



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

**FRANCISCO OIRAM FILHO**

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANACARDIACEAE: ESTRATÉGIA  
CROMATOGRÁFICA BIOGUIADA PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* E *MANGIFERA INDICA*)**

**FORTALEZA**

**2024**

FRANCISCO OIRAM FILHO

VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANACARDIACEAE: ESTRATÉGIA  
CROMATOGRÁFICA BIOGUIADA PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS (*ANACARDIUM OCCIDENTALE E MANGIFERA INDICA*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.  
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

- O1v Oiram Filho, Francisco.  
Valorização de resíduos de Anacardiaceae: Estratégia cromatográfica bioguiada para a obtenção de compostos bioativos (Anacardium occidentale e Mangifera indica) / Francisco Oiram Filho. – 2024.  
104 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.  
Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.
1. Mangifera indica. 2. Anacardium occidentale. 3. triterpenos. 4. ácidos anacárdicos. I. Título.  
CDD 660
-

FRANCISCO OIRAM FILHO

VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANACARDIACEAE: ESTRATÉGIA  
CROMATOGRÁFICA BIOGUIADA PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS (*ANACARDIUM OCCIDENTALE E MANGIFERA INDICA*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Bioquímicos.

Aprovada em: 22 / 02 / 2024

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito (Orientador)  
Embrapa Alimentos e Territórios

---

Prof. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Prof. Dr. Kirley Marques Canuto  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Profa. Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues  
Universidade do Vale do Acaraú (UVA)

Aos meus pais,  
Francisco Oiram  
Rosa Maria Pereira Rocha (*in memoriam*),

Que se esforçaram mesmo com todas as  
dificuldades para fornecer bons estudos aos  
seus filhos.

Aos meus irmãos,  
Elke Pereira Rocha e Elton Pereira Rocha

Pela amizade e apoio.

A Antonia Elidiane Gabriel do Amaral,

Por seu amor, companheirismo,  
compreensão e incentivo.

DEDICO.

## **Agradecimentos**

À Deus, por sempre ter iluminado meus caminhos, decisões e sempre me fortalecer nas minhas caminhadas.

À Universidade Federal do Ceará, por me conceder a oportunidade de uma formação acadêmica na graduação, mestrado e no doutorado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) que me apoiou financeiramente durante todo doutorado.

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

Ao Dr. Ebenezer de Oliveira Silva meu orientador durante a graduação, por sempre ter acreditado em meu trabalho e ter me incentivado durante todos esses anos de pesquisa.

Ao meu orientador Dr. Edy Sousa de Brito e co-orientador Dr. Guilherme Julião Zocolo pela orientação, paciência, companheirismo e ensinamentos.

Ao Dr. Kirley Marques Canuto, Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro Dr<sup>a</sup>. Morsyleide de Freitas Rosa e Dr<sup>a</sup>. Tigressa Helena Soares Rodrigues por aceitarem o convite para participar da banca de defesa de tese e ao Dr. Ivanildo José da Silva Junior por todas as contribuições durante a pré-defesa.

A toda a equipe de técnicos e analistas do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais pelo apoio e orientação durante as análises: Dr. Paulo Ricelli, Dra. Lorena Mara, aos amigos de pós-graduação, Carol, Camila, Fátima, Kaline, Regis, Marcelo, Jhony.

Meus agradecimentos a todos os citados e também aos que por esquecimento, não foram citados aqui.

“Deus não escolhe os capacitados,  
capacita os escolhidos. Fazer ou não  
fazer algo, só depende de nossa vontade  
e perseverança”.

Albert Einstein

## RESUMO

Metabólitos secundários são compostos presentes em plantas, possuem alta atividade biológica, estão presentes em frutos, mas também são encontrados em outras partes das plantas, como cascas, folhas e raízes. Dentre esses compostos, triterpenos e fenólicos são classes que possuem bioatividade comprovadas. Portanto, resíduos agroindustriais ricos nesses compostos, podem ser fonte de compostos bioativos, gerando interesse nas indústrias alimentícia e farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver processo de extração e métodos cromatográficos para isolamento bioguiado de compostos em resíduos de Anacardeacea (*Anacardium occidentale* e *Mangifera indica*) para a valorização desse resíduo. A extração dos compostos do pedúnculo do caju foi executada com auxílio de ultrassom de banho, utilizando metanol como solvente em 5 amostras diferentes (CCP09, CCP76, BRS275, BRS285 e EMBRAPA51). Para o extrato da casca da mangueira foi feita extração sólido-líquido com imersão em etanol durante 96 horas à temperatura ambiente. Para avaliação, quantificação e isolamento dos compostos, foram usadas técnicas cromatográficas em escala analítica e preparativa em colunas de fase reversa C<sub>18</sub>. Uma validação de método foi executada para quantificar os compostos extraídos do pedúnculo do caju. Foi executado um fracionamento do extrato oriundo da casca da mangueira visando obter frações biologicamente ativas em atividade anticâncer, para em seguida executar o isolamento bioguiado, visando isolar possíveis compostos com atividade anticâncer. Um ensaio citotóxico foi realizado para avaliar as frações oriundas do extrato da casca da mangueira. Foram avaliadas 3 linhagens cancerígenas, PC3 (próstata), HCT-116 (carcinoma de cólon), SNB-19 (astrocitoma) e 1 saudável L929 (Fibroblasto murino). Também foi feita análise de sobre carga da coluna utilizando cinco cargas de injeção (200, 400, 600, 800 e 1000 mg) visando encontrar um limite de execução de processo. Os resultados obtidos para extração dos ácidos anacárdico do caju foram viáveis, fornecendo quantidades totais que variaram entre 128,35 a 217,00 mg.100 g<sup>-1</sup>. O ensaio citotóxico do extrato da casca da mangueira mostrou resultados para as frações F4, F5, F6 que inibiram 100 % do crescimento celular para todas as células analisadas, F7 obteve 100 % de inibição para 3 linhagens de câncer (SNB-19, HCT-116 e PC3) e F8 inibiu 100 % de 2 linhagens de câncer (HCT-116 e SNB-19). A sobrecarga da coluna apresentou comportamento positivo quanto ao aumento de carga onde a carga de 800 mg apresentou boa quantidade de massa, apresentando parâmetros de desempenho favoráveis. Ao final dos processos foram obtidos por meio do isolamento bioguiado duas classes de compostos, triterpenos e ácidos anacárdicos provenientes das frações com atividade anticâncer. Como conclusão, o pedúnculo de caju se mostrou uma ótima fonte de ácidos anacárdicos, principalmente de monoeno (15:1). A validação do método foi capaz de quantificar os ácidos anacárdicos de maneira fidedigna. As estratégias cromatográficas usadas foram capazes de fornecer compostos isolados (triterpenos e ácidos anacárdicos) com potencias anticâncer oriundos do extrato da casca da mangueira. Definindo também o limite ótimo de processo uma carga de injeção de 800 mg de extrato, com boa produtividade e baixo consumo de solvente. Assim, mostrando a eficiência dos processos e valorização dessas matrizes residuais.

**Palavra chave:** *Mangifera indica*; *Anacardium occidentale*; triterpenos; ácidos anacárdicos.

## ABSTRACT

Secondary metabolites are compounds present in plants, have high biological activity, are present in fruits, but are also found in other parts of plants, such as bark, leaves and roots. Among these compounds, triterpenes and phenolics are classes that have proven bioactivity. Therefore, agro-industrial residues rich in these compounds can be a source of bioactive compounds, generating interest in the food and pharmaceutical industries. The objective of this work was to develop an extraction process and chromatographic methods for bioguided isolation of compounds in Anacardiaceae (*Anacardium occidentale* and *Mangifera indica*) residues for the recovery of this residue. The extraction of compounds from the cashew stalk was carried out using bath ultrasound, using methanol as a solvent in 5 different samples (CCP09, CCP76, BRS275, BRS285 and EMBRAPA51). For the mango bark extract, solid-liquid extraction was carried out with immersion in ethanol for 96 hours at room temperature. For evaluation, quantification and isolation of compounds, chromatographic techniques were used on an analytical and preparative scale on C18 reversed-phase columns. A method validation was performed to quantify the compounds extracted from the cashew stalk. A fractionation of the extract from the mango bark was carried out in order to obtain biologically active fractions with anti-cancer activity, to then carry out bioguided isolation, aiming to isolate possible compounds with anti-cancer activity. A cytotoxic assay was carried out to evaluate the fractions from the mango bark extract. We evaluated 3 cancerous lines, PC3 (prostate), HCT-116 (colon carcinoma), SNB-19 (astrocytoma) and 1 healthy L929 (murine fibroblast). An analysis of column overload was also carried out using five injection loads (200, 400, 600, 800 and 1000 mg) in order to find a process execution limit. The results obtained for the extraction of anacardic acids from cashew were viable, providing total amounts that varied between 128.35 and 217.00 mg.100 g<sup>-1</sup>. The cytotoxic assay of the mango bark extract showed results for fractions F4, F5, F6 that inhibited 100 % of cell growth for all cells analyzed, F7 obtained 100 % inhibition for 3 cancer lines (SNB-19, HCT- 116 and PC3) and F8 inhibited 100 % of 2 cancer lines (HCT-116 and SNB-19). The column overload showed positive behavior in terms of load increase where the 800 mg load presented a good amount of mass, presenting favorable performance parameters. At the end of the processes, two classes of compounds were obtained through bioguided isolation, triterpenes and anacardic acids from fractions with anticancer activity. In conclusion, the cashew stalk proved to be an excellent source of anacardic acids, mainly monoene (15:1). Validation of the method was capable of reliably quantifying anacardic acids. The chromatographic strategies used were able to provide isolated compounds (triterpenes and anacardic acids) with anticancer potential from mango bark extract. Also defining the optimal process limit is an injection load of 800 mg of extract, with good productivity and low solvent consumption. Thus, showing the efficiency of the processes and valorization of these residual matrices.

**Keyword:** *Mangifera indica*; *Anacardium occidentale*; triterpenoids; anacardic acids.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem do Cajueiro: Caracterizada como uma planta perene de estatura mediana e ramificação próxima ao solo, esta árvore é notável principalmente pela produção de sua valiosa castanha..... 23
- Figura 2 - Imagem da Mangueira. Árvore de porte médio a alto da família Anacardiaceae, com copas densas e arredondadas. Sua casca varia do marrom-acinzentado ao preto, apresentando rachaduras e fissuras..... 24
- Figura 3 - Imagem do caju. Considerado pseudofruto, o pedúnculo do caju é uma fruta tropical de características sensoriais marcantes causadas pela adstringência. .... 25
- Figura 4 - Imagem da manga. Fruta de clima tropical do tipo drupa caracterizada por possuir apenas uma semente no seu interior, sensorialmente carnosa e suculenta. .... 27
- Figura 5 - Caju sensorialmente não conforme para comercialização..... 29
- Figura 6 - Resíduos de podas..... 29
- Figura 7 - Estrutura molecular de alguns metabólitos secundários. (a) Ácido anacárdico; (b) Ácido ambólico; (c) Mangiferina..... 31
- Figura 8 - Fluxograma da extração dos ácidos anacárdicos do pedúnculos de caju. .... 40
- Figura 9 - Fluxograma do processo de extração e isolamento dos compostos da casca da mangueira. .... 41
- Figura 10 - Perfil cromatográfico dos AcAn trieno, dieno e monoeno presentes na amostra CCP 76 de pedúnculo de caju, analisado por Uplc-Qtof-MS<sup>E</sup>..... 52
- Figura 11 - Espectros de massa dos AcAn trieno, dieno e monoeno obtidos do perfil cromatográfico da amostra CCP 76, analisado por Uplc-Qtof-MS<sup>E</sup>..... 53
- Figura 12 - Perfil cromatográfico do padrão externo do ácido anacárdico trieno (15:3); (B) Perfil cromatográfico do pedúnculo do caju. Monitorados a 280 nm... 55
- Figura 13 - Espectros UV de (A) padrão externo AcAn trieno (15:3); (B) AcAn trieno (15:3); (C) AcAn dieno (15:2); (D) AcAn monoeno (15:1). Os espectros UV foram gravados entre 220 e 400 nm. .... 56
- Figura 14 - Perfil cromatográfico do extrato da casca da mangueira. Analisado em modo de ionização negativa por Uplc-Qtof-MS<sup>E</sup>..... 64
- Figura 15 - Perfil cromatográfico do extrato bruto da casca da mangueira (1mg.mL<sup>-1</sup>) analisado por HPLC-DAD, monitorado em 280 nm. .... 68
- Figura 16 - Perfil cromatográfico do extrato da casca da mangueira por HPLC preparativo e respectivo fracionamento, monitorado em 280 nm. .... 69
- Figura 17 - Perfil cromatográfico das frações biologicamente ativas (F4, F5, F6, F7 e F8) proveniente do extrato da casca da mangueira, analisado pro HPLC - UV/VIS preparativo..... 73
- Figura 18 - Perfil cromatográfico e respectivo espectro UV do isolamento bioguiado dos compostos proveniente das frações biologicamente ativas, analisado via HPLC – DAD (R-17; R-18 e R-19) ..... 74

