimentos (CBAs), são também promotores da saúde a longo prazo, reduzindo o risco de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Esse efeito protetor tem sido atribuído, em grande parte, a propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas C, A e E, e de compostos fenólicos como os flavonoides (DEL RIO et al., 2013; GONÇALVES, 2008).

Os CBAs são metabólitos secundários de plantas, utilizados como defesa contra danos diversos (infecções microbianas, agentes alelopáticos, excesso de radiação UV), bio-sinalizadores em síntese metabólica e, também, para atrair polinizadores. Apresentam estrutura química variada e já são descritos aproximadamente 8.000 tipos diferentes (DEL RIO et al., 2013).

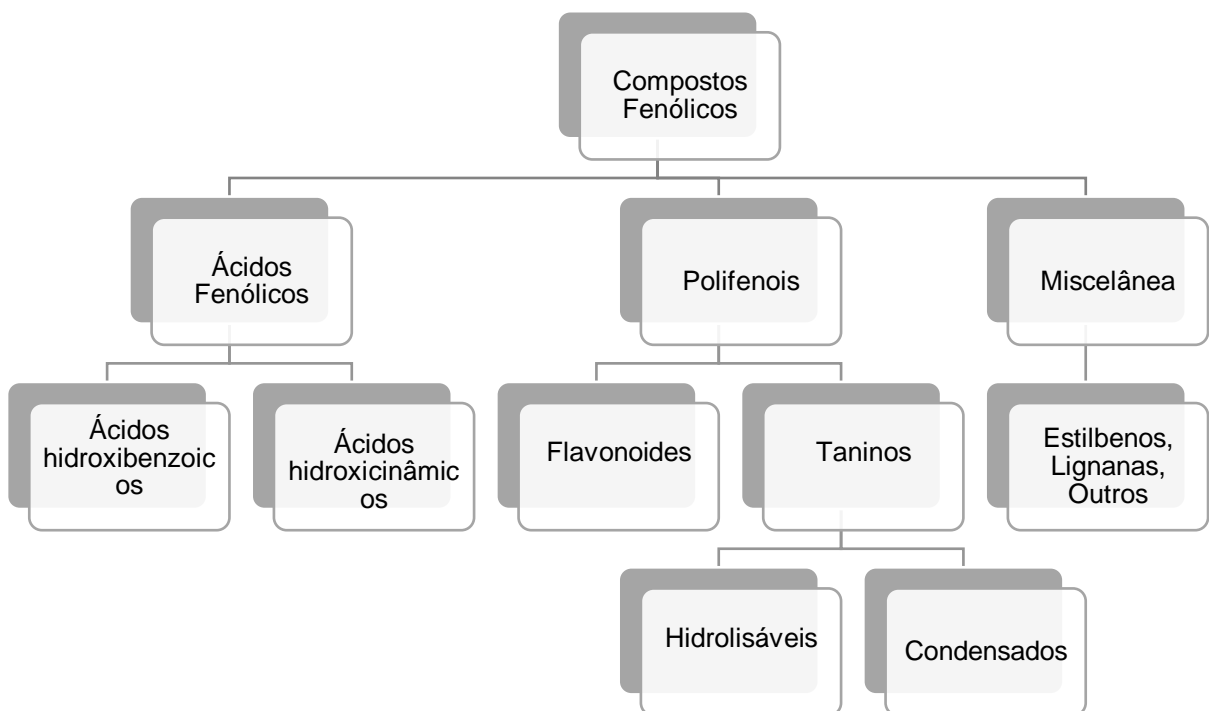
Compostos fenólicos compreendem a maior classe de fitoquímicos presentes nos domínios vegetais. São compostos extra nutricionais e podem ser encontrados em sua forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). São considerados produtos do metabolismo secundário de plantas, e o seu conteúdo nas frutas está fortemente relacionado ao grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e às condições de armazenamento. Estão associados com o sistema de defesa das plantas contra patógenos e radiação UV, além de serem responsáveis pelo aroma, cor e adstringência em vários alimentos (MANACH et al., 2004; PELEG et al., 1988; YORDI et al., 2012).



As estruturas químicas dos compostos fenólicos possuem pelo menos um anel aromático contendo um ou mais substituintes hidroxílicos. O termo polifenóis refere-se àqueles com mais de um anel fenólico e, de acordo com a forma com que estes anéis ligam-se uns aos outros, são divididos em classes distintas (Figura 12). Os três maiores grupos de compostos fenólicos compreendem a classe dos flavonoides, dos ácidos fenólicos e dos taninos (D'ARCHIVIO et al., 2008; ROLEIRA et al., 2015).

A rota do ácido chiquímico é responsável pela biossíntese de diversos compostos fenólicos nas plantas, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e taninos condensados (MAEDA; DUDAREVA, 2012). Nesta rota, carboidratos simples derivados da glicólise e da via das pentoses-fosfato são convertidos em aminoácidos aromáticos, fenilalanina e triptofano, resultando nos compostos fenólicos (MANDAL; CHAKRABORTY; DEY, 2010).

**Figura 12** Representação gráfica das principais classes de compostos fenólicos.



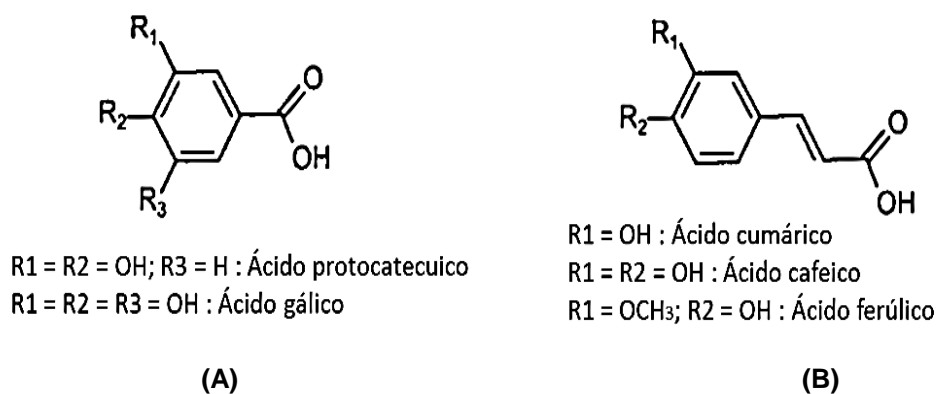
Fonte: Adaptado de Karakaya (2004)

Essas substâncias, devido aos seus múltiplos efeitos biológicos, tais como antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno, têm contribuído significativamente

para a saúde humana. Diversos polifenóis, têm ainda sido destacados devido à possibilidade de se ligarem a receptores celulares e transportadores de membranas e influenciar a expressão gênica, a sinalização e a adesão celular e modular a atividade de uma vasta gama de enzimas e receptores de células (BOUAYED et al., 2011). Por conta disso, é conveniente ter conhecimento acerca dos compostos fenólicos consumidos pelos seres humanos.

Os ácidos fenólicos possuem um grupo funcional carboxila e são divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos (Figura 13). O ácido gálico e o ácido elágico são os principais representantes dos ácidos hidroxibenzoicos. O ácido gálico é o mais comum dos ácidos fenólicos e é precursor de outros compostos bioativos, por exemplo, taninos gálicos. O ácido elágico é a molécula base para a formação dos taninos elágicos, denominados taninos hidrolisáveis. Uvas, vinhos, chá verde e chá preto são alimentos ricos em ácido gálico. Frutas vermelhas como framboesa, morango, amora, romã e outras como nozes e avelãs são ricas em taninos elágicos (CLIFFORD; SCALBERT, 2000; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

**Figura 13** Estrutura geral dos ácidos fenólicos: (A) ácidos hidroxibenzoicos e (B) ácidos hidroxicinâmicos.



Fonte: Adaptado MANACH et al., 2004.

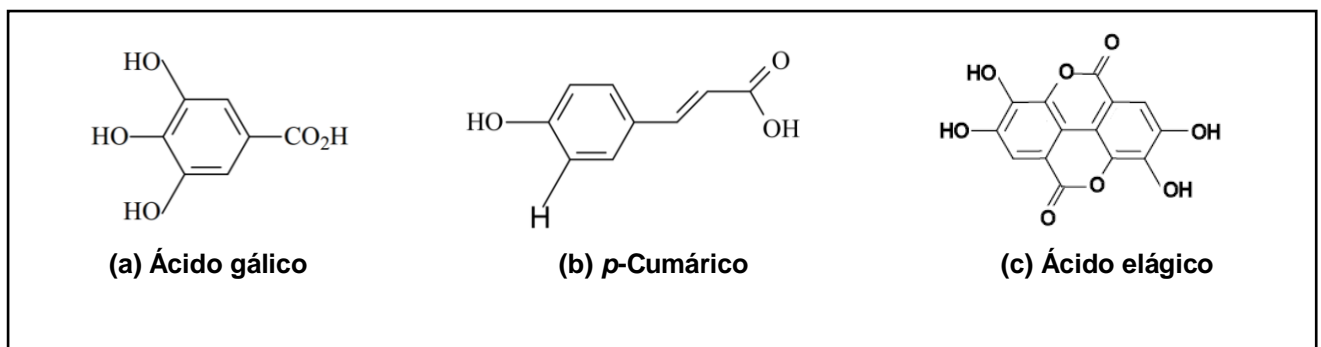
Os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são os ácidos caféico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico. Ocorrem geralmente conjugados com outros compostos, tais como o ácido tartárico ou o ácido quínico e são denominados coletivamente como ácidos clorogênicos (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Os ácidos fenólicos também podem ser encontrados ligados entre si ou a outros compostos, tendo como

exemplo o ácido clorogênico, o qual é originado da associação do ácido caféico com o ácido quínico (SOARES, 2002).

A Figura 14 apresenta a estrutura química do ácido gálico, *p*-Cumárico e ácido elágico.

Os flavonoides têm uma estrutura C6-C3-C6 composta por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos, normalmente organizada como um heterociclo oxigenado chamado pirano. Podem ser divididos em várias subfamílias de acordo com o grau de oxidação do pirano, sendo flavanóis, flavanonas, flavonas, flavonóis (essencialmente flavan-3-óis), isoflavonas e antocianidinas, as mais relevantes para dietas humanas (MANACH et al., 2004).

**Figura 14** Estrutura química dos ácidos fenólicos, gálico (a), *p*-cumárico (b) e elágico (c).



Fonte: Dias (2010).

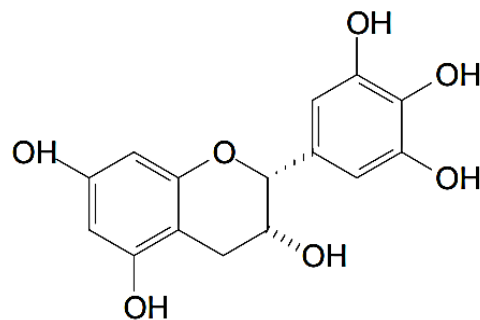
Entre os flavanóis salientam-se os 3-flavanóis e as proantocianidinas. Os flavan-3-óis caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado. Os carbonos 2 e 3 são os centros assimétricos da molécula. Os principais flavan-3-ol são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, esta foi um dos compostos identificados na cajuína. São epímeros no carbono 3, e cuja estrutura se representa na Figura 15.

Em certos casos, a polimerização de unidades fenólicas pode ocorrer em vegetais, dando origem à subclasse dos taninos, compostos de alto peso molecular e altamente hidroxilados, podendo formar complexos insolúveis com proteínas e carboidratos.

Os taninos conferem aos alimentos a sensação de adstringência devido a sua capacidade de precipitar proteínas salivares (FERREIRA, 2003). De acordo com a estrutura química, são classificados em dois grandes grupos: os taninos hidrolisáveis

e os taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico (galotanino) ou ácido elágico (elagitanino) glicosilados, onde as hidroxilas do açúcar são esterificadas com os ácidos fenólicos. Os taninos condensados, ou também chamados proantocianidinas, são polímeros de alto peso molecular compostos, em sua maioria, pela unidade monomérica de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina). As proantocianidinas são assim denominadas por formarem após quebra oxidativa, em meio alcoólico ácido à quente, pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina (BRAVO, 1998; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; MONTEIRO et al., 2005).

**Figura 15** Estrutura química do flavonoide epicatequina.

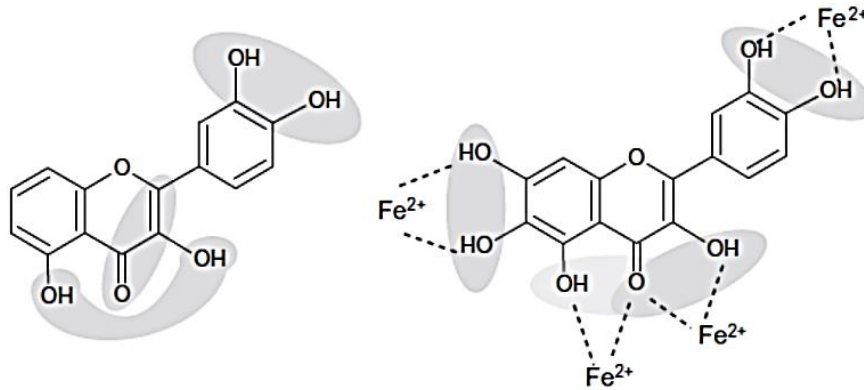


(-) Epicatequina

Fonte: Dias (2010).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ação antioxidante dos compostos fenólicos em animais. Esses fitoquímicos são altamente eficientes na quebra de reações em cadeia de radicais livres. Características químicas compartilhadas pela maioria dos compostos fenólicos são responsáveis pela sua eficiência na reação antioxidante tais como: os grupos fenólicos são prontamente ionizados e atuam como ácidos fracos, sendo capazes de estabilizar 30 os radicais livres através da doação de um elétron e/ou hidrogênio, conseqüentemente, as estruturas aromáticas resultantes não são reativas, pois se estabilizam por ressonância; os grupos hidroxila e carbonila presentes nos compostos fenólicos são centros de elevada afinidade para íons metálicos, atuando assim como quelantes de metais de transição (FRAGA et al., 2010).

**Figura 16** Características estruturais definem a ação antioxidante dos compostos fenólicos.



Fonte: Fraga et al (2010)

Características estruturais definem a ação antioxidante dos compostos fenólicos, conforme a Figura 16, pode-se observar que as áreas destacadas definem os dois critérios para a atividade antioxidante: grupos fenólicos são capazes de estabilizar os radicais livres, e os grupos hidroxila e carbonila são centros de elevada afinidade para íons metálicos.

### 3.5 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos

Estudos *in vitro* têm demonstrado que os compostos fenólicos são de considerável importância devido às suas diversas atividades biológicas, dentre as quais se destaca a antioxidante. No entanto, a quantidade total dessas moléculas presentes nos alimentos não reflete necessariamente a quantidade absorvida e metabolizada pelo organismo. Na realidade, os testes *in vitro* são essenciais para elucidar o mecanismo de ação antioxidante, porém, para que possuam credibilidade, é essencial que esses compostos bioativos estejam presentes em concentrações fisiológicas relevantes no plasma. Além disso, as concentrações que atingem os tecidos alvos são muito baixas quando comparadas com as utilizadas em ensaios *in vitro*. Portanto, a possível eficácia dos compostos fenólicos no corpo humano é grandemente determinada pela sua bioacessibilidade e biodisponibilidade (HOLST; WILLIAMSON, 2004; PIMPÃO et al., 2015).

O conceito de biodisponibilidade foi inicialmente proposto pela *Food and Drug Administration* (FDA) especificamente para a área de farmacologia. Atualmente a ANVISA define biodisponibilidade como a medida da quantidade de um medicamento, contida em uma fórmula farmacêutica, que chega à circulação sistêmica e a velocidade na qual esse processo ocorre. A partir da década de 80 o termo começou a ser utilizado também relacionado a alimentos, visto que não é apenas importante saber se um nutriente está presente no alimento, e sim o quanto é biodisponível (ANVISA, 2014; D'ARCHIVIO et al., 2007; HORST; LAJOLO, 2009).

Para que um composto químico possa exercer atividade biológica, deve atingir o alvo fisiológico em uma concentração mínima que apresente esse efeito. A liberação de um constituinte alimentar da matriz do alimento, tornando-o acessível para a absorção, é definida como bioacessibilidade (SAURA-CALIXTO et al., 2007).

Conhecer o comportamento dos compostos bioativos em situações similares às que ocorrem *in vivo* permite avaliar as diferentes matrizes alimentares e suas composições com as suas reais contribuições em relação à atividade antioxidante no organismo (RYAN; PRESCOTT, 2010; TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Embora estudos definitivos sobre a bioacessibilidade de compostos fenólicos requerem experiências *in vivo* (VAN BUGGENHOUT et al., 2010), modelos *in vitro* são significativos uma vez que são simples, baratos e reprodutíveis, além de poderem ser utilizados para pesquisar grandes números de amostras ou para estudar uma vasta gama de condições experimentais (MCDOUGALL; FYFFE; DOBSON; STEWART, 2005).

Entretanto estudos *in vivo* demandam grande investimento, mão de obra qualificada, além de por muitas vezes longos períodos de tempo. Apesar das limitações e por se constituir normalmente apenas um modelo hipotético de digestão, modelos de digestão gastrointestinal *in vitro* têm sido desenvolvidos para a avaliação de bioacessibilidade, permitindo o estudo de alterações nos componentes da dieta durante as fases gástrica e a fase intestinal, devido a fatores que tem impacto na sua bioacessibilidade (BIEHLER; BOHN, 2010; CILLA et al., 2009). Além disso, algumas pesquisas têm demonstrado que a avaliação da bioacessibilidade por modelos *in vitro* podem ser bem correlacionados com os resultados de estudos em seres humanos e em modelos animais (BIEHLER; BOHN, 2010).

O trato gastrointestinal pode ser considerado como um dispositivo de extração eficiente, onde parte dos compostos contidos em matrizes alimentares são extraídos e disponibilizados para absorção no intestino (SAURA-CALIXTO et al., 2007;

TAGLIAZUCCHI et al., 2010). É importante considerar a absorção e a atividade dos diversos compostos oriundos de alimentos, em relação as diversas condições fisiológicas do trato gastrointestinal de humanos, compreendendo os fatores que afetam a bioacessibilidade desses compostos, sua importância biológica e eficácia como ingredientes funcionais (KOSIŃSKA-CAGNAZZO, 2015). A natureza dos compostos extraíveis, a sua estabilidade e a sua atividade antioxidante dependem de muitos fatores, tais como a matriz alimentar, o pH, a temperatura, a presença de inibidores ou potenciadores de absorção, a presença de enzimas, o hospedeiro, e outros fatores relacionados (MCDUGALL et al., 2005; SAURA-CALIXTO et al., 2007; TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

A digestão gastrointestinal *in vitro* simula algumas condições gastrointestinais biológicas (enzimas gástricas e pancreáticas) e químicas (pH, temperatura e sais biliares), como também avalia o quanto estáveis e absorvidos são os compostos fenólicos e se a atividade antioxidante é alterada durante a digestão (TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Esse método é empregado devido a segurança, rapidez e não possuir restrições éticas quando comparado com o método *in vivo*.

A maioria dos polifenóis em frutas se encontra na forma glicosilada ou como polímeros. As agliconas, as quais correspondem a apenas uma pequena parte dos polifenóis, podem ser diretamente absorvidas no intestino delgado. Entretanto, a maioria dos polifenóis na sua forma nativa (polímeros, glicosilados ou esterificados) precisam ser hidrolisados através da ação de enzimas digestivas e microflora bacteriana antes de serem absorvidos (D'ARCHIVIO et al., 2010; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Tagliazucchi et al. (2010) demonstraram em estudo *in vitro* que após a digestão gástrica e intestinal, verificou-se que apenas 62% dos fenólicos originalmente presentes em uvas eram bioacessíveis. A transição a partir do ácido gástrico para o ambiente intestinal alcalino moderado causou uma diminuição da bioacessibilidade na quantidade total de fenólicos, flavonóides e especialmente antocianinas.

Vale ressaltar que bioacessibilidade dos nutrientes e/ou compostos presentes numa matriz alimentar podem variar se a mesma tiver sofrido algum processamento, como o que ocorre para obtenção da cajuína, pois ocorre uma transformação estrutural na matriz. Estas mudanças poderiam exercer uma influência significativa sobre a libertação desses compostos na célula, transformação e absorção de alguns nutrientes durante a digestão (PARADA; AGUILERA, 2007). Sendo assim, em estudo

realizado por Aschoff, et al. (2015), observou-se que a bioacessibilidade dos compostos bioativos de *Citrus* depende se eles forem digeridos como fruta inteira ou em forma de sucos. Além disso, as espécies de citros (laranja-doce e mandarina) e o armazenamento pós-colheita poderiam modular a bioacessibilidade dos carotenoides durante a digestão gastrointestinal *in vitro* (RODRIGO et al., 2015).

### 3.6 Validação de métodos analíticos

Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer (EURACHEM WORKING GROUP, 1998). Ou seja, devem originar resultados que sejam confiáveis. Para tanto, torna-se necessário avaliar o método proposto quanto a vários parâmetros. Dessa forma, assim que desenvolvido um método de análise cromatográfica, é importante fazer a validação do mesmo para avaliar se fornece resultados confiáveis, para que possa ser aplicado rotineiramente (PRESTES et al., 2007).

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método e normalmente os mais encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004).

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos: O primeiro, chamado de validação no laboratório "*in house validation*", consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia, e pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à validação completa "*full validation*". O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação (MASSART et al., 1994; THOMPSON et al., 2002).



No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE no 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.

Neste sentido, para que a validação de uma metodologia seja possível, é necessário que se verifiquem pré-requisitos dos equipamentos a serem usados, bem como alguns parâmetros tais como a precisão, linearidade, limites de detecção e quantificação.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados, obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intracorrída), concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; precisão intermediária (precisão intercorrída), expressa o efeito das variações dentro do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes; reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) mede a precisão do método quando executado em diferentes laboratórios (CASS e DEGANI, 2001; BRASIL, 2003).

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para esta quantificação é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Este parâmetro pode ser representado pela equação da reta após a realização da curva de calibração para cada padrão. Avalia-se a correlação da linearidade dos valores obtidos e, para tal, determina-se o coeficiente de correlação ( $r^2$ ). Este coeficiente de correlação é utilizado para avaliar a adequação da representação do modelo matemático expresso pela equação de cada reta. Assim, a linearidade da curva de calibração é verificada pela determinação deste coeficiente, que deverá ser superior ou igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

De acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA, o limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor

nível detectável. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. De acordo com a mesma resolução, o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado por meio do ruído, neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

### **3.7 Importância da identificação e bioacessibilidade de compostos fenólicos na cajuína.**

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento de estudos que agreguem valor à cajuína. Do ponto de vista econômico, permitir a inserção dessa bebida em novos mercados, melhorando a renda e a qualidade de vida de todos os envolvidos nessa cadeia produtiva. Recentemente o Instituto Nacional da Propriedade Industrial, INPI, fez a entrega do título de Indicação Geográfica - IG, da Cajuína do Piauí para a União das Associações, Cooperativas e Produtores de Cajuína do Piauí, Procajuína, que será responsável por administrar e fiscalizar o uso do selo.

IG é um registro concedido a produtos e serviços vinculados à determinada região, podendo ser Indicação de Procedência ou Denominação de Origem. No caso da Cajuína do Piauí, a IG é de Indicação de Procedência, a qual se relaciona com o nome geográfico de uma região, protegendo e assegurando a identidade, bem como normatizando a forma de elaborar e de controlar o processo de produção (SEBRAE, 2016).

A IG da Cajuína do Piauí contemplará produtores de todos os municípios do Estado, que produzem cajuína de acordo com os padrões previamente estabelecidos e que estão devidamente registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Com esse selo, atesta-se a qualidade do produto, que é fabricado com 100% do suco de caju.

Sendo assim, além do potencial econômico de produção, pesquisas (MELO-CAVALCANTE et al., 2003; MELO-CAVALCANTE et al., 2005; SILVA-LIMA et al., 2007; DAMASCENO et al., 2008; MELO-CAVALCANTE et al., 2008; SOUSA et al., 2018) verificaram a eficiência da cajuína como bebida nutritiva e funcional,

apresentando elevados teores de compostos fenólicos e vitamínicos C que conferiram propriedades antioxidantes e antimutagênicas (Quadro 1).

**Quadro 1** Estudos sobre o valor nutritivo e funcional da cajuína.

Estudos	Principais resultados e conclusões
Melo-Cavalcante et al. (2003)	Os autores investigaram os efeitos mutagênicos do suco de caju fresco e da cajuína em ensaio Salmonella/microsoma para determinar a possível atividade antimutagênica dos sucos contra o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . O suco de caju fresco e a cajuína foram mutagênicos bacterianos, e apresentaram forte potencial antimutagênico contra H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Os autores associaram esta atividade antimutagênica à presença de compostos fenólicos como quercetina (0,28 mg/100g), taninos (13,0 mg/100g), bem como à presença de carotenoides (0,01 mg/100g). E concluíram que o suco de caju fresco ou processado (cajuína) pode ter importante papel na proteção do DNA contra danos induzidos espécies reativas de oxigênio, gerado por mecanismos intra e extracelulares.
Melo-Cavalcante et al., (2005)	Os autores verificaram que a cajuína pode proteger a cepa TA102 de <i>S. typhimurium</i> contra o dano ao DNA induzido por aflatoxina B1. Essa proteção pode ser atribuída à presença de componentes quimicamente ativos que já se mostraram envolvidos na proteção do DNA (Melo-Cavalcante et al., 2003)
Silva-Lima et al. (2007)	Obtiveram 110 a 80 mg/100g de vitamina C (valor inicial após aberta e com 11 dias após aberta a embalagem, respectivamente).
Damasceno et al. (2008)	Obtiveram 179,5 mg/100g de Vitamina C em cajuína obtida em laboratório.
Melo-Cavalcante et al., (2008)	Os autores investigaram as propriedades antimutagênicas de suco de caju fresco e processado (cajuína), utilizando a Salmonella/ensaio microsoma e MMS (metilmetanossulfonato) e 4-NQO (4-Nitroquinolina O 1-óxido) como mutagênicos diretos e BaP (benzo [a] pireno), como um mutagênico metabolicamente ativado. A cajuína pode ser útil para proteção contra agentes mutagênicos indiretos podendo não ser apenas uma fonte de nutrientes, mas também uma mistura complexa de compostos químicos com benefícios e propriedades para melhorar a estabilidade genômica.
Sousa et al. (2018)	Obtiveram teores de 103,09 a 161,22 mg/100g de compostos fenólicos totais ao analisar dois lotes de três marcas de cajuína comercial, e uma média de 208,60 µmolTEAC/100 g de atividade antioxidante pelo método DPPH.

Dessa forma, traçar o perfil desses compostos bem como avaliar sua biocessibilidade e atividade antioxidante faz desse estudo uma pesquisa relevante frente o crescimento do número de pessoas afetadas pelas DCNTs e que tais compostos presentes na bebida podem atuar na redução do risco das mesmas. No entanto, antes de serem realizados estudos *in vivo* faz-se necessário caracterizar quimicamente os compostos presentes na cajuína, objetivo do presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F.A.P. de. Cajuína. In: Venturini Filho, W.G. (Org.) **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2006. Cap. 8, p. 169-184.
- ABREU, F.P.; DORNIER, M.; DIONISIO, A. P.; CARAIL, M.; CARIS-VEYRAT, C.; DHUIQUE-MAYER, C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 25-31, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.02.
- AGOSTINI-COSTA, T.S.; JALES, K. A.; GARRUTI, D. S.; PADILHA, V. A.; LIMA, J. B.; AGUIAR, M. de J.; PAIVA, J. R. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1075-1080, 2004.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1999.
- ASCHOFF, J. K. S.; KAUFMANN, O.; KALKAN, S.; NEIDHART, R.; CARLE, R. SCHWEIGGERT. In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 578–587, 2015.
- 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.
- BATAGLION, G. A.; DA SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. H. F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.) by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 66, p. 396–400, 2014.
- BIEHLER, E.; BOHN, T. Methods for assessing aspects of carotenoid bioavailability. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, p. 44–69, 2010.
- BOUAYED, J.; DEUBER, H.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. **Food Chemistry**, v.131, p.1466–1472, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000. Art.1º - Aprovar o Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta conforme consta do Anexo I desta Instrução Normativa e Art. 2º - Regulamento técnico de identidade e qualidade para caju clarificado ou cajuína conforme consta do Anexo II desta **Instrução Normativa**. Brasília, DF, 2000.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF: ANVISA, 29 de Maio 2003.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; LIN, L-Z.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1112-1118, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.02.009

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

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação**. Editora da UFSCar: São Carlos, 2001.

CILLA, A.; ALEGRÍA, B.; ANCOS, C.; SÁNCHEZ-MORENO, M. P.; CANO, L. P. Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids and ascorbic acid from milk and soya-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7282–7290, 2012.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Review Ellagitannins – nature , occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. November 1999, p. 1118– 1125, 2000.

COSTA, J. R. R. **Produção de Cajuína no Piauí**, Teresina, 44p, 2015. Disponível em: <http://procajuina.simplesite.com/419908315>> Acesso em 29 de janeiro de 2019.

CROFT, R. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annuary of New York Academy of Science**, v. 845, p. 435-442, 1998.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001–1043, 2009.

DAIBER, A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 897–906, 2010.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Review. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, p. 348-361, 2007.

D'ARCHIVIO, M.; SANTANGELO, C.; SCAZZOCCHIO, B.; VARÌ, R.; FILESI, C.; MASELLA, R.; GIOVANNINI, C. Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 213-228, 2008.

DAS PIYALI, T.; SREELATHA; GANESH A. "Bio oil from pyrolysis of cashew nut shell- Characterization and related properties". **Biomass Bioenergy**, v. 27, p. 265-275, 2004.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 1818–1892, 2013.

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA., C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

DIAS, F. S. **Determinação de compostos fenólicos em vinhos e caracterização de vinhos elaborados na região do Vale do São Francisco Pernambuco**. 2010. (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Bahia.

EURACHEM WORKING GROUP. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 1998.

FBB - FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL: Desenvolvimento Regional Sustentável: Série cadernos de propostas para atuação em cadeias produtivas - Série Fruticultura – Caju, v.4, Brasília, Setembro de 2010. Disponível em: <http://www.bb.com.br/docs/pub/inst/dwn/Vol4FruticCaju.pdf>. Acesso em: 10 de Abril de 2018.

FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J.; SLADE, D. Phytochemistry of the mopane, *Colophospermum mopane*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 31-51, 2003.

FIRDAUS, F.; ZAFEER, M. F.; ANIS, E.; AHMAD, M.; AFZAL, M. Ellagic acid attenuates arsenic induced neuro-inflammation and mitochondrial dysfunction associated apoptosis. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 411-417, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.017>.

FRAGA, C. G.; GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 435–44, 2010.

GÖGÜS, F.; BOZKURT, H.; EREN, B. Kinetics of Maillard reactions between the major sugars and amino acids of boiled grape juice. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 31, 196-200, 1998.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. 88f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4ª edição. New York: Oxford, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. **Pharmacological Sciences**, v. 32, p. 125–130, 2011.

HAMAD, F. B.; MUBOFU, E. B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 8569- 8590, 2015. DOI: 10.3390/ijms16048569.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de Compostos Bioativos de Alimentos. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. São Paulo: Ed Manole, 2009. Cap. 36, p. 772-807.

HOST, B.; WILLIAMSON, G. A. critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. **Natural Product Reports**. v. 21, p. 425-47, 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

HUNG, H. C.; JOSHIPURA, K. J.; JIANG, R.; HU, F. B.; HUNTER, D.; SMITH-WARNER, S. A.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W. C. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, p. 1577–1584, 2004.

IBGE, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LPSA): Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil, Rio de Janeiro Rio de Janeiro, v.29 n.12 p.1-82. 2016. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistemico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_mensal/Fasciculo/2016/lspa\\_201612\\_20170222\\_133000.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemico_da_Producao_Agricola_mensal/Fasciculo/2016/lspa_201612_20170222_133000.pdf)> Acesso em 2 abril, 2018.

INDO, H. P.; YEN, H. C.; NAKANISHI, I.; MATSUMOTO, K.; TAMURA, M.; NAGANO, Y.; MATSUI, H.; GUSEV, O.; CORNETTE, R.; OKUDA, T.; MINAMIYAMA, Y.; ICHIKAWA, H.; SUENAGA, S.; OKI, M.; SATO, T.; OZAWA, T.; CLAIR, D. K.; MAJIMA, H. J. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **Journal of Clinical Biochemical Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 2015.

IPHAN: Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Produção artesanal e práticas socioculturais associadas à cajuína no Piauí, Piauí, 2009.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 453–464, 2004.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009.



KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A.; DIERING, S.; PRIM, D.; ANDLAUER, W. Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in in vitro digestion/Caco-2 absorption model. **Food Chemistry**, v. 1, p. 288-294, 2015.

LIMA, A. C. S. DE.; SOARES, D. J.; SILVA, M. R. S.; FIGUEIREDO, R. W DE.; SOUSA, P. H. M. DE.; MENEZES, E. DE A. In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 161, p. 142-147, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.123>

LIMA, F. F.; SILVA, G. A.; DEODATO, J. N. V.; MEDEIROS, K. C.; ARAÚJO, A. S. **Avaliação físico-química de sucos de caju**. In: I Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos de Pombal, 2012, Pombal-PB. Anais da I Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos de Pombal. Mossoró: Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 1, 2011.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 73-105, 2012.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; DEY, S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, p. 359-368, 2010.

MANN J. **Secondary Metabolism**. Oxford: Clarendon Press, 1987. 374 p.

MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. **Analysis**, v.22, 1994.

MATSUDO, V.; MATSUDO, S.; ANDRADE, D.; ARAUJO, T.; OLIVEIRA, L. C. E.; BRAGGION, G. Promotion of physical activity in a developing country: The Agita São Paulo experience. **Public Health Nutrition**, v. 5, p. 253-261, 2002.

MCDUGALL, G. J.; FYFFE, S.; DOBSON, P.; STEWART, D. As antocianinas de vinho tinto; a sua estabilidade sob a digestão gastrointestinal simulada. **Phytochemistry**, v. 53, p. 5896–5904, 2005.

MELO-CAVALCANTE, A. A.; RÜBENSAM, G.; PICADA, J. N.; SILVA, E. G.; MOREIRA, F. J. C.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic evaluation, antioxidant potential and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, p. 360-369, 2003.

MELO-CAVALCANTE, A. A. C.; RÜBENSAM, G.; ERDTMANN, B.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J. A. P. Cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice lowers

mutagenicity of aflatoxin B1 in *S. typhimurium* TA102. **Genetics Molecular Biology**, v. 28, p. 328-333, 2005.

MELO-CAVALCANTE, A. A.; PICADA, J. N.; RUBENSAM, G.; HENRIQUES, J. A. P. Antimutagenic activity of cashew apple (*Anacardium occidentale* Sapindales, Anacardiaceae) fresh juice and processed juice (cajuína) against methyl methanesulfonate, 4-nitroquinoline N-oxide and benzo[a]pyrene. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 759-766, 2008.

MOON, J. M.; SHIBAMOTO T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MOO-HUCHIN, V. M.; MOO-HUCHIN, M. I.; ESTRADA-LÉOM, R. J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I. A.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; BERANCUR-ANCONA, D.; SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 166, p. 17-22, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.127.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

NASCIMENTO, R. F.; AQUINO, F. W. B.; AMORIM, A. G. N.; PRATA, L. P. Avaliação do tratamento térmico na composição química e na qualidade da cajuína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 217-221, 2003.

OLIVEIRA, V. H. *et al.* **Cultivo do cajueiro anão precoce**. 1 ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002, 40 p.

PAIVA, F. F. A.; GARRUTTI, D. S.; SILVA NETO, R. M. **Aproveitamento industrial do caju**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 85 p.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, p.21-32, 2007.

PARAMASHIVAPPA, R.; KUMAR, P. P.; VITHAYATHIL, P. J.; RAO, A. S. Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2548-2551, 2001.

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

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; SALVATORE, S.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, p. 1030–1038, 2006.

PETINARI, R. A.; TARSITANO, M. A. A. Cashew (*Anacardium occidentale* L.) commercialization in northwest of São Paulo state. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 700-702, 2002.

PIMPÃO, R. C.; VENTURA, M. R.; FERREIRA, R. B.; WILLIAMSON, G.; SANTOS, C. N. Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 454–463, 2015.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PRESTES, O. D.; PRESTA, M. A.; KOLBERG, D. I. S.; ZANELLA, R. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 18-21, 2007.

QUEIROZ, C.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Changes in bioactive compounds and antioxidant capacity of fresh-cut cashew apple. **Food Research International**, v. 44, p. 1459-1462, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H., JARDIM, I. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGO, M. J.; CILLA, A.; BARBERÁ, R.; ZACARIAS, L. Carotenoid bioaccessibility in pulp and fresh juice from carotenoid-rich sweet oranges and mandarins. **Food & Function**, v. 6, p. 1950–1959, 2015.

RYAN, L.; PRESCOTT, S. L. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1191–1197, 2010.

ROLEIRA, F. M. F.; SILVA, E. J. T.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.

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

SAURA-CALIXTO, F., SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, p. 492-501, 2007.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-85S, 2000.

SEBRAE. 2016. Relatório de Gestão do exercício de 2016 apresentado aos órgãos de controle interno e externo e à sociedade como prestação de contas anual a que esta Unidade está obrigada nos termos do parágrafo único do art. 70 da Constituição Federal, elaborado de acordo com as disposições da IN TCU nº 63/2010, da DN TCU 154/2016, da Portaria TCU 59/2017. <

[https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/PI/Anexos/RELAT%C3%93O\\_GEST%C3%83O\\_2016\\_SEBRAE\\_PIAU%C3%8D.pdf](https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/PI/Anexos/RELAT%C3%93O_GEST%C3%83O_2016_SEBRAE_PIAU%C3%8D.pdf)> Acesso em 10 abr, 2018.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SIES, H.; WILHELM, S.; SEVANI, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 969-972, 2005.

SIVAGURUNATHAN, P. S.; SIVASANKARI, S. M.; MUTHUKKARUPPAN. Characterisation of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) fruits collected from Ariyalur. **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, v. 2, p. 101-107, 2010.

SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G.P.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398-404, 2014.

SILVA NETO, R. M.; ABREU, F. A. P.; PAIVA, F. F. A. **Cajuína: como produzir com qualidade**. Edição SEBRAE TEREZINA/PI, 2003.

SILVA NETO, R.M. Embrapa. **Pedúnculo**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fr3sbpu402wyiv80084arlaeog5af.html>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

SILVA NETO, R. M.; ABREU, F. A. P.; PAIVA, F. F. A. **Processamento do pedúnculo de caju: Cajuína**. Documento 123. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Fortaleza, CE, 2009.

SOARES, E. B.; CARNEIRO, J. G. M.; SANTOS, K. B.; MURATORI, M. C. S. **Diagnóstico do setor agroindustrial da cajuína**. Universidade Federal do Piauí, Secretaria da Agricultura, Abastecimento e Irrigação do Estado do Piauí, Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2004.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUSA, A. V. B.; RODRIGUES-JÚNIOR, F. C.; SANTOS, G. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R.; PORTO-LUZ, R. G. L. Determinação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante da cajuína e do mel produzidos no Estado do Piauí – Brasil. **Interfaces Científica, Saúde e Ambiente**, v. 6, p. 21-32, 2018. DOI - 10.17564/2316-3798.2018v6n2p21-32.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, p. 599-606, 2010.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. *Pure Appl. Chem.* v. 74, p. 835, 2002.

VAN BUGGENHOUT, S.; ALMINGER, M.; LEMMENS, L.; COLLE, I.; KNOCKAERT, G.; MOELANTS, K. In vitro approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 607-618. 2010.

VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v. 13, p. 71–82, 2013.

VERMA, S.; SINGH, A. E.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.35, p.473-485, 2013.

WHO - World Health Organization. **Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Non communicable Diseases**. Geneva, 2008.

WHO, World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva, 2014.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 275 - 295, 2004.

YORDI, E. G. et al. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In: BOUAYED, J.; BOHN, T. **Well-Being and Health**. Ed Nutrition, 2012, cap. 2, p. 23-48.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**. v. 74, p. 139-162, 1994.

ZHAO, M.; TANG, S. N.; MARSH, J. L.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. **Cancer Letters**, v.780, p. 210-217, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.009>

## CAPÍTULO II – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ARTIGO CIENTÍFICO

**Versão aceita pela revista *Current Nutrition and Food Science***

PORTO-LUZ, R. G. L., MOURA, A. J. B., SILVA, B., FETT, R., ARAÚJO, M. A. M., MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. (In press.) Identification and quantification of antioxidant compounds in clarified cashew apple juice “cajuína”. *Current Nutrition and Food Science*.

## Identification and Quantification of Antioxidant Compounds in Clarified Cashew Apple Juice ‘Cajuína’

Rayssa Gabriela Lima Porto-Luz<sup>a</sup>, Amanda Jéssica Barros de Moura<sup>a</sup>, Bibiana da Silva<sup>b</sup>, Roseane Fett<sup>b</sup>, Marcos Antônio da Mota Araújo<sup>c</sup>, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departament of Nutrition, Food and Nutrition Postgraduate Program, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí,, Brazil, <sup>b</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Santa Catarina,, Brazil, <sup>c</sup>Municipal Health Foundation, Teresina, Piauí, Brazil

**Abstract:** Cajuína is obtained through clarification of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.), a non-diluted and non-fermented beverage, which is prepared from the edible part of the pseudo-fruit. This study sought to identify and quantify phenolic compounds, determine vitamin C content, total flavonoid content, and the antioxidant activity of two commercial brands of clarified cashew apple juice (cajuína) produced in Piauí, Brazil. A high vitamin C content was found mainly in brand A. A high total phenolic content was observed in brand A, and there was no significant difference in flavonoid content between the two brands. Cajuína had high antioxidant activity, which was confirmed by two methods. The highest value was found for brand A by the DPPH method. We concluded that this clarified cashew apple juice has a high antioxidant compound content, and it is a functional food.

**Keywords:** *Anacardium occidentale* L., identification of phenolic compounds, antioxidant activity, clarification of cashew apple juice, bioactive compounds, vitamin C.

### 1 Introduction

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is a native plant of tropical America, including Brazil, and is also found in Asia and some African countries [1, 2]. Belonging to the Anacardiaceae family, it is considered one of the species of greater economic importance in northeastern Brazil. According to IBGE [3], the area occupied by cashew trees in Brazil was estimated to be 619 thousand hectares, of which 99.4% is in the

northeast, 62.9% in the state of Ceará (389.358 ha), 15.5% in the State of Rio Grande do Norte (96.120 ha), and 14.1% (87,474 ha) in Piauí, which is ranked third nationally.

Cashews are seasonal fruits composed of two parts: the chestnut, which is the fruit itself, and the floral peduncle, or pseudo-fruit. The peduncle is the in natura edible part of the cashew and represents about 90% of the total mass. The remaining 10% corresponds to the fruit, from which the almonds are extracted from the nuts [4].

Cashew juice has a pleasant taste and is rich in vitamin C; however, its consumer acceptance is limited due to its astringency. The clarified juice of cashew (cajuína) is defined by the Brazilian legislation [5] as an undiluted and unfermented drink, made from the edible part of the apple, obtained through a specified technique, and subjected to a physical clarification process. The clarified juice is then subjected to thermal treatment in a water-bath using glass bottles until the sugars present in this juice become caramelized, thus resulting in an amber-colored beverage, the cajuína, which can be stored for up to two years. In cashew producing regions, this product is widely appreciated as a refreshing drink that is preferably consumed cold [6].

Several factors contribute to the development of studies that add value to cajuína. Recently, the National Institute of Industrial Property (INPI) awarded the title of Geographical Indication (GI) of Cajuína of Piauí to the Union of Associations, Cooperatives and Producers of Cajuína of Piauí (Procajuína), which will be responsible for administering and supervising the stamp use. The GI is a registration granted to products and services linked to a certain region, it may be an Indication of Source or Appellation of Origin. In the case of Cajuína of Piauí, the GI will be an Indication of Source, which is related to the geographic name of the region, protecting and ensuring the identity, as well as standardizing a way to expand and control the production process [7].

Previous studies have verified the levels of phenolic compounds in cashews [8, 9], and the antioxidant and antimutagenic properties of cajuína [10, 11, 12]. Phenolic compounds have attracted the attention of researchers due to their antioxidant activity, which helps reduce oxidative stress by moderating oxidation through elimination of free radicals [8, 13]. The use of antioxidants derived from natural resources has received attention because of its health benefits, which includes reducing the risk of cardiovascular disease, inflammation, and age-related disorders [14]. Phenolic compounds are secondary metabolites, common among plant species, and are the most common and important antioxidants in the human diet [15,16].



Thus, the objective of this study was to identify and quantify the phenolic compounds, determine vitamin C and total flavonoid content, and the antioxidant activity in two commercial brands of clarified cashew juice (cajuína).

## **2. Materials and Method**

### **2.1 Chemicals**

ABTS<sup>+</sup>(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), pancreatin, pepsin, bile extract, ultra-pure phenolic standards (Ferulic, gallic, caffeic, chlorogenic, ellagic, and p-coumaric acids; quercetin and epicatechin) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Methanol and HPLC-grade acetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and Folin–Ciocalteu reagent was purchased from Vetec Chemistry (Brazil). All chemicals used in the experiments were of analytical reagent grade. Deionized water was obtained from a Milli-Q Plus system (Millipore, Bedford, USA).

### **2.2 Samples**

Two commercial brands of cajuína were analyzed. These were selected because they had been granted a Geographical Indication (GI) registration by the Brazilian National Institute of Industrial Property. The samples, 500 mL packages in two different lots (16 units per lot), were supplied by the producers located in the state of Piauí, Brazil. The packages were sealed and stored in the Laboratory of Bromatology and Food Biochemistry, Department of Nutrition, Federal University of Piauí, Brazil, at room temperature (25 °C) until analysis.

### **2.3 Chemical and physical characterization of cashew**

Analyses of titratable acidity (TA), total soluble solids (TSS), and pH were performed using protocols described by the AOAC [17]. The TA was determined with a 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH solution and expressed as a percentage of citric acid. The pH was determined using a digital potentiometer (Hanna Instruments, model 21), calibrated with buffer

solutions of pH 4.0 and 7.0. TSS were determined by refractometry using the Abbé refractometer model RTA-100 at 20° C, and the results are expressed in °Brix

#### **2.4 Determination of vitamin C content**

The vitamin C content was determined by a titration method using a 2,6-dichlorophenol indophenol solution (DCFI), known as Tillman's Reagent, using 1% oxalic acid solution for sample dilution [17], with some modifications. Two milliliters of cajuína was mixed with 50 mL of an oxalic acid solution (1%). This solution was titrated with a 0.01% solution of DCFI to a pink color, which persisted for 15 sec. Calibration of the DCFI solution was performed with ascorbic acid solution (1 mg/mL). The results were expressed as mg ascorbic acid equivalents per 100 mL sample.

#### **2.5 Extraction procedure**

Cajuína samples (3 mL) were extracted with methanol (8 mL) in an ultrasonic bath (USC-1400 Unique) for 15 min at room temperature (20 °C). The extract was centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5702) at 2,000 × g for 15 min, and the supernatant was used to determine the profile of individual phenolic compounds, total phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity.

#### **2.6 Determination of total phenolic compounds**

The total phenolic content was determined spectrophotometrically (Hewlett-Packard 8452 Spectrophotometer) using the Folin-Ciocalteu reagent, according to the methodology of Singleton and Rossi [18]. The absorbance was read at 765 nm, and the concentration of the phenolic compounds was estimated from the standard curve of gallic acid (50, 100, 150, 250, 500, 750, 1,000 mg·mL<sup>-1</sup>). The results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per 100 mL sample.

#### **2.7 Determination of total flavonoids**

The flavonoid content was determined according to the method described by González-Aguilar, Villegas-Ochoa, Martínez-Téllez, Gardea, and Ayala-Zavala [19]. Briefly, 1 mL of extract was mixed with 4 mL of deionized water and 300 µL of 5% NaNO<sub>2</sub> for 5 min. After mixing, 300 µL of 10% AlCl<sub>3</sub> (methanolic solution) was added.

After the mixture was left standing for 1 min, 2 mL of 1 M NaOH was added. Finally, water was added to obtain a final volume 10 mL. The absorbance of the reaction mixture was determined at 415 nm. The total flavonoid concentration was calculated using the standard curve of quercetin (20, 30, 40, 50, 100, 200, and 400 mg·mL<sup>-1</sup>) and expressed as mg equivalent of quercetin (QEs) per 100 mL sample.

## **2.8 Antioxidant activity**

### *2.8.1 ABTS method*

The ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) method is based on the inactivation of the antioxidant ABTS<sup>+</sup> radical cation, which is measured by the reduction in the absorbance at 734 nm. The assay was conducted as described by Re et al. [20]. A solution containing 7 μM ABTS was prepared and mixed in the same proportion with a solution of 2.45 μM potassium persulfate to form the corresponding superoxide anion. The working solution was obtained by diluting 1 mL of this radical-forming mixture with 50 mL of ethanol to obtain an absorbance of 0.70 (± 0.02) at 734 nm. An aliquot (2.9 mL) of this solution was added to 60 μL of the extract and incubated at room temperature. The absorbance was read at 734 nm at 7 min after the addition of the extract. The total antioxidant activity was expressed as μmol in 100 mL of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).

### *2.8.2 DPPH method*

The total antioxidant activity was analyzed by determining the capacity to eliminate DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radicals using a modified version of the method of Brand-Williams, Cuvelier, and Berset [21]. A solution of 100 μM DPPH in methanol was prepared and stored under refrigeration until use. The working solution was obtained by diluting the DPPH solution with 80% methanol to an absorbance of approximately 0.80 (± 0.02) at 515 nm. An aliquot (2.9 mL) of this solution was mixed with 100 μL of the extract and incubated at room temperature for 30 min in the dark. The absorbance was measured at 515 nm, and the total antioxidant activity was expressed as μmol in 100 mL of TEAC.

## **2.9 Identification of phenolic compounds by HPLC-UV**

The identification and quantification of phenolic compounds were performed according to a method adapted from that of Souza et al [22]. The phenolic compounds were analyzed using a LC-20 AT high-performance liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan). The separation was performed using a Shimadzu GVP-ODS pre-column (10 mm × 4.6 mm) in line with a Shim-pack VP-ODS column (150 × 4.6 mm i.d., 5- $\mu$ m particle size) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) equipped with a UV-Vis SPD-20A detector. The flow rate was maintained at 0.7 mL·min<sup>-1</sup> and the column temperature was maintained at 40 °C, with an injection volume of 10  $\mu$ L. The gradient of the mobile phase was composed of (A) methanol with 1% acetic acid and (B) 1% acetic acid: from 0–1 min, 10% A; 1–5 min 15% A; 5–10 min, 20% A; 10–15 min, 25% A; 15–25 min, 30 % A; 25–30 min, 70 % A; 30–40 min, 80 % A; 40–50 min, 10 % A. The total run time was 50 min. The compounds were detected at 280 (i.e., gallic acid, epicatechin, and ellagic acid), 320 (i.e., caffeic, p-coumaric, chlorogenic, and ferulic acids), and 360 nm (i.e., quercetin). The peaks were identified by comparison with the retention time of standards, and the quantification of the compounds was based on the areas of the respective peaks detected using the LabSolutions acquisition software version 5.57 SP1 Copyright (Shimadzu Corporation). The column calibration was performed by injecting the standards in triplicate at nine different concentrations (i.e., 0.014; 0.056; 0.225; 0.45; 7.81; 15.62; 31.25; 62.5, and 120.0  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>). The levels of phenolic compounds were expressed as  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>.

## **2.10 Statistical analysis**

The Statistical Package for Social Science (SPSS) software, version 22, was used for the statistical analysis of the data. The results are presented as means of three replicates and their respective standard deviations. To verify a significant difference between the averages analyzed, the Student's t-test was used, with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) and a confidence interval of 95% [23].

## **3. Results and Discussions**

For the quality control of analyzed cajuína, physico-chemical characterization was performed. The vitamin C contents of the two brands of cajuína were determined (Table 1).

Brand A had an acidity of  $0.26\% \pm 0.06$  and brand B of  $0.18\% \pm 0.01$ . A pH of  $4.26 \pm 0.16$  was found for brand A and  $4.30 \pm 0.35$  for brand B. Soluble solid values were  $13.35 \pm 0.55$  and  $12.35 \pm 0.35$  ° Brix for brands A and B, respectively. The high vitamin C content for brand A is of note, at  $340.27 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ . Only the acidity value of brand B did not align with that recommended by the Brazilian legislation [5], which establishes minimum values of 10.00 ° Brix, 0.25% acidity in the form of citric acid for acidity, and  $60.00 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  of vitamin C in the product. It is known that an altered acidity value may compromise food preservation as well as the stability of the chemical components influencing product shelf life. Thus, the altered acidity may have compromised the vitamin C content of brand B cajuína ( $145.31 \pm 39.71 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), which was less than half the content obtained for brand A as cited above. In addition to this characteristic, this difference can be explained by the characteristics of the raw material used, including the degree of maturation, edaphoclimatic conditions, and processing time.

**Table 1.** Physical-chemical characterization and vitamin C of two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína'.

Parameters	Brand A	Brand B	Legislation**
	Mean $\pm$ SD*	Mean $\pm$ SD	
Acidity total (% citric acid)	$0.26 \pm 0.06^a$	$0.18 \pm 0.01^b$	Min 0.25
pH	$4.26 \pm 0.16^a$	$4.30 \pm 0.35^a$	-
Soluble Solids (°Brix)	$13.35 \pm 0.55^a$	$12.35 \pm 0.35^a$	Min 10
Vitamin C ( $\text{mg } 100\text{mL}^{-1}$ )	$340.27 \pm 64.27^a$	$145.31 \pm 39.71^b$	Min 60

Data represent the mean of three repetitions. Similar letters between columns, did not present statistical significance among means, according to the Student's t test at 5% ( $p > 0.05$ ) 95% CI.<sup>1</sup> Brasil (2000).

Vidal and Pereira [24] assessed laboratory-produced cajuína pH ( $4.14 \pm 0.01$ ), total soluble solids ( $10.8 \pm 0.00$  ° Brix), total acidity ( $0.390 \pm 0.001\%$ ), and vitamin C content ( $173.43 \pm 0.05 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Damasceno et al. [25] obtained a pH of  $4.4 \pm 0.0$ , soluble solids content of  $12.2 \pm 0.1$  ° Brix, and  $180 \pm 5.2 \text{ mg } \text{L}^{-1}$  of vitamin C. It is important to

highlight the high vitamin C content of cajuína in the present study ( $340.27 \pm 64.27$  mg  $100 \text{ mL}^{-1}$ ), which was higher than that observed in orange juice ( $32.36 \pm 71$  mg  $100 \text{ mL}^{-1}$ ) by Danieli et al. [25] or in the cerrado fruit, such as mangaba (*Hancornia speciosa*) ( $175.06 \pm 1.65$  mg  $100 \text{ mL}^{-1}$ ), cagaita (*Eugenia dysenterica*) ( $31.95 \pm 0.37$  mg  $100 \text{ mL}^{-1}$ ), and cajá (*Spondias mombin*) ( $42.96 \pm 1.43$  mg  $100 \text{ mL}^{-1}$ ). These results confirm that cajuína is an excellent source of vitamin C.

The phenolic compounds found in fruits and vegetables have attracted a lot of interest due to their potential as antioxidants.

In this work, the two brands of cajuína had significant amounts of total phenolics, with an emphasis on brand A ( $187.43 \pm 8.1$  mg  $100 \text{ mL}^{-1}$ ), and high flavonoid content ( $13.77 \pm 1.09$  and  $14.37 \pm 1.13$  mg) for  $100 \text{ mL}^{-1}$  A and B, respectively (Table 2). Romagnolo and Selmin [27] found that dietary flavonoid ingestion may reduce the risk of breast, colon, lung, prostate, and pancreatic tumors.

**Table 2.** Determination of total phenolic compounds, total flavonoids, and antioxidant activity of two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína'.

Cajuína	Total Phenolic* (mg $100 \text{ mL}^{-1}$ )	Flavonoids** (mg $100 \text{ mL}^{-1}$ )	TAA ABTS*** ( $\mu\text{mol TEAC}$ $100\text{mL}^{-1}$ )	TAA DPPH**** ( $\mu\text{mol TEAC}$ $100\text{mL}^{-1}$ )
<b>Brand A</b>	$187.43 \pm 8.1^a$	$13.77 \pm 1.09^a$	$1911.00 \pm 71.57^a$	$1920.63 \pm 77.85^a$
<b>Brand B</b>	$105.13 \pm 5.14^b$	$14.37 \pm 1.13^a$	$1018.75 \pm 163.83^b$	$919.27 \pm 52.39^b$

Date represent the mean of three replicates. Similar lowercase letters, the lines (brands A and B) did not indicate significant differences between the means, as determined by the Student's t test, at the level of 5% ( $p > 0.05$ ) 95% CI. 1 Total phenolics: Results expressed in mg GAE  $100 \text{ mL}^{-1}$  (Gallic Acid Equivalent); 2. Flavonoids: Results expressed in mg QE  $100 \text{ mL}^{-1}$  (Quercetin Equivalent); 3. TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Activity. TAA ABTS (Total Antioxidant Activity determined by the ABTS method); 4. TAA DPPH (Total Antioxidant Activity determined by the DPPH method).

Sousa et al. [10] analyzed the total phenolic content of three commercial brands of cajuína and obtained a mean of  $137.05 \pm 26.64$  mg  $100 \text{ mL}^{-1}$ . Lima et al. [9], obtained higher contents for cashew juice, at  $338.60 \pm 10.68$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ . Lopes, Miranda, Moura, and Filho [28] studied the total polyphenol extractable content in different cashew clones and observed  $375.79$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  for clone CCP 09 and  $124.2$  mg

GAE  $100^{-1}$  for CCP 76 clone. These results show that the difference in phenolic content is dependent on the type of cashew (clone or native) and the extraction methods used, as, according to Goli, Barzegar and Sahari [29], the concentration of phenolic compounds in fruit extracts is dependent on the solvent and the extraction method used as well as edaphoclimatic factors.

The greatest challenge of cajuína production is the standardization of the production process, since a large part of the production comes from artisanal processing. Among other factors, the origin of the raw material, the degree of fruit maturation, and cooking time can influence the physicochemical characteristics and bioactive compound content of this beverage. The cajuínas analyzed showed a vitamin C high content, phenolic compounds, and flavonoids.

The antioxidant activity of food is determined by a mixture of different antioxidants with different mechanisms of action. Therefore, the antioxidant capacity of food products should be evaluated with a variety of methods. Table 2 shows that the two brands analyzed presented high antioxidant activity, especially brand A, with  $1911.00 \pm 71.57 \mu\text{mol TEAC } 100 \text{ mL}^{-1}$  by the ABTS method and  $1920.63 \pm 77.85 \mu\text{mol TEAC } 100 \text{ mL}^{-1}$  by the DPPH method.

It can be observed that brand A, which presented a higher vitamin C and total phenolic content, was also the one with the highest antioxidant activity. These data confirm a possible relationship between these compounds and their antioxidant nature. Lima et al. [9] also verified similar antioxidant activity in cashew juice by the ABTS method ( $1810.00 \mu\text{mol TEAC } 100 \text{ g}^{-1}$ ). The reduction in total phenolic content and antioxidant activity in cashew nuts compared to cashew juice can be explained by the clarification process, which eliminates a large part of condensed tannins. Tannins are responsible for the astringency and turbidity of cashew juice, as well as phenolic compounds with antioxidant activity.

In the chromatographic separation, three phenolic acids (ellagic, gallic, and p-coumaric acids), and a flavonoid (epicatechin) were observed. As shown in Table 3, the ellagic acid was found in the greatest quantity, especially in brand A ( $1062.81 \pm 5.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Several investigations have shown that ellagic acid has biological properties, including anti-inflammatory activity [30], antimutagenic and anticarcinogenic activity [31, 32] and the ability to reduce the risk of cardiovascular diseases, atherosclerosis, and dyslipidemic disorders [33]. A higher gallic acid content was obtained in brand A

( $50.54 \pm 2.30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) followed by epicatechin, which did not differ statistically between brand A,  $14.54 \pm 1.0$  and brand B,  $12.22 \pm 0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The p-coumaric acid content was highest in brand A ( $2.99 \pm 0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

There are several biological properties associated with the compounds that were identified in the test sample. Anti-oxidant and anti-inflammatory properties [34], anti-carcinogenic properties [35], have been attributed to gallic acid. p-Coumaric acid has been associated with chemoprotective and antioxidant properties [36], reduced risk of cardiovascular diseases [37], and anticancer effects [38].

