



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

MORGANA PEREIRA MITRI

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A QUANTIFICAÇÃO
DE ÁCIDOS ANACÁRDICOS EM PEDÚNCULO DE CAJU**

FORTALEZA

2019

MORGANA PEREIRA MITRI

VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
ÁCIDOS ANACÁRDICOS EM PEDÚNCULO DE CAJU

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Orientador Pedagógico: Prof. Dr. Jair Mafezoli
Orientador profissional: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito

FORTALEZA

2019

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

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

- M671v Mitri, Morgana Pereira.
Validação de método cromatográfico para a quantificação de ácidos anacárdicos em pedúnculo de caju
/ Morgana Pereira Mitri. – 2019.
40 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Química, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Jair Mafezoli.
1. Ácidos anacárdicos. 2. Anacardium occidentale. 3. Cromatografia líquida. 4. CLAE. 5. Pedúnculo de
caju. I. Título.

CDD 540

MORGANA PEREIRA MITRI

VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
ÁCIDOS ANACARDICOS EM PEDÚNCULO DE CAJU

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jair Mafezoli (Orientador Pedagógico)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito (Orientador Profissional)
Embrapa Agroindústria Tropical

Msc. Francisco Oiram Filho (Examinador)
Embrapa Agroindústria Tropical

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força e sabedoria no decorrer desta caminhada.

Aos meus pais, Alaide e Fabio, e aos meus irmãos, Gabriela, Diego e Gabriel, por todo o amor, dedicação e apoio em todas as etapas da minha vida e pelo companheirismo, leveza e alegria, sempre capazes de diminuir o peso de quaisquer momentos difíceis. Por serem meu porto seguro e sempre acreditarem em mim, mais do que eu mesma.

À minha melhor amiga e parceira de graduação, Bruna Marques, pela amizade e por ter dividido comigo todas as dificuldades e conquistas.

Aos orientadores Dr. Edy Sousa de Brito e Dr. Jair Mafezoli por toda a paciência e conhecimentos compartilhados e ao professor Dr. Guilherme Zocolo por todos os ensinamentos e motivação, de grande importância nesta etapa final.

A todos do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da EMBRAPA pelo acolhimento e troca de conhecimentos, em especial Oiram Filho, pelo suporte, paciência e disponibilidade em todos os momentos de dúvidas, tendo sido uma influência direta nesta fase do meu aprendizado.

Aos meus amigos, Virna, Filipe, Lisa, Linda, Barbara, Caroline e Ícaro por terem sido, em algum momento e de alguma forma, meus incentivadores. Por todo o carinho, companheirismo e momentos de descontração.

Aos meus colegas de graduação, Samile, Victor Hugo, Lorena, Thiago e Clinton pela ajuda e conhecimentos compartilhados nesses 4 anos.

A todos os professores que tive desde o ensino básico até a graduação, em especial o professor Vanderley, por todas as contribuições dadas a minha formação profissional e também pessoal.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por todo o suporte e recursos essenciais para a execução desse trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O pedúnculo de caju apresenta alto valor nutricional, possuindo uma grande variedade de compostos fenólicos em sua composição. Entre esses compostos, os ácidos anacárdicos (AcAn) possuem atividade biológica e alto valor comercial, porém influenciam no sabor e conseqüentemente na aceitação do pedúnculo de caju. Apesar das metodologias de quantificação de AcAn descritas na literatura, as pequenas quantidades de AcAn presentes no pedúnculo requerem um método sensível de quantificação. Diante disto, o objetivo desse trabalho foi validar uma metodologia cromatográfica de quantificação de ácidos anacárdicos em pedúnculos de caju. Diferentes clones de caju contendo AcAn foram analisados por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detector de arranjo de díodos (CLAE-DAD) onde foi usada uma coluna cromatográfica de fase-reversa C₁₈ (150 x 4.6 mm x 5 µm). A fase móvel utilizada foi composta de acetonitrila, água e ácido acético numa proporção (80:20:1) de modo isocrático. Utilizou-se oito diferentes concentrações (variando de 1 a 100 µg.ml⁻¹) do padrão externo de AcAn 15:3 obtido por cromatografia preparativa (Grau de pureza = 99,04%). A curva de calibração obtida apresentou valores satisfatórios de precisão para o intra-dia (CV = 0,20%) e inter-dia (CV = 0,29%); linearidade ($y = 2333,5x + 2956,2$; $r^2 = 0,9979$); repetibilidade com relação ao tempo de retenção (CV = 0,45%) e às áreas (CV = 0,30%); seletividade e limites de detecção (0,25 µg.ml⁻¹) e quantificação (1,0 µg.ml⁻¹). Para a determinação do teor de ácidos anacárdicos em amostras reais, utilizou-se o extrato metanólico da polpa de caju, que apresentou um valor médio de eficiência de extração de aproximadamente 90% de ácidos anacárdicos totais em duas extrações sucessivas. Os teores de ácidos anacárdicos totais foram 0,45 mg. 100g⁻¹, 0,74 mg. 100g⁻¹, 1,11 mg. 100g⁻¹, 1,24 mg. 100g⁻¹, 1,24 mg. 100g⁻¹ em amostras de pedúnculos de cinco clones de cajueiro.

Palavras-chave: Ácidos anacárdicos; *Anacardium occidentale*; Cromatografia líquida; CLAE; Pedúnculo de caju.

ABSTRACT

The cashew apple has high nutritional value, having a wide variety of phenolic compounds in its composition. Among these compounds, anacardic acids (AcAn) have biological activity and high commercial value, but influence the taste and consequently the acceptance of cashew apple. Despite the AcAn quantification methodologies described in the literature, the small amounts of AcAn present in the cashew apple require a sensitive method of quantification. Given this, the objective of this work was to validate a chromatographic methodology of quantification of anacardic acids in cashew apples. Samples containing AcAn were analyzed on a high-performance liquid chromatograph coupled to a diode array detector, equipped with a reversed phase C₁₈ (150 × 4.6 mm × 5 μm) column using acetonitrile and water as the mobile phase both acidified with acetic acid in an isocratic mode (80:20:1). Eight different concentrations (varying from 1 to 100 μg.mL⁻¹) of the external standart AcAn 15:3 obtained by preparative chromatography (Purity = 99.04%) were used. The calibration curve obtained presented satisfactory precision values for intra-day (CV = 0.20%) and inter-day (CV = 0.29%); linearity ($y = 2333.5x + 2956.2$; $r^2 = 0.9979$); repeatability with respect to retention time (CV = 0.45%) and areas (CV = 0.30%); selectivity and detection limits (0.25 μg.mL⁻¹) and quantification (1.0 μg.mL⁻¹). For the determination of the amount of anacardic acids in real samples, we used the methanol extract of cashew pulp, which presented an average recovery value of approximately 90% of total anacardic acids in two successive extractions. The total anacardic acid contents were 0,45 mg. 100g⁻¹, 0,74 mg. 100g⁻¹, 1,11 mg. 100g⁻¹, 1,24 mg. 100g⁻¹, 1,24 mg. 100g⁻¹ in cashew apple samples from five cashew clones.