Figura 19 - Perfil cromatográfico e respectivo espectro UV do isolamento bioguiado dos compostos proveniente das frações biologicamente ativas, analisado via HPLC – DAD (R-20; R21 e R-22). .....	75
Figura 20 - Perfil cromatográfico e respectivo espectro UV do isolamento bioguiado dos compostos proveniente das frações biologicamente ativas, analisado via HPLC – DAD (R-23; R25 e R-26). .....	76
Figura 21 - Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato da casca da mangueira em escala preparativa com diferentes cargas de injeção (200, 400, 600, 800 e 1000 mg), monitorado em 280 nm.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional do pedúnculo do caju. ....	26
Tabela 2 - Descrição e identificação das amostras para o ensaio citotóxico in vitro. ....	47
Tabela 3 - Tempo de retenção e percentual de pureza da análise de 3 pontos para AcAn trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1). ....	57
Tabela 4 - 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 %.....	58
Tabela 5 - Quantificação de AcAn de trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1) de 5 extrações sequenciais e quantidade total da extração realizada em pedúnculos de caju obtidos de diferentes clones de caju, ambos expressos em mg.100 g- 1.....	61
Tabela 6 - Percentual de recuperação de AcAn trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1) de todas as cinco extrações sequenciais nos diferentes pedúnculos de caju.....	63
Tabela 7 - Anotação dos compostos presentes na casca da mangueira via UPLC-Qtof-MSE. ....	65
Tabela 8 - Dados de detecção dos compostos identificados nas frações analisadas, juntamente com a intensidade de cada composto nas respectivas frações. .	70
Tabela 9 - Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC %) das amostras na concentração única de 100 µg.mL <sup>-1</sup> .....	71
Tabela 10 - Avaliação da concentração inibitória média (CI <sub>50</sub> ) dos compostos frente às linhagens tumorais. ....	72
Tabela 11 - Percentual da pureza dos picos do isolamento bioguiado das frações biologicamente ativas, analisados via HPLC-DAD.....	77
Tabela 12 - Dados de sobrecarga da coluna obtidos com fracionamento do extrato bruto da casca da mangueira em função das diferentes cargas injetadas, expresso em massa (mg). ....	77
Tabela 13 - Resultados de produtividade e consumo de solvente para o sistema HPLC preparativo para cada fração resultante do fracionamento do extrato da casca da mangueira.....	78

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Produção brasileira de manga no período de 2012 a 2022. ....	27
Gráfico 2 - Representação gráfica da média do percentual de inibição do crescimento (IC) do extrato e frações de manga na concentração de a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . ....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcAn	Ácido Anacárdicos
LCC	Líquido da Casca da Castanha
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
TFA	Ácido Trifluoracético
UV	Ultra-Violeta
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
PTFE	Politetrafluoretileno (Teflon)
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
QToF	Triplo Quadropolo Tempo de Voo
MS	Espectro de Massa
MTT	Fenil Brometo de Tetrazolina
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
DMSO	Dimetilsulfóxido
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50 %
IC %	Concentração Inibitória
ESI	Ionização de Electrospray

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\geq$	Maior e igual
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\Sigma$	Somatório
$\text{TM}$	Marca comercial
$\mu$	Micro
<	Menor
$\pm$	Mais ou menos
=	Igual

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
2.1	<b>Anacardiaceae</b> .....	22
2.2	<b>Frutos</b> .....	25
2.3	<b>Resíduos da agroindústria.</b> .....	28
2.4	<b>Metabólitos secundários</b> .....	30
2.5	<b>Ácidos anacárdicos</b> .....	32
2.6	<b>Triterpenos</b> .....	33
2.7	<b>Fracionamento e isolamento bio-guiado</b> .....	34
2.8	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b> .....	35
2.9	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Escala Preparativa</b> .....	36
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
3.1	<b>Químicos</b> .....	37
3.2	<b>Sistema HPLC analítico</b> .....	38
3.3	<b>Sistema HPLC preparativo</b> .....	38
3.4	<b>Obtenção do padrão analítico.</b> .....	38
3.5	<b>Obtenção do extrato do pedúnculo do caju</b> .....	39
3.6	<b>Obtenção do extrato da casca da mangueira</b> .....	40
3.7	<b>Desenvolvimento de método cromatográfico para quantificação de AcAn em pedúnculo de caju</b> .....	41
3.8	<b>Validação do método para quantificação dos AcAn em pedúnculo de caju</b> .....	42
3.8.1	<i>Seletividade</i> .....	42
3.8.2	<i>Linearidade</i> .....	42
3.8.3	<i>Precisão</i> .....	43
3.8.4	<i>Teste de adequação de sistema</i> .....	44
3.8.5	<i>Limite de detecção e quantificação</i> .....	44
3.8.6	<i>Exatidão ou recuperação</i> .....	44
3.9	<b>Condições cromatográficas exploratórias em HPLC analítico (<i>Mangifera indica</i>)</b> .....	45
3.10	<b>Ampliação de escala cromatográfica</b> .....	45
3.11	<b>Condições cromatográficas em HPLC preparativo (<i>Mangifera indica</i>)</b> .....	46

3.12	Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	47
3.13	Condições cromatográficas para isolamento bioguiado das frações bioativas.....	48
3.14	Sobrecarga de coluna e parâmetros de desempenho .....	49
3.15	Condições cromatográficas Uplc-Qtof-MS. ....	50
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	51
4.1	Confirmação estrutural dos AcAn no pedúnculo do caju por Uplc-Qtof-MS .....	51
4.2	Desenvolvimento do método para quantificação dos AcAn .....	54
4.3	Validação do método de quantificação do AcAn .....	55
4.3.1	<i>Seletividade e Linearidade</i> .....	56
4.3.2	<i>Precisão e Teste de adequação de sistema</i> .....	58
4.3.3	<i>Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)</i> .....	59
4.3.4	<i>Exatidão ou recuperação</i> .....	59
4.4	Identificação estrutural dos compostos da casca da mangueira via Uplc-Qtof-MS <sup>E</sup> .....	64
4.5	Perfil exploratório HPLC analítico para o extrato casca mangueira .....	67
4.6	Fracionamento do extrato da casca da mangueira em escala preparativa .....	68
4.7	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	70
4.8	Isolamento bioguiado dos compostos presentes nas frações ativas .....	72
4.9	Parâmetros de desempenho e sobrecarga da coluna .....	77
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82
	<b>APENDICE A – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 1 (MANGIFERINA).</b> .....	93
	<b>APENDICE B – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 4 (ÁCIDO HIDROXI ISOMANGIFERÓLICO).</b> .....	94
	<b>APENDICE C – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 5 (ÁCIDO HIDROXI ISOMANGIFERÓLICO - ISÔMERO).</b> .....	94
	<b>APENDICE D – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 6 (ÁCIDO HIDROXI ISOMANGIFERÔNICO).</b> .....	95

<b>APENDICE E – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 7 (ÁCIDO HIDROXI ISOMANGIFERÔNICO - ISÔMERO).</b>	95
<b>APENDICE F – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 9 (ÁCIDO AMBÓLICO).</b>	96
<b>APENDICE G – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 10 (ÁCIDO ANACÁRDICO - 17:3).</b>	96
<b>APENDICE H – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 11 (ÁCIDO AMBÔNICO).</b>	97
<b>APENDICE I – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 12 (ÁCIDO ANACÁRDICO - 15:3).</b>	97
<b>APENDICE J – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 13 (ÁCIDO ANACÁRDICO - 17:2).</b>	98
<b>APENDICE L – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 13 (ÁCIDO ANACÁRDICO - 17:1).</b>	98
<b>APENDICE M – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO INICIAL OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.</b>	99
<b>APENDICE N – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 1 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.</b>	99
<b>APENDICE O – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 2 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.</b>	100
<b>APENDICE P – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 3 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.</b>	100
<b>APENDICE Q – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 4 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.</b>	101
<b>APENDICE R – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 5 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.</b>	101

<b>APENDICE S – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 6 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup></b> .....	102
<b>APENDICE T – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 7 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup></b> .....	102
<b>APENDICE U – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 8 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup></b> .....	103

## 1 INTRODUÇÃO

Inúmeros compostos que estão presentes em frutas e hortaliças são benéficos à saúde, e isso já é amplamente relatado há várias décadas nas diversas áreas do conhecimento. Esses efeitos benéficos dos vegetais à saúde são atribuídos aos altos níveis de polifenóis, vitaminas, minerais e fibras. Os polifenóis compreendem uma vasta variedade de compostos, que podem ser divididos em diversas subclasses, como os ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóico, antocianinas, proantocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, estilbenos, e lignanas que ocorrem em frutos em geral (DENARDIN *et al.*, 2015).

Esses compostos fenólicos fazem parte de um grupo denominado de metabólitos secundários, assim denominados por não fazerem parte das substâncias essenciais ao metabolismo primário do fruto. Sendo sintetizado em organismos vegetais por uma rota metabólica secundária, onde em geral são sinalizados para uma função de defesa em resposta a algum stress biótico ou abiótico. Outras classes de compostos presentes em frutos que também são considerados metabólitos secundários são, taninos, alcaloides, quinonas e terpenos (WINK, 2015).

Vários desses metabólitos são considerados compostos promissores e com potencial antioxidante, que ajudam a proteger o organismo no tratamento de doenças e efeitos prejudiciais dos radicais livres. Além do mais, outras atividades biológicas são atribuídas aos mais diversos metabólitos secundários, atividade anticâncer, antimutagênica, sedativo, ansiolítico, antiviral, entre outras (KABERA *et al.*, 2014). Portanto, a indústria farmacêutica tem demonstrado um grande interesse nesses diversos compostos, devido essa gama de atividades biológicas conferidas aos metabólitos secundários.

Além da presença significativa desses compostos nos frutos, alguns estudos mostram que os metabólitos secundários, estão em maior quantidade nas folhas e cascas das plantas (SOUSA *et al.*, 2016), devido esses compostos também atuarem como mecanismo de defesa das plantas (WINK, 2015). Com isso, folhas, cascas e outras partes das plantas frutíferas ou não, também se tornam uma ótima fonte para obtenção de novos fármacos, pois são ricos em compostos bioativos de interesse e possuem baixo valor agregado e muitas vezes são considerados matéria-prima residual.

Problemas com logística, embalagens e alta perecibilidade de alguns frutos e hortaliças, causam perdas nos alimentos (FAO, 2022b). No Brasil esses fatores

representam 80 % das perdas, algo em torno de 22 milhões de toneladas por ano (ONU, 2021). Assim, os desperdícios gerados por esses fatores, transformam frutos conformes para o mercado consumidor, em subprodutos não conformes para comercialização. Dentre outras frutas, o caju (*Anacardium occidentale*) se encaixa no perfil onde a formação de subprodutos é comum em toda sua linha de produção, expedição e logística. Dessa forma, o caju não aproveitado nos mercados consumidores se torna uma matéria-prima em potencial para obtenção de biocompostos (ESPARZA *et al.*, 2020).

Outros resíduos de baixo valor agregado e que causam impacto ambiental são os oriundos do cultivo da manga (*Mangifera indica L.*) tais como folhas, galhos e cascas dos galhos. Essa matriz residual vem sendo estudada em função de algumas atividades biológicas envolvendo seus extratos. Tais atividades estão relacionadas a algum efeito benéfico à saúde, seja no tratamento de doenças e/ou prevenção de doenças (PARVEZ, 2016b), com isso mostrando ser uma promissora fonte de compostos biologicamente ativos. No entanto, esses estudos estão voltados apenas para o extrato bruto, que contém uma grande quantidade e diversidade de compostos. Assim, uma maneira de tentar estudar de forma mais específica esses extratos é a aplicação de técnicas cromatográficas de separação, pois são amplamente usadas para separar compostos ou fracionar extratos, possibilitando um estudo mais abrangente em função das atividades biológicas.