**Table 3.** Phenolic compound content in two liters of clarified cashew apple juice ‘cajuína’.

Cajuína	Ellagic acid ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Gallic acid ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	p-Coumaric acid ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Epicatechin ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Brand A	$1062.81 \pm 5.70^a$	$50.54 \pm 2.30^a$	$2.99 \pm 0.05^a$	$14.54 \pm 1.00^a$
Brand B	$390.90 \pm 0.18^b$	$34.22 \pm 3.14^b$	$0.72 \pm 0.01^b$	$12.22 \pm 0.05^a$

Data represents the mean of three replicates. Similar lowercase letters between the lines (Brand A and B) did not indicate significant difference between the means, according to Student's t test, at the level of 5% ( $p > 0.05$ ) 95% CI.

Based on these data, the differences in the contents of brands A and B can be justified by the processing method used to obtain the cashew juice, variations in cooking time (pasteurization), and the raw material used, whose quality is affected by the harvest time, edaphoclimatic conditions, and origin, among other factors. Brand B had acidity parameters outside those deemed acceptable by the Brazilian legislation. This may have compromised the integrity of the compounds evaluated in this study, since acidity is directly related to food preservation.

No data were found in the literature on the identification of phenolic compounds in cajuína; however, Queiroz et al. [39] identified four phenolic acids, namely gallic acid, protocatechuic acid, and free and conjugated cinnamic acids, in cashew juice under stress. Bataglion et al. [8] obtained approximately  $577.03 \pm 4.96 \mu\text{g g}^{-1}$  of gallic acid and  $2.46 \pm 0.35 \mu\text{g g}^{-1}$  of p-coumaric acid. These differences in phenolic composition can be attributed to the processing conditions, the methods of analysis, and the extract used.



Thus, the regular consumption of clarified cashew apple juice (cajuína) provides antioxidant compounds that are important for health. The phenolic compounds in cajuína have been identified for the first time and this work may contribute to the valorization of this regional product.

#### **4. Conclusion**

We conclude that cajuína is the source of phenolic compounds such as ellagic acid, epicatechin, p-coumaric acid, and gallic acid and has high antioxidant activity. Thus, this study provides scientific evidence for the functional and antioxidant potential of cajuína, demonstrating that cashew is a functional food. In addition, this study provides information about the phenolic profile and content of this product.

#### **Conflict of interest**

The authors confirm that the content of this article has no conflict of interest.

#### **Acknowledgements**

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for the funding granted by means of the CNPq/MEC/CAPES CASADINHO-PROCAD, process 552239/2011-9 and Edital Universal (14/2011) Process 482292/2011-3. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

#### **References**

- [1] Assunção RB, Mercadante AZ. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. Food Chem 2003; 81: 495–502.
- [2] Petinari RA, Tarsitano MAA. Cashew (*Anacardium occidentale* L.) commercialization in northwest of São Paulo state. Rev Bras Frut 2002; 24: 700-02.

[3] IBGE Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LPSA): Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil, Rio de Janeiro. 2016; 29(12): 1-82.

[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/2016/lspa\\_201612\\_20170222\\_133000.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2016/lspa_201612_20170222_133000.pdf) > (accessed in april, 10, 2018).

[4] Paiva FFA, Garrutti DS, Silva Neto RM. Aproveitamento industrial do caju. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical 2000; 85.

[5] BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa (2000). Art.1º - Aprovar o Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta conforme consta do Anexo I desta Instrução Normativa e Art. 2º - Regulamento técnico de identidade e qualidade para caju clarificado ou cajuína conforme consta do Anexo II desta Instrução Normativa. Brasília, DF.

[6] SEBRAE. Relatório de Gestão do exercício de 2016 apresentado aos órgãos de controle interno e externo e à sociedade como prestação de contas anual (2016). IN TCU nº 63/2010, da DN TCU 154/2016, da Portaria TCU 59/2017.<[https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/PI/Anexos/RELAT%C3%93RIO\\_GEST%C3%83O\\_2016\\_SEBRAE\\_PIAU%C3%8D.pdf](https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/PI/Anexos/RELAT%C3%93RIO_GEST%C3%83O_2016_SEBRAE_PIAU%C3%8D.pdf)> Acesso em 18 dec, 2018.

[7] Abreu FP, Dornier M, Dionisio AP, Carail M, Caris-Veyrat C, Dhuique-Mayer C. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. Food Chem 2012; 138: 25–31.

[8] Bataglioni GA, da Silva FMA, Eberlin MN, Koolen HHF. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.) by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Food Res Int 2014; 66: 396–400.

- [9] Lima ACS, Soares DJ, Silva MRS, Figueiredo RW, Sousa PHM, Menezes EA. In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chem* 2014; 161: 142–7.
- [10] Sousa AVB, Rodrigues-Junior FC, Santos GM, Moreira-Araújo RSR, Porto-Luz RGL. Determinação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante da cajuína e do mel produzidos no Estado do Piauí – Brasil. *Interfaces Científica, Saúde e Ambiente* 2018; 6: 21–32.
- [11] Melo-cavalcante AA, Rübensam G, Picada JN, Silva EG, Moreira FJC, Henriques JAP. Mutagenic evaluation, antioxidant potential and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environ Mol Mutagen* 2003; 41: 360–369.
- [12] Melo-Cavalcante AA, Picada JN, Rubensam G, Henriques JAP. Antimutagenic activity of cashew apple (*Anacardium occidentale* Sapindales, Anacardiaceae) fresh juice and processed juice (cajuína) against methyl methanesulfonate, 4-nitroquinoline N-oxide and benzo[a]pyrene. *Genet Mol Biol* 2008; 31: 759–766.
- [13] Plaza M, Pozzo T, Liu J, Ara KZG, Turner C, Karlsson EN. Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *J Agricult Food Chem* 2014; 62: 3321–3333.
- [14] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agricult Food Chem* 2005; 53: 1841–56.
- [15] Kim KH, Moon E, Choi SU, Kim SY, Lee KR. Polyphenols from the bark of *Rhus verniciflua* and their biological evaluation on antitumor and antiinflammatory activities. *Phytochem* 2013; 92: 113–121.
- [16] Minutolo M, Amalfitano C, Evidente A, Frusciante L, Errico A. Polyphenol distribution in plant organs of tomato introgression lines. *Nat Prod Res* 2013; 27(9): 787–795.

- [17] AOAC Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 20<sup>rd</sup> ed, Arlington, 2016 .
- [18] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16: 144–158.
- [19] González-Aguilar GA, Villegas-Ochoa MA, Martínez-Téllez MA, Gardea AA, Ayala-Zavala JF. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *J Food Sci* 2007; 72:197–202.
- [20] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Riceevans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231–1237.
- [21] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 1995; 28: 25–30.
- [22] Souza MM, Silva B, Costa CSB, Badiale-Furlong E. Free phenolic compounds extraction from Brazilian halophytes, soybean and rice bran by ultrasound-assisted and orbital shaker methods. *An Acad Bras Cienc* 2018; 90: 3363-3372.
- [23] Siegel S. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, McGraw-Hill 1995.
- [24] Vidal RHL, Pereira CG. Ion Exchange Resin Applied to Obtain Clarified Cashew Juice. *Sep Sci Technol* 2015; 50: 2737–2746.
- [25] Damasceno LF, Fernandes FAN, Magalhaes MMA, Brito ES. Non-enzymatic browning in clarified cashew apple juice during thermal treatment: Kinetics and process control. *Food Chem* 2008; 106: 172-179.
- [26] Danieli F, Costa LRLG, Silva LC, Hara ASS, Silva AA. Determination of vitamin C in sample orange juice in natura and commercial samples of orange juice pasteurized and bottled in Tetra Pak packages. *J Health Sci Inst* 2009; 27: 361–365.

- [27] Romagnolo DF, Selmin OI. Flavonoids and cancer prevention: A review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr* 2012; 31: 206–238.
- [28] Lopes MMA, Miranda MRA, Moura CFH, Filho JE. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. *Ciênc Agrotecnol* 2012; 36:325–332.
- [29] Goli AH, Barzegar M, Sahari MA. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem* 2005; 92: 521–525.
- [30] Firdaus F, Zafeer MF, Anis E, Ahmad M, Afzal M. Ellagic acid attenuates arsenic induced neuro-inflammation and mitochondrial dysfunction associated apoptosis. *Toxicol Report* 2018; 5: 411–417.
- [31] Kumar D, Basu S, Parija L, Rout D, Manna S, Dandapat J, Debata, P. R. Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 2016; 81:31–37.
- [32] Liang W-Z, Chou, C-T, Cheng J-S, *et al.* The effect of the phenol compound ellagic acid on Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cytotoxicity in liver cells. *Eur J Pharmacol* 2016; 780: 243–251.
- [33] García-Niño WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacol Res*, 2015; 97: 84–103.
- [34] Oliveira L, Thomé G, Lopes T, *et al.* Effects of gallic acid on delta aminolevulinic dehydratase activity in biochemical, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats, *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 1201–1299.
- [35] Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 35: 473–485.

[36] Kannan RRR, Thangaradjou RAT, Anantharaman P. Phytochemical constituents, antioxidant properties and p-coumaric acid analysis in some seagrasses. *Food Res Int* 2013; 54: 1229–1236.

[37] Roy A J, Prince PSM. Preventive effects of p-coumaric acid on cardiac hypertrophy and alterations in electrocardiogram, lipids, and lipoproteins in experimentally induced myocardial infarcted rats. *Food Chem Toxicol* 2013; 60: 348–354.

[38] Sharma SH, Chellappan DR, Chinnaswamy P, Nagarajan S. Protective effect of p-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats. *Biomed Pharmacother* 2017; 94: 577–588.

[39] Queiroz C, Silva AJR, Lopes MLM, Fialho E, Valente-mesquita VL. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chem* 2011; 125: 128–132.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**Versão submetida à Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

PORTO-LUZ, R. G. L., SOARES, A. K. de O., SILVA, B., FETT, R., ARAÚJO, M. A. M., MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. (In press.) ***In vitro* bioaccessibility and identification of antioxidant compounds in clarified cashew juice “cajuína”** *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.*

## ***In vitro* bioaccessibility and identification of antioxidant compounds in clarified cashew juice “cajuína”**

Rayssa Gabriela Lima PORTO-LUZ <sup>a</sup>, Ana Karine de Oliveira SOARES <sup>a</sup>, Bibiana DA SILVA <sup>b</sup>, Roseane FETT <sup>b</sup>, Marcos Antônio da Mota ARAÚJO <sup>c</sup>, Regilda Saraiva dos Reis MOREIRA-ARAÚJO <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Food and Nutrition Postgraduate Program, Federal University of Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela s/n, Ininga, Teresina, Piauí 64049-550, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Itacorubi, 1346, Florianopolis, Santa Catarina 88034-001, Brazil.

<sup>c</sup> Municipal Health Foundation, Governador Artur de Vasconcelos Street, 3015, Aeroporto, Teresina 64002-530, Brazil.

### **Abstract**

The objective of this study was to determine the *in vitro* bioaccessibility and identity of the phenolic compounds, and total antioxidant activity of two commercial brands of cajuína. The simulated gastrointestinal digestion caused a reduction in the total phenolic content, total flavonoids, and antioxidant activity in both cajuína brands. However, the content of all compounds identified by High performance liquid chromatography after the simulated digestion process increased, in particular ellagic and gallic acids in brand A. Such compounds may be involved in processes of transformation and release of the food matrix, a fact that generated an increase in the bioaccessible fraction. However, there is a reduction in the total bioaccessible fraction and antioxidant activity, indicating that most of the present compounds are unstable, and they underwent degradation after the simulated digestion process. Simulated gastrointestinal digestion affected the profile and content of phenolic compounds, and, as expected, antioxidant activity. It is worth mentioning the increase in the bioaccessible fraction of acids ellagic, gallic, p-coumaric and the epicatechin flavonoid.

### **Practical Application**

The study reports the identification and bioaccessibility of bioactive compounds with antioxidant activity in 'cashew' clarified cashew juice. Disseminating this information can contribute to greater consumption as well as the use of the raw material, in



addition, the bioactive compounds identified in the drink help to prevent the development of diseases.

**Key words:** Phenolic compounds. Simulated gastrointestinal digestion. Flavonoids. *Anacardium occidentale* L.

## 1 Introduction

Tropical regions host a wide variety of fruit species, the consumption of which gained much interest in recent years owing to their high content of bioactive compounds (Da Silva et al., 2014; Rufino et al., 2010). The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is a tropical plant native to Brazil, and is distributed in various tropical regions, including Mozambique, Tanzania, Kenya, Guinea Bissau, Indonesia, Thailand, Vietnam, Nigeria, and India (Paramashivappa et al., 2001).

The cashew pseudofruit, which is known as cashew apple, is a fibrous and juicy fruit. Since the cashew pulp is rich in ascorbic acid (Queiroz et al., 2011), phenolic compounds and minerals, it can be described as a functional food. The cashew has good potential for processing owing to its fleshy pulp, smooth skin, high sugar content, and exotic flavor being widely consumed in the form of juice, nectar, sweets, and jelly among others (Lima et al., 2014; Sivagurunathan et al., 2010).

The clarified juice of cashew apple (cajuína) is defined by the Brazilian legislation (Brasil, 2000), as an undiluted and unfermented drink, arising from the edible part of the apple, obtained through an appropriate technique, and subjected to a physical clarification process. This juice must display certain characteristics: color varying from colorless to yellow translucent; specific flavor being slightly acid and astringent; and specific aroma. The law recommends the use of authorized technology adjuvants in physical clarification, and the product obtained should correspond to the Standards of Identity and Quality (PIQ) fixed for fruit juice.

Several factors contribute to the development of studies that add value to cajuína. Recently, the National Institute of Industrial Property (INPI) awarded the title of Geographical Indication (GI) of Cajuína of Piauí to the Union of Associations, Cooperatives and Producers of Cajuína of Piauí (Procajuína), which will be responsible for administering and supervising the stamp use. The GI is a registration granted to products and services linked to a certain region, it may be an Indication of Source or Appellation of Origin. In the case of Cajuína of Piauí, the GI will be an Indication of

Source, which is related to the geographic name of the region, protecting and ensuring the identity, as well as standardizing a way to expand and control the production process (Sebrae, 2016).

Previous studies have revealed high levels of phenolic compounds in cashew (Bataglioni et al., 2015; Lima et al., 2014), and antioxidant and antimutagenic properties in cajuína (Melo-Cavalcante et al., 2003; Melo-Cavalcante et al., 2008). In humans, the antioxidant effect of phenolic compounds helps protect cells against oxidative damage caused by free radicals, stabilizing or deactivating free radicals before they damage the cells (Pisoschi & Pop, 2015). Thus, these compounds have attracted attention as potential agents for reducing the risk of many diseases related to oxidative stress (Mosele et al., 2016).

However, in functional terms, the determination of the total content of bioactive compounds in foods is not sufficient because their bioaccessibility, i.e., the amount released from the matrix during gastrointestinal digestion and available for absorption in the intestine, is more important. To our knowledge, no study has reported on the bioaccessibility of cajuína. Therefore, the determination of the bioaccessibility of cajuína phenolic compounds is important because its constituents may be bioaccessible and exert beneficial effects. Accordingly, the objective of this study was to identify the phenolic compounds, determine their bioaccessibility, and assess the total antioxidant activity.

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Chemicals**

ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), pancreatin, pepsin, bile extract, ultra-pure phenolic standards (Ferulic, gallic, caffeic, chlorogenic, elagic and pcoumaric acids; quercetin and epicatechin) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Methanol and HPLC grade acetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), Folin–ciocalteu reagent from Vetec Chemistry (Brazil). All chemicals used in the experiments were of analytical reagent grade. Deionized water was obtained from a Milli-Q Plus system (Millipore, Bedford, USA).

## **2.2 Samples**

Two commercial brands of cajuína were analyzed. These were selected because they had Geographical Indication (GI) registration granted by the Brazilian National Institute of Industrial Property. The samples (16 units in each lot) were supplied by the producers located in the state of Piauí, Brazil, in 500-mL packages, in two different lots. The packages were sealed and stored in the Laboratory of Bromatology and Food Biochemistry, Department of Nutrition, Federal University of Piauí, Brazil, at temperature of 4°C until analysis.

## **2.3 Sample Preparation**

Cajuína samples (3 mL) were extracted with methanol (8 mL) in an ultrasonic bath (USC-1400 Unique) for 15 min at room temperature (20 °C). The extract was centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5702) at  $2,000 \times g$  for 15 min and the supernatant was used to determine the profile of individual phenolic compounds, total phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity.

## **2.4 Determination of total phenolic compounds**

The total phenolic content was determined spectrophotometrically (Hewlett-Packard 8452 Spectrophotometer) using the Folin Ciocalteu reagent according to the methodology of Singleton & Rossi (1965). The absorbance was read at 765 nm and the concentration of the phenolic compounds was estimated from standard curve of gallic acid (50, 100, 150, 250, 500, 750, 1,000 mg·mL<sup>-1</sup>). The results were expressed in mg of gallic acid equivalent (GAE) per 100 mL of sample.

## **2.5 Determination of total flavonoids**

The flavonoid content was determined according to the method described by González-Aguilar et al. (2007). Briefly, 1 mL of extract was mixed with 4 mL of deionized water and 300 µL of 5% NaNO<sub>2</sub> for 5 min. After mixing, 300 µL of 10% AlCl<sub>3</sub> (methanolic solution) was added. After standing for 1 min, 2 mL of 1 M NaOH was added. Finally, water was added to a final volume 10 mL. The absorbance of the reaction was determined at 415 nm. The total flavonoid concentration was calculated

using the standard curve of quercetin (20, 30, 40, 50, 100, 200, and 400 mg·mL<sup>-1</sup>) and expressed as mg equivalent of quercetin (QEs) per 100 mL of sample.

## **2.6 Antioxidant activity**

### **2.6.1 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method**

The ABTS method is based on the inactivation of the antioxidant ABTS<sup>+</sup> radical cation, which is measured by the reduction in the absorbance at 734 nm. The method was conducted as described by Re et al. (1999). A solution containing 7 μM ABTS was prepared and mixed in the same proportion with a solution of 2.45 μM potassium persulfate to form the corresponding superoxide anion. The working solution was obtained by diluting 1 mL of this radical-forming mixture with 50 mL of ethanol to obtain an absorbance of 0.70 (± 0.02) at 734 nm. An aliquot (2.9 mL) of this solution was added to 60 μL of extract and incubated at room temperature. The absorbance was read at 734 nm, 7 min after the addition of the extract. The total antioxidant activity was expressed as μmol in 100 mL of trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).

### **2.6.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method**

The total antioxidant activity was analyzed by investigating the capacity to eliminate DPPH free radicals using a modified version of the method of Brand-Williams et al. (1995). A solution of 100 μM DPPH in methanol was prepared and stored under refrigeration until use. The working solution was obtained by diluting the DPPH solution with 80% methanol to an absorbance of approximately 0.80 (± 0.02) at 515 nm. An aliquot (2.9 mL) of this solution was mixed with 100 μL of extract and incubated at room temperature for 30 min in the dark. The absorbance was measured at 515 nm and the total antioxidant activity was expressed as μmol in 100 mL<sup>-1</sup> of TEAC.

## **2.7 In vitro simulated digestion**

The digestions were performed with simulated gastric and intestinal fluids, both of which were prepared in accordance with the procedures implemented by Moura & Canniatti Brazaca (2006). The simulated gastrointestinal digestion was performed with pepsin (0.032 g) solubilized in 3 mL of 0.1 M HCl for the gastric phase, and pancreatin (0.036 g) and bile salts (0.220 g) dissolved in 5 mL of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> for the intestinal phase. The sample (20 mL) was added 20 mL of 0.01 M HCl and the pH adjusted 2 using 2 M HCl. After adjusting the pH, 3.0 mL of pepsin solution was added and the

sample stirred in a water bath at 37 °C for 2 h (Tecnal TE820) to simulate the digestion of food in the stomach. Then, the solution was cooled to 20 °C and titrated with 0.5 M NaOH 0.5 to pH of 7.5 to simulate the pH of the small intestine. Subsequently, 5.0 mL of pancreatin solution and bile salts was added, followed by agitation in a water bath at 37 °C for 2 h to simulate the digestion of food in the intestine. Finally, the sample was centrifuged at 6,800 × g for 15 min and the supernatant stored at -80 °C until analysis.

## **2.8 Bioaccessibility**

After the *in vitro* digestion procedure, the supernatant was analyzed for total phenolics, total flavonoids, and antioxidant activity as described previously. For the identification of phenolic compounds by HPLC-UV, the supernatant was diluted in the mobile phase (1:2 v/v) and filtered through a 0.45-µm membrane before injection. The bioaccessibility (%) was defined as the content of compound released during the simulated digestion process compared to the content of the compound in the sample, and the value was calculated according to the formula below (Leufroy et al., 2012).

### **Equation 1.**

$$\text{Bioaccessibility (\%)} = \left( \frac{\text{Content of the compound released in the simulated digestion}}{\text{Contents of the compound in the sample}} \right) \times 100$$

## **2.9 Identification of phenolic compounds by HPLC-UV**

The identification and quantification of phenolic compounds was performed according to an adapted method of Souza et al. (2018). The phenolic compounds were analyzed using a LC-20 AT high-performance liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan). The separation was performed using a Shimadzu GVP-ODS pre-column (10 mm × 4.6 mm) in line with a Shim-pack VP-ODS column (150 × 4.6 mm i.d., 5-µm particle size) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) equipped with a UV-Vis SPD-20A detector. The flow rate was maintained at 0.7 mL·min<sup>-1</sup> and the column temperature was maintained at 40 °C, with an injection volume of 10 µL. The gradient of the mobile phase was composed by (A) methanol with 1% acetic acid and (B) 1% acetic acid: from 0–1 min, 10% A; 1–5 min 15% A; 5–10 min, 20% A; 10–15 min, 25% A; 15–25 min, 30 % A; 25–30 min, 70 % A; 30–40 min, 80 % A; 40–50 min, 10 % A. The total run time was 50 min. The compounds were detected at 280 (i.e., gallic acid,

epicatechin and ellagic acid), 320 (i.e., caffeic, p-coumaric, chlorogenic, and ferulic acids), and 360 nm (i.e., quercetin). The peaks were identified by comparison with the retention time of standards, and the quantification of the compounds was based on the areas of the respective peaks detected using the LabSolutions acquisition software version 5.57 SP1 Copyright (Shimadzu Corporation). The column calibration was performed by injecting the standards in triplicate at nine different concentrations (i.e., 0.014; 0.056; 0.225; 0.45; 7.81; 15.62; 31.25; 62.5, and 120.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The levels of phenolic compounds were expressed as  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### **2.10 Statistical analysis**

The Statistical Package for Social Science (SPSS) software, version 22, was used for the statistical analysis of the data. The results are presented as means of three replicates and their respective standard deviations. To verify a significant difference between the averages analyzed, the Student's *t*-test was used, with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) and a confidence interval of 95% (Siegel, 1995).

## **3 Results and Discussion**

The results of total phenolics and total flavonoids are shown in Table 1.

Brand A contains a significantly higher content of total phenolics before and after the simulated digestion ( $187.43 \pm 8.1$ ;  $105.25 \pm 6.61 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ , respectively) than brand B does ( $105.13 \pm 5.14$ ;  $53.63 \pm 8.75 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ , respectively). Moreover, brand A displays a higher bioaccessibility (56.15%) than brand B does (51.01%). On the other hand, there was no significant difference in the total flavonoid content between brand A ( $13.77 \pm 1.09$ ;  $11.57 \pm 1.07 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) and B ( $14.37 \pm 1.13$ ;  $12.81 \pm 0.28 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) before and after *in vitro* digestion, respectively, nor between treatments for each brand, i.e., the levels of these compounds remained stable during the *in vitro* digestion, displaying a high bioaccessibility (84.02 and 89.14%) for brands A and B, respectively.

In a similar study on cashew juice, Lima et al. (2014) obtained  $338.60 \pm 10.68$  and  $130.60 \pm 3.02 \text{ mg GAE}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  total phenolics before and after simulated gastrointestinal digestion, respectively, thus obtaining a bioaccessible fraction of 39%. Although the total phenolic content in the present study was lower than that in the previous study, higher bioaccessibility (56.15% for brand A and 51.01% for brand B)

was measured. Therefore, although the clarification and pasteurization of cajuína reduce the phenolic content, they make the phenolic compounds highly bioaccessible.

**Table 1** - Determination of total phenolics and flavonoids in two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína' before and after simulated gastrointestinal digestion.

Compounds	Samples	Before digestion	After digestion	Bioaccessible fraction (%)
		(mg·100 mL <sup>-1</sup> ) Mean ± SD	(mg·100 mL <sup>-1</sup> ) Mean ± SD	
Total phenolics	A	187.43 ± 8.1 <sup>a</sup> A	105.25 ± 6.61 <sup>b</sup> A	56.15
	B	105.13 ± 5.14 <sup>a</sup> B	53.63 ± 8.75 <sup>b</sup> B	51.01
	Cashew apple juice (Lima et al., 2014)	338.60 ± 10.68	130.60 ± 3.02	38.57
Total flavonoids	A	13.77 ± 1.09 <sup>a</sup> A	11.57 ± 1.07 <sup>a</sup> A	84.02
	B	14.37 ± 1.13 <sup>a</sup> A	12.81 ± 0.28 <sup>a</sup> A	89.14

Mean of three replicates. Equal lowercase letters between before and after digestion and equal uppercase letters between the A and B brands represent not significant differences between the means according to the Student's *t*-test, at a significance level of 5% ( $p > 0.05$ ) and 95% confidence interval. Total phenolics: results expressed in mg GAE·100 mL<sup>-1</sup> (Equivalent to Gallic Acid). Flavonoids: Results expressed in mg QE·100 mL<sup>-1</sup> (equivalent to quercetin). SD: standard deviation.

It is worth emphasizing that the reagent used for the determination of total phenolics (Folin Ciocalteu) also reacts with reducing compounds such as vitamin C and sugars, which are present in the sample studied. Thus, the reduction in the total phenolic content due exclusively to the digestive process might be less than what was actually determined because the presence of reducing agents could lead to overestimation of the total phenolic content.

The antioxidant activity results obtained with the ABTS and DPPH methods are shown in Table 2.

High antioxidant activity was measured, especially in brand A cajuína. With the DPPH method, average values of  $1,920.63 \pm 77.85$  and  $1,018.68 \pm 11.05$   $\mu\text{mol TEAC}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  before and after digestion, respectively, were obtained. Similar results were obtained for the same brand using the ABTS method ( $1,911.00 \pm 71.57$ ;  $881.49 \pm 88.74$   $\mu\text{mol TEAC}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  before and after digestion, respectively). The

bioaccessible fraction obtained with the DPPH method (53.03%) was the highest in brand A, whereas that obtained with the ABTS method (46.12%) was the highest in brand B.

**Table 2** - Determination of the total antioxidant activity of two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína' before and after simulated gastrointestinal digestion.

Compounds	Samples	Before digestion	After digestion	Bioaccessible fraction (%)
		$\mu\text{mol TEAC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ Mean $\pm$ SD	$\mu\text{mol TEAC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ Mean $\pm$ SD	
DPPH method	A	1,920.63 $\pm$ 77.85 <sup>a</sup> A	1,018.68 $\pm$ 11.05 <sup>b</sup> A	53.03
	B	919.27 $\pm$ 52.39 <sup>a</sup> B	376.55 $\pm$ 55.86 <sup>b</sup> B	40.96
ABTS method	A	1,911.00 $\pm$ 71.57 <sup>a</sup> A	881.49 $\pm$ 88.74 <sup>b</sup> A	46.12
	B	1,018.75 $\pm$ 163.83 <sup>a</sup> B	509.19 $\pm$ 165.41 <sup>b</sup> B	49.98

Mean of three replicates. Equal lowercase letters between before and after digestion and equal uppercase letters between the A and B brands represent not significant differences between the means according to the Student's *t*-test, at a significance level of 5% ( $p > 0.05$ ) and 95% confidence interval. TEAC: trolox equivalent antioxidant activity. SD: standard deviation.

Lima et al. (2014) obtained similar antioxidant activity values when they analyzed cashew juice using the ABTS method, i.e., 1,810.00  $\pm$  1.92 and 480.00  $\mu\text{mol TEAC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  before and after digestion, respectively. However, the cashew juice studied by these authors had a bioaccessible fraction (27%) lower than that obtained in this study (46.12% and 49.98%, brands A and B, respectively). This indicates that, despite processing, cajuína is an excellent option for cashew consumption.

The results of the identification and quantification of phenolic compounds in cajuína before and after *in vitro* gastrointestinal digestion are summarized in Table 3. Three phenolic acids (ellagic, gallic, and *p*-coumaric) and one flavonoid (epicatechin) were identified. Ellagic acid was the most abundant, especially in brand A (1,062.81  $\pm$  5.7  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). After simulated gastrointestinal digestion, the content of ellagic acid increased in both brands, especially in brand A (1,898.14  $\pm$  31.42  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), which presented a bioaccessible fraction of 178.59%.

The fruits of the Anacardiaceae family are rich in ellagitannins, which increase after *in vitro* digestion likely because of hydrolysis, releasing free ellagic acid. Previous studies simulating *in vitro* digestion showed that, generally, ellagitannins are fairly



stable under the physiological conditions of the stomach. According to a previous study, the acidity (pH 1.8–2.0) and enzymes present in the stomach did not cause hydrolysis of ellagitannins and no degradation was observed (Tomás-Barberán et al., 2009). However, under intestinal physiological conditions, ellagitannins were hydrolyzed, freeing ellagic acid, likely because of the pH and effect of pancreatic enzymes and bile salts (Verotta et al., 2018).

Several studies have shown that ellagic acid has biological properties, including anti-inflammatory, antimutagenic, and anticarcinogenic activity, reducing the risk of cardiovascular diseases, atherosclerosis, and dyslipidemic disorders and stimulating wound healing and skin elasticity (Firdaus et al., 2018; Tomás Barberán et al., 2017).