Keywords: Anacardic acids; *Anacardium occidentale*; Liquid chromatography; HPLC; Cashew Apple.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pseudofruto e fruto do cajueiro.	17
Figura 2. Estrutura molecular do ácido salicílico.	19
Figura 3. Estrutura molecular dos ácidos anacárdicos com suas variações na cadeia lateral.	20
Figura 4. Sistema HPLC-DAD analítico.	24
Figura 5. Esquema do processo de extração.	28
Figura 6. Esquema do processo de extração para a quantificação em amostras reais.	28
Figura 7. Perfil cromatográfico do padrão de ácido anacárdico 15:3, monitorado a 280nm.	29
Figura 8. Espectro de ultravioleta dos ácidos anacárdicos trieno (15:3) (I), dieno (15:2) (II), monoeno (15:1) (III) e padrão externo (IV).	30
Figura 9. a) Curva de calibração padrão externo, (n=6) intra-dia; (b) Curva de calibração do padrão externo, (n=9) inter-dia.	31
Figura 10. Porcentagem de ácidos anacárdicos obtidos em cada uma das três extrações para as três amostras de polpa de caju.	33
Figura 11. Etapas da extração a) polpa de caju; b) extratos metanólicos da primeira à terceira extração (da esquerda para a direita) e c) extrato seco da polpa de caju.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do pedúnculo de caju.	18
Tabela 2. Resultados estatísticos para regressão linear da curva de calibração do padrão externo, teste t-Student e teste F, a um nível de confiança de 95 %.....	31
Tabela 3. Resultados estatísticos para precisão intra-dia (n=6) e inter-dia (n=9), obtidos através dos pontos da curva de calibração, expressos em valores para coeficiente de variação (CV) e coeficiente de determinação (r^2).	32
Tabela 4. Resultados estatísticos para repetibilidade expressos em valores de coeficiente de variação (CV) para o tempo de retenção e a área.	32
Tabela 5. Valores de massa em mg e concentração de ácidos anacárdicos em mg/100g de polpa para as extrações 1, 2 e 3 das amostras de pedúnculo de caju.	33
Tabela 6. Concentrações de ácidos anacárdicos trieno, dieno e monoeno em mg/100g de polpa.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcAn	Ácido Anacárdico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LCC	Líquido da Castanha de Caju
DAD	Diode Array Detector
ICH	International Conference of Harmonisation
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	17
3.1 Caju.....	17
3.2 Adstringência	18
3.3 Ácido Anacárdico	19
3.4 Atividade biológica	20
3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	21
3.6 Quantificação de ácidos anacárdicos	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Materiais.....	23
4.1.1 <i>Polpa de Caju</i>	23
4.1.2 <i>Reagentes</i>	23
4.1.3 <i>Equipamentos</i>	23
4.2 Métodos	23
4.2.1 <i>Obtenção do padrão analítico</i>	23
4.2.2 <i>Método Cromatográfico em HPLC-DAD Analítico</i>	24
4.3 Validação do método analítico	25
4.3.1 <i>Seletividade</i>	25
4.3.2 <i>Linearidade</i>	25
4.3.3 <i>Precisão</i>	26
4.3.4 <i>Repetibilidade</i>	27
4.3.5 <i>Limite de detecção e quantificação</i>	27
4.4 Obtenção do extrato metanólico da polpa de caju.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Obtenção do padrão analítico.....	29
5.2 Validação do método analítico	29
5.2.1 <i>Seletividade</i>	29
5.2.2 <i>Linearidade</i>	30
5.2.3 <i>Precisão</i>	31
5.2.4 <i>Repetibilidade</i>	32

<i>5.2.5 Limite de detecção e quantificação</i>	32
5.3 Quantificação em amostras reais	32
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A planta *Anacardium Occidentale Linn* (cajueiro) é uma árvore tropical originária do Brasil, que vem sendo cultivada também na Índia e em países do leste africano. É o pedúnculo do caju (pseudofruto) quem sustenta o verdadeiro fruto do cajueiro, a castanha. O Brasil é o maior exportador e consumidor do pedúnculo do caju, que se apresenta como suculento e fibroso (Morais, 2010).

O pedúnculo do caju tem ganhado relevância devido à suas propriedades farmacológicas e composição, sendo rico em carotenoides, vitamina C e uma grande variedade de compostos fenólicos (Cunha, 2017). Dentre esses compostos fenólicos, os ácidos anacárdicos são derivados do ácido salicílico e estão presentes principalmente em plantas da família Anacardiaceae. Vários estudos comprovaram as atividades biológicas dos ácidos anacárdicos, sendo estas: antitumoral (Huang et al, 2014), antioxidante (Kubo, 2005), antiparasitária (Schultz et al., 2006) e inseticida (Farias et al, 2009).

Apesar dessas características e da utilização na forma de subprodutos (sucos, doces, geleias etc) apenas 15% dos pedúnculos de caju chegam a ser aproveitados já que a adstringência e perecibilidade acabam comprometendo a aceitação e comercialização do produto (Luciano, 2011).

A relação entre a adstringência e os ácidos anacárdicos foi estudada por Mendes (2019), de modo que os pedúnculos de caju considerados mais adstringentes foram aqueles que apresentaram uma maior concentração de ácidos anacárdicos. Devido às características farmacológicas, a elevada quantidade de ácidos anacárdicos presente contribui para o uso do pedúnculo do caju como um alimento funcional, entretanto, diminui a aceitação do pseudofruto devido ao sabor.

Os estudos de quantificação de ácidos anacárdicos em pedúnculo de caju são escassos, já que, por apresentar aproximadamente 60% de ácidos anacárdicos em sua composição (Philip et al, 2008), o líquido da castanha de caju (LCC) é considerado mais relevante. A utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na quantificação de compostos se mostra bastante promissora, sendo capaz de reproduzir resultados de maneira eficiente e precisa (Oiram Filho, 2017). A validação do método seguindo parâmetros já estabelecidos garante uma maior credibilidade dos resultados, desse modo, o desenvolvimento de um método de quantificação possibilitaria o

monitoramento da presença dos ácidos anacárdicos nos pedúnculos de diferentes clones de cajueiros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Validar método cromatográfico para a quantificação de ácidos anacárdicos em pedúnculo de caju.

2.2 Objetivos específicos

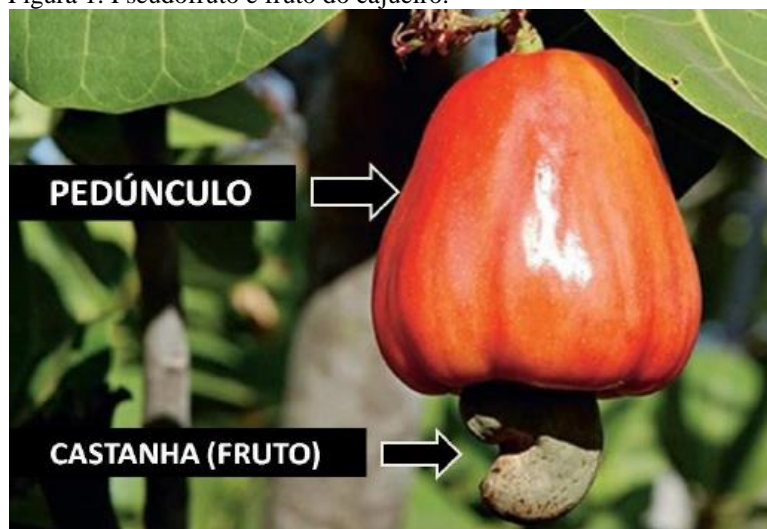
- Obter o extrato metanólico da polpa de caju.
- Isolar o ácido anacárdico 15:3 por cromatografia preparativa.
- Quantificar ácidos anacárdicos em amostras reais de pedúnculos de caju.

3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

3.1 Caju

O cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*), é uma espécie de planta arbórea nativa da América tropical que pode atingir 10-12m de altura. Esta espécie pertence à classe das *dicotiledônias*, ordem *terebinthales*, família Anacardiaceae (Toschi et al, 1993). Seu fruto também é produzido em países tropicais como Índia, Moçambique, Tanzânia e Quênia (Watanabe et al., 2010). O caju apresenta-se constituído por fruto (castanha) e pseudofruto (pedúnculo), como ilustrado na Figura 1, onde a castanha corresponde a 10% do peso do caju (Paiva, 2000).

Figura 1. Pseudofruto e fruto do cajueiro.



Fonte: Mendes, 2019.

O caju é a cultura de maior importância sócio-econômica para a região Nordeste do Brasil. A amêndoa é muito apreciada, constituindo, juntamente com o líquido da casca da castanha (LCC), o principal produto de exportação. O pedúnculo de aparência exótica apresenta alto teor de vitamina C e grande valor nutricional (Agostini-costa, 2004), não sendo comercializado somente *in natura* mas também por meio de diversos subprodutos, como sucos, doces, licores, geleias, pastas, cristalizados, pratos salgados, refrigerantes, vinhos e aguardentes (Faria, 2018). Entretanto, o pedúnculo do caju é pouco valorizado quando comparado com a castanha.