Portanto, considerando as questões e desafios relacionados aos resíduos gerados pela agroindústria, especialmente aqueles provenientes das Anacardiaceae, o desenvolvimento de processos e métodos cromatográficos inovadores são fundamentais para seu melhor aproveitamento econômico. Estes métodos têm como objetivo realizar a extração e o isolamento bioguiado de compostos biologicamente ativos, visando não apenas à valorização, mas também ao efetivo aproveitamento desses resíduos. Este enfoque não só propõe uma solução sustentável para o manejo de resíduos, mas também abre caminhos para a descoberta de novas aplicações práticas e comerciais para esses materiais residuais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anacardiaceae

A Anacardiaceae é uma família de plantas com características resiníferas, de folhas estipuladas (SOUZA; LORENZI, 2005), é representada atualmente por 81 gêneros e cerca de 800 espécies, dos quais 14 gêneros e 64 espécies estão registrados no Brasil (ASSIS *et al.*, 2021; PELL *et al.*, 2011). São plantas de grande importância econômica, tanto por seus frutos e produtos derivados, como por seus subprodutos e resíduos, todos ricos em compostos bioativos, dentre elas se destacam duas espécies, o Caju (*Anacardium occidentale*) e a Manga (*Mangifera indica*).

#### *Anacardium occidentale*

O cajueiro (Figura 1) é uma planta tropical, originária do Brasil, distribuída em quase todo território brasileiro, predominantemente cultivada na região nordeste, os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Bahia detém 95 % da produção nacional. Considerado uma planta perene, de porte médio e com ramificação baixa, tem como seu principal produto a castanha (EMBRAPA, 2022). Contudo, o pedúnculo do caju também exerce grande importância comercial, uma vez que pode ser consumido na forma *in natura* ou processado para produção de sucos, geleias, doces e compotas. O caju também tem obtido relevância em nichos de mercados específicos, como o vegano, se tornando uma alternativa de produtos de origem vegetais em substituição aos de origem animal já existente, produtos similares a queijo, leite e até mesmo carne de hambúrguer já são elaborados com produtos oriundos do cajueiro (EMBRAPA, 2022; MITCHELL *et al.*, 2022).

Figura 1 - Imagem do Cajueiro: Caracterizada como uma planta perene de estatura mediana e ramificação próxima ao solo, esta árvore é notável principalmente pela produção de sua valiosa castanha.



Fonte: Autor

### *Mangifera indica*

A mangueira (Figura 2) é uma árvore, de porte médio a alto, possui aspecto frondoso e suas copas cheias e arredondadas. Sua casca tem cor variando de marron-acinzentado ao preto, com aspecto rachado ou mesmo pequenas fissuras e que descamam em pedaços irregulares. Possui uma raiz principal longa e não ramificada, podendo ultrapassar 6 a 8 metros de comprimento, além de uma massa de raízes superficiais que auxiliam na nutrição da árvore. O sistema de raiz de uma mangueira adulta pode atingir 1,2 metros de profundidade e se espalhar lateralmente a uma distância próximo de 8 metros (BOJAPPA; SINGH, 1974; MOUCO, 2010; PARVEZ, 2016a; YADAV *et al.*, 2018). As folhas são dispostas em ramos espirais com formatos oblongos, normalmente com lâminas foliares de 25 cm de comprimento e 8 cm de largura (SHAH *et al.*, 2010).

Figura 2 - Imagem da Mangueira. Árvore de porte médio a alto da família Anacardiaceae, com copas densas e arredondadas. Sua casca varia do marrom-acinzentado ao preto, apresentando rachaduras e fissuras.



Fonte: Autor

Originária do continente asiático foi introduzida no Brasil em dois momentos, inicialmente pelos portugueses durante a colonização, e em outro momento, no século XX com cultivares que vieram da América do Norte. No Brasil, boa parte das variedades cultivadas é destinada a mercados internacionais, são elas: "Tommy Atkins", "Haden", "Keitt", "Kent", "Palmer", "Rosa" e "Espada", cada uma com suas características e aspectos sensoriais (MOUCO, 2010). No entanto, as duas últimas cultivares tem uma participação majoritária no consumo do mercado interno.

Plantas da família anacardiáceas possuem inúmeros compostos bioativos, distribuídos em diversas partes da planta, fruto, folhas, cascas e raízes. Temos como exemplo de anacardiáceas com grande potencial biológico, além da mangueira (*Mangifera indica*), o Cajueiro (*Anacardium occidentale*), a Cajazeira (*Spondias mombins L.*) e a Siriguela (*Spondias purpurea*), todas essas com estudos focados para

compostos bioativos (GUEDES *et al.*, 2020; OIRAM FILHO *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2021)

## 2.2 Frutos

### *Caju (Anacardium occidentale)*

O pedúnculo do caju (Figura 3) apesar de ser considerado um subproduto do cajueiro, onde seu produto de principal é a castanha, teve uma produção mundial em 2021 que ultrapassou 1,3 milhões de toneladas (FAO, 2023), no entanto, além de ter representatividade comercial, o pedúnculo do caju é extremamente rico em carotenoides, flavonoides, ácidos anacárdicos (AcAn), taninos, polifenóis em geral (DAS; ARORA, 2017), vitaminas, minerais (Tabela 1), que auxiliam na prevenção e tratamentos de doenças (RUNJALA; KELLA, 2017).

Figura 3 - Imagem do caju. Considerado pseudofruto, o pedúnculo do caju é uma fruta tropical de características sensoriais marcantes causadas pela adstringência.



Fonte: Autor

Tabela 1 - Composição nutricional do pedúnculo do caju.

<b>Constituintes</b>	<b>Valores (mg.100 mL<sup>-1</sup>)</b>
Vitamina C	241,13
Polifenóis Totais	271,03
Antocianinas	228,85
Potássio	43,61
Magnésio	4,13
Cálcio	6,01
Sódio	2,34
Ferro	0,37
Fósforo	2,21
Enxofre	0,46
Manganês	0,20
<b>Constituintes</b>	<b>Valores (%)</b>
Cinzas	1,04
Fibras	3,59
Açúcares Totais	10,57
Proteínas	1,13
Lipídeos	2,99

Fonte: AKYEREKO *et al.* (2023)

Tradicionalmente o caju é usado no tratamento de cólicas uterinas, reumatismo, escorbuto, distúrbios estomacais e inflamações na garganta (ATTRI, 2009; DA SILVA *et al.*, 2021; RUNJALA; KELLA, 2017). Esses efeitos benéficos estão intimamente ligados a potenciais atividades biológicas relacionadas ao caju, assim como em outras partes do cajueiro. Um dos compostos de maior relevância presentes praticamente em todas as partes do cajueiro é o ácido anacárdico.

#### *Manga (Mangifera indica)*

A manga (Figura 4) é cultivada em inúmeros países, considerada uma fruta de grande importância na balança comercial das exportações (PALMEIRA *et al.*, 2012), devido ser uma das maiores culturas produzidas no mundo. Está na segunda posição entre as frutas tropicais mais produzidas, ficando atrás apenas da banana (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2022). Segundo a Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados (ABRAFRUTAS), a manga foi a fruta mais exportada no Brasil no ano de 2021, onde foram enviadas 272,5 mil toneladas para os mercados externos, esses números representam um aumento de 12 % quando comparado ao ano de 2021 (ABRAFRUTAS, 2022). Além disso, a manga possui uma importância nutricional, pois é rica vitaminas, minerais e vários compostos fenólicos (PAN *et al.*, 2018).

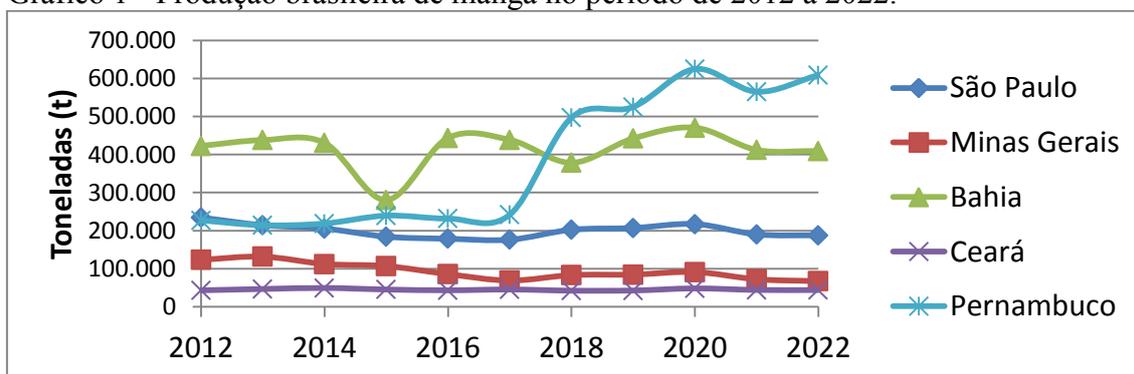
Figura 4 - Imagem da manga. Fruta de clima tropical do tipo drupa caracterizada por possuir apenas uma semente no seu interior, sensorialmente carnosa e suculenta.



Fonte: Portal Embrapa.

Devido aos seus benefícios e uma busca incessante da população por hábitos alimentares mais saudáveis o consumo de frutas aumentou (YAHIA; CARRILLO-LOPEZ, 2018). Essa demanda de consumo afeta positivamente a produção nacional de manga que alcançou a quantidade de pouco mais que 1,4 milhões (Gráfico 1) de toneladas em 2021 (EMBRAPA, 22; IBGE, 2021), grande parte dessa produção está voltada para o consumo in natura, no entanto, o consumo de sucos, polpas e produtos minimamente processado da manga também fazem parte dessa demanda de produção.

Gráfico 1 - Produção brasileira de manga no período de 2012 a 2022.



Fonte: Embrapa; IBGE.

### 2.3 Resíduos da agroindústria.

Para atender a demanda de todos os mercados, a fruticultura mundial acaba gerando uma grande quantidade de resíduos, em torno de 20-40% dos frutos não são aproveitados após colheita e seus processamentos (BANERJEE; BANERJEE; *et al.*, 2016; BANERJEE; VIJAYARAGHAVAN; *et al.*, 2016), parte dessas perdas são em decorrência de problemas com logística e manejo gerando produtos não conformes (Figura 5). Além dessas situações, tratando-se especificamente da cajucultura, o produto de maior importância econômica é a castanha, fazendo que pedúnculo do caju seja tratado como um subproduto. No entanto, apenas 10 a 20 % desse pedúnculo é aproveitado nas indústrias de alimentos, gerando assim um desperdício de 80 a 90 % dessa excelente fonte de nutriente (EMBRAPA, 2022), que representa em números aproximadamente 118 mil toneladas (FAO, 2022a)

Por outro lado, existe outra fonte de resíduo pertinente à fruticultura em geral, as podas (Figura 6), as quais são executadas com diversos fins: crescimento, manutenção, limpeza de pragas e produção. Assim, devido ao porte das árvores e ao manejo necessário e periódicos dos pomares as com podas, partes da planta como folhas, galhos e cascas acabam se tornando resíduos diretos do cultivo (FONSECA *et al.*, 2006; MOUCO, 2010). No entanto estes resíduos são considerados de baixo valor agregado, uma vez que suas aplicações são bem restritas.

Figura 5 - Caju sensorialmente não conforme para comercialização.



Fonte: CEAGESP

Figura 6 - Resíduos de podas.



Fonte: Autor.

Muitos estudos envolvendo extratos provenientes dessas partes das plantas tem apresentado alguma atividade biológica, seja ela no tratamento de doenças ou na prevenção de alguns males (PARVEZ, 2016b). Porém, essas atividades estão ligadas aos metabólitos secundários. Estudos mostram que os metabólitos secundários presentes em

frutos, estão em maior quantidade nas folhas e cascas das plantas (SOUSA *et al.*, 2016), devido esses compostos também atuarem como mecanismo de defesa das plantas (WINK, 2015). Com isso, folhas, cascas e outras partes das plantas frutíferas ou não, se tornam uma ótima fonte para obtenção de novos fármacos, pois são ricos nos compostos bioativos de interesse e possuem baixo valor agregado e muitas vezes são considerados matéria-prima residual.