Similarly, gallic acid content increased significantly after the simulated digestion in both brands, particularly in brand A ( $50.54 \pm 2.30$  and  $59.18 \pm 2.95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  before and after digestion, respectively). Several biological properties are associated with gallic acid, such as antioxidant and anti-inflammatory activity, anti-carcinogenic activity, and antihyperglycemic effects such as lowering glucose and glycosylated hemoglobin levels and increasing insulin levels in experimental diabetes models. This suggests the possibility of using gallic acid as a complementary therapy to hypoglycemic drugs (Oliveira et al., 2016; Pereira et al., 2018.).

Table 3 shows a significant variation between the levels of epicatechin in brand A before and after simulated digestion ( $14.54 \pm 1.0$  and  $32.39 \pm 0.83 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), presenting a bioaccessibility of 222.75%. However, there was no significant difference between the levels of epicatechin before and after the *in vitro* digestion in brand B ( $12.22 \pm 0.05$  and  $14.15 \pm 0.33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), which also presented a lower bioaccessibility than brand A did. This difference between brands can be explained by the different processing procedure of cashew juice, pasteurization time, and differences between the raw materials, which are affected by several factors such as harvest time and climatic conditions.

Among the compounds identified, *p*-coumaric acid was present in the least amount, i.e.,  $2.99 \pm 0.05$  and  $6.56 \pm 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  before and after digestion, respectively, for brand A, and  $0.72 \pm 0.01$  and  $0.82 \pm 0.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  before and after digestion, respectively, for brand B. *p*-Coumaric acid has been associated with chemoprotective and antioxidant properties, antimicrobial activity, cardiovascular diseases antagonist, and anticancer activity (Kannan et al., 2013; Roy & Prince, 2013; Sharma et al., 2017).

**Table 3** - Content of phenolic compounds in two brands of clarified cashew apple juice 'cajuína' before and after simulated gastrointestinal digestion as determined by HPLC-UV.

Compounds	Samples	Before digestion	After digestion	Bioaccessible fraction (%)
		( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Mean $\pm$ SD	( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Mean $\pm$ SD	
Ellagic Acid	A	1062.81 $\pm$ 5.70 <sup>aA</sup>	1898.14 $\pm$ 31.42 <sup>bA</sup>	178.59
	B	390.90 $\pm$ 0.18 <sup>aB</sup>	683.55 $\pm$ 2.28 <sup>bB</sup>	174.85
Gallic acid	A	50.54 $\pm$ 2.30 <sup>aA</sup>	59.18 $\pm$ 2.95 <sup>bA</sup>	117.02
	B	34.22 $\pm$ 3.14 <sup>aB</sup>	41.69 $\pm$ 0.53 <sup>bB</sup>	121.63
<i>p</i> -Coumaric acid	A	2.99 $\pm$ 0.05 <sup>aA</sup>	6.56 $\pm$ 0.10 <sup>bA</sup>	224.13
	B	0.72 $\pm$ 0.01 <sup>aB</sup>	0.82 $\pm$ 0.00 <sup>bB</sup>	113.88
Epicatechin	A	14.54 $\pm$ 1.00 <sup>aA</sup>	32.39 $\pm$ 0.83 <sup>bA</sup>	222.75
	B	12.22 $\pm$ 0.05 <sup>aA</sup>	14.15 $\pm$ 0.33 <sup>aB</sup>	115.57

Mean of three replicates. Equal lowercase letters between before and after digestion and equal uppercase letters between the A and B brands represent not significant differences between the means according to the Student's *t*-test, at a significance level of 5% ( $p > 0.05$ ) and 95% confidence interval. SD: standard deviation.

In a previous study on cashew apple, Bataglioni et al. (2015) found that gallic acid and *p*-coumaric acid were present in the amount of  $148.53 \pm 1.56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $2.46 \pm 0.35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively. Thus, it can be inferred that cajuína, when ingested regularly, may promote health benefits owing to the high content of bioactive compounds and antioxidant activity.

The observed mismatch between the bioaccessible fractions of the total phenolic content and antioxidant activity with the bioaccessible fraction of the compounds identified by HPLC indicates that these compounds behave differently when exposed to the conditions of digestion. The effects of flavonoids on intestinal digestion have been demonstrated in previous studies (Bouayed et al., 2011). While compounds such as ellagitannins, among others, may undergo hydrolysis, releasing free ellagic acid or other phenolic acids. Thus, it can be inferred that most of the phenolics present in cashew are unstable, causing a reduction in total phenolic content and antioxidant activity. However, it is noted that the four compounds identified may be involved in

transformation and release processes which may have caused an increase in the bioaccessible fraction, thus, the regular consumption of clarified cashew apple juice (cajuína) provides antioxidant compounds that are important for health.

#### **4 Conclusion**

We conclude that cajuína is the source of phenolic compounds such as ellagic acid, epicatechin, p-coumaric acid, and gallic acid and has high antioxidant activity.

#### **Acknowledgments**

To the CNPq-CAPES, Edital Casadinho-PROCAD, Process 55223 / 2011-9 and Process 165188 / 2014-6 for the financial assistance. To CNPq, Edital Universal 01/2016, Process 431314 / 2016-0 for financial assistance. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

#### **References**

- Bataglion, G. A., Silva, F. M. A., Eberlin, M. N., & Koolen, H. H. F. (2015). Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 180(1), 280–287.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, (1), 14-21.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2000). *Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000*. Art.1º - Aprovar o Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta conforme consta do Anexo I desta Instrução Normativa e Art. 2º - Regulamento técnico de

identidade e qualidade para caju clarificado ou cajuína conforme consta do Anexo II desta Instrução Normativa. Brasília, DF.

Da Silva, N. A., Rodrigues, E., Mercadante, A. Z., & Rosso, V. V. (2014). Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22), 5072–5084.

Firdaus, F., Zafeer, M. F., Anis, E., Ahmad, M., & Afzal, M. (2018). Ellagic acid attenuates arsenic induced neuro-inflammation and mitochondrial dysfunction associated apoptosis. *Toxicology Reports*, 5(1), 411–417.

González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72(3), 197–202.

Kannan, R. R. R., Thangaradjou, R. A. T., & Anantharaman, P. (2013). Phytochemical constituents, antioxidant properties and p-coumaric acid analysis in some seagrasses. *Food Research International*, 54(1), 1229–1236.

Leufroy, A., Noël, L., Beauchemin, D., & Guérin, T. (2012). Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood. *Food Chemistry*, 135(2), 623–633.

Lima, A. C. S. de., Soares, D. J., Silva, M. R. S., Figueiredo, R. W de., Sousa, P. H. M. de., & Menezes, E. de A. (2014). In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 161(15), 142–147.

Melo-Cavalcante, A. A., Rübensam, G., Picada, J. N., Silva, E. G., Moreira, F. J. C., & Henriques, J. A. P. (2003). Mutagenic evaluation, antioxidant potential and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuína. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41(5), 360–369.

Melo-Cavalcante, A. A., Picada, J. N., Rubensam, G., Henriques, J. A. P. (2008). Antimutagenic activity of cashew apple (*Anacardium occidentale* Sapindales, Anacardiaceae) fresh juice and processed juice (cajuína) against methyl methanesulfonate, 4-nitroquinoline N-oxide and benzo[a]pyrene. *Genetics and Molecular Biology*, 31(3), 759–766.

Moura, N. C., & Canniatti-Brazaca, S. G. (2006). Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 270–276.

Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2016). Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and colonic fermentation. *Food Chemistry*, 201(15), 120–130.

Oliveira, L., Thomé, G., Lopes, T., Reichert, K., Oliveira, S., Pereira, A., Balsissareli, J., Krewer, C., Morsch, V., Schetinger, M., & Spanevello, R. (2016). Effects of gallic acid on delta aminolevulinic dehydratase activity in biochemical, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84(1), 1201–1299.

Paramashivappa, R., Kumar, P. P., Vithayathil, P. J., & Rao, A. S. (2001). Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49(5), 2548–2551.

Pereira, A. S., Oliveiraa, L. S., Lopes, T. F., Baldissarelli, J., Palma, T. V., Soares, M. S. P., Morscha, S. V. M., Melazzo, C., de Andradea, M. R. C. S., & Spanevelloc, R. M. (2018). Effect of gallic acid on purinergic signaling in lymphocytes, platelets, and serum of diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101(1), 30–36.

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97(5), 55–74.

Queiroz, C., Lopes, M. L. M., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2011). Changes in bioactive compounds and antioxidant capacity of fresh-cut cashew apple. *Food Research International*, 44(5), 1459–1462.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Riceevans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9)1231–1237.

Roy, A. J., & Prince, P. S. M. (2013). Preventive effects of p-coumaric acid on cardiac hypertrophy and alterations in electrocardiogram, lipids, and lipoproteins in experimentally induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology*, 60(1), 348–354.

Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996–1002.

Sharma, S. H., Chellappan, D. R., Chinnaswamy, P., & Nagarajan, S. (2017). Protective effect of p-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94(1), 577–588.

Sebrae. (2016). Relatório de Gestão do exercício de 2016 apresentado aos órgãos de controle interno e externo e à sociedade como prestação de contas anual a que esta Unidade está obrigada nos termos do parágrafo único do art. 70 da Constituição Federal, elaborado de acordo com as disposições da IN TCU nº 63/2010, da DN TCU 154/2016, da Portaria TCU 59/2017. <  
[https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/PI/Anexos/RELAT%C3%93RIO\\_GEST%C3%83O\\_2016\\_SEBRAE\\_PIAU%C3%8D.pdf](https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/PI/Anexos/RELAT%C3%93RIO_GEST%C3%83O_2016_SEBRAE_PIAU%C3%8D.pdf)> Acesso em 10 abr, 2018.

Siegel, S., & John Castellan Jr, N. (1998). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences* (2. ed.) New York: McGraw-Hill.

Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(1), 144–158.

Sivagurunathan, P., Sivasankari, S., & Muthukkaruppan, S. M. (2010). Characterisation of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) fruits collected from Ariyalur District. *Bioscience Research*, 2(1), 101–107.

Souza, M. M., Silva, B., Costa, C. S. B., & Badiale-Furlong, E. (2018). Free phenolic compounds extraction from Brazilian halophytes, soybean and rice bran by ultrasound-assisted and orbital shaker methods. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 3363-3372.

Tomás-Barberan, F. A., Espin, J. C., & Garcia-Conesa, M. (2009). Bioavailability and metabolism of ellagic acid and ellagitannins. *Chemistry and Biology of Ellagitannins*, 281-304.

Tomás-Barberán, F. A., González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M. A., Selma, M. V., García-Conesa, M. T., & Espín, J. C. (2017). Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(1), 366–374.

Verotta, L., Panzella, L., Antenuccia, S., Calvenzani, V., Tomayci, F., Petronic, K., Caneva, E., & Napolitano, A. (2018). Fermented pomegranate wastes as sustainable source of ellagic acid: Antioxidant properties, anti-inflammatory action, and controlled release under simulated digestion conditions. *Food Chemistry*, 246(1)129–136.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

PORTO-LUZ, R. G. L., SOARES, A. K. de O., SILVA, B., ARAÚJO, M. A. M., MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. **Validação de metodologia analítica para identificação de compostos fenólicos.**



## Padronização da metodologia analítica para identificação de compostos fenólicos

Rayssa Gabriela Lima Porto Luz<sup>1</sup>, Ana Karine de Oliveira Soares<sup>1</sup>, Bibiana Da Silva<sup>2</sup>,  
Marcos Antônio da Mota Araújo<sup>3</sup>, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Teresina, Piauí – Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<sup>3</sup>Fundação Municipal de Saúde, Departamento de Estatística, Teresina, Piauí, Brasil.

**RESUMO** A validação de um método analítico é fundamental para implementar um sistema de controle de qualidade em laboratórios analíticos. Os métodos analíticos desenvolvidos devem originar resultados que sejam confiáveis. Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo, desenvolver uma metodologia para a identificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV). O ensaio utilizou coluna Shim-pack VP-ODS (150 x 4,6 mm d.i., tamanho de partícula de 5 µm) com detector ultravioleta a 280 e 320 nm e fase móvel constituída de metanol/ácido acético 1% e ácido acético 1 %, com fluxo 0,7 mL/min método por gradiente. Os parâmetros utilizados no processo de validação foram: linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação. Todos os resultados se mostraram satisfatórios, o método demonstrou-se adequado para a quantificação de compostos fenólicos, considerando os parâmetros especificados pela ANVISA-Brasil Resolução 899/2003.

**Palavras-chave:** Validação, HPLC, Compostos fenólicos, cajuína.

**ABSTRACT** The validation of an analytical method is fundamental to implement a quality control system in analytical laboratories. Analytical methods developed should yield results that are reliable. Thus, the objective of this study was the development of a methodology for the identification of phenolic compounds by high performance liquid chromatography (HPLC-UV). The assay used a Shim-pack VP-ODS (150 x 4.6 mm di, particle size 5 µm) with ultraviolet detector at 280 and 320 nm and mobile phase consisting of 1% methanol / acetic acid and acetic acid 1 %, with flow 0.7 mL / min method by gradient. The parameters used in the validation process were: linearity, precision, limits of detection and quantification. All the results were satisfactory, the

method proved adequate for the quantification of phenolic compounds, considering the parameters specified by ANVISA-Brasil Resolution 899/2003.

**Key words:** Validation, HPLC, Phenolic compounds, cashew.

## 1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos compreendem a maior classe de fitoquímicos presentes nos domínios vegetais. São compostos bioativos e podem ser encontrados em sua forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas. São considerados produtos do metabolismo secundário de plantas, e o seu conteúdo nas frutas está fortemente relacionado ao grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e às condições de armazenamento. Estão associados com o sistema de defesa das plantas contra patógenos e radiação UV, além de serem responsáveis pelo aroma, cor e adstringência em vários alimentos (MANACH et al., 2004; PELEG et al., 1988; YORDI et al., 2012).

Os compostos fenólicos apresentam estruturas muito diversas e, portanto, também são suscetíveis de apresentar diferentes propriedades funcionais. Sendo assim, é indispensável verificar a composição destes compostos nos alimentos, realizando estudos *in vitro* antes da atribuição das respectivas propriedades.

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. Nesta ordem de ideias, o desenvolvimento e a validação de uma metodologia para a identificação de compostos fenólicos nos alimentos deve ser parte integrante da caracterização e do controle de qualidade dos mesmos (ABU-REIDAH *et al.*, 2013).

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método, neste estudo foi verificado a linearidade, precisão (repetibilidade), limite de detecção e limite de quantificação (RIBANI et al., 2004).

A linearidade de um método corresponde à capacidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ARAGÃO et al., 2009).

De acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA, o limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a

estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. De acordo com a mesma resolução, o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado por meio do ruído, neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaio independentes de uma série de medições repetidas a uma mesma amostra, a amostras semelhantes ou a uma solução padrão, em condições definidas. É normalmente obtida usando o valor do coeficiente de variação (CV), e pode ser avaliada em circunstâncias específicas de medição, como a repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade (DUTRA et al., 2010; ICH, 2003; INMETRO, 2003; ISO, 1993). No presente estudo foi realizada a repetitividade, que avalia a dispersão dos resultados de medições sucessivas usando o mesmo método sob as mesmas condições de análise.

Dentro deste contexto, objetivou-se com o presente estudo, desenvolver e validar uma metodologia analítica para identificação de compostos fenólicos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector UV-visível (HPLC-UV).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes**

Padrões fenólicos ultra-puros (ácidos ferúlico, gálico, cafeico, clorogênico, elágico e *p*-cumárico; quercetina e epicatequina) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). Metanol e ácido acético grau HPLC foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes utilizados nas análises foram grau analítico. A água desionizada foi obtida a partir de um sistema Mille-Q Plus (Millipore, Bedford, EUA).

### **2.2 Soluções contendo os padrões**

Pesou-se 0,01 g de cada padrão fenólico e diluiu-se em 10 mL de metanol puro, exceto o ácido elágico que foi diluído em solução metanol/NaOH 0,05 M, resultando em 8 soluções de 1000 ppm cada. A partir dessas soluções, preparou-se uma mistura contendo os 8 padrões numa concentração inicial de 125 ppm e posteriormente 1,25 ppm. Estas soluções foram utilizadas para realização dos testes e diluídas de acordo

com os parâmetros a serem validados. Para identificar qual pico correspondia a cada padrão, realizou-se o procedimento de contaminação à mistura elaborada.

### 2.3 Condições cromatográficas

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-20 AT (Shimadzu Corporation, Japão). A separação foi realizada em coluna Shim-pack VP-ODS (150 × 4,6 mm d.i., tamanho de partícula de 5 µm) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) e pré-coluna Shimadzu GVP-ODS (10 mm × 4,6 mm) equipado com detector de UV-Vis SPD-20A. A taxa de fluxo foi mantida em 0,7 mL min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna foi mantida a 40 ° C, com volume de injeção de 10 µL. O gradiente de fase móvel foi composto por (A) metanol com ácido acético 1% e (B) ácido acético 1 %, variando de 0-1 min, 10% A; 1-5 min 15% A; 5-10 min, 20% A; 10 -15 min, 25% A; 15-25 min, 30 % A; 25-30 min, 70 % A; 30-40 min, 80 % A; 40-50 min, 10 % A. O tempo total de execução foi de 50 min. Os compostos foram detectados em 280 (ácido gálico, epicatequina e ácido elágico), em 320 (ácidos caféico, *p*-cumárico, clorogênico e ferúlico) e 360 nm (quercetina).

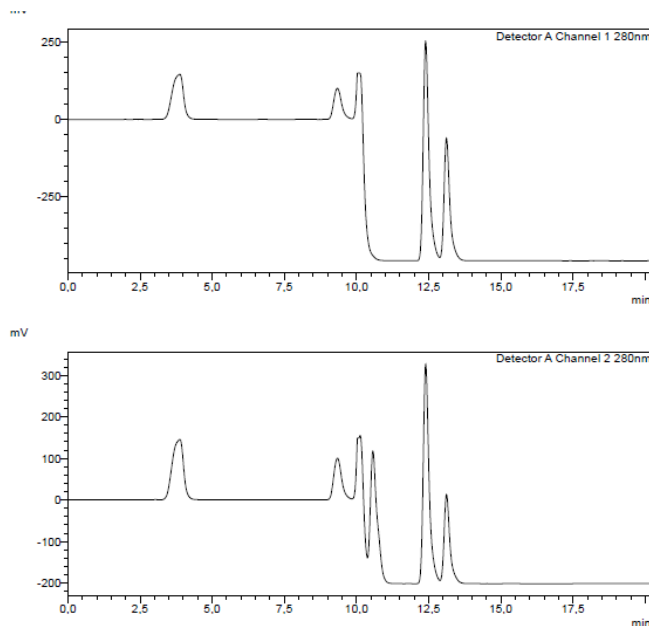
### 2.4 Validação do método analítico

Os parâmetros de validação avaliados foram, linearidade, precisão, e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), segundo Ribani et al. (2004). Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas de cada padrão através da injeção em triplicata das suas respectivas soluções em sete concentrações diferentes, posteriormente, foram realizados os cálculos da média das áreas e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), para cada composto analisado em todas as curvas de calibração. A precisão do método foi verificada pela repetibilidade da mesma amostra analisada em nove replicatas de uma concentração intermediária (31,25 µg.µL<sup>-1</sup>) com valores expressos através da média e desvio padrão relativo (coeficiente de variação). Para o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dividiu-se o coeficiente linear pelo coeficiente angular da curva analítica, para cada um dos padrões. Estes resultados foram multiplicados por 3 para LD e por 10 para LQ, e os resultados expressos em termos de concentração (µg.µL<sup>-1</sup>) (RIBANI et al., 2004).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a otimização desta metodologia, primeiramente foram efetuados ajustes de gradiente, tendo como base a metodologia descrita por Souza et al. (2018). Neste âmbito, foram testados diferentes tempos de eluição e diferentes gradientes. A Figura 1 apresenta o cromatograma obtido em testes iniciais.

**Figura 1** Cromatograma de separação dos padrões fenólicos em testes iniciais.

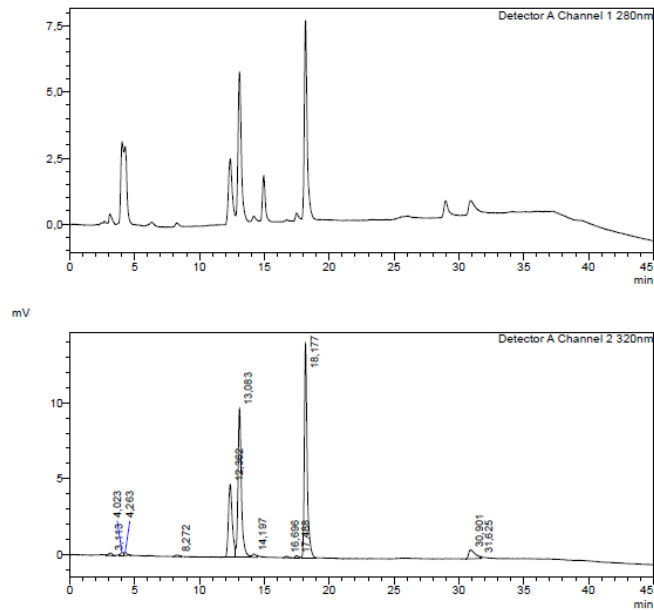


Fonte: Dados da pesquisa

O grande objetivo destes ajustes era a separação e aumento da resolução dos picos dos compostos testados. Verificou-se que acidificando a fase móvel contendo metanol com ácido acético a 1% houve uma melhora na resolução dos picos (Figura 2).

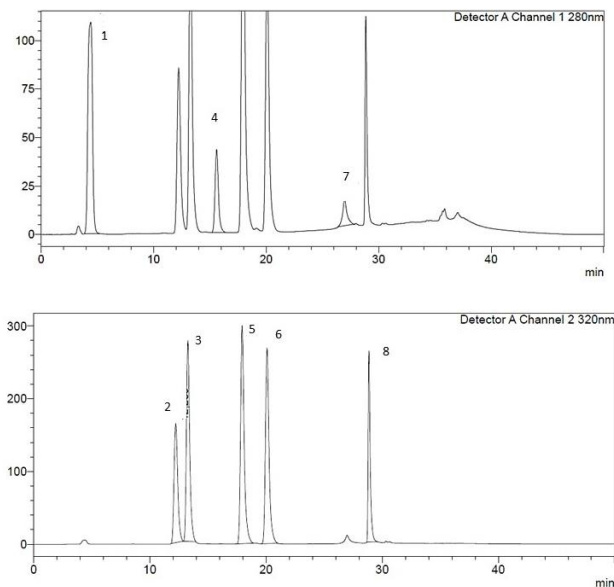
Quanto aos comprimentos de onda, segundo a literatura, os mais utilizados para a leitura deste tipo de compostos são: 280, 310, 340, 380, 450 e 510 nm (Yao et al., 2004). Após testes com estes comprimentos de onda, verificou-se que a absorção máxima e um menor ruído foram obtidos em 280 e 320 nm.

**Figura 2** Cromatograma de separação dos padrões fenólicos após acidificação da fase móvel.



Surge assim o gradiente que foi descrito na metodologia deste trabalho e que permitiu a separação de todos os compostos em estudo em 50 minutos de corrida. A Figura 3 é um dos bons exemplos obtidos com as alterações realizadas. Salienta-se a já conseguida a separação de todos os compostos.

**Figura 3** Cromatogramas de separação dos padrões fenólicos em 280 e 320 nm.



280 nm (1- ácido gálico, 4 – epicatequina, 7- ácido elágico); 320 nm (2- ácido clorogênico, 3 – ácido caféico, 5 – p-cumárico, 6- ferúlico 8 – quercetina).

No processo de validação, a repetibilidade faz-se necessário para saber se o equipamento, nas mesmas condições e com as mesmas amostras, apresenta valores concordantes. Observa-se na Tabela 1 que o sistema é preciso (repetibilidade) para todos os padrões analisados pois de acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA,

o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% para o coeficiente de variação.

**Tabela 1** Avaliação da precisão (repetibilidade) do método para os padrões fenólicos.

	<b>Média*</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>CV** (%)</b>
<i>p</i> -Coumárico	6412088	35737,23	0,55
Clorogênico	3571287	102582,30	2,87
Cafeico	5388374	133311,70	2,47
Ferúlico	5684140	67309,37	1,18
Elágico	373943	4356,92	1,16
Gálico	3063108	63552,79	2,07
Quercetina	3257638	74743,36	2,29
Epicatequina	881181	9073,25	1,02

\*média das áreas dos picos numa concentração de 31,25 µg/mL \*\*CV: Coeficiente de variação

Na avaliação da linearidade, procedeu-se à regressão linear de cada composto, a partir de sete pontos. Segundo critério da RDC 899/2003, o coeficiente de correlação (*r*) deve ser no mínimo igual a 0,99. Na Tabela 2 são apresentados os valores detalhados para os padrões, verificando-se que todos os critérios aplicados estão em conformidade.

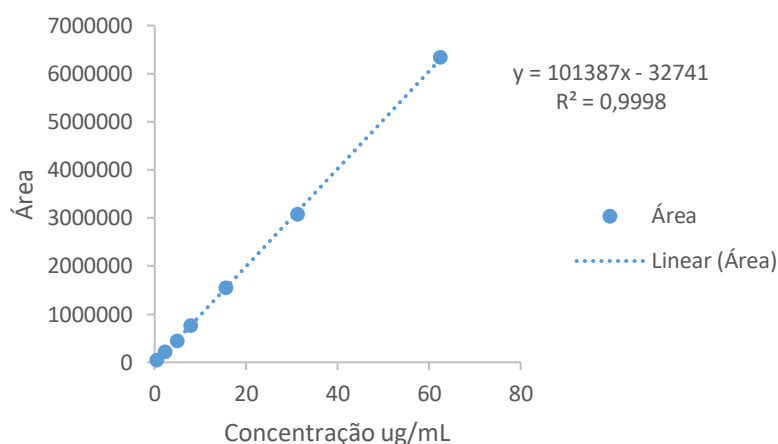
**Tabela 2** Parâmetros das curvas de calibração dos compostos avaliados (µg. mL<sup>-1</sup>).  
Verificação da linearidade para validação de método analítico HPLC-UV.

<b>Padrão Fenólico</b>	<b>Equação de regressão <sup>a</sup></b>	<b>Coefficiente de correlação</b>
<i>p</i> -Coumárico	$y = 209255x - 9390,3$	0,9999
Clorogênico	$y = 109573x + 24929$	0,9989
Cafeico	$y = 171247x + 23688$	0,9998
Ferúlico	$y = 187786x - 21173$	0,9998
Elágico	$y = 14948x - 72606$	0,9983
Gálico	$y = 101387x - 32741$	0,9998
Quercetina	$y = 114407x - 142200$	0,9959
Epicatequina	$y = 27533x + 5307,4$	0,9994

<sup>a</sup> *y* expressa a resposta de detecção (área de pico mV); *x* concentração de composto fenólico (em µg.µL<sup>-1</sup>).

As curvas obtidas demonstraram que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, obtida correlacionando a área do cromatograma. A Figura 4 apresenta como exemplo a curva de calibração para o padrão fenólico ácido gálico.

**Figura 4** Determinação gráfica da curva de linearidade através da curva analítica clássica para o padrão ácido gálico.



A determinação dos limites descritos na Tabela 3 foi realizada recorrendo às fórmulas descritas para este fim conforme descrito anteriormente.

**Tabela 3** Verificação dos limites de detecção e quantificação (LD e LQ) para validação de método analítico em HPLC-UV.

<b>Padrão Fenólico</b>	<b>LOD (µg.µL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (µg.µL<sup>-1</sup>)</b>
p-Coumárico	0,004	0,014
Clorogênico	0,018	0,056
Cafeico	0,004	0,014
Ferúlico	0,018	0,056
Elágico	1,660	5,000
Gálico	0,150	0,450
Quercetina	0,075	0,225
Epicatequina	0,75	2,25

LOD (limite detecção); LOQ (Limite de quantificação).

Estes resultados revelam um grande interesse para a avaliação e a validação da metodologia em causa e para que seja possível confirmar a presença ou a ausência de um dado composto fenólico presente nas amostras a serem analisadas.



No final da avaliação dos parâmetros descritos, o sistema demonstrou ser reprodutível e linear com os limites de detecção e quantificação delimitados para os respectivos padrões fenólicos no sistema HPLC-UV disponível.

#### 4 CONCLUSÃO

A validação do método mostrou-se eficaz demonstrando ser linear e preciso, com os respectivos limites de detecção e quantificação determinados. Com o protocolo proposto, permitiu-se a identificação dos oito padrões em 50 minutos de corrida, os coeficientes de correlação ficaram dentro do esperado. A repetibilidade do método permaneceu dentro dos limites aceitáveis, permitindo que este protocolo de identificação e quantificação seja utilizado de forma eficiente para a caracterização de compostos fenólicos na cajuína.

#### REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI–QTOF–MS). **Food Research International**, v. 51, p. 54-362, 2013.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF: ANVISA, 29 de Maio 2003.

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M. Determinação de Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Isocrática Durante Estacionamento da Erva-Mate. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 119-123, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION; **Statistics-Vocabulary and Symbols- Part 1: Probability and General Statistical Terms**, ISO 3534-1, 1993.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

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

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H., JARDIM, I. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SOUZA, M. M.; SILVA, B.; COSTA, C, S, B.; BADIALE-FURLONG, E. Free phenolic compounds extraction from Brazilian halophytes, soybean and rice bran by ultrasound-assisted and orbital shaker methods. **An Acad Bras Cienc**, v. 90, p. 3363-3372, 2018.

YAO, L.; JIANG, Y.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; LIU, X.; DUAN, J., RAYMONT, K.; LISLE, A.; XU, Y. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. **Food Chemistry**, v. 84, p. 253-263, 2004.

YORDI, E. G. et al. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In: BOUAYED, J.; BOHN, T. **Well-Being and Health**. Ed Nutrition, 2012, cap. 2, p. 23-48.