Um dos principais motivos do baixo consumo do caju *in natura* se deve ao fato de seu pedúnculo ser altamente perecível, uma vez que apresenta uma casca muito frágil, dificultando o manuseio e transporte do produto. Ainda, considerando que a maioria dos

produtos vegetais é constituído de 80% de água, sua composição facilita o crescimento microbiano e as reações químicas e bioquímicas (Moura, 2004).

O caju apresenta variação na sua composição química, a qual depende do tipo, clone e região produtora. Os dados médios de composição do caju estão apresentados na Tabela 1 (Paiva et al, 2000).

Tabela 1. Composição química do pedúnculo de caju.

Componente	Valores médios
Umidade (%)	86
pH	4,2
Açúcares redutores (%)	7,9
Açúcares totais (%)	8,4
Ácido ascórbico (mg/100g)	18,5
Taninos (%)	0,35
Cálcio (mg/100g)	14,5

Fonte: Paiva, 2000.

Pesquisadores relataram que o pedúnculo do caju apresenta uma quantidade significativa de ácido anacárdico, vitamina C, carotenoides (Assunção e Mercadante, 2003) e flavonoides (Brito et al, 2007). Contudo, é no líquido da castanha de caju (LCC) onde há a maior quantidade de ácidos anacárdicos, que juntamente com cardois e cardanois, formam 90% da composição do LCC (Neto et al, 2014).

Apesar do seu valor nutricional, o pedúnculo do caju apresenta elevada adstringência, fazendo com que tenha pouca aceitação (Agostini-Costa, 2002).

3.2 Adstringência

A adstringência se refere a um conjunto de sensações na boca frequentemente encontrada em alimentos ricos em taninos. Os taninos são compostos fenólicos que apresentam a capacidade de precipitar proteínas, em particular proteínas salivares na cavidade oral, conferindo uma propriedade conhecida como adstringência. As sensações são: contração do tecido da língua, secura e aspereza na boca (Santos-buelga, 2000; Valentotà, 2003).

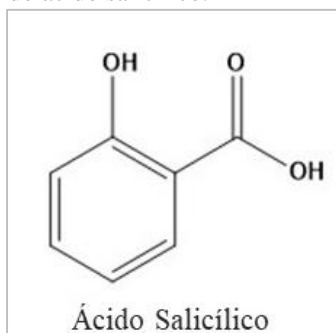
Além dos polifenóis, alguns outros compostos são associados à sensação de adstringência como sais de alumínio, agentes desidratantes (álcool e acetona) e ácidos orgânicos (Bajec, 2008). Estudos mostraram que os ácidos anacárdicos também

contribuem para a adstringência dos pedúnculos de caju, apresentando diferentes intensidades com relação às variações de ácidos anacárdicos presentes (Mendes, 2019).

3.3 Ácido Anacárdico

Os ácidos anacárdicos, com nomenclatura 2-hidroxi-6-pentadecil-benzoico, são compostos fenólicos derivados do ácido salicílico e estão presentes em grande quantidade no caju (Seong *et al*, 2014). São compostos relativamente não polares que apresentam um anel aromático a uma cadeia lateral que pode variar na quantidade de carbonos e de insaturações (Neto et al, 2014). As longas cadeias alquílicas dos ácidos anacárdicos provêm da condensação de ácidos graxos saturados ou insaturados (Morais, 2017).

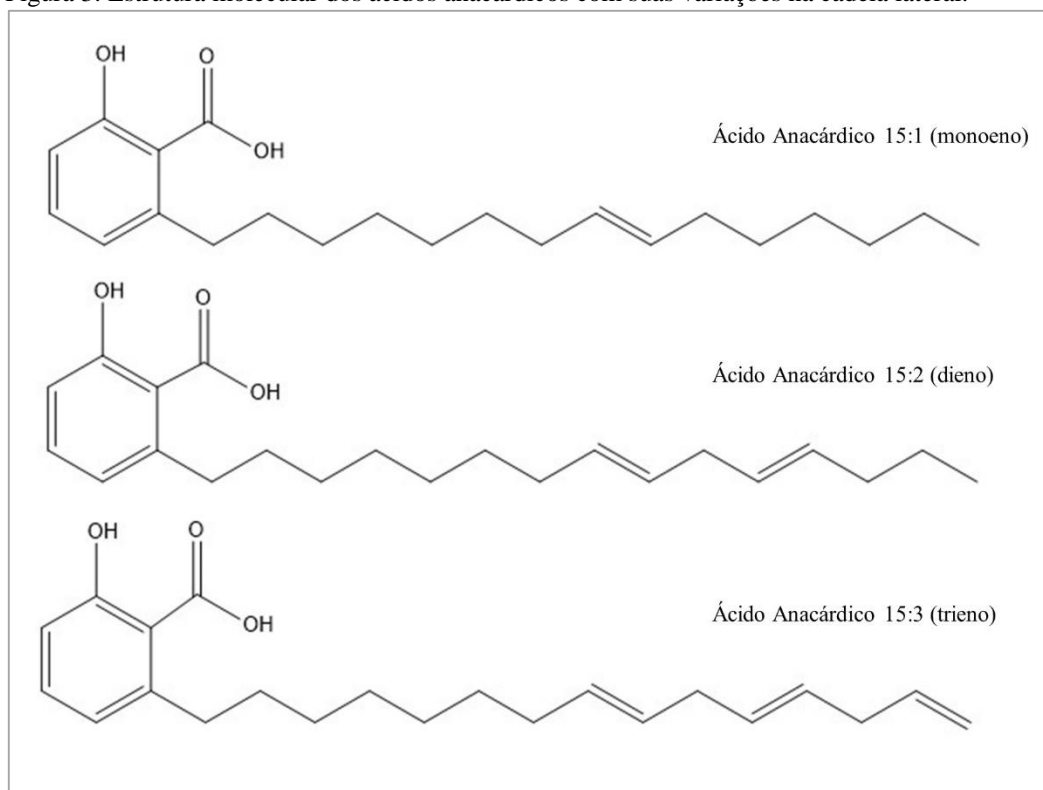
Figura 2. Estrutura molecular do ácido salicílico.



Fonte: Autor.

No caju, são encontrados majoritariamente os ácidos anacárdicos com 15 carbonos na cadeia lateral. Estas cadeias laterais podem conter de uma a três insaturações (figura 3), onde os ácidos anacárdicos se apresentam como monoeno, dieno e trieno (15:1; 15:2; 15:3 respectivamente). Estudos mostraram que o pedúnculo apresenta uma maior quantidade de ácido anacárdico monoeno, enquanto o LCC apresenta o ácido anacárdico trieno como majoritário. A variação na quantidade de insaturações influencia na atividade biológica desses ácidos, podendo ser mais ou menos eficientes dependendo da aplicação (Trevisan, 2006; Morais, 2017).

Figura 3. Estrutura molecular dos ácidos anacárdicos com suas variações na cadeia lateral.



Fonte: Autor.

3.4 Atividade biológica

Os ácidos anacárdicos são compostos interessantes devido à sua variada atividade biológica. A atividade antitumoral foi estudada por Kubo et al (1993a) que sugeriu que o consumo contínuo do pedúnculo, assim como de seus subprodutos, durante períodos prolongados poderia ser vantajoso no controle de tumores, e por Huang et al (2014), onde demonstrou-se a inibição significativa do crescimento de tumores *in vitro* e *in vivo* pelos ácidos anacárdicos. Posteriormente, estes compostos apresentaram potencial para um possível novo medicamento no tratamento do câncer de próstata devido a capacidade de induzir à apoptose celular (Tan *et al*, 2017).

Em função do impedimento da geração de radicais superóxido, os ácidos anacárdicos apresentam atividade antioxidante preventiva, uma característica não encontrada no ácido salicílico (Kubo et al, 2005). Além disto, estudos anteriores realizados por Kubo et al (1993b) já haviam demonstrado a capacidade de inibição de bactérias como *S. aureus*, *P. acnes* e *S. mutans* pelos ácidos anacárdicos, indicando o possível uso desses compostos em problemas causados por essas bactérias especialmente na pele e nos dentes.