## 2.4 Metabólitos secundários

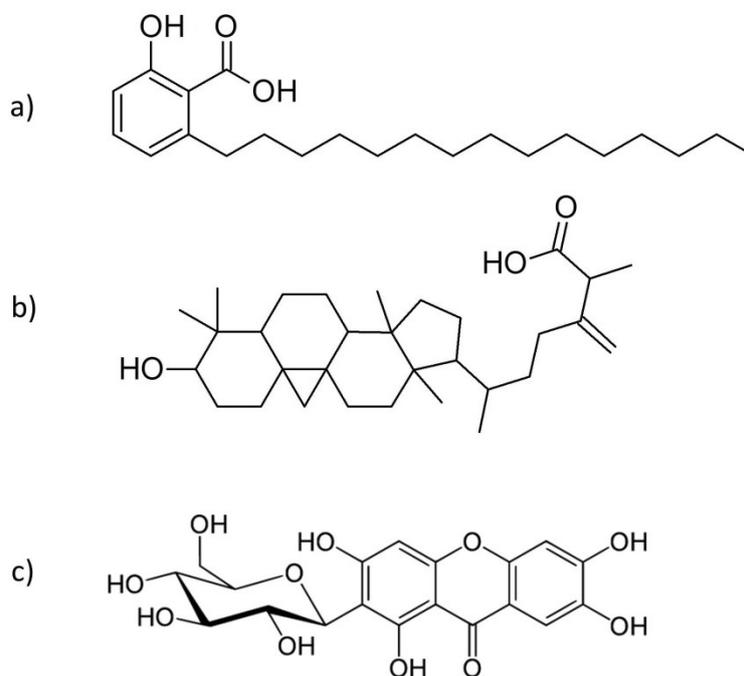
Alguns compostos fenólicos fazem parte de um grupo denominado de metabólitos secundários. Esses metabólitos são chamados de secundários por não fazerem parte das substâncias necessárias ao metabolismo primário do fruto (WINK, 2015). No entanto, atualmente chamados de “metabólitos especializados”, anteriormente referidos como metabólitos secundários, constituem substâncias orgânicas essenciais na defesa e na resistência das plantas. Estes metabólitos incluem uma variedade de compostos como alcaloides, flavonoides, terpenoides, peptídeos, fenóis, esteroides, entre outros compostos orgânicos de baixo peso molecular (ELSHAFIE *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2023).

Terpenos são moléculas lipofílicas que interagem diretamente com biomembranas e proteínas das membranas celulares, agindo diretamente na fluidez e permeabilidade de membrana, também podem atuar na modulação das atividades das proteínas de membrana e receptores, com isso, muitos terpenos têm sido usados no auxílio contra viroses (WINK, 2015).

Os taninos são metabólitos de grande importância nos frutos e, podem ser divididos em duas grandes classes hidrolisáveis e condensados, essas classes se distribuem em quatro estruturas básicas: os galotaninos, elagitaninos, taninos complexos e taninos na forma condensada, tal classificação é dependente do grau de polimerização em que essas moléculas se encontram (GRASEL; FERRÃO, 2016). Os taninos desempenham um papel essencial na definição das propriedades sensoriais de frutas e produtos derivados de frutas. Esses taninos estão presentes em algumas frutas e também foram relatados em frutos do gênero *Spondias* (GOMES *et al.*, 2013), por exemplo, Umu, Cajá, Seriguela que são da família das Anacardiáceas. Também são atribuídas a esses taninos algumas atividades biológicas como, anticancer, antimutagênica (RUFINO *et al.*, 2010).

Vários desses metabólitos secundários (Figura 7) são considerados compostos promissores e com potencial antioxidante, que ajudam a proteger o organismo no tratamento de doenças e efeitos prejudiciais dos radicais livres. Além do mais, outras atividades biológicas são atribuídas aos mais diversos metabólitos secundários, como efeito sedativo, ansiolítico, entre outras (KABERA *et al.*, 2014). Com isso, despertando um interesse da indústria farmacêutica nesses compostos, devido essa gama de atividades biológicas conferidas aos metabólitos secundários.

Figura 7 - Estrutura molecular de alguns metabólitos secundários. (a) Ácido anacárdico; (b) Ácido ambólico; (c) Mangiferina.



Fonte: Autor.

Alguns metabólitos secundários são específicos para alguma família, gênero ou espécie. Nas anacardiáceas são comumente relatados a presença de diferentes tipos de ácidos anacárdicos, entre outros metabólitos, como por exemplo, quecertina, ácido ferúlico, caféico e gálico estão presentes em *Anacardium occidentale* (SALEHI *et al.*, 2019), assim como, mangiferina, catequina, kaempferol, ácido ambólico estão presentes no perfil metabolômico em *Mangifera indica* (ANJANEYULU; RADHIKA, 2000; KUMAR *et al.*, 2021).

## 2.5 Ácidos anacárdicos

Os ácidos anacárdicos (AcAn) (Figura 7a) são compostos com alto potencial biológico, amplamente estudado em diferentes aplicações, atividade bactericida, inibição enzimática, anti-carcinogênica, inseticida, anti-parasitária dentre outras (ANJUM *et al.*, 2021; AYEPOLA; ISHOLA, 2009; BALLAL *et al.*, 2013; BARCELOS *et al.*, 2007; KONAN; BACCHI, 2007; MENDES *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 2008). Devido à sua estrutura molecular, ele é considerado um lipídeo fenólico, pois ligado ao seu anel aromático está um cadeia carbônica que pode variar tanto em número de carbonos, como na presença de insaturações (OIRAM FILHO *et al.*, 2018; TREVISAN *et al.*, 2006). Os AcAn são encontrados em diversas plantas da família das *Anacardiaceae* (GUEDES *et al.*, 2020; NEVES *et al.*, 2021; OIRAM FILHO *et al.*, 2019) e em diferentes partes dessas plantas, contudo são encontrados majoritariamente no líquido da casca da castanha (LCC).

A atividade anticâncer relacionada aos AcAn já é relatada em diversos estudos com diferentes linhagens cancerígenas, como câncer de mama, sarcomas musculares, cólon do útero, pulmão, melanoma (GALOT-LINALDI *et al.*, 2021; LEGUT *et al.*, 2014; TOMASIAK *et al.*, 2023). O efeito citotóxico dos AcAn foi visto em estudo com camundongos portadores de câncer de mama, nos quais o tratamento aplicado reduziu o tamanho das células tumorais, como induziu a apoptose celular dos cancros (GNANAPRAKASAM *et al.*, 2021). Também foi evidenciada a inibição de crescimento em células de câncer de pâncreas associados ao tratamento com AcAn, bem como o efeito sinérgico a medicamentos quimioterápicos (PARK *et al.*, 2018).

No entanto, seu mecanismo de combate no tratamento ou prevenção contra células tumorais ainda não está bem desvendado, mas evidentemente relacionado a inibições enzimáticas e correlações com sínteses bioquímicas (ZHAO *et al.*, 2018). Um grupo de enzimas denominadas Histona-acetiltransferases (HATs) desempenham um papel significativo na regulação da expressão gênica. Portanto, alterações relacionadas a essa enzima está frequentemente associada com a manifestação de inúmeras doenças fisiopatológicas, em destaque o câncer (TRISCIUOGGIO *et al.*, 2018). Em relação à inibição das HATs voltadas para tratamento e prevenção de câncer, os AcAn tem um

desempenho positivo quanto ao mecanismo de inibição não competitiva das HATs (SHANMUGAM *et al.*, 2021).

## 2.6 Triterpenos

Os Triterpenos (Figura 7b) são uma subclasse dos terpenos. Fruto da ciclização do esqualeno, o 2,3 epóxido de esqualeno é o precursor na biossíntese dos triterpenos. São formados a partir da síntese de dois ou mais isoprenos (5 carbonos), podendo ser classificados de acordo com a quantidade de isopreno em sua estrutura. Sua estrutura química tem como característica a presença de 6 isoprenos totalizando 30 átomos de carbonos (TENG *et al.*, 2018). Os triperpenos podem ser classificados em tetracíclicos ou pentacíclicos de acordo com a quantidade de anéis formados em sua estrutura química.

Os triterpenos tetracíclicos possuem grupos divididos em cucurbitanos, cicloartanos, dammarano, lanostano, protostano, contendo 4 anéis estruturais (A, B, C e D), estão presentes em uma diversidade de plantas a exemplo de, cucurbitáceas, leguminosas, frutíferas, árvores em geral (TENG; CHEN, 2017). Por sua vez, pertencentes aos triterpenos pentacíclicos pode-se citar os compostos naturais mais conhecidos, tais como, ácido betulínico, ácido corosólico, ácido ursólico, celastrol, ácido oleanólico, entre outros (SHANMUGAM *et al.*, 2012).

Esses compostos desempenham funções de crescimento e desenvolvimento nas plantas, contudo, majoritariamente exercem funções de defesa e interações químicas por motivos bióticos e abióticos do meio (BARTWAL *et al.*, 2013). Comumente presentes no metabolismo secundário de plantas esses compostos podem também ser encontrados em fungos e bactérias (THIMMAPPA *et al.*, 2014). Os triterpenos têm demonstrado uma larga gama de atividades biológicas, tais como, anti-inflamatória, sedativa, hepatoprotetora, antialérgica, antioxidante, anticancerígena e outras (HILL; CONNOLLY, 2011; QING *et al.*, 2017).

Inúmeros mecanismos estão relacionados à atividade anticâncer dos triterpenos, por exemplo, anti-inflamatório, antioxidante, regulação do ciclo celular e também regulação epigenética que trata da modulação da expressão de genes (LI *et al.*, 2020). Diversos triterpenos, pentacíclicos e tetracíclicos tem efeitos positivos, tanto no tratamento como na prevenção de diferentes tipos de células tumorais, câncer de pulmão, mama, intestino, carcinoma de ovário (ÖZDEMİR; WIMMER, 2022).

## 2.7 Fracionamento e isolamento bio-guiado

Estudos bio-guiados são inicialmente pautados na etnofarmacologia que estuda doenças existentes e tratamentos tradicionais ou terapias populares com uso de extratos oriundos de produtos naturais e fitoterápicos (MOORE *et al.*, 2017; ROLLINGER *et al.*, 2006). Uma vez confirmada a eficácia do fitoterápico, o extrato é fracionado e investigando-se sua atividade biológica por meio de ensaios citotóxico, de forma a identificar qual fração tem maior atividade biológica. Assim, direcionando de maneira eficiente para identificação do composto responsável por tal atividade. Em suma, o conceito simplificado da técnica de ensaios bio-guiados é rastrear os compostos responsáveis pela atividade biológica, seu aumento na atividade específica e/ou um efeito sinérgico entre os compostos do extrato bruto (ROLLINGER *et al.*, 2006).

Inúmeros estudos científicos comprovam alguma atividade biológica em extratos provenientes de produtos naturais. No entanto, esses extratos possuem uma diversidade de compostos que em alguns casos não se sabe de efeito sinérgico ou até mesmo deletério para células humanas. Assim, ao longo dos anos diversas técnicas de fracionamento foram desenvolvidas, aprimoradas e atualmente utilizadas para separar e fracionar os extratos em porções menos complexas, dentre elas destacam-se: cromatografia líquida de alta eficiência, camada delgada, permeação em gel e técnicas de partição líquido-líquido (BUCAR *et al.*, 2013; CANNELL, 1998; STICHER, 2008), facilitando o estudo e compreensão da bioatividade desses extratos.

Técnicas como cromatografia e partições são usadas para auxiliar no fracionamento, assim como estudos de citotoxicidade guiam o isolamento desses compostos presentes nas frações.

Segundo BOYOM *et al.* (2010), em estudo bioguiado em extratos de frutos de uma planta da família Anacardeaceae (*Sorindeia juglandifolia*) foi executado um fracionamento via cromatografia flash, resultando em 35 frações, onde duas destas frações obtiveram resultados positivos no controle de Malaria. Também trabalhando com cromatografia flash SEQUEDA-CASTAÑEDA *et al.* (2021), em extratos de diferentes partes de cajueiro selvagem (*Anacardium excelsum*), obtiveram 59 frações para avaliar a capacidade antioxidante, direcionando as melhores respostas antioxidantes para as respectivas frações.

Extratos das folhas de searsia (*Searsia chirindensis*), uma planta da família das anacardiáceas, foram avaliados para o efeito bactericida de seus compostos, contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, utilizando o fracionamento bio guiado a partir de 10 frações obtidas em coluna cromatográfica de sílica gel. Os resultados direcionaram para cinco compostos presentes em três frações do extrato bruto (MADIKIZELA *et al.*, 2013).

## 2.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é um processo de separação de diferentes compostos presentes em uma mistura, sendo esta técnica uma variação moderna derivada da cromatografia líquida clássica (SNYDER *et al.*, 2011). A separação dos compostos de uma mistura por meio de cromatografia líquida ocorre na presença de duas fases, uma fase fixa (estacionária) e uma fase fluida que permeia por toda fase estacionária, denominada de fase móvel (LANÇAS, 2009).

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 (processos de sorção) ou de natureza química (troca iônica, interações hidrofóbicas, outras) (VITOLLO, 2005), e estão diretamente associadas à estrutura molecular de cada composto e por consequente ao aspecto polar de cada molécula.

Em relação à fase estacionária e sua polaridade, o processo de separação pode ser conduzido em fase reversa ou fase normal. A fase reversa é a uma das primeiras opções e usualmente utilizada com resultados satisfatórios na separação final. A coluna cromatográfica contendo a fase estacionária, composta por sílica com suporte de C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub> (cadeias carbônicas) deixa a matriz com característica menos polar que a fase móvel. No caso dos processos cromatográficos conduzidos em fase normal se têm características opostas à fase reversa, onde a fase estacionária é mais polar que a fase móvel (SNYDER *et al.*, 2012), assim a ordem de eluição dos compostos separados é diferente em cada processo.