## DISCUSSÃO GERAL

Para o controle de qualidade da cajuína analisada, foi realizada a caracterização físico-química. A marca A apresentou elevado teor de vitamina C ( $340,27 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ) e apenas o valor de acidez da marca B não estava de acordo ao recomendado pela legislação brasileira, que estabelece valores mínimos de 0,25% de acidez na forma de ácido cítrico e no mínimo  $60,00 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  de vitamina C no produto. Sabe-se que um valor de acidez alterado pode comprometer a conservação de alimentos, bem como a estabilidade dos componentes químicos que influenciam a vida de prateleira do produto. Assim, a acidez alterada pode ter comprometido o conteúdo de vitamina C da cajuína da marca B ( $145,31 \pm 39,71 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), que foi menos da metade do conteúdo obtido para a marca A citada acima. Além disso, essa diferença pode ser explicada pelas características da matéria-prima utilizada, incluindo o grau de maturação, condições edafoclimáticas e tempo de processamento e armazenamento. Vale reassaltar que o teor de vitamina C decresce naturalmente após a produção durante o período de armazenamento, ocasionado pela oxidação da vitamina C reponsável também pela intensidade do escurecimento durante o armazenamento.

Quanto ao teor de compostos bioativos, a marca A apresentou um conteúdo significativamente maior de compostos fenólicos totais antes e depois da digestão simulada ( $187,43 \pm 8,1$ ;  $105,25 \pm 6,61 \text{ mg.}100 \text{ mL}^{-1}$ , respectivamente) do que a marca B ( $105,13 \pm 5,14$ ;  $53,63 \pm 8,75 \text{ mg.}100 \text{ mL}^{-1}$ , respectivamente). Além disso, a marca A apresentou uma maior bioacessibilidade (56,15%) do que a marca B (51,01%). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa no teor de flavonoides totais entre a marca A ( $13,77 \pm 1,09$ ;  $11,57 \pm 1,07 \text{ mg.}100 \text{ mL}^{-1}$ ) e B ( $14,37 \pm 1,13$ ;  $12,81 \pm 0,28 \text{ mg.}100 \text{ mL}^{-1}$ ), antes e após a digestão *in vitro*, respectivamente. Ou entre os tratamentos para cada marca, ou seja, os níveis desses compostos permaneceram estáveis durante a digestão *in vitro*, apresentando alta bioacessibilidade (84,02 e 89,14%) para as marcas A e B, respectivamente, demonstrando a estabilidade dos flavonoides presentes na cajuína.

Em um estudo semelhante sobre o suco de caju, Lima et al. (2014) obtiveram  $338,60 \pm 10,68$  e  $130,60 \pm 3,02 \text{ mg de GAE.}100 \text{ g}^{-1}$  de fenólicos totais antes e após a digestão gastrointestinal simulada, respectivamente, obtendo-se uma fração bioacessível de 39%. Embora o conteúdo fenólico total no presente estudo tenha sido

menor do que no estudo anterior, houve uma maior bioacessibilidade (56,15% para a marca A e 51,01% para a marca B). Portanto, embora o processo de clarificação e a pasteurização necessários para elaboração da cajuína reduzam o conteúdo fenólico presente na matéria-prima, pode-se inferir que os tornam mais bioacessíveis.

Vale ressaltar que o reagente utilizado para a determinação dos fenólicos totais (*Folin Ciocalteu*) também reage com compostos redutores como a vitamina C e açúcares, que estão presentes na amostra estudada. Assim, nas análises realizadas antes do processo da digestão simulada, o teor elevado de açúcares redutores e vitamina C pode ter superestimado o teor de compostos fenólicos pela baixa especificidade do método, enquanto que as análises realizadas após o processo de digestão, pode ter havido uma menor interferência de compostos como açúcares e vitamina C, o que faz com que o resultado após digestão seja até mais exato quanto ao valor real contido na amostra para o teor de compostos fenólicos. Em resumo, a redução do teor total de fenólicos devido exclusivamente ao processo digestivo pode ser menor do que a que foi determinada, pois a presença de agentes redutores pode levar a uma superestimação do conteúdo fenólico total nas análises antes da digestão.

O resultado obtido para atividade antioxidante foi compatível ao teor de fenólicos totais, uma vez que se verificou uma elevada atividade antioxidante, principalmente na cajuína da marca A. Com o método DPPH, foram obtidos valores médios de  $1.920,63 \pm 77,85$  e  $1.018,68 \pm 11,05 \mu\text{mol TEAC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  antes e após a digestão, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos para a mesma marca usando o método ABTS ( $1.911,00 \pm 71,57$ ;  $881,49 \pm 88,74 \mu\text{mol TEAC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  antes e após a digestão, respectivamente). A fração bioacessível obtida pelo método DPPH (53,03%) foi mais elevada para a marca A, enquanto a obtida pelo método ABTS (46,12%) foi a mais elevada da marca B. Isso indica que, apesar do processamento, a cajuína é uma excelente opção para o consumo de caju.

Foram identificados três ácidos fenólicos (elágico, gálico e *p*-cumárico) e um flavonóide (epicatequina). O ácido elágico foi o mais abundante, principalmente na marca A ( $1.062,81 \pm 5,7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Após a digestão gastrointestinal simulada, o conteúdo de ácido elágico aumentou em ambas as marcas, especialmente na marca A ( $1.898,14 \pm 31,42 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), que apresentou uma fração bioacessível de 178,59%.

Os frutos da família *Anacardiaceae* são ricos em elagitaninos, e esse aumento pode ser devido à hidrólise desses compostos, liberando o ácido elágico livre. Estudos anteriores simulando a digestão *in vitro* mostraram que, em geral, os elagitaninos são

bastante estáveis sob as condições fisiológicas do estômago. As condições ácidas (pH 1,8-2,0) e enzimas presentes no estômago não causam hidrólise dos elagitaninos e nenhuma degradação foi observada (TOMAS-BARBERAN et al., 2009). No entanto, sob as condições fisiológicas do intestino delgado, os elagitaninos foram hidrolisados liberando ácido elágico livre, o que pode ser devido ao pH e aos efeitos das enzimas pancreáticas e sais biliares (LARROSA et al., 2010).

Vários estudos demonstraram que o ácido elágico tem propriedades biológicas, incluindo atividade anti-inflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares, aterosclerose e dislipidemia, estimulando a cicatrização de feridas e a elasticidade da pele (FIRDAUS et al., 2018; TOMÁS BARBERÁN et al., 2017).

Da mesma forma, o teor de ácido gálico aumentou significativamente após a digestão simulada em ambas as marcas, particularmente na marca A ( $50,54 \pm 2,30$  e  $59,18 \pm 2,95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  antes e após a digestão, respectivamente). Diversas propriedades biológicas estão associadas ao ácido gálico, como atividade antioxidante e antiinflamatória, atividade anticancerígena e efeitos anti-hiperglicêmicos, como redução dos níveis de glicose e hemoglobina glicosilada e aumento dos níveis de insulina em modelos experimentais de diabetes. Isso sugere a possibilidade do uso do ácido gálico como terapia complementar aos hipoglicemiantes (OLIVEIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2018).

Os níveis de epicatequina na marca A antes e após a digestão simulada ( $14,54 \pm 1,0$  e  $32,39 \pm 0,83 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), apresentaram uma bioacessibilidade de 222,75%. No entanto, não houve diferença significativa entre os níveis de epicatequina antes e após a digestão *in vitro* com relação a marca B ( $12,22 \pm 0,05$  e  $14,15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), que também apresentou menor biodisponibilidade do que a marca A. Essa diferença entre as marcas pode ser explicada pelo diferente processo de processamento do suco de caju, pelo tempo de pasteurização, armazenamento e pelas diferenças entre as matérias-primas, que são afetadas por vários fatores, como o tempo de colheita e as condições climáticas.

Entre os compostos identificados, o ácido *p*-cumárico estava presente em menor quantidade, ou seja,  $2,99 \pm 0,05$  e  $6,56 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  antes e após a digestão, respectivamente, para a marca A e  $0,72 \pm 0,01$  e  $0,82 \pm 0,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  antes e após a digestão, respectivamente, para marca B. O ácido *p*-cumárico tem sido associado a propriedades quimioprotetoras e antioxidantes, atividade antimicrobiana, antagonista

de doenças cardiovasculares e atividade anticâncer (KANNAN et al., 2013; ROY & PRINCE, 2013; SHARMA et al., 2017).

Tendo em vista o exposto, pode-se observar que enquanto houve uma redução no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante após digestão simulada, houve um aumento no teor dos compostos fenólicos identificados por HPLC. Como foi citado anteriormente, o método utilizado para quantificar os fenólicos totais por espectrofotometria utilizando o reagente *Folin Ciocalteu*, apesar de ser o mais utilizado, tem a limitação de não ser muito específico, pois o reagente também interage com outros compostos redutores, tais como açúcares e vitamina C, presentes na amostra em estudo, fato que pode ter superestimado o teor de fenólicos totais antes da digestão. O processo de identificação por HPLC é mais preciso, pois o método foi desenvolvido exclusivamente para a identificação de compostos fenólicos. Pode-se ainda inferir que o aumento pós-digestão dos compostos identificados pode ser justificado pela hidrólise e liberação de ácido fenólicos livres. Sabe-se que os taninos hidrolisáveis além outros polióis, são também ésteres de ácido gálico que podem sofrer hidrólise durante o processo digestivo liberando ácido gálico livre. Elagitaninos, entre outros, podem sofrer hidrólise, libertando ácido elágico livre ou outros ácidos fenólicos. Sabe-se também que alguns compostos são instáveis e não resistem ao processo pós-digestão, contribuindo para uma redução na fração bioacessível dos fenólicos totais. Entretanto, nota-se que os quatro compostos identificados podem estar envolvidos em processos de transformação e liberação que podem ter ocasionado aumento na fração bioacessível, em detrimento da redução na fração bioacessível dos totais. Assim, o consumo regular de suco de caju clarificado fornece compostos antioxidantes importantes para a saúde.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

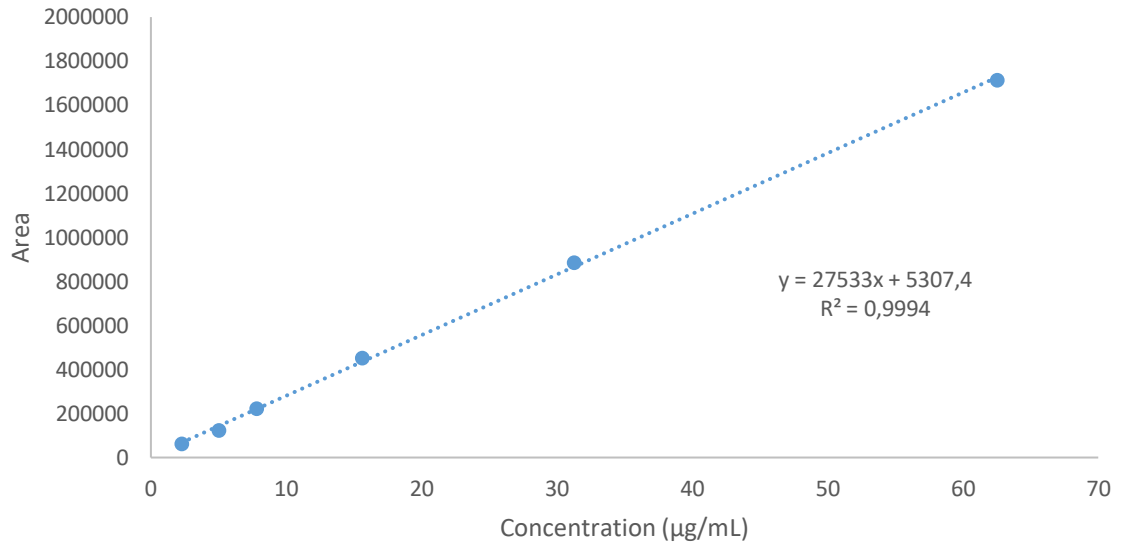
Verificou-se com o presente estudo que o suco clarificado de caju (cajuína) é fonte de compostos fenólicos como o ácido elágico, epicatequina, ácido *p*-cumárico e ácido gálico e possui elevada atividade antioxidante, sendo um trabalho inédito na identificação destes compostos no referido produto, bem como em relação a bioacessibilidade. Assim, este estudo fornece evidências científicas para o potencial funcional e antioxidante do suco clarificado de caju (cajuína).

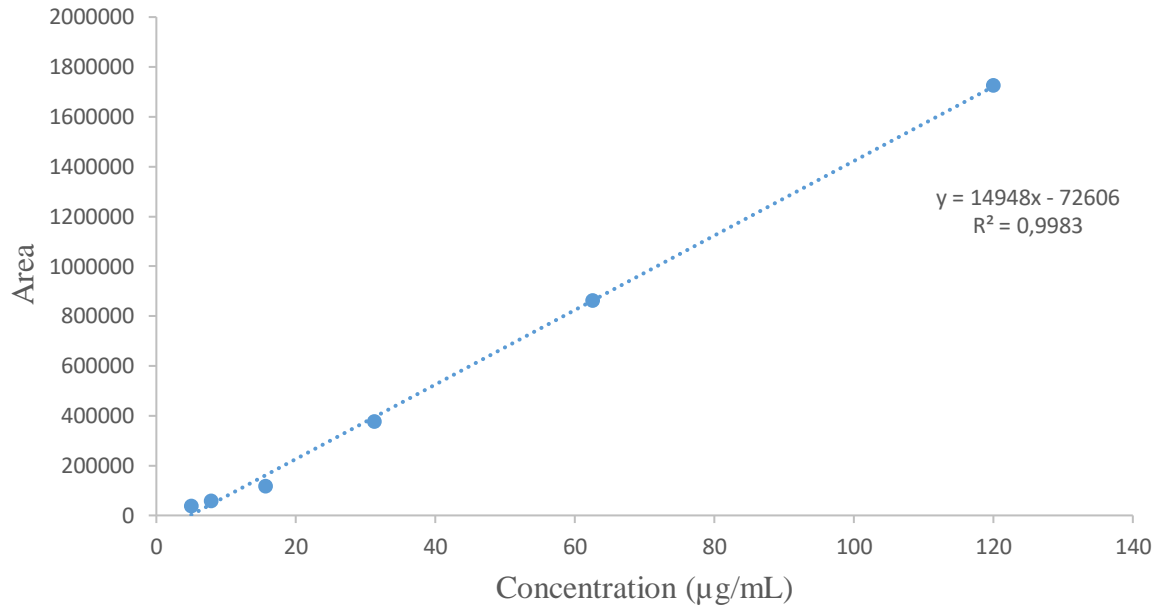
## SUGESTÕES

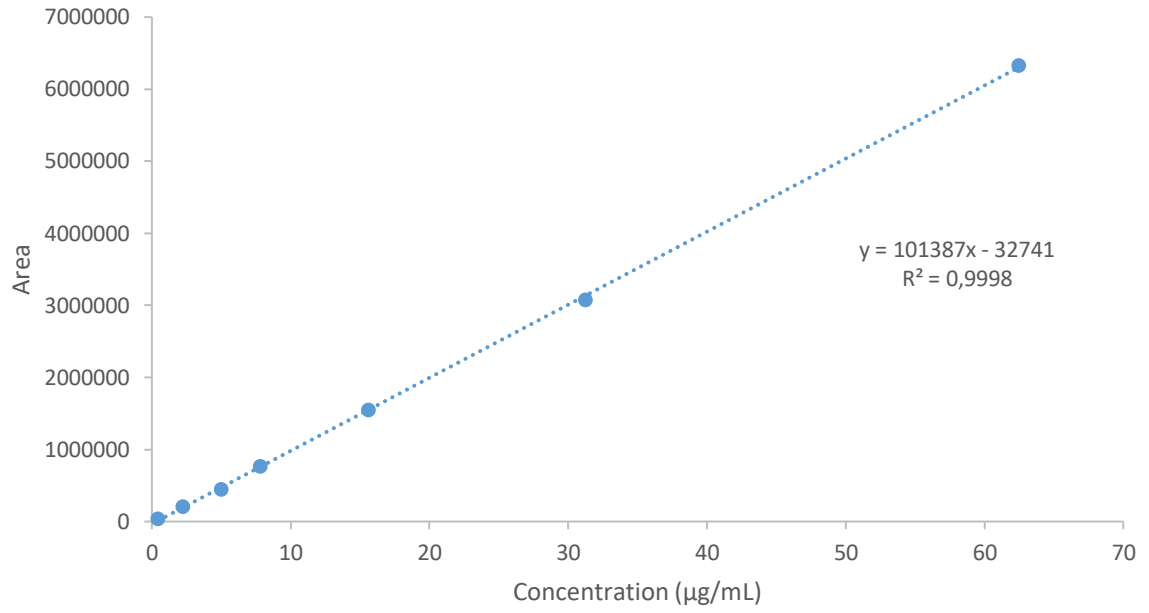
Tendo em vista a importância dos compostos identificados no suco de caju clarificado (cajuína) para a saúde, sugere-se para pesquisas futuras, o desenvolvimento de estudos *in vivo* que avaliem o efeito do consumo de cajuína no controle da peroxidação lipídica e, dessa forma, verificar uma possível relação entre sua ingestão de cajuína e a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, tais como, doenças cardiovasculares, câncer, dentre outras.

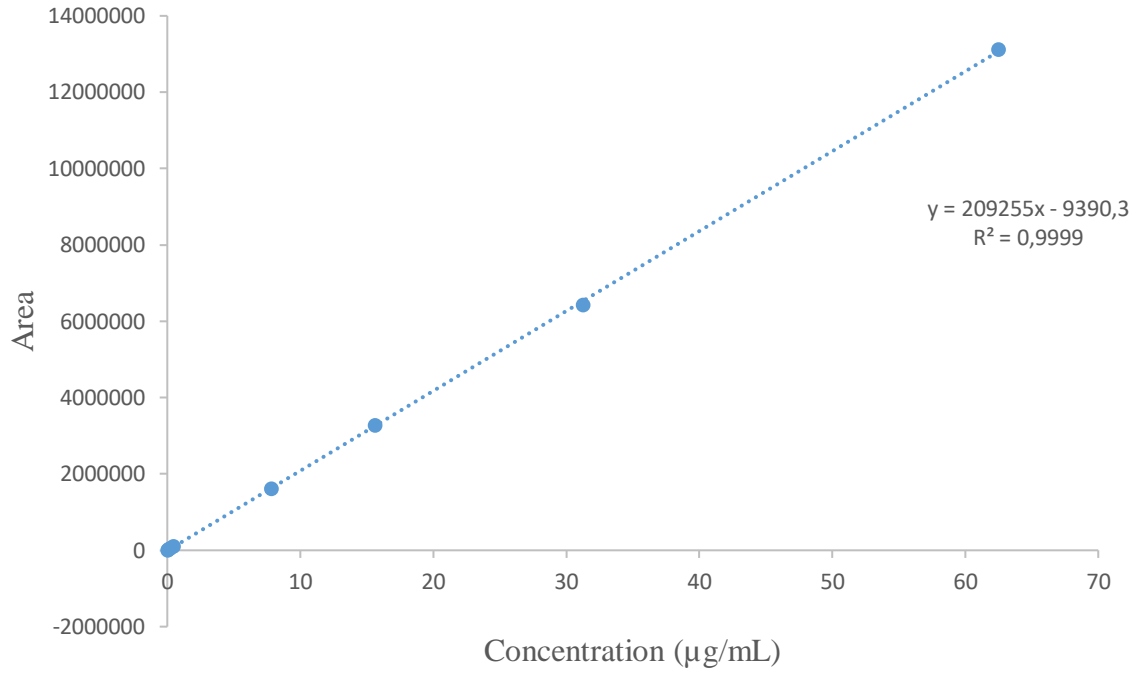


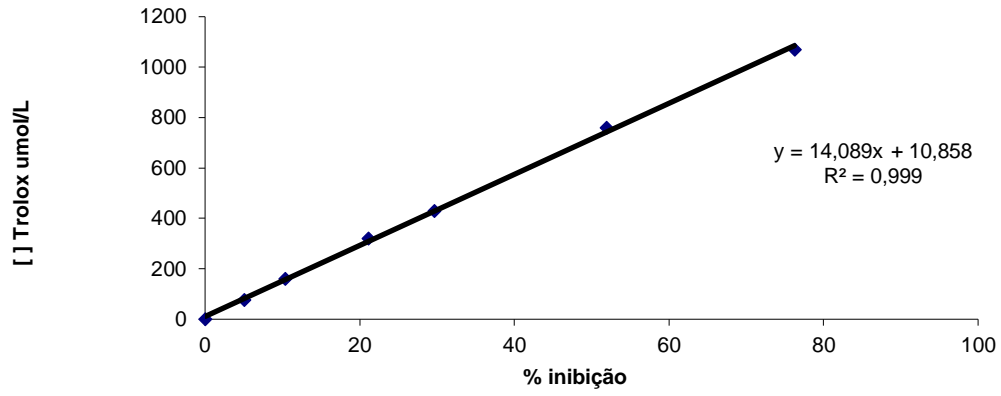
## **APÊNCIDES**

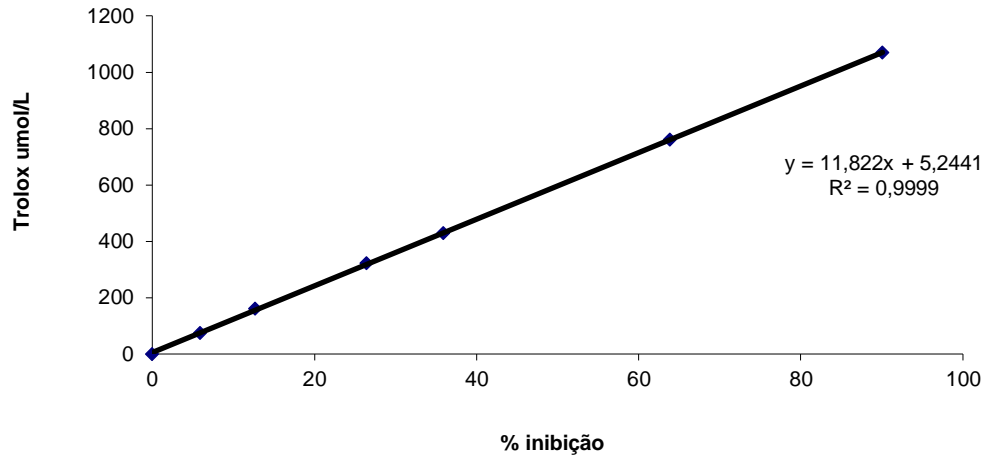
**Apêndice A – Curva padrão de Epicatequina HPLC - UV**

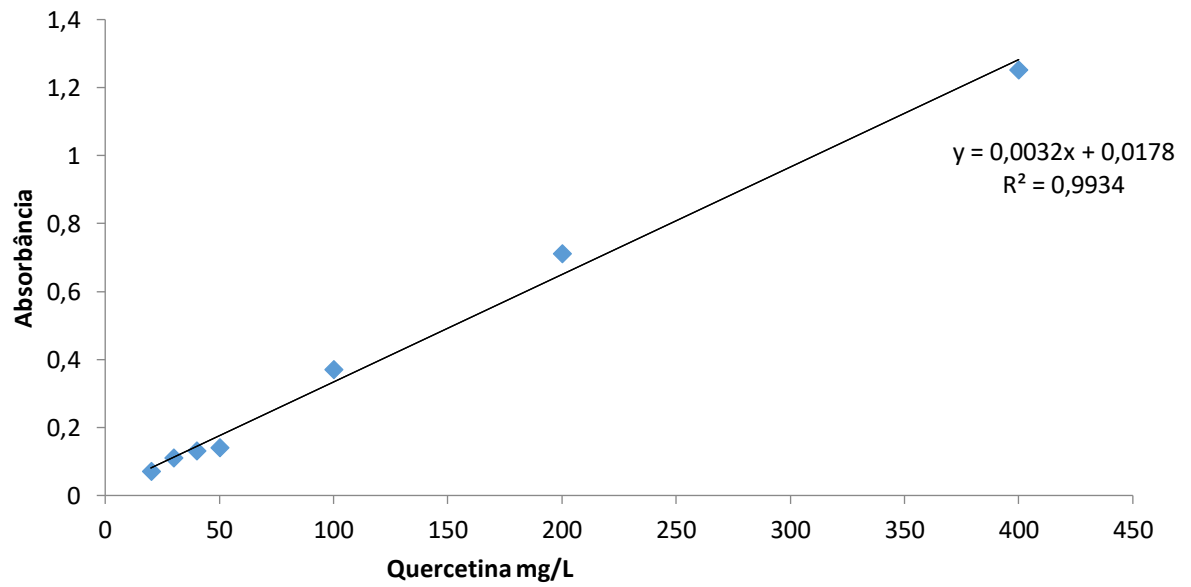
**Apêndice C – Curva padrão de ácido elágico HPLC-UV**

**Apêndice D – Curva padrão de ácido gálico HPLC-UV**

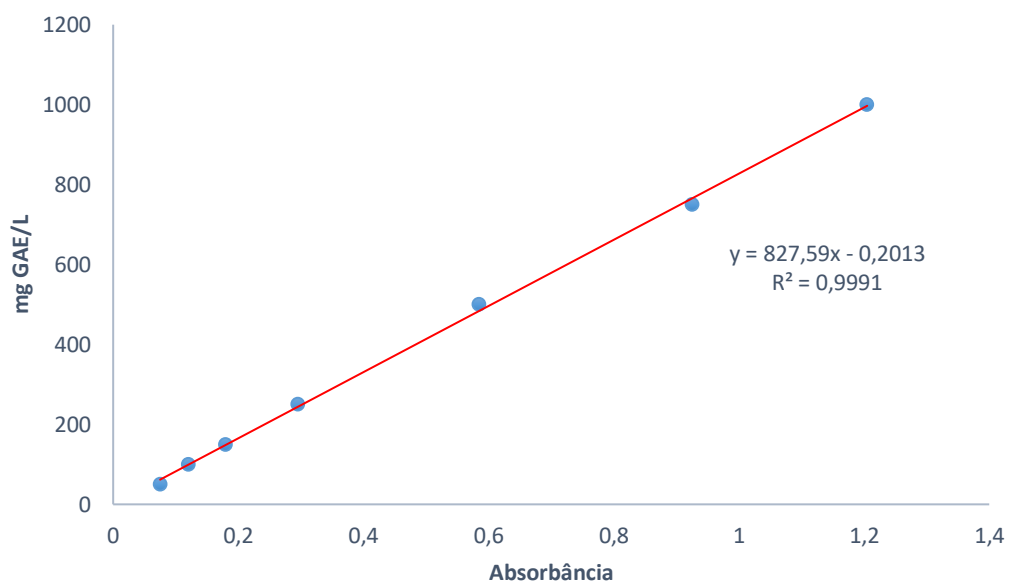
**Apêndice E – Curva padrão de ácido *p*-cumárico HPLC-UV**

**Apêndice F – Curva padrão de Trolox - Método DPPH**

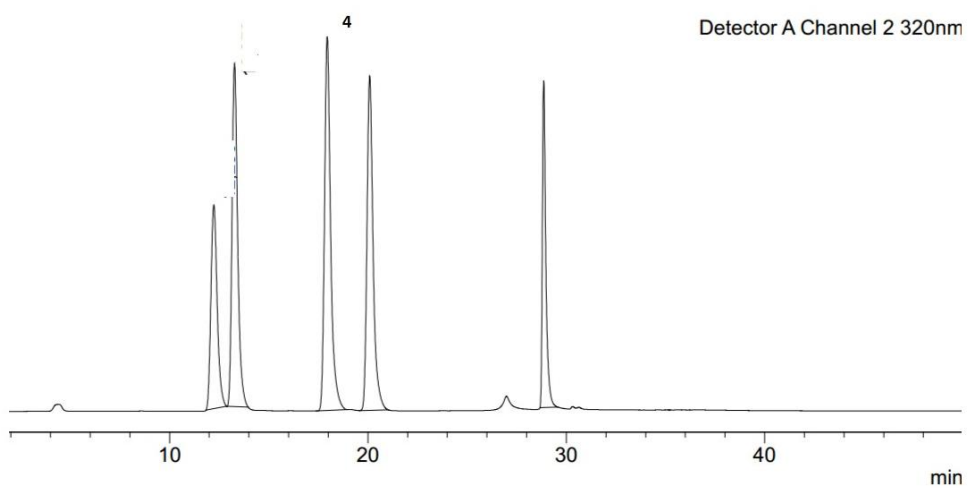
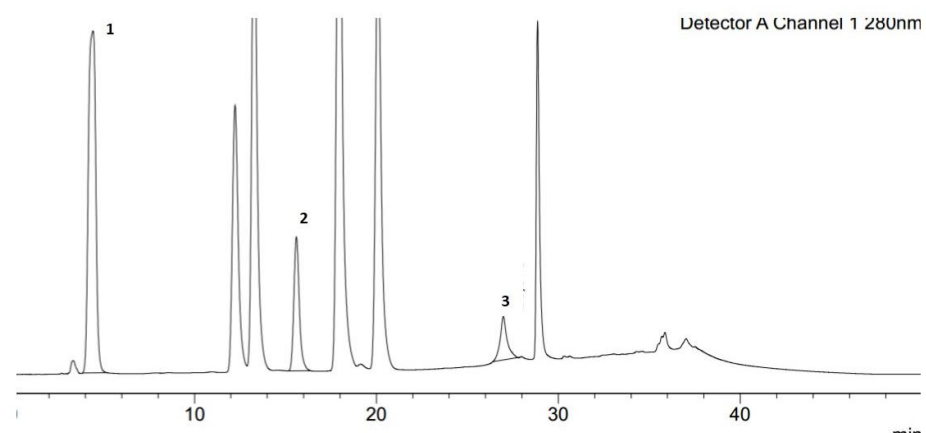
**Apêndice G – Curva padrão de Trolox - Método ABTS**

**Apêndice H – Curva padrão de quercetina – Determinação de flavonoides**



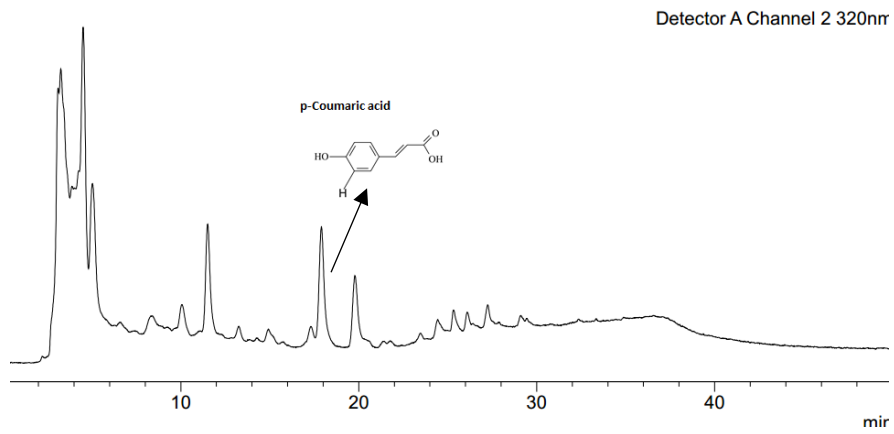
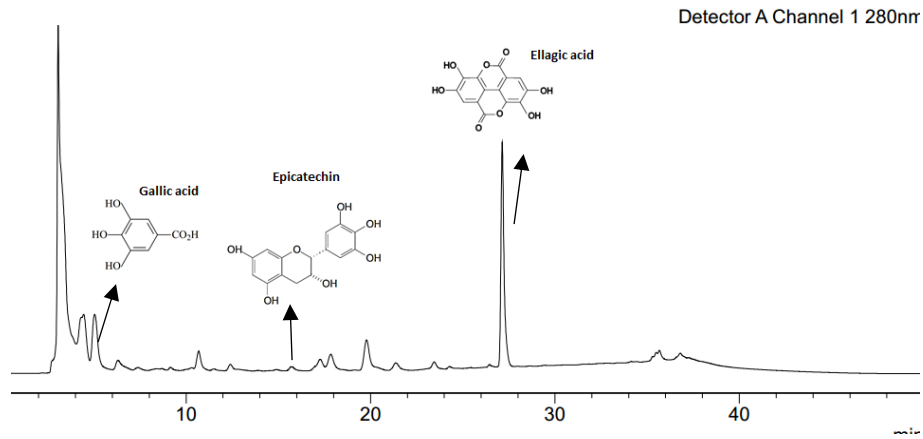
**Apêndice I – Curva padrão de ácido gálico – Determinação de fenólicos totais.**

**Apêndice J – Cromatogramas de separação dos padrões fenólicos disponíveis - HPLC-UV.**



1 – Ácido gálico, 2 – Epicatequina, 3 – Ácido elágico, 4 – *p*-Cumárico

**Apêndice L – Cromatograma de separação dos compostos fenólicos da cajuína (marca A) por HPLC-UV.**



**Apêndice M – Outros artigos Publicados****ARTIGO CIENTÍFICO**

**Versão publicada pela Revista *African Journal of Agricultural Research***

PORTO, R. G. L., FETT, ARÊAS, J. A. G., BRANDÃO, A. C.A. C., MORGANO, M. A., SOARES, R. A. M., ARAÚJO, M. A. M., MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Bioactive compounds, antioxidant activity and minerals of 'Cajuí' (*Anacardium humile* St. Hill) during the ripening. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 48, p. 4924-4930, 2016.