A atividade antiparasitária foi observada em um estudo contra larvas de um besouro da batata, *Trypanosoma Cruzi* e pequenas pragas como pulgões e ácaros. A preferência alimentar significativa desses parasitas por substratos que não haviam sido tratados com ácidos anacárdicos foi maior, portanto, a pulverização de plantas com produtos contendo ácidos anacárdicos seria uma ferramenta eficiente na minimização de danos causados por pragas nas plantações (Schultz et al., 2006). Já na forma de anacardato de cálcio, o ácido anacárdico extraído do LCC apresentou eficiência no controle do crescimento do mosquito *Aedes Aegypti*, tornando o anacardato de cálcio uma alternativa viável na substituição dos larvicidas organofosfatados e organofosforados (Farias et al, 2009).

3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Entre os métodos de análise conhecidos, a cromatografia é um método físico-químico que se destaca devido a facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (como a espectrofotometria e a espectrometria de massas) (Collins, 2005). É utilizada especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio e outras (Lanças, 2009).

A Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) é o tipo mais versátil e amplamente utilizado de cromatografia. Emprega uma fase estacionária muito finamente dividida e uma fase móvel líquida, que contém a amostra na forma de uma mistura de solutos (Skoog, 2006). A fase estacionária presente na coluna cromatográfica é composta por sílica com suporte de C8 ou C18 (cadeias carbônicas), o que a torna com uma característica apolar (Snyder, 2012). A separação ocorre por meio da interação de cada componente presente em uma amostra com uma fase estacionária, essa interação pode ser de natureza física (através de processos de adsorção) ou de natureza química (através de troca iônica, interações hidrofóbicas, etc), e estão associadas à estrutura molecular de cada composto e consequentemente à polaridade de cada molécula (Vitolo, 2005 citado em Oiram Filho, 2017).

O processo de separação pode ser em fase reversa ou em fase normal, onde a cromatografia em fase reversa é mais utilizada e consiste em uma coluna apolar e uma mistura de solvente orgânico e água como fase móvel. Existem dois métodos de eluição

da fase móvel: quando há variação do percentual de solvente o método é gradiente e quando a composição da fase móvel permanece constante durante todo o processo o método é chamado de isocrático.

A CLAE pode ser analítica ou preparativa. A cromatografia líquida preparativa é utilizada com a finalidade de fracionar e/ou purificar substâncias em larga escala, devido a possibilidade do uso de maiores volumes, já a analítica é utilizada para quantificação e/ou identificação de compostos. A escala analítica é também considerada uma etapa preliminar ao desenvolvimento de métodos, já que possibilita a adequação dos parâmetros cromatográficos. Apesar de ser uma excelente técnica de separação, deve ser utilizada juntamente à uma técnica instrumental de confirmação da identidade química dos compostos (Lanças, 2009 citado em Mendes, 2019). No uso do método de HPLC-DAD, o rastreamento e detecção dos compostos presentes na amostra é baseado na informação fornecida pelo espectro UV-Vis e pelo tempo de retenção, que são comparados com valores de referência obtidos para os padrões puros (Rocha, 2015).

3.6 Quantificação de ácidos anacárdicos

Ademais de outras metodologias de quantificação, a análise quantitativa de ácidos anacárdicos por HPLC vem sendo empregada principalmente na determinação dos ácidos anacárdicos em LCC por este apresentar grande concentração desses compostos (Oiram filho, 2017; Trevisan et al, 2006; Lima, 1999).

Na determinação em pedúnculos de caju, os teores de ácidos anacárdicos totais encontrados por Agostini-Costa (2003), utilizando clorofórmio; metanol: ácido fórmico como solvente para a extração, via espectroscopia no ultravioleta variaram entre 16,5 e 30,4 mg/100g de pedúnculo. Posteriormente, Agostini-Costa (2004), utilizando a mesma metodologia, determinou os teores de ácidos anacárdicos em pedúnculos de clones de cajueiro no Nordeste, cujo os valores foram superiores aos encontrados anteriormente.

Trevisan et al (2006) determinou a concentração de ácidos anacárdicos via HPLC em diferentes produtos do cajueiro utilizando pedúnculos de caju previamente liofilizados, onde ofereceu valores médios de 0,22g, 0,32g e 0,56g por quilograma de pedúnculo para os ácidos anacárdicos trieno, dieno e monoeno, respectivamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Polpa de Caju

As polpas dos pedúnculos de caju foram gentilmente cedidas pela Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram analisadas amostras provenientes de 5 diferentes clones de cajueiros (207 pro 106/2, planta 115, 213 HI 5892.2, BRS 226 e 301 ATC 276).

4.1.2 Reagentes

Os reagentes usados foram Acetonitrila grau HPLC e Metanol grau HPLC da Lichrosolv Merck (pureza $\geq 99,9\%$); Ácido Acético Glacial P.A. Sigma-Aldrich (pureza $\geq 99,7\%$); e água purificada com sistema Mili Q.

4.1.3 Equipamentos

4.1.3.1 HPLC analítico

Utilizou-se o cromatógrafo Shimadzu LC-20AB Prominence acoplado a um detector de arranjo de diodo Shimadzu SPD-M20A Prominence e com um autosampler Shimadzu SIL-20AC Prominence (Quioto, Quioto, Japão). Os dados foram tratados com o uso do software Shimadzu LC Solution.

4.1.3.2 HPLC preparativo

Utilizou-se o cromatógrafo Waters 2555 – Quaternary Gradiente Module acoplado a um detector UV visível Waters 2489 e com um coletor de fração Waters Fraction Collector III (Dublin, Leinster, Irlanda). O processamento dos dados foi feito através do software Empower Pro.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção do padrão analítico

Os compostos presentes em uma mistura de ácidos anacárdicos foram isolados por cromatografia preparativa, segundo o método descrito por Oiram Filho et al (2019), onde foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFire Prep C₁₈ OBD (100 x 19 mm x 5 μ m). A fase móvel foi usada de maneira isocrática, utilizando como

solventes metanol: água: ácido acético na proporção 90:10:1. O tempo de corrida foi de 35 min, fluxo de eluição de 8 mL.min⁻¹, à temperatura de 25 °C, volume de injeção de 1 mL e concentração de 100 mg.mL⁻¹. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm. Após o isolamento, a pureza do ácido anacárdico 15:3 foi avaliada através do percentual de área dos picos cromatográficos obtidos via HPLC-DAD, todos os picos dentro do LOD foram integrados e seus percentuais de área foram considerados.

4.2.2 Método Cromatográfico em HPLC-DAD Analítico

O procedimento foi conduzido segundo o método desenvolvido por Paramashivappa *et al.* (2001) e otimizado por Oiram Filho (2017), onde foi usada uma coluna cromatográfica de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS (M) C18 (150 x 4.6 mm x 5 µm). A fase móvel foi utilizada de maneira isocrática, sendo composta de acetonitrila, água e ácido acético numa proporção (80:20:1). O tempo de corrida foi de 30 min, com fluxo de 1,5 mL.min⁻¹, à temperatura de 30 °C e com volume de injeção da amostra de 20 µL. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm e a aquisição dos espectros UV foi realizada na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

Figura 4. Sistema HPLC-DAD analítico.



Fonte: Autor.

4.3 Validação do método analítico

A validação do método deve ser feita de modo a avaliar a qualidade e consistência, bem como a confiabilidade dos resultados obtidos. Os parâmetros foram verificados de acordo com o método proposto pela Anvisa (Brasil, 2003), seguindo os critérios de seletividade, linearidade, precisão (intra-dia e inter-dia), repetibilidade, limites de detecção e quantificação.

4.3.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método possui de identificar de maneira inequívoca um determinado analito na presença de outros componentes (ICH, 2005). Para a avaliação da pureza dos picos cromatográficos, levou-se em consideração os espectros de ultravioleta dos mesmos, onde foram comparados com os espectros do padrão, por meio do software Shimadzu LC Solution. Os picos com espectros de ultravioleta (220 a 400 nm) que apresentaram similaridade maior que 95% foram considerados puros.

4.3.2 Linearidade

Foi construída uma curva analítica usando um padrão externo, o ácido anacárdico 15:3, com oito diferentes pontos de concentração: 1; 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Com o objetivo de demonstrar a proporcionalidade entre os valores obtidos e as concentrações da substância, utilizou-se a regressão linear da curva para a obtenção do coeficiente de determinação (r^2). A equação da reta é expressa pela equação:

$$y = ax + b \quad (1)$$

Sendo a e b o coeficiente angular e linear, respectivamente; y a variável dependente e x a variável independente.