Um fator importante na cromatografia em geral, é forma de detectar os compostos analisados. Diferentes tipos de detectores são capazes de analisar uma vasta quantidade de substâncias, como exemplos podem ser citados, a espectroscopia UV, espectrometria de massas, fluorescência e detectores eletroquímicos. Esses componentes

estão localizados logo após a coluna cromatográfica e, são responsáveis por fornecer informações de forma qualitativa e quantitativa das moléculas presentes em uma amostra. Os dados de saída fornecidos pelos detectores são gravados por um computador e gerado um cromatograma (gráfico resposta do detector) contendo dados dos componentes separados pela coluna cromatográfica (ALI, 2022).

Detectores UV são amplamente usados em cromatografia líquida, baseado no ultravioleta (UV) e na absorção de luz visível, são detectores altamente sensíveis para muitos solutos que tenham absorção no UV visível ou na região de 160 a 600 nm. Detectores de fluorescência são seletivos e bastante sensíveis, no entanto apenas para compostos que respondem a excitação causada pela radiação fornecida por lâmpadas de xênon ou de deutério, com isso limitando seu uso a compostos que fluorescem ao receber essa energia. A espectrometria de massa por sua vez, é uma técnica de detecção que analisa os compostos eluidos da coluna, primeiramente ionizando esses compostos de forma negativa  $(M-H)^-$  ou positiva  $(M+H)^+$ , para em seguida medir a massa e/ou fragmentos moleculares específicos de cada molécula (ALI, 2022; SNYDER *et al.*, 2011)

## 2.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Escala Preparativa

A cromatografia líquida em escala preparativa é uma técnica de alta performance que visa a purificação de compostos presentes em uma mistura (JIN *et al.*, 2016). O uso de maior carga ou volume de injeção associado a possibilidade de execução sob altas pressões (HOSTETTMANN *et al.*, 1998), possibilitando assim o uso de vazões maiores, são características fundamentais para escala preparativa. Os interesses na escala preparativa não ficam apenas no âmbito acadêmico (GARCÍA PALACIOS *et al.*, 2009; GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1989), mas também âmbito industrial, devido à robustez, reprodutibilidade e versatilidade na purificação de uma larga variedade de biomoléculas (SOUSA *et al.*, 2012).

Uma das características principais entre a cromatografia preparativa e analítica é a mudança de alguns componentes dentro do sistema cromatográfico, como bomba de fluxo e coluna. A coluna é um dos acessórios cromatográficos de maior importância na mudança de escala devido as dimensões serem bem maiores, com isso alterando vários fatores, por exemplo, volume e carga de injeção e fluxo de eluição.

Na cromatografia preparativa as amostras contendo diferentes compostos são separadas com objetivo de conseguir uma pureza adequada, no entanto, a cromatografia preparativa tem uma melhor capacidade na taxa de recuperação dos compostos quando comparada a cromatografia analítica (JANDERA *et al.*, 1997). Contudo, para um incremento no rendimento da recuperação da molécula alvo e um decréscimo nos custos de execução, a carga de injeção na escala preparativa deve ser maior quando comparada à escala analítica (FENG *et al.*, 1996), respeitando sempre os limites de carga de cada coluna de acordo com suas especificações. Por outro lado, esse aumento na carga injetada pode ocasionar um alargamento nos picos dentro do perfil cromatográfico, em função de uma saturação da coluna, com isso limitando o uso de alguns parâmetros da cromatografia analítica, tais como resolução e tempo de retenção (JIN *et al.*, 2016).

Em trabalho desenvolvido para obtenção de biofungicida SOUZA (2019) utilizou cromatografia preparativa para o isolamento de 3 lipopeptídeos (iturina, surfactina e fengecina) produzidos por uma bactéria. Os resultados mostraram a capacidade e viabilidade da ampliação de escala para o isolamento desses compostos, chegando a uma carga de injeção por análise de até 60 mg extrato, levando em consideração parâmetros de desempenhos como, consumo de solvente e produtividade do método desenvolvido. Estudos de sobrecarga de coluna e limite ótimo de processo para isolamento de moléculas alvo também podem ser executados em escala preparativa, assim como mostra estudo executado por OIRAM FILHO *et al.* (2019) relacionado ao isolamento de ácidos anacárdicos aonde se chegou a um limite ótimo de processo a carga de 100 mg de extrato injetado em sistema de escala preparativa.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Químicos**

Foram usados para o desenvolvimento desta tese, etanol P.A. (pureza  $\geq 99,8$  %) adquirido da Dinâmica (São Paulo, Brasil), metanol e acetonitrila grau HPLC (pureza  $\geq 99,9$  %) adquirido da Lichrosolv Merck, (Darmstádio, Alemanha), água ultrapura obtida do sistema MilliQ (São Paulo, Brasil), ácido trifluoracético (pureza  $\geq 99,7$  %) e ácido acético P.A. (pureza  $\geq 99,9$  %) provenientes da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

### 3.2 Sistema HPLC analítico

Foi utilizado um sistema cromatográfico composto por um cromatógrafo Shimadzu LC-20AB Prominence acoplado a um detector de arranjo de diodo Shimadzu SPD-20A Prominence e com um amostrador automático Shimadzu SIL-20AC Prominence (Quioto, Quioto, Japão). Os dados foram tratados com o uso do software Shimadzu LC Solution.

### 3.3 Sistema HPLC preparativo

Foi utilizado um sistema cromatográfico composto por um cromatógrafo Waters 2555 – Quaternary Gradient 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.

### 3.4 Obtenção do padrão analítico.

O padrão de AnAc trieno (15:3) utilizado para preparação da curva analítica foi obtido a partir do método descrito por OIRAM FILHO *et al.* (2019), onde foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFire Prep C<sub>18</sub> OBD (100 x 19 mm x 5 µm), metanol, água ambos acidificados com ácido acético para composição da fase móvel que foi conduzida de maneira isocrática (90:10:1). O tempo de corrida foi de 35 min, fluxo de eluição de 8 mL.min<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 °C, volume de injeção de 1 mL e concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup>. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm. 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.

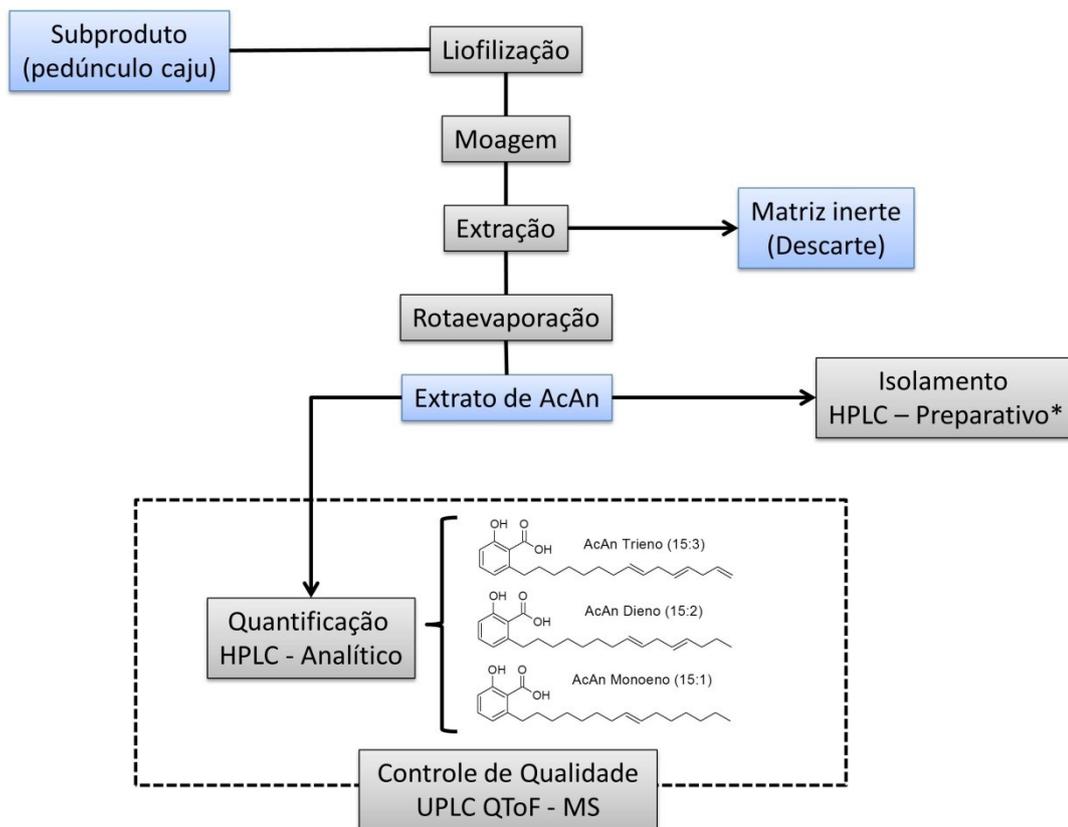
### 3.5 Obtenção do extrato do pedúnculo do caju

Os pedúnculos de caju foram gentilmente cedidos pela Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram analisadas 5 amostras provenientes de diferentes clones de cajueiros (CCP 09, CCP76, BRS 275, BRS 285 e EMBRAPA 51).

Os pedúnculos foram minimamente processados em pequenos cubos de 2 x 2 cm e em seguida foram liofilizadas (LioBras K105, São Carlos, SP, Brazil) por 96 horas para total remoção de água. As amostras foram moídas em um moinho de faca (Cadence MDR302-127, Navegantes, SC, Brazil) para obtenção de um pó com objetivo de aumentar a superfície de contato com o solvente, assim otimizando a extração dos AnAc.

Para obtenção dos extratos, foram feitas cinco extrações consecutivas visando a exaustão dos AnAc presente na amostra. Foram pesados 500 mg de pedúnculo do caju em pó e adicionados 9 mL de metanol, assistidas em ultrassom de banho, utilizando o Sonicador Ultrasonic Cleaner 1400 (THORTON/UNIQUE), durante 20 min e posteriormente centrifugadas (Kindly KC5, São Paulo, SP, Brazil) por 10 min. Os sobrenadantes das cinco extrações foram filtrados em papel de filtro e secos por destilação sob baixa pressão (Buchi V-850, Valinhos, SP, Brazil). Cada sobrenadante foi analisado separadamente para obter o percentual de extração de cada etapa. O extrato seco contendo AnAc foi solubilizado em metanol e filtrado em filtro de disco PTFE 45 µm para posteriormente ser injetado no HPLC-DAD para análise de quantificação (OIRAM FILHO *et al.*, 2023).

Figura 8 - Fluxograma da extração dos ácidos anacárdicos do pedúnculos de caju.



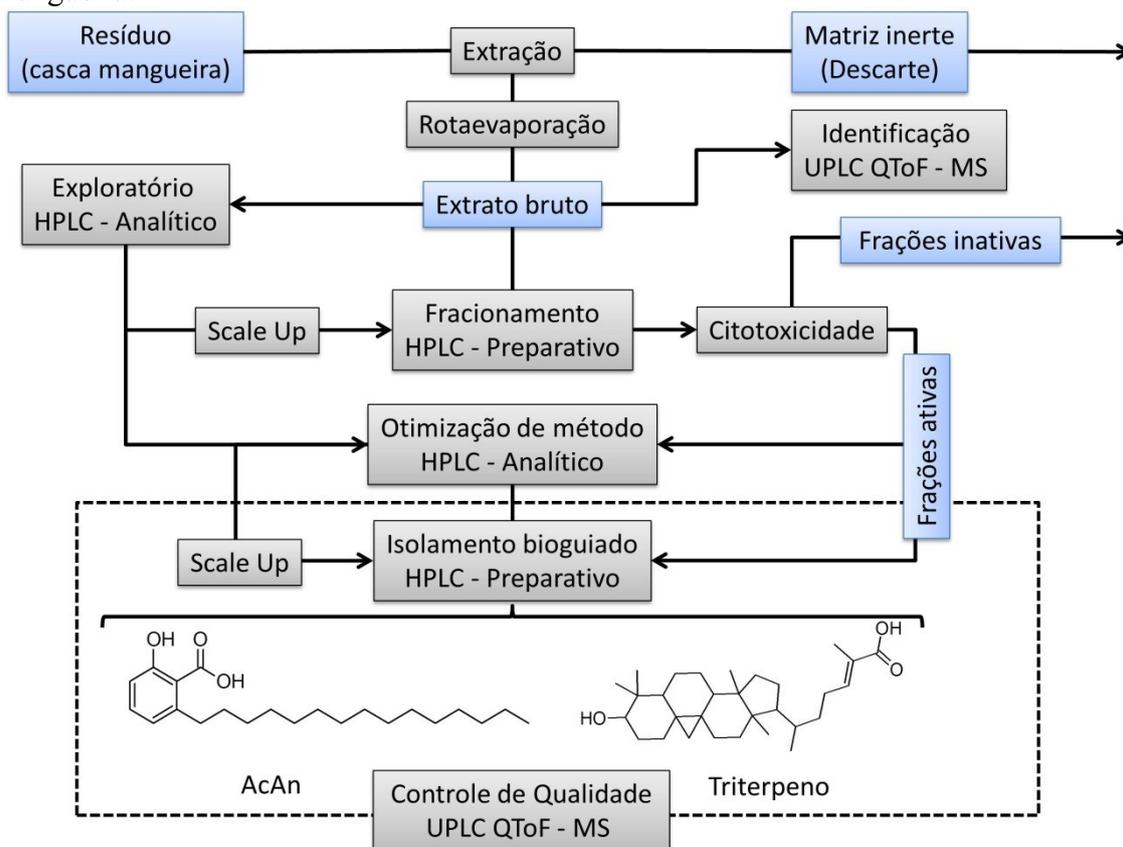
Fonte: Autor

\*Etapa padronizada e publicada de acordo com OIRAM FILHO *et al.* (2019)