## Bioactive compounds, antioxidant activity and minerals of 'Cajuí' (*Anacardium humile* St. Hill) during the ripening

Rayssa Gabriela Costa Lima Porto, Roseane Fett, Jose Alfredo Gomes Arêas, Amanda de Castro Amorim Serpa Brandao, Marcelo Antonio Morgano, Rosana Aparecida Manolio Soares, Marcos Antonio da Mota Araujo, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araujo.

Article Number - FBCA15661961

Vol.11(48), pp. 4924-4930, December 2016, <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11455> Received: 19 July 2016 Accepted: 08 November 2016 Published: 01 December 2016 Copyright © 2019 Author(s) retain the copyright of this article. This article is published under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0](#).

### ABSTRACT

The present study aimed to determine the content of minerals, bioactive compounds and the antioxidant activity of 'Cajuí' (*Anacardium humille* St. Hill) during the ripening. The fruits were collected in three maturity stages. The content of the minerals, total phenolics, proanthocyanidin and carotenoids contents as well as the antioxidant activity, ABTS (2,2-azinobis-3-ethylben-zothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (ferric reducing antioxidant power) were determined, with results expressed on Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). The Student's t-test was employed to analyse the data, based on a significance level of  $p < 0.05$ . The total phenolic contents were determined as  $1424.33 \pm 28.62$ ,  $991.16 \pm 21.52$  and  $867.08 \pm 28.56$  mg GAE.100 g<sup>-1</sup> for the immature, semi-mature and mature stages, respectively. Regarding the carotenoid content,  $18.05 \pm 1.01$  was obtained for the immature stage,  $8.62 \pm 0.96$  was obtained for the semi-mature stage, and  $8.32 \pm 0.97$  mg-β-carotene.100 g<sup>-1</sup> was obtained for the mature stage. Regarding the antioxidant activity; it was particularly relevant for the fruits in the immature stage in the three methods used: DPPH ( $30399.63 \pm 27.06$  μM TEAC.100g<sup>-1</sup>), ABTS ( $40860.62 \pm 9.32$  μM TEAC 100 g<sup>-1</sup>) and FRAP ( $6118.22 \pm 83.04$  μM TEAC.100 g<sup>-1</sup>). The 'cajuí' exhibited high antioxidant activity and content of bioactive compounds, especially for the immature stage. Among the minerals, 'cajuí' showed high levels of K (potassium), P (phosphorus), and Mg (magnesium). Thus, the cajuí presents itself as a good source of antioxidant compounds which can be exploited by the food industry as an ingredient for the development of a food with functional properties and the pharmaceutical industry, as phytochemical.

**Key words:** Minerals, phenolic compounds; maturation stages; antioxidant activity

## INTRODUCTION

The Cerrado's flora comprises a variety of fruit tree species with great potential for agricultural use, which are traditionally used by the local population, who consume them *in natura* or processed as juice, liquor, ice cream, jams and sweets (Silva et al., 2008). Among the compounds present in foods with functional properties, antioxidants have received special attention because they protect the human body against oxidative stress, thus avoiding a great number of chronic non-communicable diseases (Canuto et al., 2010; Yahia, 2010).

*Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae) is commonly known as 'cajuzinho-do-cerrado' or 'cajuí' (Hoehne, 1979). This pseudo-fruit can be consumed in the form of juice, sweets and wine. The 'cajuzinhos' ("small cashews") are popularly recognised as having excellent taste and low astringency. The high sugar and total soluble solids contents, which influence the level of sweetness of these small cashew apples, are apparently responsible for the good sensory acceptance (Agostini-Costa et al., 2004).

During fruit maturation, physical, chemical, biochemical and physiological changes occur, which result in detectable transformations in the colour, flavour, aroma and texture (Romojaro et al., 1996). Some authors have demonstrated the existence of significant differences in the levels of bioactive compounds and in the antioxidant capacity of other tropical fruits at different maturation stages (Park et al., 2006; Zhang et al., 2006). Therefore, the present study aimed to determine the influence of the maturation stage on the bioactive compounds content and the antioxidant activity of the 'cajuí' fruit.

## MATERIALS AND METHODS

### *Samples preparation*

The *A. humile* St. Hill fruits were provided in two lots in the months of August and September of 2012 by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa), located at latitude 05°05'21" and longitude 42°48'07" in the city of Teresina, capital of the State of Piauí, Brazil. The fruits were collected directly and were in three different maturation stages (immature, semi-mature and mature), as determined by physical characteristics such as fruit colour and shape (immature - green fruit and firm texture; semi-mature - yellowish

green fruit and soft texture; and ripe - yellow fruit and soft texture) with the satisfactory integrity of the samples based on the fruit conservation state. Once sanitised, the pulp of the fruit was removed, and the fruits were dried in a ventilated oven at 45°C for 12 h. After drying, the fruits were ground in a mill and stored in plastic bags at -20°C for later analysis of the levels of bioactive compounds and the antioxidant properties.

### *Reagents*

The Folin-Ciocalteu phenol reagent, catechin,  $\beta$ -carotene, 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Gallic acid, sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), hydrochloric acid (HCl), anhydrous ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), methanol, ethanol, hexane and acetone were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro-RJ, Brazil). All of the reagents used were of analytical degree, and deionised water was used.

### *Procedure*

The bioactive compounds analyses were performed in the Food Chemistry Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (Florianopolis - SC), and minerals analyses in Institute of Food Technology (Campinas – SP).

### *Preparation of extracts*

The extracts were prepared with a dry sample according to Rufino et al. (2010). Two solvents were used: 80% acetone and a methanol/acetone/water mixture (4:4:2 by volume). The extraction was conducted with an ultrasound device (USC-1400-Original ®) for a period of 60 min, followed by centrifugation at 4000 rpm. Subsequently, the supernatant was used to determine the total phenolic and proanthocyanidin contents and the antioxidant activity.

### *Determination of total phenolics content*

For this analysis, 2 ml of deionised water was added to a 10 ml flask, 100  $\mu\text{l}$  of sample (extract) was pipetted with an automatic pipette, and the sample was

transferred to a 10 ml volumetric flask. Next, 0.5 ml of the Folin-Ciocalteu reagent was added, followed by vigorous agitation. After 5 min, 1.5 ml of sodium carbonate at 20% m/v was added, and the mixture was well agitated and diluted with deionised water to a volume of 10 ml. After a 2 h rest at room temperature with the sample kept in the dark, the absorbance was measured at 765 nm with a spectrophotometer Hewlett-Packard model HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK) in a 10 mm cuvette (Singleton and Rossi, 1965). The total phenolic content was expressed in mg gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of sample. Each determination was performed in triplicate and repeated at least three times.

#### *ABTS method*

The ABTS (2,2-azinobis-3-ethylben-zothiazoline-6-sulphonic acid) method used was previously described by Re et al. (1999). The ABTS<sup>+</sup> cation was produced by mixing ABTS (7 mM) with 2.45 Mm potassium persulphate (final concentration) and keeping the mixture in the dark and at room temperature for 16 h. For analysis, the reagent was diluted in ethanol until the absorption at 734 nm reached the value of  $0.700 \pm 0.02$ . The absorbance was measured in a Hewlett-Packard 8452A spectrophotometer 7 min after (kept at room temperature and in the dark) the addition of the extract. The results were expressed in  $\mu\text{M}$  Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per 100 g of sample. Each determination was performed in triplicate and repeated at least three times.

#### *DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method*

For this analysis, 0.0394 g of the radical was weighted and dissolved in 10 ml of methanol. After this procedure, the solution was diluted 1:100 in 80% methanol v/v, adjusting the initial absorption to 0.800. Once the solution was prepared, 2.9 ml of the radical was pipetted into a 10 mm cuvette. The initial absorption was then measured. A 100  $\mu\text{l}$  sample of extract was added, and a reaction time of 30 min was allowed at room temperature with the sample kept in the dark with the spectrophotometer Hewlett-Packard model HP 8452A. The results were compared to the standard antioxidant Trolox and expressed in  $\mu\text{M}$  TEAC 100 -1g of sample. The method was conducted according to Kim et al. (2002). Each determination was performed in triplicate and repeated at least three times.



#### *FRAP (ferric reducing antioxidant power) method*

For the sample, 200  $\mu$ l of the 3 M ferric chloride solution was pipetted into 10 ml test tubes in triplicate. Next, 200  $\mu$ l of the sample extract was added to each test tube, followed by homogenisation with a vortex agitator. At this point, a chronometer was started to time the reaction. The reaction occurred for 30 min in a water bath at 37°C. The sample was then removed from the water bath, and 3.6 ml of the previously prepared TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) solution was added. Ten min after the addition of TPTZ (kept at room temperature and protected from light), the absorbance was measured at 620 nm with a spectrophotometer Hewlett-Packard model HP 8452A in 10 mm cuvettes. The results were expressed in  $\mu$ M TEAC per 100 g of sample, according to the methodology described by Benzie and Strain (1999), with modifications by Arnous et al. (2002). Each determination was performed in triplicate and repeated at least three times.

#### *Determination of total carotenoid content*

The carotenoid content was determined according to the methodology by Alvarez-Suarez et al. (2011) and Ferreira et al. (2009). In brief, 1 g of sample was weighed in a 30 ml beaker, and 10 ml of the acetone/hexane (4:6) solvent, which was kept under agitation for 10 min, was added. Next, the content was filtered, and the absorbance was determined at 450 nm with a spectrophotometer Hewlett-Packard model HP 8452A. The results were expressed in mg of  $\beta$ -carotene per 100 g of sample, for comparison with the standard  $\beta$ -carotene curve previously constructed. Each determination was performed in triplicate and repeated at least three times.

#### *Determination of proanthocyanidin content*

The level of proanthocyanidin (condensed tannins) was determined by colorimetry using the vanillin method and using catechin as a standard (Price et al., 1978). For this procedure, 5.0 ml of the vanillin reagent (0.5 g of reagent and 200 ml of methanol HCl at 4%) was added to 1.0 ml of the methanol/acetone extract. After 20 min of reaction in the dark and at room temperature, the reading was taken at an absorbance of 500 nm. Measurements were performed in triplicate, and the results were expressed in mg

of catechin equivalent (CE) per 100 g of dry sample. Each determination was performed in triplicate and repeated at least three times.

#### *Determination of minerals*

To determine the mineral, all glassware used after washing with soap Extran (Merck) previously remained immersion in nitric acid (HNO<sub>3</sub>) 25% (v/v) for 24 h. Then, the glassware was rinsed with distilled water and demineralized (MΩ resistivity of 18.2 cm<sup>-1</sup>). To determine the role of calcium (Ca), copper (Cu), iron (Fe), magnesium (Mg), sodium (Na), potassium (K), phosphorus (P) and zinc (Zn) in the samples, we used as a method of sample preparation by dry digestion, according to Horwitz and Latimer (2005) were weighed in a porcelain capsule 2.5 g sample in triplicate. Then, the samples were pre-calcined in the heating plate and incinerated in a muffle furnace at 450°C until formation of ash-free black dots. The ashes were quantitatively transferred to a volumetric flask with 25 ml of hydrochloric acid 5% (v/v) and the solution was filtered through quantitative filter paper before reading on emission spectrometer with inductively coupled plasma (ICP-OES). Analytical blanks were prepared by omitting the samples. The quantification of inorganic elements was performed using an emission spectrometer (ICP-OES) of Varian (Mulgrave Victoria, Australia) model Vista MPX axial view, equipped with a source of radio frequency (RF) of 40 MHz, one simultaneous multi-element detector solid state type Charge Coupled Device (CCD), a peristaltic pump, a spray chamber and nebulizer sea spray. The system is fully controlled by the ICP Expert software using the plasma gas liquid argon with purity of 99.996% (Air Liquid, SP, Brazil).

#### *Statistical analysis*

For the statistical analysis, a database was created with the statistical package for the social sciences (SPSS, 2010) software, version 17.0. The results are presented in tables with their respective means and standard deviations for each variable studied. To determine if there was a significant difference between means, Student's t-test and Tukey's test of means were used, Analysis of variance (ANOVA) and normality Kolmogorov Smirnov test were also applied. The significance level adopted for all the tests was  $p < 0.05$  (5%) (Andrade and Ogliare, 2010).

## RESULTS AND DISCUSSION

These results (Table 1) indicate that the total phenolics content decreased throughout the maturation process. Lopes et al. (2012) studied the antioxidant potential of the *A. occidentale* from different early dwarf clones during their ripening and obtained values lower than those in the present study, varying from 26.70 to 375.79 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>. Rocha et al. (2013) obtained sequential extraction values of 51.15 and 11.58 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> in alcoholic and aqueous extracts, respectively. This inconsistency can be explained by differences in soil, climate, growing season, postharvest storage and extraction methods (Melo et al., 2006; Barreto et al., 2007; Rufino et al., 2010). Plants may also activate polyphenol synthesis in response to stress, such as injury, pathogens or low nutrients (Dixon and Paiva, 1995). Nevertheless, the variation between samples in different maturation stages is expected because maturation can be defined as a sequence of alterations in colour, flavour and texture of fruits and vegetables in general.

**Table 1.** Total phenolic content, Carotenoids content and proanthocyanidins content in 'cajuí' (*Anacardium humile* St Hill) at three maturation stages, expressed on a dry basis.<sup>1</sup>

Maturation Stages	Total Phenolics (mg.GAE.100 g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	Carotenoids (mg- $\alpha$ -carot.100 g <sup>-1</sup> )	Proanthocyanidins (mg CE.100g <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>
Immature	1424.33±28.62 <sup>a</sup>	18.05±1.01 <sup>a</sup>	37.41±0.00 <sup>a</sup>
Semi-mature	991.16±21.52 <sup>b</sup>	8.62±0.96 <sup>b</sup>	5.88±1.64 <sup>b</sup>
Mature	867.08±28.56 <sup>c</sup>	8.32±0.97 <sup>b</sup>	4.96±1.65 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Data was expressed as average  $\pm$  SD, n=3; <sup>2</sup>Equivalent to gallic acid (GAE);  
<sup>3</sup>Catechin Equivalent (CE) ;The same letters in the row represent non-significant difference between means according to Student's t-test p<0.05.

Rocha et al. (2011) obtained values of 170, 184 and 190 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> for three 'cajuí' varieties using a 70% acetone extraction. The variation in the content of these compounds can be explained by climate and soil change, among other environmental factors, because the fruits used for the study by Rocha et al. (2011) were collected in the states of Goias, Bahia and Federal District. There are no data in the literature concerning the total phenolic content in 'cajuí' at different maturation stages; however, studies have been conducted with other fruits. For instance, Lichtenthäler et al. (2003) and Pacheco-Palencia et al. (2009), demonstrated açai

(*Euterpe oleraceae* Mart.) to be a fruit rich in phenolic compounds and with high antioxidant activity.

Gordon et al. (2012) obtained total phenolics contents of  $12317 \pm 264$ ,  $3039 \pm 149$  and  $3437 \pm 154$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  for the immature, semi-mature and mature stages of açai, respectively. Those results were similar to the ones obtained in the present study. Using a comparison with other typical fruits from the Cerrado region, Almeida et al. (2011) obtained  $98.8 \pm 5.6$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  for 'mangaba',  $159.9 \pm 5.6$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  for 'murici' (or golden spoon),  $83.8 \pm 6.1$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  for tamarind and  $44.6 \pm 2.7$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  for 'umbu' (or Brazil plum). The contents obtained in the cited fruits were lower than the ones observed in the present study. The carotenoids content decreased significantly as the fruit matured (Table 1): the immature stage exhibited the greatest carotenoid content ( $18.05 \pm 1.01$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ), followed by the semi-mature ( $8.62 \pm 0.96$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) and mature ( $8.32 \pm 0.97$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) stages.

Lopes et al. (2012) obtained the a minimum of  $0.09$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  and maximum value of  $37.58$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  of carotenoids in *A. occidentale* when studying different early dwarf clones during their ripening. Therefore, the carotenoids content obtained in the present study was higher in the three maturation stages in comparison to the data from the literature, especially in the immature stage. Carotenoids are present in chloroplasts and are normally masked by the presence of other dominant chlorophyll pigments. Therefore, although they are present in greater amounts in the immature stage, carotenoids are not visually perceived because chlorophyll is the dominant pigment. As the fruit matures and chlorophyll degrades, the carotenoids become visible in colour shades varying from orange-yellow to red. Regarding the proanthocyanidin content, the values obtained also differed statistically among the immature ( $37.41 \pm 0.00$  mg CE  $100 \text{ g}^{-1}$ ), semi-mature ( $5.88 \pm 1.64$  mg CE  $100 \text{ g}^{-1}$ ) and mature ( $4.96 \pm 1.65$  mg CE  $100 \text{ g}^{-1}$ ) stages. Rocha et al. (2011) obtained higher values (186, 242 and 132 mg CE  $100 \text{ g}^{-1}$ ) for the three varieties of 'cajuí'.

The carotenoid and proanthocyanidin content in plants can vary according to the environment, cultivation system, solar incidence, type of soil and even the type of extraction and methodology employed for analysis. Table 2 shows the results for antioxidant activity using three different methods (DPPH, ABTS and FRAP). The immature stage exhibited the highest antioxidant activity.

The antioxidant activity of 'cajuí' decreased with maturation (Table 2), becoming lower in the mature stage for all the methods in different extracts. Due to the complexity

of the composition of foods, their antioxidant power depends on the synergistic effects and redox interaction between the different nutrient and “non-nutrient” molecules, which together contribute to the possible health benefits. Therefore, attention has been given to the antioxidant activity of fruits, a parameter that allows a real evaluation of the nutritional value of foods (Lenucci et al., 2006; Pellegrini et al., 2007).

**Table 2.** Determination of antioxidant activity (DPPH, ABTS and FRAP) of ‘cajuí’ (*Anacardium humile* St Hill) at three maturation stages, expressed on a dry-weight.<sup>1</sup>

Maturation stages	DPPH – TEAC <sup>2</sup> µM.100 g <sup>-1</sup>	ABTS- TEAC µM.100 g <sup>-1</sup>	FRAP – TEAC µM.100 g <sup>-1</sup>
Immature	30399.63 ± 27.06 <sup>a</sup>	40860.62 ± 9.32 <sup>a</sup>	6118.22 ± 83.04 <sup>a</sup>
Semi-Mature	18647.86 ± 61.65 <sup>b</sup>	15107.08 ± 1.93 <sup>b</sup>	2882.20 ± 29.01 <sup>b</sup>
Mature	18498.16 ± 88.10 <sup>b</sup>	12171.12 ± 3.87 <sup>c</sup>	2125.48 ± 36.76 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Results presented as mean ± SD, n=3; <sup>2</sup> TEAC value (antioxidant activity equivalent to Trolox). The same letters in the row represent non-significant difference between means according to Student's t-test p<0.05.

In comparison to the present study, Gordon et al. (2012) obtained decreasing values throughout the maturation of açai when determining the antioxidant activity using the ABTS radical-scavenging method, namely 17.0 ± 0.71, 4.04 ± 0.05 and 2.78 ± 0.10 µM TEAC 100 g<sup>-1</sup>. Such values are lower than the ones obtained in this study. However, it is interesting to observe that the antioxidant activity decreased with a decrease in the total phenolics content, demonstrating once again that the presence of such compounds influences the antioxidant activity.

Bramorski et al. (2011) obtained similar values to the ones found in the present study for mature ‘camarinha’ fruit (*Gaylussacia brasiliensis* (Spreng) Meisn), with values of 2041.20 ± 4.03, 2110.62 ± 19.94 and 765.32 ± 2.60 µM TEAC 100 g<sup>-1</sup> for a methanol extraction using the ABTS, DPPH and FRAP methods, respectively. For an extraction with acetone, the results were 2054.72 ± 1.54, 2256.64 ± 92.50 and 851.77 ± 21.59 µM TEAC 100 g<sup>-1</sup> for ABTS, DPPH and FRAP, respectively. Thus, based on the higher values obtained in the present study, ‘cajuí’ exhibited high antioxidant activity.

Moo-Huchin et al. (2015) determined the antioxidant compounds, antioxidant activity and content of individual phenolic compounds of freeze-dried peel from three tropical fruits grown in Yucatan, México: purple star apple (*Chrysophyllum cainito* L.), yellow cashew and red cashew (*Anacardium occidentale*). The freeze-dried peels were good source of antioxidant compounds. ABTS

and DPPH values in the peel from each fruit were 3050.95 to 3322.31  $\mu\text{M}$  Trolox 100 g<sup>-1</sup> dry weight (DW) or 890.19 to 970.01 mg of vitamin C 100 g<sup>-1</sup> DW, and 1579.04 to 1680.90  $\mu\text{M}$  Trolox 100 g<sup>-1</sup> DW or 340.18 to 362.18 mg of vitamin C 100 g<sup>-1</sup> DW, respectively.

Table 3 presents the contents of minerals (mg/100 g) and recommended daily intake (RDI) in the *A. Humile* (stage mature). The fruit is highlighted in the content K (127 mg 100<sup>-1</sup>g), P (27.0 mg 100<sup>-1</sup>g) and Mg (9.8 mg 100<sup>-1</sup>g). Fruits in general are a good potassium source because this cation represents one of the most abundant minerals due to its diversity of functions in plants (Andola et al., 2011; Soares et al., 2004). Marc et al. (2011) conducted analysis in cashew apple juice (*A. occidentale*) and obtained values ranged from 2043.8 to 2189.5 mg L<sup>-1</sup> for K, 213.9 to 215.8 mg L<sup>-1</sup> for P, and 195.6 to 215.1 mg L<sup>-1</sup> for the mineral Mg. Among macro minerals analyzed, these were obtained in greater quantity similar to the present study. Trace elements do not provide calories but they play an important role in the metabolic processes of the human body.

**Table 3.** Mineral composition (mg.100<sup>-1</sup> g) of the *Anacardium humile* St Hill fruit in stage mature in relation DRI (Dietary Reference Intakes).

Minerals	DRI (mg/day; $\mu\text{g/day}^*$ )	Values**	%***
Calcium	1000	2.4 ( $\pm$ 0.2)	0.24
Copper	900	0.13 ( $\pm$ 0.01)	0.01
Iron	14	0.24 ( $\pm$ 0.01)	1.71
Phosphorus	700	27.0 ( $\pm$ 1)	3.85
Potassium	-	127.0 ( $\pm$ 5)	-
Sodium	-	8.1 ( $\pm$ 0.6)	-
Magnesium	260	9.8 ( $\pm$ 0.1)	3.77
Zinc	7	0.14 ( $\pm$ 0.01)	2.00

\*Daily Intake: mg/day for calcium, magnesium, phosphorus, iron, zinc and manganese; mg / day for copper (Brasil, 2005); \*\* Results are expressed as averages  $\pm$  SD (mg / 100 g); \*\*\* Percentage adequacy according to the IDR.

## CONCLUSIONS

'Cajuí' exhibited a high content of phenolic compounds, especially at the immature stage. The acetone solvent performed the best for the extraction of such compounds. The proanthocyanidin content was greatest in the immature stage and decreased during the maturation process. The cajuí showed high levels of K, P

and Mg. 'Cajuí' displayed a high total carotenoids content, with the highest content at its immature stage. The fruit exhibited high antioxidant activity as confirmed by the three methods tested (ABTS, DPPH and FRAP), especially at the immature stage. Thus, the cajuí presents itself as a good source of antioxidant compounds which can be exploited by the food industry as an ingredient for the development of a food with functional properties and the pharmaceutical industry, as phytochemical.

### **CONFLICT OF INTERESTS**

The authors have not declared any conflict of interests.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank the National Counsel of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) for the funding granted by means of the CNPq/MEC/CAPES CASADINHO-PROCAD, process 552239/2011-9 and Edital Universal (14/2011) Process 482292/2011-3, and the Food Chemistry Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (Florianópolis - SC), and Institute of Food Technology (Campinas – SP).

### **REFERENCES**

Agostini-Costa TS, Jales KA, Garrutti, DS, Padilha VA, Aguiar J, Lima JB, Paiva J (2004). Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *A. microcarpum* e em oito clones de *A. occidentale* disponíveis no Nordeste do Brasil. *Ciência Rural* 34:1075-1080.

Almeida MMB, Souza PHM, Arriaga AMC, Prado GMP, Magalhães CEC, Mais GAM (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern. Brazil. *Food Res. Int.* 44:2155-2159.

Alvarez-Suarez J M, Tulipani S, Díaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, Damiani E, Astolfi P, Bompadre S, Battino M (2011). Antioxidant and antimicrobial capacity of

several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.* 48:2490-2499.

Andola C, Rawal RS, Bhatt ID (2011). Comparative studies on the nutritive and anti-nutritive properties of fruits in selected berberis species of West Himalaya, India. *Food Res. Int.* 44:2352-2356.

Andrade DF, Ogliare PJ (2010). *Estatística para Ciências Agrárias e Biológicas com noções de Experimentação*, Florianópolis: Editora da UFSC.

Arnous A, Makris D, Kefalas P (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Composit. Anal.* 15:655-665.

Barreto GPM, Souza ACR, Azeredo HMC, Mercadante AZ (2007). Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. *Alimentos e Nutrição* 18:207-213.

Benzie IFF, Strain JJ (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymol.* 299:15- 27.

Bramorski A, Cherem AR, Mezadri T, Melo SS, Deschamps FC, Gonzaga LV, Rockenbach II, Fett R (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil. *Food Res. Int.* 44:2134-2138.

Canuto GA, Xavier AAO, Neves LC, Benassi MT (2010). Caracterização físico química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. *Rev. Bras. Fruticultura* 32:1196-1205.

Dixon RA, Paiva NL (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell, Rockville* 7:1085-1097.



Ferreira ICFR, Barros L, Abreu RMV (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicine Chemistry* 16:1543-1560.

Gordon A, Cruz APG, Cabral LMC, Freitas SC, Taxi CMAD, Donangelo CM, Mattietto MF, Matta VM, Marx F (2012). Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. *Food Chem.* 133:256-263.

Hoehne FC (1979). Enumeração das principais espécies de fruteiras indígenas, pela ordem alfabética de suas famílias. In F.C. Hoehne (Ed.). *Frutas indígenas* pp. 13-79. São Paulo: Instituto de Botânica.

Horwitz W, Latimer JRG (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. Cap. 50, methods 985.35 e 984.27, pp. 15-18.

Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 50:3713-3717.

Lenucci MS, Cadinu D, Taurino M, Piro G, Dalessandro G (2006). Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 54:2606-2613.

Lichtenthäler R, Marx F, Kind OM (2003). Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. *European Food Res. Technol.* 216:166-173.

Lopes MMA, Miranda MRA, II; Moura CFH, Filho, JE (2012) Compostos bioativos e atividade antioxidante total de pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.) durante o amadurecimento de clones de cajueiro anão-precoce 36:325-332.

Marc A, Achille TF, Mory G, Koffi N, Georges NA (2011). Minerals Composition of the Cashew Apple Juice (*Anacardium occidentale* L.) of Yamoussoukro, Cote D'ivoire. *Pakistan J. Nutr.* 10:1109-1114.

Melo EA, Lima VLAG, Maciel MIS (2006). Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Brazilian J. Food Technol.* 19:89-94.

Moo-Huchin VM, Moo-Huchin MI, Estrada-Léon RJ, Cuervas-Glory L, Estrada-Mota IA, Ortiz-Vázquez E, Betancur-Ancona D (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem.* 166:17-22.

Pacheco-Palencia L, Duncan CE, Talcott ST (2009). Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chem.* 115:1199- 1205.