Como forma de avaliação da confiabilidade da calibração da curva e da regressão linear, foram aplicados os testes estatísticos t -Student e teste F a um nível de confiança de 95%. Utilizou-se as equações 2, 3 e 4.

$$S^2_y = \frac{\sum(d^2i)}{n-2} \quad (2)$$

$$S^2_a = \frac{S^2_y \cdot n}{D} \quad (3)$$

$$S^2 b = \frac{S^2 y \cdot \sum(x^2 i)}{D} \quad (4)$$

Na qual S_y é o desvio padrão no eixo y ; S_a e S_b o desvio padrão do coeficiente angular (a) e linear (b), respectivamente; x_i é o valor individual de x ; n é o número total de pontos na curva; d_i é o desvio vertical de cada ponto e D é o determinante dado por

$$\begin{vmatrix} \sum x^2 i & \sum x i \\ x i & n \end{vmatrix}.$$

Os desvios padrões calculados foram utilizados segundo as equações 5, 6 e 7 para a obtenção dos valores de $t_{calc(a)}$, $t_{calc(b)}$ e F_{calc} .

$$t_{calc(a)} = \frac{|1-a|}{S_a} \quad (5)$$

$$t_{calc(b)} = \frac{|b|}{S_b} \quad (6)$$

$$F_{calc} = \frac{\frac{S_b}{3}}{\frac{1}{\sum d_i}} \quad (7)$$

Para valores de $T_{calc} > T_{tabelado}$ o parâmetro é significativo a um nível de confiança de 95% e deve permanecer na curva. No caso de valores de $T_{calc} < T_{tabelado}$, o parâmetro não tem significância e pode ser excluído. Para o teste F, é válido que se $F_{calc} > F_{tabelado}$ os parâmetros são significativos a um nível de 95% de confiança para a regressão linear. No caso de $F_{calc} < F_{tabelado}$, independente do coeficiente de determinação (r^2), os parâmetros não possuem significância, indicando que não há relação linear entre os eixos x e y (Oiram Filho, 2017).

4.3.3 Precisão

A precisão foi analisada injetando-se oito diferentes pontos de concentração do padrão externo (1; 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a fim de avaliar a reprodutibilidade. A repetitividade dos pontos, que envolve várias medições da mesma amostra, foi determinada em triplicata e suas médias foram analisadas no mesmo dia (intra-dia) e, posteriormente, as médias foram analisadas em três dias diferentes (inter-dia). A precisão foi calculada a partir dos desvios padrões e coeficientes de variação:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (8)$$

$$Cv = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (9)$$

Onde S é o desvio padrão, n o número de medidas, x_i é o valor individual de cada medição e \bar{x} é a média (Oiram Filho, 2017).

4.3.4 Repetibilidade

Para o ensaio de repetibilidade, que expressa a precisão nas mesmas condições operacionais e em um curto intervalo de tempo, um ponto intermediário da curva de calibração ($40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) foi injetado 10 vezes seguidas. Calculou-se o desvio padrão e o coeficiente de variação a partir dos valores de área e tempo de retenção.

4.3.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção representa a menor concentração na qual uma substância pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Assim como o LD, o limite de quantificação (LQ) é expresso como uma concentração. Este último representa a menor concentração na qual uma substância pode ser quantificada com exatidão e fidelidade.

A utilização do método visual possibilitou a determinação do limite de detecção através da distinção entre o ruído e o sinal analítico da menor concentração visível (detectável). No caso de métodos cromatográficos, o valor mínimo para a quantificação é obtido pela curva de calibração (Ribani et al, 2004).

4.4 Obtenção do extrato metanólico da polpa de caju

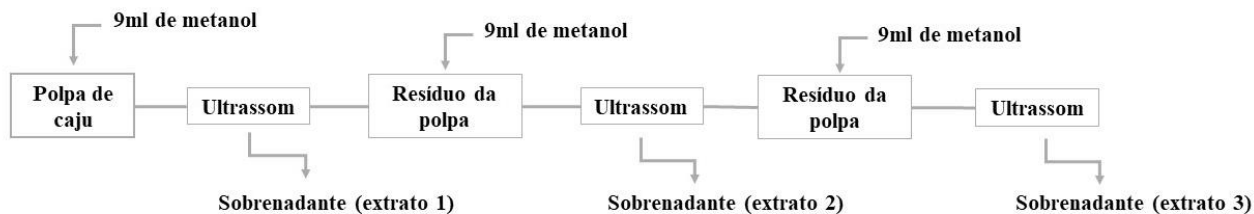
As extrações foram realizadas em triplicata, as massas de extrato obtidas foram solubilizadas em 2 mL de metanol e filtradas em filtros de disco $0,45\mu\text{m}$ para a análise cromatográfica.

4.4.1 Teste Inicial

Para a análise de eficiência da extração, 5g de polpa do pedúnculo do caju foram submetidos à três extrações sucessivas com 9 mL de metanol, assistidas por ultrassom, utilizando o Sonicador Ultrasonic Cleaner 1400 (THORTON/UNIQUE), durante 20 min e posteriormente centrifugadas por 10 min. Os sobrenadantes foram separadamente

filtrados em papel de filtro e secos utilizando-se o Concentrador Plus (EPPENDORF) e nitrogênio para a eliminação do solvente.

Figura 5. Esquema do processo de extração.



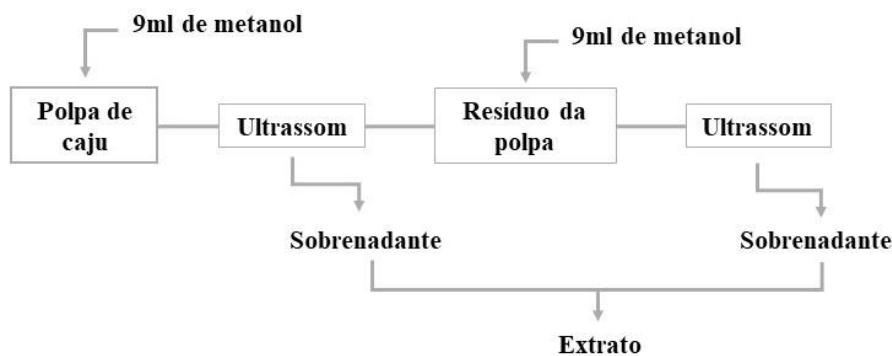
Fonte: Autor.

As massas obtidas foram analisadas para definir o ponto de exaustão do soluto.

4.1.2 Amostras reais

Para a extração de ácidos anacárdicos nas amostras reais, 5g de polpa do pedúnculo do caju foram submetidos à duas extrações sucessivas com 9 mL de metanol, assistidas por ultrassom durante 20 min e posteriormente centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e seco utilizando-se o Concentrador Plus (EPPENDORF) e nitrogênio para a eliminação do solvente.

Figura 6. Esquema do processo de extração para a quantificação em amostras reais.



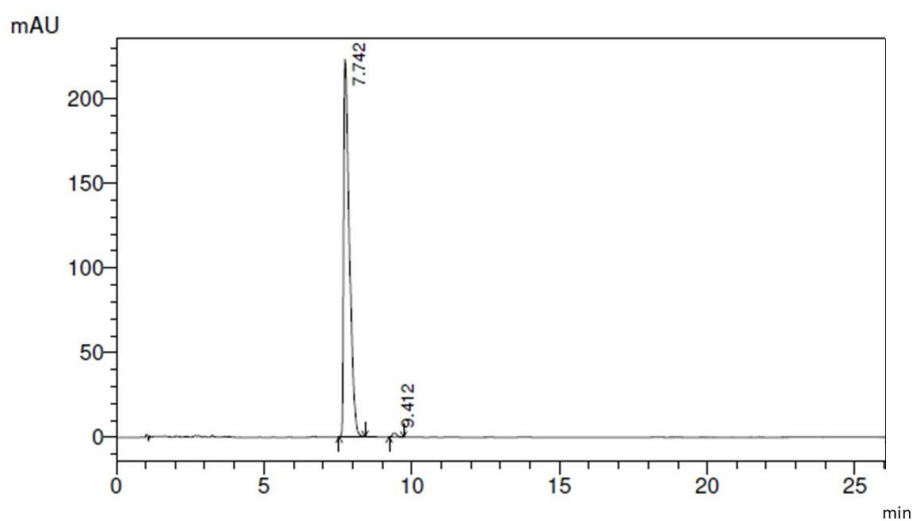
Fonte: Autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do padrão analítico

O padrão analítico do ácido anacárdico 15:3 obtido por cromatografia preparativa foi analisado em HPLC-DAD e a pureza foi determinada a partir das áreas dos picos. Todos os picos foram integrados como mostrado no cromatograma da Figura 7 e os percentuais foram calculados, resultando em um padrão de ácido anacárdico 15:3 com 99,04% de pureza.