### 3.6 Obtenção do extrato da casca da mangueira

O extrato foi obtido a partir do método descrito por JOHN *et al.* (2012) com adaptações, utilizando uma extração sólido-líquido por imersão das cascas de mangueira. Foi utilizado etanol como solvente para uma melhor extração dos compostos polares e apolares presentes na matriz residual, a proporção foi de 1 parte de casca para 4 partes de solvente. O solvente ficou em contato com as cascas por 24 horas em temperatura ambiente e foram feitas 4 extrações para uma exaustão do soluto presente na matriz sólida, totalizando 96 h de extração. O solvente contendo soluto foi filtrado em filtro de papel quantitativo para retirada de material particulado maior, em seguida rota-evaporado para obtenção do extrato propriamente dito.

Figura 9 - Fluxograma do processo de extração e isolamento dos compostos da casca da mangueira.



Fonte: Autor

### 3.7 Desenvolvimento de método cromatográfico para quantificação de AcAn em pedúnculo de caju

Para estabelecer uma condição ótima do método cromatográfico, alguns parâmetros foram testados previamente, como coluna  $C_8$  (100 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) e  $C_{18}$  (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), diferentes tipos de solventes orgânicos (metanol e acetonitrila) em diferentes concentrações na fase móvel (60, 70 e 80%), acidificado ou não com ácido acético e diferentes vazões de eluição (1,0, 1,2 e 1,5 mL.min<sup>-1</sup>).

Para a desenvolvimento do método cromatográfico foi utilizada uma coluna de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS (M)  $C_{18}$  (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m). A fase móvel foi utilizada de maneira isocrática, sendo composta por 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<sup>-1</sup>, à temperatura de 30 °C e com volume de injeção da amostra de 20  $\mu$ L. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm e a

aquisição dos espectros UV foi realizada na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

### **3.8 Validação do método para quantificação dos AcAn em pedúnculo de caju**

A validação do método foi estabelecida de acordo com os métodos descritos por International Conference Harmonization (ICH) (ICH, 2005) e, foi conduzida de modo a avaliar a qualidade e consistência, bem como a confiabilidade dos resultados obtidos. Os parâmetros verificados foram de seletividade, linearidade, precisão (intra-dia e inter-dia), adequação do sistema, limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ). Foi preparada uma curva analítica com oito pontos de diferentes concentrações (1; 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de AnAc trieno (15:3). Além disso, cinco amostras de pedúnculos de diferentes clones produzidos no campo experimental da Embrapa Agroindústria Tropical. As amostras foram pesadas e solubilizadas em metanol em uma concentração de 25  $\text{mg.mL}^{-1}$  para a quantificação dos AnAc.

#### **3.8.1 Seletividade**

A seletividade é definida pela a capacidade que o método possui de identificar de maneira inequívoca um determinado analito presente em uma mistura ou matriz sem interferência de outros componentes (ICH, 2005; VESSMAN *et al.*, 2001). Para a avaliação da pureza dos picos cromatográficos, foi levado em consideração a pureza de 3 pontos de cada pico e 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.

#### **3.8.2 Linearidade**

Para avaliar a linearidade do método foi construída uma curva analítica usando um padrão externo de AnAc trieno (15:3), diluído em metanol em diferentes concentrações (1; 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e todos os testes foram

executados em triplicata. Foram aplicados os testes T-student e Teste F a um nível de confiança de 95 % para garantir uma alta confiabilidade dos dados obtidos da curva de calibração e da regressão linear. Os cálculos foram conduzidos seguindo as seguintes equações:

$$S^2y = \frac{\sum(d^2i)}{n-2} \quad (1)$$

$$S^2a = \frac{S^2y.n}{D} \quad (2)$$

$$S^2b = \frac{S^2y.\sum(x^2i)}{D} \quad (3)$$

em que  $Sy$  é o desvio padrão no eixo y;  $Sa$  e  $Sb$  o desvio padrão do coeficiente angular (a) e linear (b), respectivamente;  $xi$  é o valor individual de x;  $n$  é o número total de pontos na curva;  $di$  é o desvio vertical de cada ponto e  $D$  é o determinante dado por

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

A partir dos desvios padrões calculados nas equações 1,2 e 3, foram calculados os valores de  $t_{calc(a)}$ ,  $t_{calc(b)}$  e  $F_{calc}$ .

$$t_{calc(a)} = \frac{|1-a|}{S_a} \quad (4)$$

$$t_{calc(b)} = \frac{|b|}{S_b} \quad (5)$$

$$F_{calc} = \frac{\frac{S_b}{1}}{\frac{1}{\sum a_i}} \quad (6)$$

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 valido 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, FRANCISCO *et al.*, 2017).

### 3.8.3 Precisão

A precisão do método foi determinada a partir da avaliação da reprodutibilidade das oito diferentes concentrações do padrão externo (1; 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). A reprodutibilidade das triplicatas de cada ponto da curva

analítica foi avaliada no mesmo dia (intra-dia) e, posteriormente em três dias diferentes (inter-dia). A precisão foi calculada a partir dos desvios padrões e coeficientes de variação:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (7)$$

$$Cv = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (8)$$

em que 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.

#### **3.8.4 Teste de adequação de sistema**

O teste de adequação do sistema foi determinado a partir da repetibilidade de um ponto intermediário da curva de calibração ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) que foi injetado 10 vezes seguidas nas mesmas condições operacionais. A partir dos tempos de retenção e áreas obtidos foi calculado o desvio padrão e o coeficiente de variação.

#### **3.8.5 Limite de detecção e quantificação**

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração na qual uma substância pode ser detectada, assim conseguindo diferenciar um analito de um ruído. O limite de quantificação (LOQ) também é expresso como uma concentração e, representa a menor concentração na qual uma substância pode ser quantificada com exatidão e fidelidade.

Os parâmetros LOD e LOQ foram baseados pela avaliação visual de acordo com descrito no padrão internacional de validação (ICH, 2005).

#### **3.8.6 Exatidão ou recuperação**

Alguns protocolos podem ser aplicados a diferentes compostos para avaliar a recuperação do método cromatográfico. Um desses protocolos é dopar a amostra utilizando o composto alvo em uma concentração conhecida (BRASIL, 2003; ICH, 2005). No entanto, algumas amostras não possibilitam serem dopadas para garantir uma recuperação próxima da adequada conforme estipulado pelas diretrizes de validação.

Porém, a extração exaustiva garante que a molécula alvo presente na amostra seja extraída completamente, possibilitando assim a avaliação da recuperação dessa molécula pelo método já desenvolvido (SWARTZ; KRULL, 2018).

Os espectros de cada ácido anacárdico das cinco extrações sequenciais foram utilizados para dar suporte aos cálculos de recuperação. Portanto, foi possível calcular a porcentagem de recuperação de cada uma das cinco extrações para os três diferentes AcAn (trieno, dieno e monoeno) utilizando a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{A_x}{\sum A_n} \cdot 100 \quad (9)$$

em que  $A_x$  é a área do pico cromatográfico para cada analito de cada uma das cinco extrações,  $\sum A_n$  é a área do somatório total dos picos cromatográficos das cinco extrações sequenciais para cada molécula.

### **3.9 Condições cromatográficas exploratórias em HPLC analítico (*Mangifera indica*)**

Para avaliação inicial do extrato da casca da mangueira, o método foi conduzido com uma coluna cromatográfica de fase-reversa Waters Xselect™ – HSS C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm x 5 µm). A fase móvel utilizada foi composta de metanol (B), água (A) ambos acidificados com 0,05% ácido trifluoracético (TFA) em um gradiente exploratório de 60 min, variando de 5 % a 95 % de solvente B em 48 min, de 48 min a 54 min em 100 % de solvente B e de 54 min a 60 min 5 % de solvente B. O fluxo de eluição foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, à temperatura de 35 °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. O controle instrumental da análise e o processamento dos dados foram tratados com o uso do software Shimadzu LC Solution.

### **3.10 Ampliação de escala cromatográfica**

O volume de injeção foi calculado de acordo com as equações (AUBIN; CLEARY, 2009; GUILLARME *et al.*, 2007) abaixo e otimizado em função do equipamento, onde o volume de injeção foi descrito de acordo com a equação 10.

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot \frac{dc_2^2}{dc_1^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (10)$$

em que  $V_{inj2}$  é a carga de injeção da escala preparativa,  $V_{inj1}$  é a carga de injeção da escala analítica,  $dc_2$  o diâmetro interno da coluna preparativa,  $dc_1$  o diâmetro interno da coluna analítica,  $L_2$  o comprimento da coluna preparativa e  $L_1$  o comprimento da coluna analítica.

A vazão de eluição foi calculada de acordo com a equação 11 descrita abaixo e ajustado em função de fatores de viabilidade de execução e econômicas, expresso na equação.

$$Q_2 = Q_1 \cdot \frac{dc_2^2}{dc_1^2} \cdot \frac{dp_1}{dp_2} \quad (11)$$

em que  $Q_2$  é a vazão de eluição do sistema preparativo,  $Q_1$  é a vazão de eluição do sistema analítico,  $dc_2$  o diâmetro interno da coluna preparativa,  $dc_1$  o diâmetro interno da coluna analítica,  $dp_1$  o diâmetro da partícula no analítico e  $dp_2$  o diâmetro da partícula no preparativo.

### 3.11 Condições cromatográficas em HPLC preparativo (*Mangifera indica*)

O método cromatográfico em escala analítica foi transposto pela ampliação de escala, utilizando como base as equações 10 e 11, resultando numa condição cromatográfica onde foi usada uma coluna de fase reversa Waters SunFire Prep C<sub>18</sub> OBD (250 x 20 mm x 15 µm). A fase móvel utilizada foi composta por metanol (B), água (A) ambos acidificados com 0,05% ácido trifluoracético (TFA) em um gradiente de eluição de 60 min, variando de 5 % a 100 % de solvente B em 20 min, mantendo em 100 % de solvente B até 55 min, em seguida mantendo 5 % de solvente B de 55 a 60 min. O fluxo de eluição de 7 mL.min<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 °C, volume de injeção de variando de 1 a 20 mL, com concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm. Tanto o controle do equipamento quanto o processamento dos dados foi feito através do software Empower Pro.

O fracionamento inicial do extrato foi feito em 9 frações, uma fração inicial de 0 a 15 min, e outras 8 frações de 5 em 5 min, a fração entre 55 a 60 min foi considerada descarte e não foi coletada. As frações coletadas foram enviadas para ensaio de citotoxicidade em diferentes linhagens de células cancerígenas, para auxiliar no isolamento bioguiado dos compostos.

### 3.12 Citotoxicidade *in vitro*

Para analisar a citotoxicidade *in vitro* do extrato bruto da casca da mangueira e das 9 frações obtidas, foram testadas 3 linhagens de células tumorais e uma não tumoral pelo método MTT (MOSMANN, 1983) que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. As linhagens tumorais utilizadas, SNB-19 (Astrocitoma), HCT-116 (Carcinoma de cólon - humano), PC3 (Próstata) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640. Para linhagem não tumoral L929 (Fibroblasto murino) o cultivo deu-se em DMEM, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. As amostras (Tabela 2) foram diluídas em DMSO puro para concentrações de estoque de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Tabela 2 - Descrição e identificação das amostras para o ensaio citotóxico *in vitro*.