Park YS, Jung ST, Kang SG, Drzewiecki J, Namiesnik J, Haruenkit R (2006). In vitro studies of polyphenols, antioxidants and other dietary indices in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57:107- 122.

Pellegrini N, Colombi B, Salvatore S, Brenna OV, Galaverna G, Rio DD, Bianchi M, Bennett RN, Brighenti F (2007). Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *J. Sci. Food Agric.* 87:103-111.

Price ML, Scoyoc SV, Butler LG (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. 4930 Afr. J. Agric. Res. Food Chem.* 26:1214-1218.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Riceevans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26:1231-1237.

Rocha MS, Figueiredo RW, Araújo MAM, Moreira-Araújo RSR (2013). Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado piauiense. *Rev. Bras. Frutic.* 35:933-941.

Rocha WS, Lopes RM, Silva DB, Vieira RF, Silva JP, Agostini-Costa TS (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Rev. Bras. Frutic.* 33:1215-1221.

Romojaro F, Martínez-Madrid MC, Hidalgo FS (1996). Nuevas tecnologías de conservación de frutas y hortalizas: atmosferas modificadas. Madri: Mundi-prensa.

Rufino MSM, Alves RE, Pérez-Jiménez J, Saura Calixto F, Brito ES, Mancini-Filho J (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 121:996-1002.

Silva MR, Lacerda DBCL, Santos GG, Martins DMO (2008). Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciênc. Rural* 38(1):790-793.

Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-168.

Soares LMV, Shishido K, Moraes AMM, Moreira VA (2004) Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24:202-206.

SPSS (Statistical package for social sciences) (2010). *SPSS Statistics 17.0 Brief Guide*.

<https://www.hks.harvard.edu/fs/pnorris/Classes/A%20SPSS%20Manuals/SPSS%20Statistics%20Brief%20Guide%2017.0.pdf>

Yahia EM (2010). The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health. In L. A. Rosa E. Alvarez-Parrilla, & GA GonzalezAguilara (Eds.). *Fruit and vegetable phytochemicals chemistry nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell: Hoboken.

Zhang X, Koo J, Eun JB (2006). Antioxidant activities of methanol extracts and phenolic compounds in Asian pear at different stages of maturity 15:44-50.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**Versão publicada pela Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento.**

GOMES, S. A., SOUSA, A. V. B., BRITO, M. M., SANTOS, G. M., PORTO, R. G. C. L., MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Avaliação da resposta glicêmica em indivíduos saudáveis após ingestão de mel produzido no Estado do Piauí - Brasil. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v.12, n.71, p.277-284, 2018.

**Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento****ISSN 1981-9919 versão eletrônica**

Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício

**w w w . i b p e f e x . c o m . b r - w w w . r b o n e . c o m . b r***Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento, São Paulo. v.12. n.71.**p.277-284. Maio/Jun. 2018. ISSN 1981-**9919 277***AVALIAÇÃO DA RESPOSTA GLICÊMICA EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS  
APÓS A INGESTÃO DE MEL PRODUZIDO NO ESTADO DO PIAUÍ – BRASIL**Sara Andrade Gomes<sup>1</sup>, Ana Virgínia Brandão de Sousa<sup>1</sup>Marilene Magalhães de Brito<sup>1</sup>, Gleyson Moura dos Santos<sup>1</sup>Rayssa Gabriela Costa Lima Porto<sup>1,2</sup>, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo<sup>1</sup>**RESUMO**

A resposta glicêmica é dependente da velocidade de digestão e absorção dos carboidratos presentes nos alimentos. Considerando a importância da aplicação do índice glicêmico como ferramenta de auxílio à prescrição de dietas, este estudo objetivou avaliar a resposta glicêmica do mel produzido no estado do Piauí. Trata-se de um estudo experimental de abordagem quantitativa e analítica. A amostra de mel foi adquirida no mercado local de Teresina. Foram recrutados 08 voluntários e o mel foi caracterizado quanto ao índice glicêmico (IG) e carga glicêmica (CG), por meio da avaliação da resposta glicêmica após a ingestão do mesmo. Observou-se uma população sedentária saudável. A ingestão do mel provocou elevação da glicemia e pico da resposta glicêmica em 30 minutos, sendo que a partir desse tempo até 60 minutos, verificou-se um acentuado declínio. Posteriormente aos 90 minutos ocorreu um declínio gradual dos níveis de glicemia. O resultado do cálculo sob a curva da resposta glicêmica (IUAC) obtido com a média dos valores de glicemia tanto da glicose quanto do mel demonstrou que, a IUAC da glicose foi de 158,4 e do mel de 111,6 mmol/L. A determinação da resposta glicêmica do mel mostrou resultados de IG de 70,04% podendo classificá-lo como alto IG ( $\geq 70$ ) e elevada CG (24,5 g). Portanto,

apesar de ser um produto amplamente utilizado pela população por conter inúmeros compostos benéficos à saúde deve-se ter atenção ao seu consumo, visto que o mesmo provoca um aumento rápido da glicemia pós - prandial.

**Palavras-chave:** Índice glicêmico; carga glicêmica; mel.

## **ABSTRACT**

The glycemic response is dependent on the rate of digestion and absorption of carbohydrates present in food. Considering the importance of the application of the glycemic index as a tool to aid in the prescription of diets, this study aimed to evaluate the glycemic response of honey produced in the state of Piauí. This is an experimental study with a quantitative and analytical approach. The sample of honey was purchased in the local market of the city of Teresina. Eight volunteers were recruited and the honey was characterized as regards the glycemic index (GI) and glycemic load (GL), by means of the evaluation of the glycemic response after its ingestion. A healthy sedentary population was observed. The ingestion of the honey caused an increase in the glycemia and peak of the glycemic response in 30 minutes, and from that time up to 60 minutes, there was a severe decline. After 90 minutes there was a gradual decline in blood glucose levels. The result of the calculation under the glucose response curve (IUAC) obtained with the average glucose values for both glucose and honey showed that the glucose IUAC was 158.4 mmol / L and the honey was 111.6. The determination of the glycemic response of honey showed GI results of 70.04%, which can be classified as high GI ( $\geq 70$ ) and high GL (24.5 g). Therefore, despite being a product widely used by the population for its content of countless beneficial compounds to health, attention should be paid to its consumption, since it causes a rapid increase in postprandial blood glucose.

**Keywords:** Glycemic index; Glycemic load; Honey.

## INTRODUÇÃO

A dieta é um dos principais fatores modificáveis do estilo de vida e está relacionada com a prevenção de diversas Doenças Crônicas Não Transmissíveis e/ou de suas complicações. Os carboidratos são os principais responsáveis pela glicemia pós-prandial e pela secreção de insulina e estão relacionados com a etiologia de diversas doenças crônicas (Lellan e colaboradores, 2010).

Os carboidratos da dieta estão presentes em grande variedade de alimentos de origem vegetal, que na natureza são as fontes alimentares mais abundantes. As diferenças na composição dos alimentos vegetais, quanto aos tipos e quantidades de carboidratos, tem merecido especial atenção de diferentes pesquisadores, para caracterizar seus efeitos sobre a saciedade, controle de glicemia, peso corporal, lipidemia, fundamentais para a manutenção da saúde (Nascimento, 2012).

A resposta glicêmica é dependente da velocidade de digestão e absorção dos carboidratos presentes nos alimentos. Diferentes fontes de carboidrato variam quanto às suas taxas de absorção e, conseqüentemente, quanto aos seus efeitos sobre as concentrações de glicose, na qual pode ser quantificada através do índice glicêmico dos alimentos (Silva, 2013).

Os conceitos de índice glicêmico (IG) e carga glicêmica (CG) têm sido amplamente investigados como potenciais ferramentas para o planejamento de refeições e/ou para avaliação do risco de doenças associado ao consumo de carboidrato. O IG foi proposto para avaliar e classificar os alimentos com base nas respostas glicêmicas, ou seja, a capacidade que o carboidrato contido em um alimento tem em aumentar a glicemia (Silva e Mello, 2006; Siqueira, Rodrigues e Frutuoso, 2007).

O IG é calculado a partir da glicemia encontrada no sangue, até duas horas após a ingestão do alimento fonte de carboidrato. Portanto, este índice é considerado qualitativo. A diminuição da resposta glicêmica dos alimentos tem sido associada à redução dos riscos de diabetes e doenças cardiovasculares, além de maior controle do tratamento de diabetes (Nascimento, 2012).

Em relação à CG, a mesma fornece o resultado do efeito glicêmico da dieta porque avalia não só a qualidade, mas a quantidade do carboidrato a partir de uma determinada porção consumida na dieta (Moura, Costa, Navarro, 2007).



Assim, observa-se que na literatura são verificadas várias evidências da importância da medida do índice glicêmico, destacando que uma dieta de baixo índice glicêmico apresenta vantagens metabólicas relacionadas ao menor aumento pós-prandial na glicemia. Nesse contexto, dentre os alimentos que tem sido investigado pelos pesquisadores quanto à resposta glicêmica o mel tem se destacado.

O Mel é definido como “o produto alimentício produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores e de secreções procedentes de partes vivas de certas plantas, ou secreções de insetos sugadores de plantas que vivem sobre algumas espécies vegetais que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia”. Além do elevado conteúdo energético, o mel possui enzimas, vitaminas, e a presença de elementos químicos importantes para o bom funcionamento do organismo. Possui ainda a maioria dos elementos minerais essenciais para o organismo humano, especialmente o selênio, manganês, zinco, cromo e alumínio (Brasil, 2000; Pires, 2011; Silva e colaboradores, 2006).

Considerando a importância da aplicação do índice glicêmico como ferramenta de auxílio à prescrição de dietas, o desenvolvimento do presente estudo torna-se importante, visto que o mel é um alimento regional e de elevado valor nutritivo e que é consumido por boa parte da população nordestina. Dessa forma, objetivou-se neste estudo avaliar a resposta glicêmica do mel produzido no estado do Piauí.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

A pesquisa seguiu a resolução específica do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 466/ 2012 de 13 de junho de 2012), tendo os procedimentos metodológicos adotados no presente estudo envolvendo a aplicação dos testes em seres humanos, submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí – UFPI (CAAE: 36625414.4.0000.5214).

Trata-se de um estudo experimental de abordagem quantitativa e analítica, realizado no Laboratório de Avaliação Nutricional do Departamento de Nutrição da UFPI no período de abril de 2014 a Janeiro de 2015.

Foram incluídos no estudo, indivíduos saudáveis, com idades entre 18 e 59 anos, não fumantes e que não possuíam histórico prévio de diabetes e não faziam uso de medicações (exceto anticoncepcionais orais e injetáveis). Quanto aos critérios

de exclusão foram excluídos deste estudo fumantes, portadores de doenças crônicas como diabetes e indivíduos que faziam uso de medicações.

A amostra obtida se deu por conveniência, totalizando um n amostral de oito pessoas, pois segundo, Moura, Costa e Navarro (2007), o procedimento para determinar e validar um índice glicêmico deve ser aplicado, no mínimo a 08 indivíduos saudáveis e utilizando-se a média, tanto do alimento a ser testado quanto do alimento referência.

O recrutamento e seleção desses indivíduos foram feitos mediante uma explicação da pesquisa e convite em sala de aula no departamento de nutrição da universidade em questão. Os indivíduos ao serem abordados foram entrevistados para saber se os mesmos possuíam os critérios de inclusão para participar do estudo.

Quanto ao produto alimentício empregado no estudo (mel) foi adquirido no mercado consumidor local de Teresina - PI. No qual, previamente à compra foi realizada uma pesquisa para verificar quais as marcas mais comercializadas nos supermercados. Dentre as mais comercializadas foi adquirida uma para ser avaliada quanto à resposta glicêmica.

Para se proceder à determinação do IG do mel houve uma etapa preparatória, representada pelo cálculo das quantidades do alimento a ser testado. Para a realização do cálculo foi consultada a tabela de composição de alimentos como fonte de informações sobre o teor de carboidratos no mel (Taco, 2011). De acordo com a referida tabela 100g de mel tem 84 g de carboidratos. A partir desse dado, foi calculada a porção do mel referente a 35 gramas de carboidratos disponíveis.

Em geral os estudos que avaliam a resposta glicêmica dos alimentos utilizam de 25 a 50g de carboidrato disponível na porção do alimento teste/controle. Neste estudo foi utilizada a porção do alimento referente à 35g de carboidrato disponível para viabilizar a ingestão do mel no tempo estipulado, visto que é um alimento de sabor doce e que não permite ingestões de grandes quantidades. Sendo assim, as porções de alimentos utilizados para a avaliação da resposta glicêmica, segundo a quantidade de 35 g de carboidratos disponíveis, foram: alimento controle (glicose), 35 gramas e mel, 42 gramas.

Previamente aos testes, os participantes foram orientados a manterem seus hábitos alimentares e atividades físicas, a não consumirem álcool no dia anterior (24 horas) ao teste, e realizarem jejum de 10 a 12 horas. Foi elaborado um questionário para o registro dos dados pessoais, antropométricos e valores de glicemia de cada

voluntário. No primeiro dia de cada voluntário foram obtidos os dados pessoais e antropométricos, nos quais foram registrados no questionário.

A avaliação antropométrica foi realizada por indivíduo devidamente treinado. A altura dos participantes foi determinada utilizando-se um antropômetro vertical milimetrado, com extensão de 2 m e escala de 0,5 cm. O peso foi obtido utilizando uma balança eletrônica digital, com capacidade de 150 kg. Além disso, foi calculado o Índice de Massa Corpórea (IMC) relacionando o peso (kg) e altura (metros ao quadrado) apresentados (Bray, Gray, 1988).

Quanto aos testes, os mesmos foram realizados durante 04 dias, no período da manhã, após o jejum noturno de 10 a 12 horas. No primeiro, segundo e terceiro dias os voluntários ingeriram glicose (alimento padrão) e logo após foram realizadas as medidas da glicose sanguínea. Esse procedimento se repetiu no quarto dia substituindo, no entanto, a glicose pelo mel. A determinação do IG seguiu o protocolo adotado por Wolever e colaboradores (1991) e FAO/WHO (1998) e as recomendações de Wolever e colaboradores (2008).

A medida da glicemia foi efetuada somente por um único avaliador, devidamente treinado. A concentração de glicose sanguínea foi determinada utilizando um glicosímetro (Accu-Check Active<sup>®</sup>, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Juntamente com o glicosímetro foi utilizado outros materiais necessários para a medida da glicemia, tais como lancetador, lancetas e fitas (Accu-Check Active<sup>®</sup>).

As medições da glicose sanguínea foram realizadas através da coleta de sangue capilar da polpa digital. Após a ingestão do respectivo alimento, e novas glicemias capilares foram obtidas aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Os voluntários tiveram 05 minutos para ingerir o alimento avaliado, podendo consumir até 500 mL de água durante as duas horas do teste.

Posteriormente, foi determinada a curva glicêmica de cada alimento, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010. Após a determinação da curva glicêmica, usando a média dos valores obtidos, realizou-se o cálculo da área sob a curva de resposta glicêmica, que foi realizado geometricamente aplicando-se a regra trapezoidal, a qual considera apenas a área de incremento glicêmico acima do valor de glicose de jejum (Wolever e colaboradores, 1991; FAO/WHO, 1998).

A área sob a curva obtida com o alimento teste dividida pela área sob a curva do alimento padrão foi multiplicada por 100, caracterizando o IG do alimento para cada

voluntário. A determinação do IG do alimento foi realizada a partir da média aritmética simples dos 06 resultados, referentes a cada um dos voluntários.

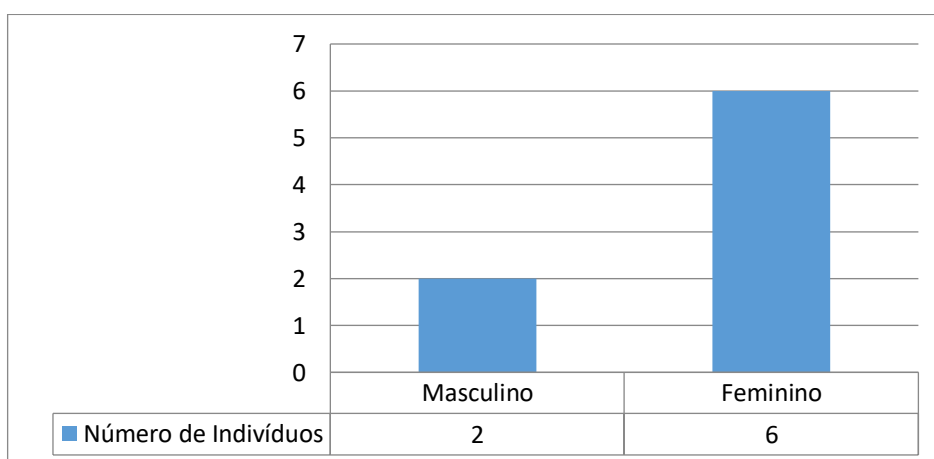
A média dos índices glicêmicos individuais é considerada como o IG do produto testado (Wolever e colaboradores, 1991). E então este valor foi utilizado para calcular a CG que é determinada como produto do IG do alimento e da quantidade disponível existente na porção do alimento [CG= (IG x teor de carboidrato disponível na porção)/100] (Salmeron e colaboradores, 1997).

Para tabulação e análise dos dados foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2010. Os dados foram analisados mediante estatísticas descritivas (frequência, percentual, médias e desvio padrão) e expressos em gráficos e tabelas.

## RESULTADOS

Na figura 1, está apresentada a distribuição dos indivíduos, segundo o sexo. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que entre o total de pessoas estudadas, 75% (n=6) pertenciam ao sexo feminino e 25% (n=2) ao sexo masculino.

**Figura 1.** Distribuição dos indivíduos segundo o sexo. Teresina - PI, 2015.



**Fonte:** Dados da Pesquisa.

A Tabela 1 apresenta a caracterização da população estudada, de acordo com os resultados, os participantes da pesquisa são classificados como eutróficos, pois apresentaram valores de índice de massa corporal dentro dos parâmetros considerados adequados, que é de 18,5 a 24, 9 kg/m<sup>2</sup>.

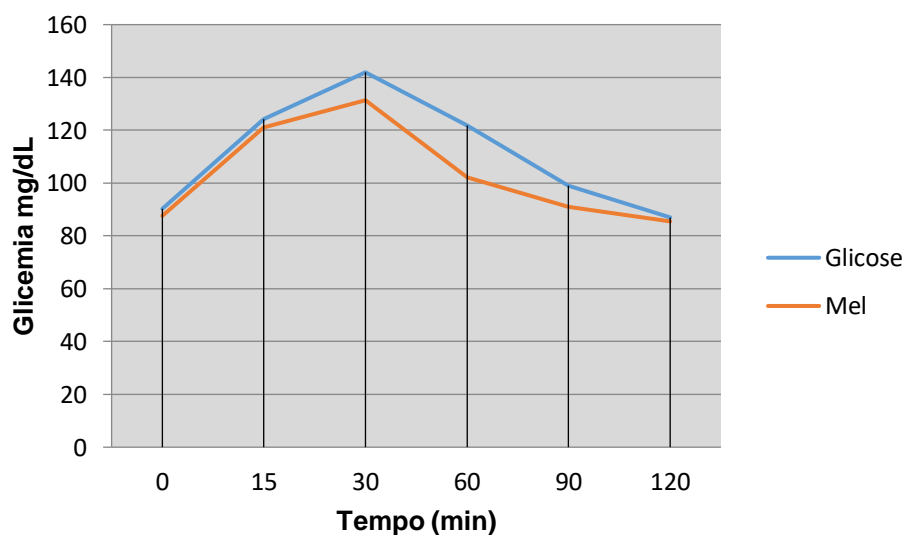
**Tabela 1.** Caracterização da amostra estudada segundo idade, dados antropométricos. Teresina - PI, 2015.

<b>Características</b>	<b>Médias <math>\pm</math> DP</b>
Idade (anos)	22,25 $\pm$ 1,48
Peso (Kg)	59,05 $\pm$ 10,68
Estatutura (m)	1,70 $\pm$ 0,11
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	20,92 $\pm$ 2,43

**Fonte:** Dados da Pesquisa.

A curva referente à resposta glicêmica do mel em comparação à glicose está ilustrada na Figura 2. Observa-se que a ingestão do mel provocou elevação da glicemia e pico da resposta glicêmica em 30 minutos, sendo que a partir desse tempo até 60 minutos, verificou-se um acentuado declínio. Posteriormente aos 90 minutos ocorreu um declínio gradual dos níveis de glicemia.

**Figura 2.** Valores médios de glicemia referente à ingestão de glicose e mel por indivíduos saudáveis. Teresina – PI, 2015.



**Fonte:** Dados da Pesquisa.

**Tabela 2.** Resultado do cálculo da área sob a curva da resposta glicêmica do mel e glicose, índice glicêmico e carga glicêmica do mel. Teresina PI, 2015.

<b>Alimento</b>	<b>* IAUC</b>	<b>**IG (%)</b>	<b>***CG (g)</b>
<b>Padrão (Glicose)</b>	158,4	-	-
<b>Teste (Mel)</b>	111,6	70,04	24,5

\*IUAC: Área incremental sob a curva da resposta da glicose no sangue.

\* IG: Índice glicêmico \*\*CG: Carga glicêmica

**Fonte:** Dados da Pesquisa.

O resultado do cálculo sob a curva da resposta glicêmica (IUAC) obtido com a média dos valores de glicemia tanto da glicose quanto do mel esta apresentado na Tabela 2. Como pode ser observada, a IUAC da glicose foi de 158,4 e do mel de 111,6 mmol/L.

## **DISCUSSÃO**

No presente estudo observou-se uma população sedentária saudável, uma vez que, os valores de índice de massa corporal encontravam-se dentro do considerado adequado, segundo a organização mundial de saúde (WHO, 1998). Em estudo que avaliou os efeitos do consumo prévio de carboidratos sobre a resposta glicêmica e desempenho, a população estudada também se apresentou eutrófica (Sapata, Fayn, Oliveira, 2006).

Em referência a resposta glicêmica do mel em comparação à glicose. Em estudo elaborado por Passos (2012) que avaliou a curva glicêmica de alimentos regionais cearenses observou que a presença, sobretudo de açúcar em alguns alimentos pode ter relação com o formato de sua curva glicêmica, verificando o traçado da curva desses alimentos bem próxima das curvas dos testes com a glicose, com elevação mais prolongada (45 minutos) e queda mais lenta.

Em relação ao pico glicêmico da glicose, os resultados do presente estudo concordam com os resultados obtidos por Brand-Miller e colaboradores (2009) em que analisando um banco de dados de mais de 1000 alimentos avaliou-se o índice glicêmico, a glicemia pós-prandial e a forma da curva em indivíduos saudáveis,

verificou-se que universalmente o pico glicêmico da glicose ocorreu em 30 minutos, e, quase sempre, a menor leitura foi observada em 120 minutos.

No presente estudo, observou-se que aproximadamente aos 80 minutos o traçado da curva voltou à linha de base, ou seja, ao valor da glicemia de jejum. Brand-Miller e colaboradores (2009) observaram que em geral, alimentos açucarados, incluindo refrigerantes e sumos de fruta, independentemente do IG eram mais susceptíveis de voltar à linha de base entre 60 e 75 minutos. Verificou-se uma exceção nas batatas, alimentos ricos em amido que tenderam a permanecer acima da linha de base aos 120 minutos, ou seja, valores de glicemia acima do valor de jejum mesmo após os 120 minutos.

De acordo com o mesmo autor, estes resultados podem ser explicados pelo fato de que os açúcares simples, tais como sacarose, lactose, frutose e qualquer que seja a sua origem, contribui com menos porções de glicose do que amido, 50g de sacarose, por exemplo, contém apenas 25 g de equivalentes de glicose em comparação com 50 g de equivalentes de glicose no amido.

Brand-Miller e colaboradores (2009) afirmam que a curva glicêmica não deve ser observada somente do ponto de vista do cálculo da área sob a curva. Em muitos estudos têm feito este tipo de observação restrita, avaliando apenas a resposta da glicose ou do alimento no sangue geralmente sem levar em conta a forma da curva. Ainda de acordo com esses autores, é possível que os carboidratos de alguns alimentos provoquem um acentuado “pico” na curva glicêmica que possa desaparecer rapidamente, de modo que, ao se realizar o cálculo da área sob a curva, se obtenha um valor aquém ao de referência, constatando-se possivelmente uma área igual a de algum alimento que provoque um aumento e um decréscimo mais graduais na glicemia.

Quanto ao cálculo sob a curva da resposta glicêmica, os resultados deste estudo indica que o mel gerou menores níveis de glicose no sangue, em comparação com o alimento padrão. Em estudo conduzido por Chepulis e Francis (2013) que avaliaram o índice glicêmico de cinco amostras de mel manuka, um tipo de mel produzido por abelhas européias (*Apis mellifera*), também obtiveram resultados da IUAC menor para as amostras de mel em comparação à glicose.

Katare e Rana (2013) avaliaram a resposta glicêmica de duas variedades de doce, uma contendo o mel como adoçante e outro açúcar, as autoras utilizaram 25g de carboidratos disponíveis nos doces, sendo que o valor obtido para a área sob a

curva foi de 114,16 mmol/L para o doce preparado com açúcar e 79,16 mmol/L para doce no qual foi utilizado mel como adoçante.

Quanto ao índice glicêmico do mel do presente estudo, observa-se que resultou no valor de 70,4% em comparação com a glicose, que se pressupõe que tem um resultado de 100%, visto que em 100 g de glicose verificou-se 100 g disponíveis de carboidratos. De acordo com esse resultado o IG do mel é classificado como elevado ( $IG \geq 70$ ).

Robert e Ismail (2009) determinaram o IG do mel selvagem da Malásia e mel Australiano, que está amplamente disponível nesse País. Ao contrário do presente estudo, utilizou-se 50 g de carboidratos disponíveis nas duas variedades de mel e 50 g de glicose diluída em 400 mL de água. Os valores obtidos de IG foram inferiores aos resultados obtidos no presente estudo, sendo de 65 e 59% para o mel da Malásia e Australiano, respectivamente. Arcot e Brand-Miller (2005) relataram valores de IG entre 32 e 75% para oito diferentes méis australianos e norte-americanos.

Na literatura há poucos estudos que avaliam a resposta glicêmica dos méis brasileiros, sendo que especificamente o mel produzido no Piauí não há nenhum estudo que analise o índice glicêmico neste produto. Vale ressaltar que o valor obtido no presente estudo está dentro do intervalo publicado pela tabela internacional de índice glicêmico, na qual o mel tem um valor de IG que varia entre 32 e 87%. Este intervalo provavelmente representa diferenças na composição entre méis, principalmente em relação aos carboidratos.

Uma possível explicação para valor obtido de um alto IG do mel piauiense é o estágio de maturação, no qual influencia diretamente na quantidade e qualidade de carboidratos existentes nesse produto.

Melo et al. (2003) afirmam que quando mais velho for o mel menos sacarose conterà, pois a invertase, enzima incorporada ao néctar pela saliva das abelhas transforma os açúcares, em particular a sacarose, que resulta numa mistura de glicose e frutose.

Em relação a carga glicêmica do mel produzido no Piauí obteve-se um valor de 24,5 g. Sendo assim, verificou-se que o mel analisado possui uma elevada carga glicêmica. Diferentes valores foram verificados no estudo que avaliou a CG de várias amostras de mel, sendo obtidos valores entre 15 e 21 g (Bogdanov e colaboradores, 2008).



A CG considera a quantidade de alimento ingerido e não somente a porção de carboidratos no alimento teste. Segundo Moura, Costa e Navarro (2007), a CG indica uma noção mais real do efeito glicêmico de diferentes porções alimentares, mas precisa ser avaliada com cuidado porque os valores referentes ao tamanho da porção podem variar para cada país e para cada pessoa, podendo, conseqüentemente, induzir possível alteração na quantidade de carboidrato e nos valores da Carga Glicêmica. Portanto, os profissionais da área de saúde devem calcular sua própria Carga Glicêmica usando dados do tamanho de suas porções consumidas e composição de carboidrato.

Passos (2012) discute a importância da metodologia aplicada na avaliação da resposta glicêmica dos alimentos, pois embora o método utilizado seja plenamente validado e amplamente utilizado por outros pesquisadores, é importante também observá-lo criticamente sob este aspecto.

## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o pico glicêmico do mel ocorreu em 30 minutos após a ingestão. Sendo assim, o mel analisado apresentou elevado índice glicêmico e elevada carga glicêmica. Desta forma, ressalta-se que são necessários mais estudos para avaliar a resposta glicêmica das variedades de mel existentes no Piauí e analisar quais os fatores contribuintes para esse resultado.

## **REFERÊNCIAS**

1. Arcot, J.; Brand-Miller, J. A Preliminary Assessment of the Glycemic Index of Honey. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Publication Num: 05/027. Sydney, Austria: Rural Industries Research and Development Corporation, 2005.
2. Bogdanov, S.; Jurendic, T.; Sieber, R.; Gallmann, P. Honey for nutrition and health: a Review. American Journal of the College of Nutrition. Vol. 27. 2008. p. 677-689.
3. Brand-Miller, J.C.; Stockmann, K.; Atkinson, F.; Petocz, P.; Denyer, G. Glycemic index, postprandial glycemia, and the shape of the curve in healthy subjects: analysis of a database of more than 1000 foods. The American Journal of Clinical Nutrition. Vol. 89. 2009. p. 97-105.

4. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Regulamento Técnico de identidade e qualidade do mel. Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000. Brasília. 2000.
5. Bray, G.A.; Gray, D.S. Obesity I: Pathogenesis. *The Western Journal of Medicine*. 1988. p. 149:429-41
6. Chepulis, L.; Francis, E. The glycemic index of Manuka honey. *e-SPEN Journal*. Vol. 8. 2013. p. 22-24.
7. Food and Agriculture Organization/ World Health Organization (FAO/WHO). Carbohydrates in Human Nutrition: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition, n. 66, Rome, 1998.
8. Katare, C.; Rama, S. Acceptability and glycemic response of honey incorporated traditional sweet preparation. *Indian Journal of applied research*. Vol. 3. Num. 4. 2013.
9. Melo, Z.F.N.; Duarte, M.E.M.; Mata, M.E.R.M.C. Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastática em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande. Vol. 5. Num. 1. 2003. p. 89-99.
10. Moura, C.M. A.; Costa, S.A.; Navarro, F. Índice glicêmico e carga glicêmica: aplicabilidade na prática clínica do profissional nutricionista. *Revista brasileira de obesidade, nutrição e emagrecimento*, São Paulo. Vol. 1. Num. 6. 2007. p. 01-11.
11. Nascimento, V.B. Emprego do índice glicêmico e carga glicêmica dos alimentos: uma alternativa na dieta de pacientes com doenças crônicas? *Revista da Associação Brasileira de Nutrição*. Vol. 4. Num.5. 2012. p. 48-54.
12. Passos, T.U. Consumo alimentar cearense: índice glicêmico e carga glicêmica de alimentos regionais e impacto potencial no risco de doenças crônicas não transmissíveis. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – CE. 2012.
13. Pires, R.M.C. Qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera linnaeus* produzido no Piauí. Dissertação de Mestrado. Centro de ciências da saúde, Universidade federal do Piauí. Piauí. 2011.
14. Portero-McLellan, K.C.; Srebernick, S.M.; Meireles, F.; Postali, C.C.; Leandro-Merhi, V.A. Determinação do índice glicêmico e da carga glicêmica de dietas

- hospitalares para indivíduos com diabetes. Cadernos Saúde Coletiva. Rio de Janeiro. Vol. 18. Num. 2. 2010. p. 259-65.
15. Robert, S.D.; Ismail, A.A.S. Two varieties of honey that are available in Malaysia gave intermediate glycemic index values when tested among healthy individuals. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia. Vol. 153. Num. 2. 2009. p. 145-148.
  16. Salmeron, J.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; Wing, A.L.; Willett, W.C. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. JAMA. Vol. 277. Num. 6, 1997. p. 472-477.
  17. Sapata, K.B.; Fayn, A.P.T.; Oliveira, A.R. Efeitos do consumo prévio de carboidratos sobre a resposta glicêmica e desempenho. Revista brasileira de medicina do esporte. Vol. 12. Num. 4. 2006. p. 18-194.
  18. Silva, C.V. Características físico-químicas de mel de capixingui e silvestre da região de Ortigueira- PR. 2013. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina. 2013.
  19. Silva, F.M.; Mello, V.D.F. Índice glicêmico e carga glicêmica no manejo do diabetes melito. Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre – HCPA. Vol. 26. Num. 2. 2006. p. 73-81.
  20. Silva, R.A.; Maia, G.A.; Sousa, P.H.M.; Costa, J.M.C. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. Alimentos e Nutrição Araraquara. Vol.17. Num.1. 2006. p.113-120.
  21. Siqueira, F.R.; Rodrigues, F.L.P.; Frutuoso, M.F.P. Índice Glicêmico como ferramenta de auxílio de prescrição de dietas. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, São Paulo. Vol. 22. Num. 01. 2007. p.54-58.
  22. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAM.4. ed. Campinas. 2011.
  23. [Wolever, T.M.](#); [Brand-Miller, J.C.](#); [Abernethy, J.](#); [Astrup, A.](#); [Atkinson, F.](#); [Axelsen, M.](#); [Björck, I.](#); [Brighenti, F.](#); [Brown, R.](#); [Brynes, A.](#); [Casiraghi, M.C.](#); [Cazaubiel, M.](#); [Dahlqvist, L.](#); [Delport, E.](#); [Denyer, G.S.](#); [Erba, D.](#); [Frost, G.](#); [Granfeldt, Y.](#); [Hampton, S.](#); [Hart, V.A.](#); [Hätönen, K.A.](#); [Henry, C.J.](#); [Hertzler, S.](#); [Hull, S.](#); [Jerling, J.](#); [Johnston, K.L.](#); [Lightowler, H.](#); [Mann, N.](#); [Morgan, L.](#); [Panlasigui, L.N.](#); [Pelkman, C.](#); [Perry, T.](#); [Pfeiffer, A.F.](#); [Pieters, M.](#); [Ramdath, D.D.](#); [Ramsingh, R.T.](#); [Robert, S.D.](#); [Robinson, C.](#); [Sarkkinen, E.](#); [Scazzina, F.](#); [Sison, D.C.](#); [Sloth, B.](#); [Staniforth, J.](#); [Tapola, N.](#); [Valsta, L.M.](#); [Verkooijen,](#)

- [I.](#); [Weickert, M.O.](#); [Weseler, A.R.](#); [Wilkie, P.](#); [Zhang, J.](#) Measuring the glycemic index of foods: interlaboratory study. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 87. Num. 1. 2008. p. 247-257.
24. Wolever, T.M.; Jenkins, D.J.; Jenkins, A.L.; Josse, R.G. The glycemic index: methodology and clinical implication. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 54. Num.5. 1991. p. 846-854.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**Versão publicada pela Current Nutrition and Food Science.**

SOUZA, B. V. C., GALVÃO, L. M. V., VALE, L. C., ROCHA, L. M., CARDOSO, M. L. S., PORTO-LUZ, R. G. L., GONÇALVES, F. B., MOREIRA-ARAÚJOM R. S. R., NUNESM L. C. C. Food Products with Babassu Mesocarp: A review Food Products with Babassu Mesocarp **Current Nutrition and Food Science**, v.14, n.4, p.274-279, 2018.

## Food Products with Babassu Mesocarp: A review

### Food Products with Babassu Mesocarp

Bárbara Verônica Cardoso de Souza<sup>a\*</sup>, Luanne Morais Vieira Galvão<sup>b</sup>, Larice de Carvalho Vale<sup>c</sup>, Lindalva de Moura Rocha<sup>a</sup>, Mônica Larissa Sousa Cardoso<sup>a</sup>, Rayssa Gabriela Costa Lima Porto Luz<sup>d</sup>, Maria Fabrícia Beserra Gonçalves<sup>a</sup>, Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araújo<sup>a</sup>, Lívio César Cunha Nunes<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil; <sup>b</sup>Instituto Federal do Piauí, Teresina, Piauí, <sup>c</sup>Coordenação de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Pícos, Brasil; <sup>d</sup>Instituto Federal do Maranhão, São João dos Patos, Maranhão; <sup>e</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

**Abstract:** *The babassu palm is one of the most important representatives of the palm family in Brazil. The almond and mesocarp are the edible parts of the babassu (Orbignya), used in human food, animal and as medicine. Due to the fact that the babassu mesocarp is rich in starch and other nutrients, the objective of this work was to carry out a technological survey on the use of the mesocarp of babassu in the elaboration of food products such as biscuits, breads and cereal bars. The search for deposited patents was carried out in the databases of the National Institute of Industrial Property (INPI), the European Patent Convention (EPO), the United States Patent and Trademark Office (USPTO) and the World Intellectual Property Organization (WIPO). And the database for the search for scientific articles was the Web of Science. When the "babassu and mesocarp" combinations were searched, seven patents were deposited with INPI. And among articles related to keywords, only one article was related to human food. In general, these results demonstrate a perspective of the technological application of the babassu mesocarp in the elaboration of food products, being a promising area.*

**Keywords:** babassu, mesocarp, foods, cereal bar, bread, cookies.

## 1. Introduction

The babassu palm is one of the most important representatives of the palm family in Brazil. It belongs to the genus *Orbignya* and it has about 20 species in Central, North and South America, distributed from southern Mexico to Peru, Bolivia, and Brazil [1]. The botanists differ regarding to the classification of the babassu palm, classifying it as *Orbignya oleifera*, *O. martiana*, *O. speciosa*, or even, *O. phalerata* [2]. According to Carvalho [3], the babassu explored in the Piauí State was called *Orbignya speciosa*.

The extractivism of the babassu palm tree is a secular activity in the Brazilian territory, being public and notorious its use as a source of food, energy and material

for building houses. The Brazilians babassus, present in 18.5 million hectares, are concentrated in the Northeast, North and Central-West regions, with a greater emphasis on the Northeast region, in which Maranhão and Piauí States have the biggest potential of almonds and the larger area occupied by cocais [ 2].

The coconut or “coquilho” (fruit of the babassu palm tree) is composed of four main parts: 1) epicarp (15% of the fruit) is the fibrous outer layer, 2) mesocarp (20% of the fruit) is the middle layer between the epicarp and the endocarp, which is fibrous and amylaceous, i.e. rich in starch, 3) endocarp (59% of the coconut) is the inner woody layer where the almonds are housed, and 4) almonds (6% of the coconut) which is white, covered with a brown film, and in each fruit is usually found 3 to 4 almonds [4].

The babassu mesocarp flour has 68.3% of starch; 1.54% of protein; 0.27% of lipids; 1.25% of soluble carbohydrates; and 2.54% of dietary fiber [5]. A phytochemical study, in samples of babassu mesocarp from the states of Piauí and Maranhão, found the presence of tannins, flavonoids, saponins and free anthraquinones [6].

In addition to the nutritional properties, the powder of the babassu mesocarp has antioxidant activity, according to a study by Silva *et al* [7], in which this property of the aqueous extract of *Orbignya phalerata* was evaluated *in vitro*. It is also important to highlight that this raw material has low toxicity once the aqueous extract of the powder of this species was administered orally in mice and no visible clinical signs of toxicity were observed, the general activity of the rats was not altered, as well as their consumption of feed and water. And there was no change on most of the biochemical and hematological parameters studied [7].

Despite the importance of the babassu mesocarp, due to its composition rich in nutrients, fibers and other bioactive compounds, this raw material is still poorly introduced into human food, even though it is an excellent ingredient that can be used in the preparation of new dietary products such as biscuits, breads and cereal bars [1, 6].

---

Based on the above considerations, the aim of this work was to carry out a technological prospection on the uses and applications of the babassu mesocarp (*Orbignya spp.*) in the elaboration of food products, based in the search for patents and articles. In order to search and analyze patents were used the databases of National Institute of Industrial Property (INPI), European Patent Office (EPO), and United States Patent and Trademark Office (USPTO). The articles were researched and analyzed in the Web of Science database.

## 2. Method

The methodology used was the technological monitoring on a national and international patents databases and published scientific articles, in which the babassu mesocarp was cited and/or related to food processing for humans. The bases of patent documents chosen were the National Institute of Industrial Property (INPI), the World Intellectual Property Organization (WIPO), the European Patent Office (EPO), and the United States Patent and Trademark Office (USPTO). The article search was performed in the Web of Science database.

The search strategy was developed by the choice of keywords and by the definition of the monitoring period (2007 to 2017). The search was performed with the insertion of the keywords in the title and/or abstract field, therefore the terms used were *Orbignya*, babassu and mesocarp. A total of 06 combinations were performed between the keywords, for each combination the AND operator was used. In addition to these combinations, patent and article searches were conducted relating the use of the babassu mesocarp in the production of food products such as biscuit, bread and cereal bars.

The crossing of the keywords was performed with the same words in all databases, however it was used the English language when executing the search in an international database. The titles, abstracts and claims were read and the amount of patent and articles were identified, excluding duplications. Those documents were analyzed.

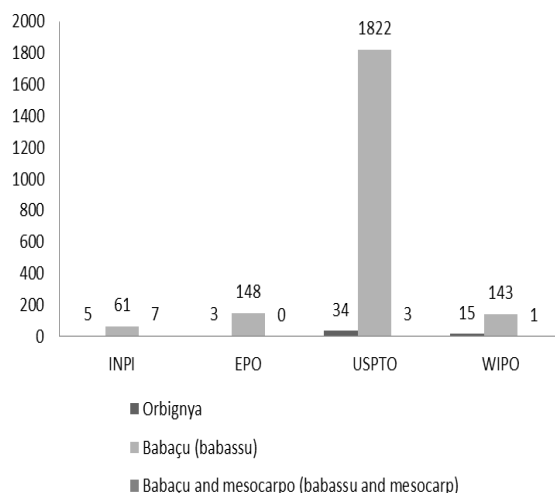
## 3. State of the art on food products with mesocarp babassu

### 3.1 *Patentes*

Eleven patents were deposited with the keywords "babassu mesocarp", in which seven patents were deposited at INPI, three at USPTO and one at WIPO, as shown in Fig. (1). Only in the INPI there was a patent deposited in which the babassu mesocarp was related to Food Technology, and accordingly to the International Patent Classification is in the human needs section (Section A), subclass A23L. This patent referred to the process of producing a nutritive bar, with the babassu mesocarp as an ingredient.

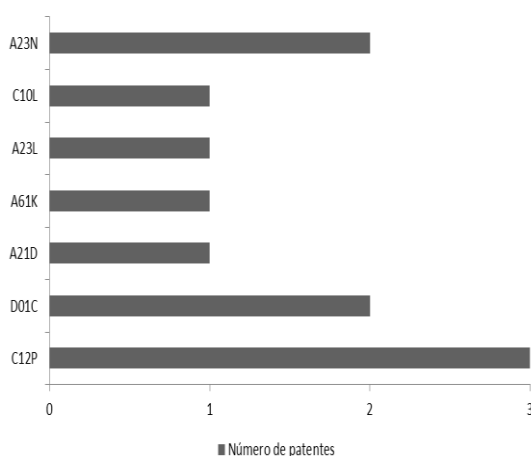


**Fig. (1).** Scope of research, with results of searches in articles and patent databases.



It is shown in Fig. (2) that the most cited sections, using the keywords babassu and mesocarp, were C12P, which covers fermentation processes or that uses enzymes to synthesize a desired chemical composition or compound or to separate optical isomers of a racemic mixture; D01C that deals with natural or manufactured lines or fibers (similar man-made from natural polymers and derivatives); and A23N which refers to machines or apparatus for the treatment of fruits, vegetables or flower bulbs harvested in bulk, not included elsewhere, peeling vegetables or fruit in bulk, and apparatus for the preparation of animal feed.

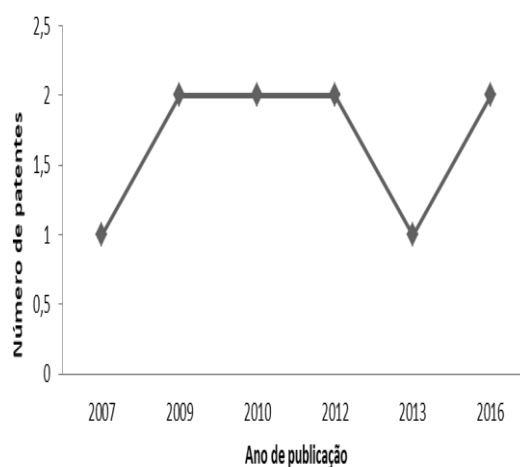
**Fig. (2).** International Patent Classification with babassu and mesocarp keywords.



In the analysis of Fig. (3), is clear that the number of patent applications does not vary much, with a maximum of two patents being deposited per year. The last two patents published in 2016 relate to the extraction of lipids and the production of

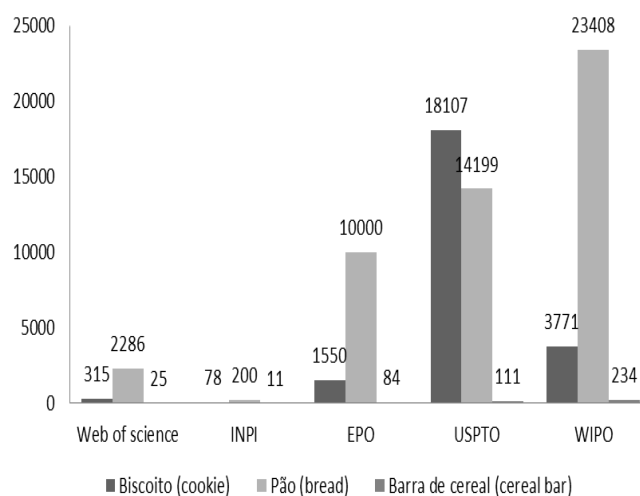
derivates from these lipids from parts of vegetative plants (babassu), such as leaves, stems, roots and tubers. These industrial products include esters that can be mixed with petroleum based fuels. The explanation for a small number of patent applications can be justified by the preference of researchers to publish their research on scientific papers to file patents or even to not publish the results in any way.

**Fig. (3).** Evolution of published patent applications with the keywords babassu and mesocarp.



The Fig. (4) represents the numbers of publications and patents related to the food products of this technological prospection. Despite the elevated number of published articles and patent applications using the keywords "biscuit", "bread" and "cereal bar", only one patent was deposited at the INPI that used the babassu mesocarp as one of the ingredients. This invention consisted in the production of a nutritional bar for human consumption, using as raw material cassava, honey, babassu and cashew, with high nutritional value, rich in carbohydrates, proteins, minerals, vitamins and fiber, bound by a natural binder system (BR 10 2012 004990-2) [8].

The above-cited patent features a product with a high nutritional value, with ingredients rich in carbohydrates, proteins, minerals, vitamins and fibers, bound by a natural binder system (honey, manioc starch, water and sunflower oil), different from the industrialized ones that use chemical additives to obtain such an attribute, being beneficial for the health of the consumer, besides being of low cost and contributes to the reduction of food waste [8].

**Fig. (4).** Number of publications and patents related to food products.

### 3.2 Articles

Regarding to the articles, none was found in which used the mesocarp babassu in human food, in the Web of Sciences database. However, there is an article published in 2016 by Couri and Giada [9], researched at Google Scholar, in which a gluten-free bread based on babassu mesocarp was developed and the physical, chemical and sensorial properties were evaluated. It was proved that the addition of this raw material also improves the nutritive value of foods, increasing the soluble fiber content and reducing the total glycogen content.

This study verified that the use of babassu mesocarp flour in the elaboration of gluten-free bread provided a better behavior of the mass, as to its sustentation and structure, giving rise to breads in the desired format. In the evaluation of the centesimal composition, the bread with the mesocarp of babassu presented high mineral content, as well as soluble and insoluble fibers [9]. This characteristic is important, since dietary fibers have relevant functions in promoting good intestinal functioning, prevent cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus, obesity, dyslipidemias and neoplasms [11, 12, 13, 14, 15].

This bread also presented a decrease in the protein content, which from the technological point of view is an advantage, since these proteins are not gluten-forming and their presence could denature the protein structure of the dough, decreasing the elasticity and the viscosity of the breads [16].

Another important aspect observed in the addition of the babassu mesocarp powder was the reduction of the total glycogen content and, consequently, the caloric value of the formulations. Breads are usually rich in starch and poor in other nutrients [17].

In addition to this article discussed above, which used the mesocarp of babassu, another was found, also in academic google, that made a thermogravimetric study and of the nutritional properties of bread added of this raw material. The results of the addition of the mesocarp, instead of wheat flour, showed a certain similarity with whole breads [18].

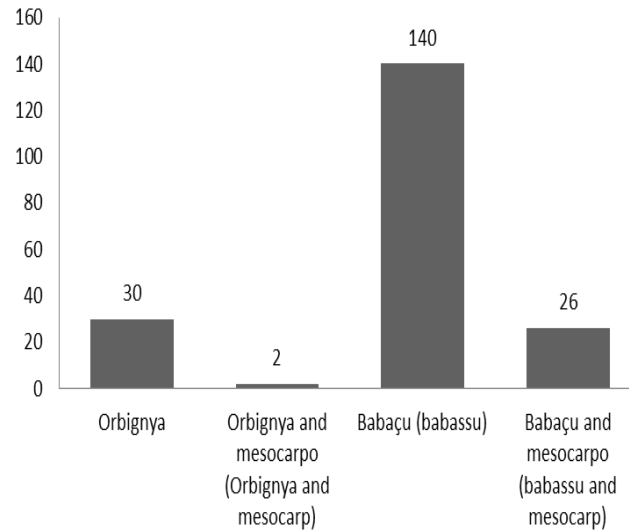
Arévalo-Pinedo et al (2013) developed and evaluated the stability of cereal bars based on dried babassu almond flour (*Orbygnia speciosa*). The cereal bars developed were 10 and 12% dry babassu almond flour. As for the centesimal composition, the cereal bars showed 8.45 to 8.75% humidity; 18.57 to 15.28% protein, 10.96 to 9.52% fat; 26.28 to 26.20% sugars, 0.87 to 0.91% ash, pH 5.38 to 5.39 and 8.48 to 8.75% acidity. During storage at room temperature, there were no significant changes in the physico-chemical characteristics and there was no microbial growth in the two formulations. As for the sensorial analysis, the formulations were well accepted by the tasters, reaching high acceptance rates for all the sensorial attributes evaluated as color, aroma, flavor and texture, with more than 80% of acceptability index [19].

No published articles were found that used the babassu mesocarp flour in biscuits. In relation to the cereal bars, only a deposited patent, already described previously and this publication cited above, which used the almond of babassu and not the mesocarp. Therefore, publications that used babaçu mesocarp meal in substitution for wheat with excellent nutritional results were found in the foods selected for analysis only for bread production, with the need for more food products being developed with this raw material , As well as a wider dissemination of existing products.

There are also some papers published in annals of congress, dissertations of master and work of conclusion of course that showed those showed the use of babassu mesocarp flour as an ingredient in the processing of cookies, bread and cake. This would be a viable alternative to partially or totally replacing wheat flour, and making food products healthier and more nutritious, as well as making these products accessible to food-restricted people, such as celiacs.

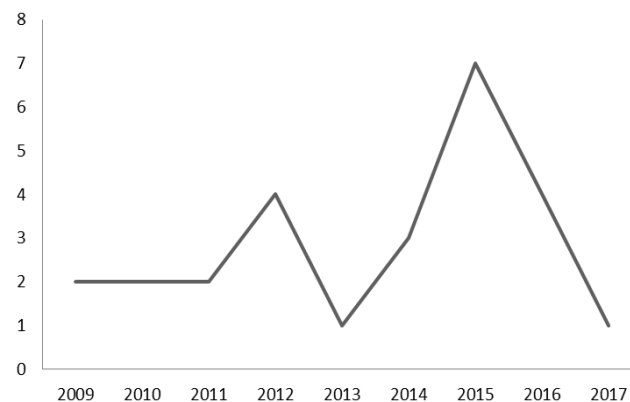
The terms "*Orbignya*", "*Orbignya* and mesocarp", "babassu" and "babassu and mesocarp" were used to search for articles in the Web of Science. It was found 30, 2, 140 and 26 articles, respectively, highlighted in Fig. (5). The two articles found in the search with the keywords "*Orbignya* and mesocarp" are among the 26 articles obtained from the search with the keywords "babassu and mesocarp".

**Fig. (5).** Number of articles published in the Web of Science database with the keywords "Orbignya", "Orbignya and mesocarp", "babassu" and "babassu and mesocarp".



The number of published articles per year during the period from 2007 to 2017, using the keywords "babassu and mesocarp", can be verified in the Fig. (6). A total of 26 publications were obtained from the Web of Science database, in 2015 was observed the highest number of publications totaled 07.

**Fig. (6).** Number of publications per year for "babassu and mesocarp" in the Web of Science database.



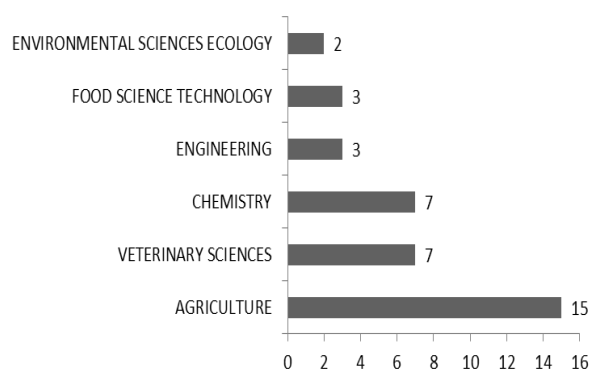
The main area of concentration of articles published in the Web of Science was Agriculture, followed by Veterinary Medicine and Chemistry. Three articles were published in the area of Food Science and Technology (Fig. 7). In the article published

in 2015 [20] was simulated an *in vitro* gastrointestinal digestion of babassu mesocarp, in the absence and in the presence of milk. The lignin was used to evaluate the bioaccessibility of copper, iron and zinc, the results of which showed that the bioaccessibility of these minerals in the milk was not influenced by mesocarp.

Maniglia and Tapia-Blácido [21] published a study on the isolation of babassu mesocarp starch to optimize their chemical composition, crystallinity, particle size, and functional properties. The isolated starch presented a higher antioxidant activity, due to the increased bioavailability of phenolic compounds, therefore making it a functional ingredient to be applied as a raw material in food production.

Another article in the Food Technology field showed that the babassu mesocarp can still be used to produce biodegradable films, due to their chemical composition (amylose, lipids, fibers and total phenolic compounds). The characteristics presented by these biofilms were: stiffness, less soluble, less permeable to water vapor, less hydrophilic and more crystalline. They also presented antioxidant activity, being a great option as packaging or coating for foods that are sensitive to oxidation [22].

**Fig. (7).** Record of publications by concentration area for "*Orbignya* and mesocarp" and "babassu and mesocarp", in the Web of Science database.



It was found in this prospective study that researchers publish more articles than patents, which can be explained by the lack of information about intellectual property, especially in the Food Technology area. Thus, there are still a few studies published about the babassu mesocarp, and there is an open field for new proposals of innovation for human nutrition with this raw material, which is nutritionally rich and has a high technological potential, especially for those who have celiac disease.

#### **4. Conclusions & future trends**

This review shows that there are few studies reporting the use of babassu mesocarp in food processing, in which wheat can be totally or partially replaced by this raw material, adding nutritional value to foods such as breads, biscuits and cereal bars, besides being an alternative for people with celiac disease. Thus, its use has been encouraged, and recently approved the project "Mini social franchises in the productive chain of Coco Babassu", financed by the Federal Government, to strengthen the production chain of babassu in Brazil, due to its potentialities, valuing a product of the chain that is underutilized in human food. Therefore, there is a prospect of studies with the application of the babassu mesocarp as an ingredient for the elaboration of food products.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors confirm that the content of this article has no conflict of interest.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the Federal University of Piauí, the support of the company Babcool and Fitofit, and the reviewers of this article.

#### **REFERENCES**

- [1] Reis DD. Estudo da composição nutricional e dos coeficientes de digestibilidade da farinha amilácea fina do babaçu determinada com suínos nas fases de crescimento e terminação. Dissertação de Mestrado. Ciência Animal Tropical: Universidade Federal do Tocantins 2009.
- [2] Machado GC, Chaves JBP, Antoniassi R. Composição de ácidos graxos e características físico e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. Revista Ceres 2006;53(308): 463-70.
- [3] Carvalho MDF. Aproveitamento Racional do Babaçu. Teresina: UFPI-CNPQ, 2007. 48 p.
- [4] Tavares JC. Universalidade e singularidades do espaço transitório: um estudo a partir de quebradeiras de coco babaçu/MIQCB e trabalhadores rurais sem terra/MST no maranhão (1990 – 2000). Tese de Doutorado. Geografia: Universidade Federal de Santa Catarina 2008.

- [5] Souza, AIP. Efeito do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*, *Arecaceae*) sobre a bioquímica sanguínea em animais com tumor Ehrlich. Dissertação de mestrado. Saúde e Ambiente: Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2008.
- [6] Nonato RC, Ferreira PRB, Sa LLF, Oliveira FA. ; Nunes LCC, Albuquerque WF. Composição centesimal e fitoquímica do mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp*) de regiões do Piauí e Maranhão. *Biofar: Revista de Biologia e Farmácia* 2013;09: 130.
- [7] Silva AP. Cerqueira, GS.; Nunes LC, de Freitas RM. Effects of an aqueous extract of *Orbignya phalerata* Mart on locomotor activity and motor coordination in mice and as antioxidant in vitro. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012;67(3): 260-3.
- [8] Mello, J. C., Nóbrega, F. C. G., Furtado, J. A. L., Muratori, M. C. S., Pereira, M. M. G., Carneiro, R. M. Processo de produção de barra nutritive tendo como ingredients derivados da mandioca, mel, mesocarpo de babaçu, pedúnculo e castanha de caju. BR1020120049902 (2013).
- [9] Couri MHS, Giada MLR. Pão sem glúten adicionado de farinha do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*): avaliação física, química e sensorial. *Revista Ceres* 2016;63(3): 297-304.
- [10] Bernaud FSR, Rodrigues TC. Fibra alimentar ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arq Br Endocrinol e Metab* 2013; 57(6): 397-405.
- [11] Mora BRC, Conde LPO. Avance de resultados sobre consumo de fibra em España y beneficios asociados a ingesta de fibra insoluble. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2010; 16(3): 147-153.
- [12] Paula TP, S T T, Almeida JC, Dall'Alba V, Gross JL, Azevedo MJ. The role of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet food groups in blood pressure in type 2 diabetes. *Br J Nutr* 2012; 108(1): 155-162.
- [13] Santos NZS, Callegari A, Barim EM, Mclellan KCP. Baixo consumo de fibra dietética está associado com adiposidade visceral em usuários de unidade de saúde escola do interior do estado de São Paulo. *Nutrire* 2013; 38(12): 416-420.
- [14] Monteiro FV, Nascimento KO. Associação do consumo do amido resistente na prevenção e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. *Rev Verde Agroecologia Desenvolvimento Sustentável* 2013; 8(5): 12-19.
- [15] Ayala LAC, de França LC. Caracterização e utilização de variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em produtos de panificação." *Rev Bras Tecnologia Agroindustrial* 2011; 5.1s.



- [16] Capriles VD, Arêas JAG. Avanços na produção de pães sem glúten: aspectos tecnológicos e nutricionais. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos 2011; 29:129-136
- [17] Rangel, JH. "Estudo termogravimétrico e das propriedades nutricionais do Mesocarpo de Babaçu [Orbignya Speciosa] em adição ao pão." Acta Tecnológica 2012; (6.2): 12-17.
- [18] Arévalo-Pinedo, Aroldo, et al. "Desenvolvimento de barra de cereais à base de farinha de amêndoa de babaçu (Orbygnia speciosa)." Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais 2013; (15.4): 405-411.
- [20] Fioroto AM, Nascimento AN, Oliveira PV. *In Vitro* Evaluation of Cu, Fe, and Zn Bioaccessibility in the Presence of Babassu Mesocarp. Journal of agricultural and food chemistry 2015;63(28): 6331-7.
- [21] Maniglia BC, Tapia-Blácido DR. Isolation and characterization of starch from babassu mesocarp. Food Hydrocolloids 2016; 55: 47-55.
- [22] Maniglia, BC, Tessaro L, Lucas AA, Tapia-Blácido DR. Bioactive films based on babassu mesocarp flour and starch. Food Hydrocolloids 2017; 70: 383-91.