Figura 7. Perfil cromatográfico do padrão de ácido anacárdico 15:3, monitorado a 280nm.



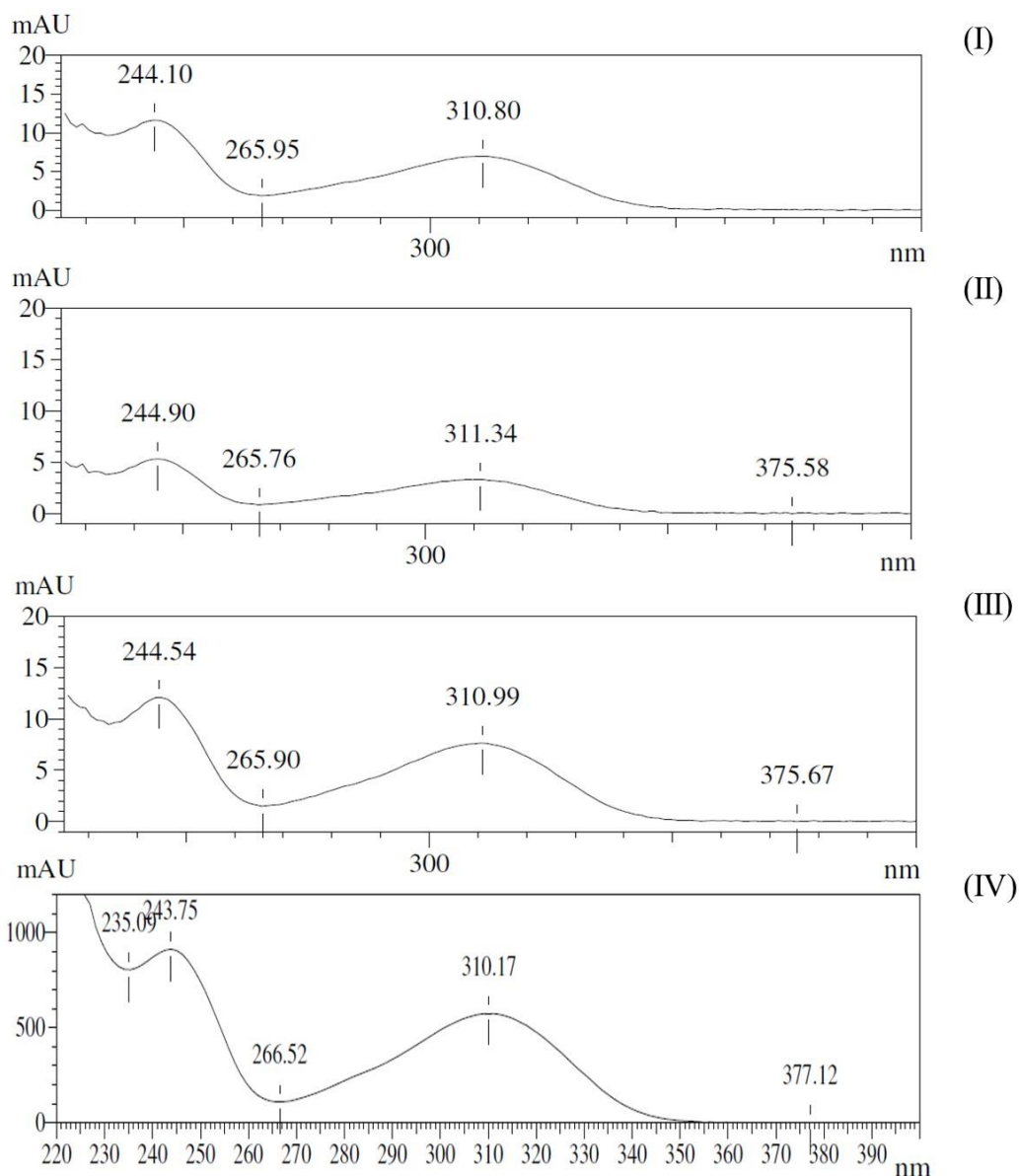
Fonte: Autor.

5.2 Validação do método analítico

5.2.1 Seletividade

Para a análise da seletividade, comparou-se os espectros ultravioleta das amostras com o padrão externo de ácido anacárdico 15:3. Os espectros apresentaram similaridade, confirmando a pureza dos picos.

Figura 8. Espectro de ultravioleta dos ácidos anacárdicos trieno (15:3) (I), dieno (15:2) (II), monoeno (15:1) (III) e padrão externo (IV).

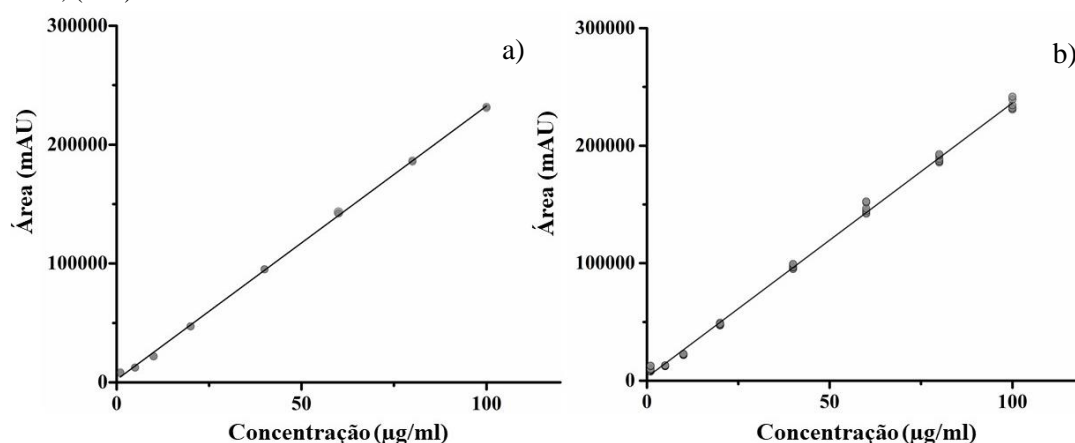


Fonte: Autor.

5.2.2 Linearidade

A curva de calibração foi construída a partir de oito pontos de concentração (1; 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de ácido anacárdico 15:3. Nas Figuras 9a e 9b é possível visualizar a linearidade da curva, que foi confirmada pelo valor do coeficiente de determinação da equação da curva analítica do padrão intra-dia ($y = 2301,7x + 2230,5$) e inter-dia ($y = 2333,5x + 2956,2$). Os coeficientes de determinação encontrados para a curva intra-dia e inter-dia foram respectivamente $r^2 = 0,9993$ e $r^2 = 0,9979$, estando de acordo com o valor aceito ($r^2 \geq 0,990$) pela ANVISA (Brasil, 2003).

Figura 9. a) Curva de calibração padrão externo, (n=6) intra-dia; (b) Curva de calibração do padrão externo, (n=9) inter-dia.



Fonte: Autor.

Os valores para o teste *t*-Student e o teste *F* estão dispostos na Tabela 2, onde o teste *t*-Student representou significância para os parâmetros de calibração da curva e o teste *F* para a regressão linear. Ambos foram avaliados a um nível de confiança de 95%.

Tabela 2. Resultados estatísticos para regressão linear da curva de calibração do padrão externo, teste *t*-Student e teste *F*, a um nível de confiança de 95%.