Nº	Código Amostra	Concentração de teste (µg.mL <sup>-1</sup> )
1	Extrato Bruto – EB	
2	Fração inicial – Fi	
3	Fração 1- F1	
4	Fração 2 - F2	
5	Fração 3 - F3	
6	Fração 4 - F4	100
7	Fração 5 - F5	
8	Fração 6 - F6	
9	Fração 7 - F7	
10	Fração 8 - F8	

Fonte: Autor

As células foram plaqueadas nas concentrações de 0,7 x 10<sup>5</sup> céls.mL<sup>-1</sup> (HCT-116 e L929), 0,1 x 10<sup>6</sup> céls.mL<sup>-1</sup> (SNB-19 e PC3) e 0,3 x 10<sup>6</sup> céls.mL<sup>-1</sup>. As amostras foram testadas na concentração de 100µg.mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 100 µL da

solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100  $\mu$ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Para a triagem inicial das frações com potencial para inibir o crescimento das linhagens testadas, foi calculado o percentual de inibição de crescimento (IC %), determinado levando-se em consideração a média do controle negativo como 100 % de proliferação. Para a avaliação do potencial citotóxico das frações foi utilizada uma escala de intensidade, a qual considera alta atividade tóxica quando inibido entre 95 % a 100 % o crescimento celular, atividade moderada quando de 70 % a 90 % e sem efeitos quando menor que 50 % (FOUCHÉ *et al.*, 2008).

Após a triagem inicial, as frações que apresentaram inibição do crescimento celular superior a 75 %, foram testadas em diferentes concentrações para a determinação da concentração que inibe 50 % da proliferação celular ( $CI_{50}$ ).

### **3.13 Condições cromatográficas para isolamento bioguiado das frações bioativas**

#### *Sistema HPLC analítico*

Para o isolamento bioguiado dos compostos presentes nas frações biologicamente ativas, provenientes do extrato da casca da mangueira, um método foi desenvolvido e conduzido nas seguintes condições: uma coluna cromatográfica de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS(M)  $C_{18}$  (150 x 4.6 mm x 5  $\mu$ m). A fase móvel utilizada foi composta de metanol (B), água (A) ambos acidificados com 0,05% ácido trifluoracético (TFA), em uma corrida cromatográfica de 40 min, onde de 0 a 15 min 40 % (B) e 60 % (A), de 15 a 33 min 100 % (B) e de 33 a 40 min 40 % (B) e 60 % (A). O fluxo de eluição foi de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, à temperatura de 35 °C e com volume de injeção da amostra de 20  $\mu$ L. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm e a aquisição dos espectros UV foi realizada na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm. O controle instrumental da análise e o processamento dos dados foram tratados com o uso do software Shimadzu LC Solution.

#### *Sistema HPLC preparativo*

O método cromatográfico para isolamento bioguiado em escala analítica foi transposto pela ampliação de escala, resultando numa condição cromatográfica onde foi

usada uma coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFire Prep C<sub>18</sub> OBD (100 x 19 mm x 5 µm). A fase móvel utilizada foi composta por metanol (B), água (A) ambos acidificados com 0,05 % ácido trifluoracético (TFA) em uma corrida cromatográfica de 40 min, onde de 0 a 10 min 40 % (B) e 60 % (A), de 10 a 35 min 100 % (B) e de 35 a 40 min 40 % (B) e 60 % (A). O fluxo de eluição de 8,5 mL.min<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 °C, volume de injeção de variando de 1 a 20 mL, com concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm. Tanto o controle do equipamento quanto o processamento dos dados foi feito através do software Empower Pro.

O isolamento bio guiado dos compostos presentes nas frações biologicamente ativas foram executados minuto a minuto, totalizando 40 frações. Foram analisadas as frações que correspondem aos devidos tempos de retenção dos compostos de interesse eluidos.

### 3.14 Sobrecarga de coluna e parâmetros de desempenho

O ensaio de saturação de coluna foi executado com 5 cargas de injeção (200, 400, 600, 800 e 1000 mg) do extrato da casca da mangueira, visando determinar um limite de processo em relação a carga injetada no sistema HPLC preparativo. Os parâmetros de desempenho, rendimento, produtividade e consumo de solvente foram avaliados para embasar a escolha da melhor carga de injeção.

As equações utilizadas para os cálculos de consumo de solvente e produtividade foram adaptadas a partir de trabalhos relatados na literatura (ARCANJO *et al.*, 2015; OIRAM FILHO *et al.*, 2019; SILVA JR *et al.*, 2006). O cálculo utilizado para o consumo de solvente do sistema cromatográfico preparativo está em função dos seguintes parâmetros, vazão volumétrica, tempo de corrida, percentual do solvente orgânico e massa das frações obtidas, expresso em mL.mg<sup>-1</sup>, assim como mostram as equações 12 e 13:

$$CS_{pr.} = \frac{t_{cor} \cdot Q_{pr.} \cdot \%_{sol}}{m_{obt}} \quad (12)$$

Onde,  $CS_{pr.}$  é o consumo de solvente em escala preparativa, expresso em mL.mg<sup>-1</sup> de frações obtidas,  $t_{cor}$  é o tempo da corrida cromatográfica,  $Q_{pr.}$  é a vazão volumétrica (mL.min<sup>-1</sup>) do sistema preparativo,  $\%_{sol}$  é o percentual de solvente

orgânico presente na fase móvel e  $m_{obt}$  a massa de fração obtida presente em cada carga de injeção.

A produtividade do sistema preparativo, expressa em  $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  por g de adsorvente, foi calculada levando em consideração parâmetros específicos do sistema, vazão volumétrica, massa de adsorvente da coluna utilizada e a concentração das frações obtidas, assim como mostram as equações 13.

$$P_{pr.} = \frac{Q_{pr.} \cdot C_{fr}}{m_{ads}} \quad (13)$$

Onde,  $P_{pr.}$  é a produtividade para o sistema preparativo,  $Q_{pr.}$  é a vazão volumétrica ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) do sistema preparativo,  $C_{fr}$  é a concentração da fração obtida em cada carga de injeção,  $m_{ads}$  é a massa de adsorvente da coluna preparativa.

### 3.15 Condições cromatográficas Uplc-Qtof-MS.

Para identificação dos compostos nos dois extratos (*Anacardium occidentale* e *Mangifera indica*), foram realizadas análises em um sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução quadrupolo Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) para realizar a identificação inequívoca dos compostos presentes no extrato. As separações foram realizadas em coluna  $C_{18}$  (Waters Acquity UPLC  $C_{18}$ , 150 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ). O perfil dos metabólitos contidos nos dois extratos foram obtidos inicialmente por um gradiente exploratório, sendo a fase móvel composta por:  $\text{H}_2\text{O}$  (A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo ácido fórmico (0,1 % v/v). As amostras foram submetidas ao seguinte gradiente: 2 – 95 % do solvente (B) em 20 minutos a uma vazão de 500  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . A análise dos extratos foi conduzida em modo de ionização negativo no intervalo de 100 – 1200 Da. As condições da fonte ESI foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 2800 V, tensão do cone 40 V, temperatura da fonte 120  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura de solvatação 330  $^{\circ}\text{C}$ , fluxo de gás do cone de 20  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , o fluxo do gás de solvatação 600  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , e MCP (microcanais tensão da placa) – detector a 1900 V.

A identificação estrutural dos metabólitos presentes no extrato da casca da mangueira e no pedúnculo do caju foi feita mediante as fórmulas moleculares e os valores de  $m/z$  obtidos a partir de espectros de alta resolução, observados nos picos cromatográficos de maior intensidade, por meio do software MassLynx (water Corporation). As propostas estruturais das moléculas encontradas foram realizadas com

os dados de MS/MS, por meio do estabelecimento de padrões de fragmentação (BOUSLIMANI *et al.*, 2014; YULIANA *et al.*, 2013).

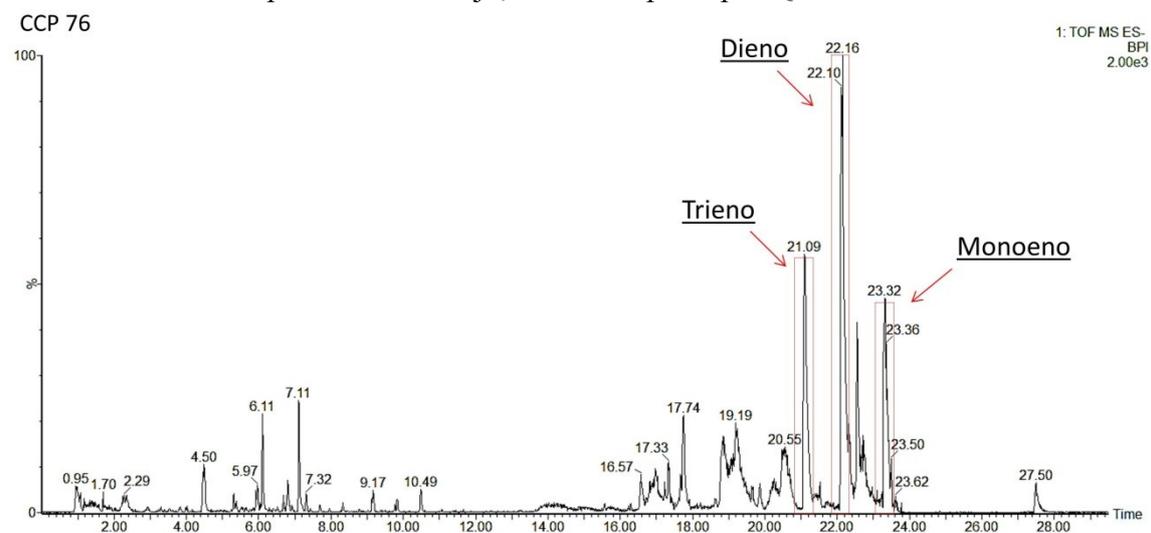
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Anacardium occidentale*

#### 4.1 Confirmação estrutural dos AcAn no pedúnculo do caju por Uplc-Qtof-MS

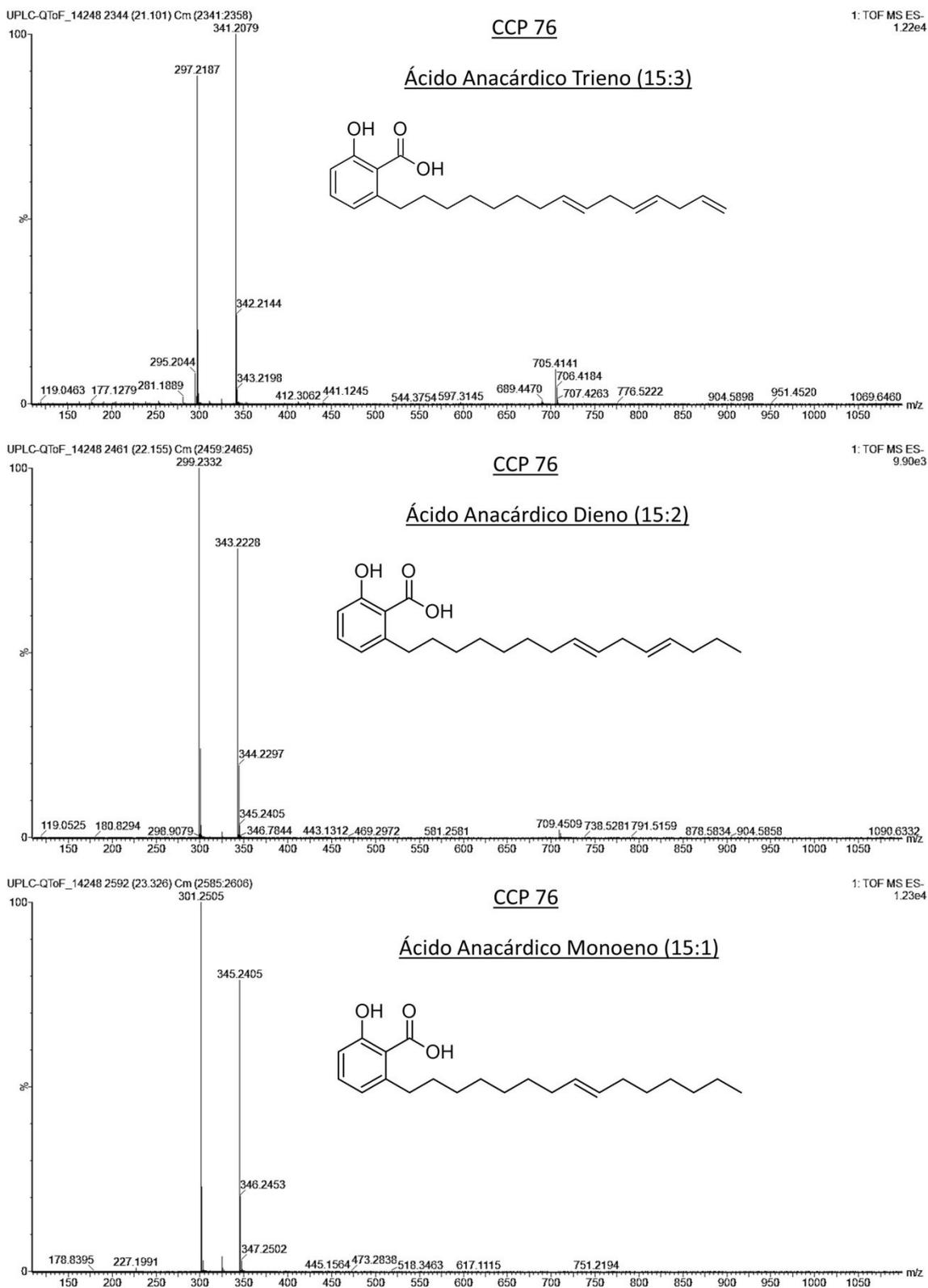
Os AcAn foram confirmados por meio de espectrometria de massas de alta resolução, através da análise de espectros de primeira ordem (MS), que permitiu a determinação precisa das fórmulas moleculares. Adicionalmente, os espectros de segunda ordem (MS<sup>2</sup>) e os íons fragmentados forneceram evidências conclusivas para a confirmação estrutural desses compostos, conforme padrões estabelecidos em publicações de alto impacto na área de espectrometria de massas. Os três AnAc foram identificados em todas as amostras avaliadas, tomando como exemplo o clone CCP 76 (Figura 10) na qual o AnAc trieno (15:3) exibiu um espectro de massas de primeira ordem  $[M - H]^-$  de 341.2079, correspondente à fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>, e um íon fragmento com  $m/z$  297.2187, oriundo da perda neutra de CO<sub>2</sub>, representado por  $[M - H - CO_2]^-$ ; O AnAc dieno (15:2) apresenta uma massa de  $[M - H]^-$  de 343.2228, correspondente à fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>, e um íon fragmento com  $m/z$  de 299.2332, resultante da perda neutra de CO<sub>2</sub>, indicado por  $[M - H - CO_2]^-$ . Já o AnAc monoeno (15:1), possui uma massa de  $[M - H]^-$  de 345.2405, ou seja, espectro de primeira ordem revelando a fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub> e um íon fragmento em  $m/z$  301.2505, também decorrente da perda neutra de CO<sub>2</sub>, como mostrado por  $[M - H - CO_2]^-$  (Figura 11). Essas massas moleculares e os respectivos padrões de fragmentação também foram reportados em outras pesquisas (CUNHA *et al.*, 2017; ERSAN *et al.*, 2016; OIRAM FILHO, F. *et al.*, 2017).