Padrão	Coeficiente Angular					Curva analítica
	a	S_a	t_{cal}	t_{tab}	Teste t	
Ácido anacardico 15:3	2333,5	15,79	147,63	2,009	Significativo	$y = 2333,5x + 2956,2$
	Coeficiente Linear					
	b	S_b	t_{cal}	t_{tab}	Teste t	
	2956,2	830,91	3,56	2,009	Significativo	
	F_{calculado}		F_{tabelado}		Teste F	
	21812,56		1,576		Significativo	

Fonte: Autor.

A significância do teste *t*-Student para o coeficiente linear e angular evidencia a influencia direta de cada um deles nos valores de quantificação, devendo permanecer na equação da reta. O resultado do teste *F* também foi significativo, mostrando que existe uma relação linear entre os eixos X e Y. Desse modo é possível garantir uma maior confiança aos dados de calibração da curva.

5.2.3 Precisão

Os valores de coeficiente de variação para o tempo de retenção e coeficiente de determinação foram calculados para as curvas intra-dia e inter-dia, sendo $r^2=0,9993$; CV=

0,20% e $r^2=0,9979$; $CV= 0,29\%$, respectivamente. Os coeficientes de variação foram considerados satisfatórios de acordo com a ANVISA (Brasil, 2003).

Tabela 3. Resultados estatísticos para precisão intra-dia (n=6) e inter-dia (n=9), obtidos através dos pontos da curva de calibração, expressos em valores para coeficiente de variação (CV) e coeficiente de determinação (r^2).

Padrão	Intra-dia (n=6)		Inter-dia (n=9)	
	r^2	CV(%)	r^2	CV(%)
Ácido Anacardico 15:3	0,9993	0,20	0,9979	0,29

Fonte: Autor.

5.2.4 Repetibilidade

Os valores de coeficiente de variação para a área e o tempo de retenção (presentes na Tabela 4) foram calculados segundo os valores obtidos a partir das 10 injeções consecutivas do ponto intermediário com concentração de $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para os parâmetros, tempo de retenção e área do pico, foram obtidos CV de 0,45 e 0,30 %, respectivamente. Apesar de não haver uma regra geral, valores até 1% são considerados aceitáveis (Lanças, 2004).

Tabela 4. Resultados estatísticos para repetibilidade expressos em valores de coeficiente de variação (CV) para o tempo de retenção e a área.

Padrão	Repetibilidade	
	Tempo de retenção	Área
Ácido Anacardico 15:3	CV(%) 0,45	CV(%) 0,30

Fonte: Autor.

5.2.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação determinados através do método visual corresponderam respectivamente à $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mostrando a alta sensibilidade do método para a determinação de ácidos anacárdicos.

5.3 Obtenção do extrato metanólico da polpa de caju

5.3.1 Teste Inicial

As massas de extrato obtidas para as extrações 1, 2 e 3 estão presentes na Tabela 5. Os extratos foram utilizados para a quantificação dos ácidos anacárdicos. As

concentrações de ácido anacárdico obtidas a partir das áreas e utilizando-se a equação da curva de calibração estão expressas em mg por 100g de polpa.

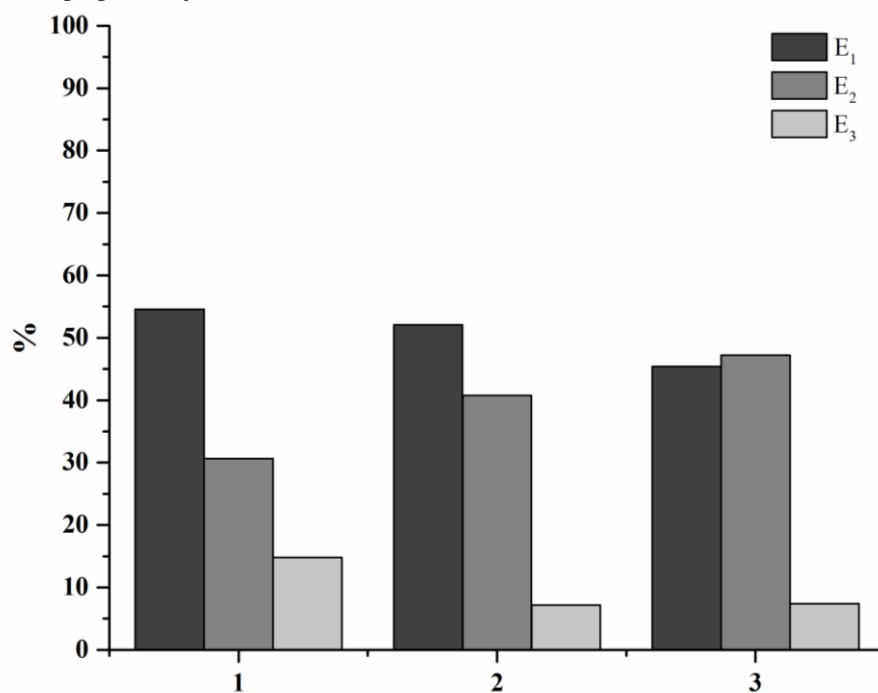
Tabela 5. Valores de massa em mg e concentração de ácidos anacárdicos em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de polpa para as extrações 1, 2 e 3 das amostras de pedúnculo de caju.

	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	Massa (extrato)	Concentração de AcAn	Massa (extrato)	Concentração de AcAn	Massa (extrato)	Concentração de AcAn
Extração1	748,1	3,02	697,2	16,32	751,1	7,95
Extração2	83,2	1,7	72,1	12,77	76,5	8,27
Extração3	33,1	0,82	10,9	2,24	28,3	2,24

Fonte: Autor.

De acordo com os valores de concentração para cada extração, as amostras 1, 2 e 3 apresentaram nas duas primeiras extrações um total de 85,21%, 92,84% e 92,61% de ácidos anacárdicos totais, respectivamente. Desse modo, duas extrações seriam consideradas suficientes para a quantificação, uma vez que a terceira extração foi menor que 15%.

Figura 10. Porcentagem de ácidos anacárdicos obtidos em cada uma das três extrações para as três amostras de polpa de caju.



Fonte: Autor.

A coloração dos extratos metanólicos variou da primeira para as seguintes extrações, sendo as extrações 2 e 3 de intensa coloração amarela (Figura 11). A cor não apresenta relação com a intensidade de ácidos anacárdicos extraídos, já que a cor amarela proveniente do caju é atribuída à grande quantidade de carotenoides e flavonoides presentes em sua composição.

Figura 11. Etapas da extração a) polpa de caju; b) extratos metanólicos da primeira à terceira extração (da esquerda para a direita) e c) extrato seco da polpa de caju.



Fonte: Autor.

5.3.2 Amostras Reais

A concentração de ácidos anacárdicos encontrada nas polpas de pedúnculos de diferentes tipos de cajueiro está presente na Tabela 6. Os valores médios de $22\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para o trieno, $32\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para o dieno e $56\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para o monoeno encontrados por Trevisan et al (2006) são referentes à massa seca do pedúnculo de caju, portanto, levando-se em consideração um valor aproximado de 90% de umidade nos pedúnculos, as concentrações encontradas em massa úmida ficam mais próximas dos valores citados. Ainda assim, os valores mais baixos de concentração obtidos podem ser justificados devido ao diferente método de extração utilizado. Apesar da utilização de metanol ser eficiente para a extração de ácidos anacárdicos, não houve total solubilização do extrato para a análise cromatográfica, além de ter ocorrido perda de ácidos anacárdicos na etapa de filtração com o disco devido a elevada presença de particulados do pedúnculo de caju.

Tabela 6. Concentrações de ácidos anacárdicos trieno, dieno e monoeno em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de polpa.

Amostras (mg/100g)	207 pro 106/2	Planta 115	213 HI 5892.2	BRS 226	301 ATC 276
AcAn 15:3	$0,37 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,10$	$0,14 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,18$
AcAn 15:2	$0,22 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,31$
AcAn 15:1	$0,65 \pm 0,2$	$0,32 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,33$	$0,24 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,48$

Fonte: Autor.

Com exceção do caju proveniente do clone 301 ATC 206, a concentração de ácido anacárdico monoeno foi maior quando comparada ao ácido anacárdico dieno e trieno nas amostras de pedúnculos de caju, resultado também observado por Trevisan (2006). A variação nos teores de ácidos anacárdicos pode ser justificada pelo fato de que os pedúnculos foram provenientes de diferentes cajueiros, apresentando composições químicas variadas.

6 CONCLUSÃO

O método cromatográfico foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo ICH (2005), fornecendo uma curva de calibração com $r^2 = 0,9979$, sendo eficaz na quantificação de ácidos anacárdicos em pedúnculos de caju por apresentar alta sensibilidade (limite de quantificação $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

O ácido anacárdico 15:3 isolado por cromatografia preparativa apresentou elevada pureza (99,04%), possibilitando o uso deste como padrão na construção da curva de calibração.

Os valores das concentrações de ácidos anacárdicos nas amostras reais foram considerados baixos comparados à literatura. Apesar da eficiência da extração com metanol, a utilização de diferentes metodologias de extração e/ou variação de solventes para a solubilização dos extratos obtidos pode ser testada a fim de garantir que uma quantidade considerável de ácidos anacárdicos possa ser quantificada através do método cromatográfico estabelecido.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. nanum disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1075-1080, 2004.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A.; ABREU, L. N.; LIMA, A.; ROSSETTI, A. G.; SILVEIRA, E. R. Determinação de ácidos anacárdicos em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 5, n. 2, p. 77-81, 2003.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, M. V.; LIMA, A.; AGUIAR, M. J.; LIMA J. B.; PAIVAJ. Tanino em pedúnculos de caju: efeito de algumas variações genéticas e climáticas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (B. CEPPA)**, v. 20, n. 2, p. 226-278, 2002. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v20i2.1252>
- ASSUNCAO, 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.
- BAJEC, M. R., PICKERING, G.J. Astringency: Mechanisms and Perception. **CRC critical reviews in food science and nutrition**. V. 48, p. 858-875, 2008.
- BRASIL. **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Resolução RE. nº 899, de 29 de maio de 2003.
- BRITO, E.S. de et al. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium Occidentale* L.) by LC-DAD-ECI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112-1118, 2007.
- COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Editora Unicamp, 2005.
- CUNHA, A.G., BRITO, E.S., MOURA, C.F.H., RIBEIRO, P.R.V., MIRANDA, M.R.A. UPLC–qTOF-MS/MS-based phenolic profile and their biosynthetic enzyme activity used to discriminate between cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) maturation stages. **Journal of Chromatography B** v. 1051, p. 24–32, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.022>
- FARIA, P.A. FONSECA, N.C.P., OLIVEIRA, J.P., BASTOS, G.G. . CAJU: O sabor do nordeste. **Revista de Gastronomia**, v. 1, n. 1, 2018.
- FARIAS, D. F. et al. Insecticidal action of sodium anacardate from brazilian cashew nut shell liquid against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 3, p. 386-389, 2009.
- HUANG, H. et al. Anacardic acid induces cell apoptosis associated with induction of ATF4-dependent endoplasmic reticulum stress. **Toxicology Letters**, v. 228, n. 3, p. 170-178, 2014. ISSN 0378-4274.
- ICH; ICH Harmonized Tripartite: validation of analytical procedures:text and methodology. Q2 (R1) (2005);

- KUBO I, MUROI H, & HIMEJIMA M. Structure - Antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal of Agricultural food Chemicals**, v. 41, p. 1016-1019, 1993b
- KUBO, I. et al. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 555-562, 2005. ISSN 0308-8146.
- KUBO, I., OCHI, M., VIEIRA, P. C. & KOMATSU, S. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1012-1015, 1993a
- LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. In: (Ed.). **Métodos Cromatográficos de Análise**: Rima, v.6, 2004.
- LANÇAS, F.M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- LIMA, C.A. **Estudo dos ácidos anacárdicos do óleo da casca de castanha de caju (CNSL) (*Anacardium occidentale* L) dos clones de cajueiro anão precoce CCP 076 e CCP 09 em cinco estágios de maturação**. 1999. 184f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- LUCIANO, R.C., ARAÚJO, L.F., AGUIAR, E.M., PINHEIRO, L.E.; NASCIMENTO, D.S. Revisão sobre a potencialidade do pedúnculo do caju na alimentação animal. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.5, n.3, p.53-59, 2011
- MATIAS, R. et al . Cashew nut shell liquid and formulation: toxicity during the germination of lettuce, tomato seeds and coffee senna and seedling formation. **Acta Sci., Agron.**, Maringá, v. 39, n. 4, p. 487-495, 2017.
- MENDES, L. M. R. **Isolamento bioguiado dos compostos adstringentes do pedúnculo de caju**. Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Ceara, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Fortaleza, 2019.
- MORAIS, S. M. et al. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 1, p. 31, 2017.
- MORAIS, T.C., PINTO, N.B., CARVALHO K.M., RIOS, J.B., RICARDO, N.M., TREVISAN, M.T., RAO, V.S., SANTOS, F.A. .Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemico Biological Interactions**, v.183, p. 264-269, 2010.
- MOURA, R. S. F.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; SOUSA, A. G.; SILVA, M. M.; OLIVEIRA, A. M. V. Modelagem matemática para isoterma em polpa de caju. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, n.2, p.32-40, 2004.
- NETO, L. et al. Characterization of cytotoxic activity of compounds derived from anacardic acid, cardanol and cardol in oral squamous cell carcinoma. 2014, BioMed Central. p.P30.
- OIRAM FILHO, Francisco et al. Productivity of a preparative high-performance liquid chromatography isolation of anacardic acids from cashew nut shell liquid. **Separation**

Science Plus, [s.l.], v. 2, n. 6, p.192-199, 29 abr. 2019.

<https://doi.org/10.1002/sscp.201900014>

OIRAN FILHO, F. **Isolamento em escala preparativa de ácidos anacárdicos provenientes do líquido da casca da castanha do caju (LCC)**. Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Ceara, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Fortaleza, 2017.

PAIVA, F.F. de A.; GARRUTI, D. dos S.; SILVA NETO, R.M. da. **Aproveitamento Industrial do caju**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT/SEBRAE/CE, 2000. 88p. (Embrapa-CNPAT. Documentos, 38)

PARAMASHIVAPPA, R. et al. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2548-2551, 2001. ISSN 0021-8561.

PHILIP, J. Y. N. et al. Isolation of anacardic acid from natural cashew nut shell liquid (CNSL) using supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9350-9354, 2008. ISSN 0021-8561.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004. ISSN 0100-4042.

ROCHA, T. A. M. C. **Desenvolvimento e validação de um método de HPLC-DAD-FLD para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2015.

SANTOS-BUELGA, C., SCALBERT, A. Review proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agric.**, New York, v. 80, p.1094-1117, 2000.

SCHULTZ, D. J. et al. Bioactivity of anacardic acid against colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7522-7529, 2006. ISSN 0021-8561.

SEONG, Y. et al. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 2, p. 369-377, 2014. ISSN 1085-9195.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; Fundamentos de Química Analítica, tradução da 8ª edição norte-americana, editora Thomson, 2006.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.. **Practical HPLC Method Development, Second Edition**, p. 616-642, 2012b. ISSN 1118592018.

TAN, J., JIANG, X., YIN, G., HE, L., LIU, J., LONG, Z., JIANG, Z., YAO, K. Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway". **Oncology Reports** v. 38, no. 3, p. 1373-1382, 2017. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5841>

TOSCHI, T. G.; CABONI, M. F.; PENAZZI, G.; LERCKER, G.; CAPELLA, P. A study of cashew nut oil composition. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, V. 70, n. 10, p. 1017-1020, 1993.

TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006. ISSN 0278-6915.

VALENTOVÁ, H.; PANOVSÁ, Z. Taste. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition** (Second Edition), p. 5180-5187, 2003

WATANABE, Y.; SUZUKI, R.; KOIKE, S.; NAGASIMA, K.; MOCHIZUKI, M.; FORSTER, R.J.; KOBAYASHI, Y. . In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. **Journal of Dairy Science**, V. 93, n. 11, p. 5258-5267, 2010. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2754>