Figura 10 - Perfil cromatográfico dos AcAn trieno, dieno e monoeno presentes na amostra CCP 76 de pedúnculo de caju, analisado por Uplc-Qtof-MS<sup>E</sup>.



Fonte: Autor

Figura 11 - Espectros de massa dos AcAn trieno, dieno e monoeno obtidos do perfil cromatográfico da amostra CCP 76, analisado por Uplc-Qtof-MS<sup>E</sup>.



Fonte: Autor

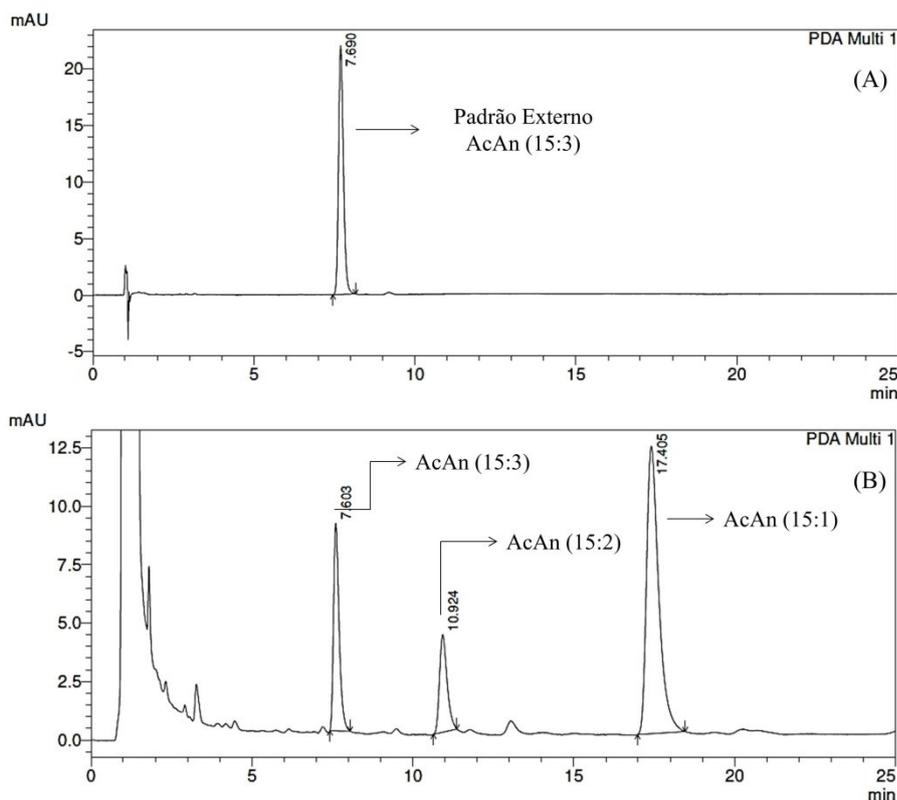
## 4.2 Desenvolvimento do método para quantificação dos AcAn

O método de separação cromatográfica foi otimizado a partir do método descrito por OIRAM FILHO, FRANCISCO *et al.* (2017), a fim de ajustar os parâmetros analíticos para possibilitar as análises dos AcAn presentes no pedúnculo de caju. Os testes executados previamente mostraram que a melhor condição cromatográfica para separação dos AcAn presentes nas amostras foram as seguintes: uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa (150 x 4.6 mm x 5µm), fase móvel de maneira isocrática com 80 % de acetonitrila e uso de 1 % ácido acético para melhor resolução dos picos cromatográficos, fluxo de eluição de 1.5 mL.min<sup>-1</sup>.

Colunas cromatográficas com maior quantidade de carbonos ligados na fase estacionária possuem maior resolução cromatográfica (CRISCUOLO *et al.*, 2019). Portanto, devido as características apolares dos AcAn, a coluna C<sub>18</sub>, obteve uma melhor resolução cromatográfica quando comparada com a coluna C<sub>8</sub>. A acetonitrila mostrou maior eficiência na separação dos três AcAn, devido seu alto poder de eluição quando comparada ao metanol (SNYDER *et al.*, 2012). Parâmetros como percentual de solvente orgânico e fluxo de eluição, foram definidos a partir dos princípios de menor concentração e menor tempo de corrida, respectivamente, capazes para separar os AcAn com perfeição. O pH (3.0) da fase móvel melhorou a simetria dos picos, evitando a formação de efeitos de cauda, devido a inativação dos silanois residuais presentes na fase estacionária (LAI *et al.*, 2020).

Os picos foram identificados usando seus respectivos tempos de retenção e espectros UV de cada AcAn. A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico de pedúnculo de caju, onde foram identificados (1) AcAn trieno (15:3), (2) AcAn dieno (15:2) e (3) AcAn monoeno (15:1) e o perfil cromatográfico do padrão analítico de AcAn trieno (15:3).

Figura 12 - Perfil cromatográfico do padrão externo do ácido anacárdico trieno (15:3); (B) Perfil cromatográfico do pedúnculo do caju. Monitorados a 280 nm.



Fonte: Autor.

### 4.3 Validação do método de quantificação do AcAn

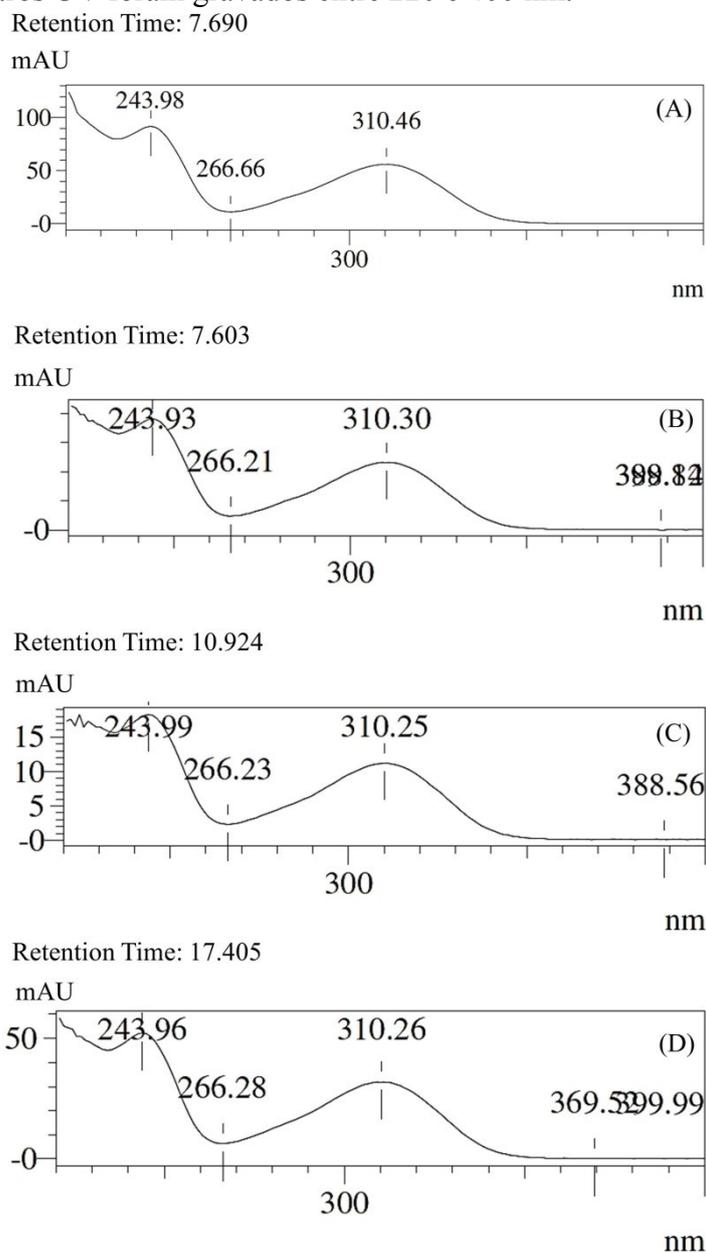
A validação do método foi conduzida baseada nos princípios e parâmetros fornecidos pelo International Conference Harmonization (ICH) (ICH, 2005) e os resultados obtidos para seletividade, linearidade, precisão, teste de adequação de sistema, limites de quantificação e detecção foram de acordo com as normas exigidas para cada parâmetro citado. Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados mostraram que a metodologia desenvolvida em HPLC-DAD, foi capaz de monitorar e quantificar os ácidos anacárdicos presentes em pedúnculos de caju.

O método validado tem relevância, pois apresentou níveis de detecção adequados às concentrações dos ácidos anacárdicos de interesse, fornecendo dados confiáveis, precisos, de maneira rápida e de uso adequado às necessidades laboratoriais (SNYDER *et al.*, 2012). Assim, fornecendo dados robustos sobre os níveis de quantificação de AcAn de pedúnculos de caju, suprimindo a necessidade de métodos validados específicos para AcAn em pedúnculos de caju.

### 4.3.1 Seletividade e Linearidade

A Figura 13 mostra os resultados de seletividade, que foram avaliados com base no espectro UV do padrão externo de trieno AnAc (15:3). As purezas calculadas a partir dos três picos foram 99,17 %, 98,19 % e 99,40 % (Tabela 3) para AnAc (15:3), (15:2) e (15:1), respectivamente.

Figura 13 - Espectros UV de (A) padrão externo AcAn trieno (15:3); (B) AcAn trieno (15:3); (C) AcAn dieno (15:2); (D) AcAn monoeno (15:1). Os espectros UV foram gravados entre 220 e 400 nm.



Fonte: Autor

Tabela 3 - Tempo de retenção e percentual de pureza da análise de 3 pontos para AcAn trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1).

Ácido Anacárdico	$t_R$ (min)	Índice de pureza (%)
(15:3)	7,603	99,17
(15:2)	10,924	98,19
(15:1)	17,405	99,40

Fonte: Autor

A curva de calibração foi construída a partir de oito concentrações (1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de trieno AcAn (15:3). A Tabela 4 lista a linearidade da curva, que foi confirmada pelo valor do coeficiente de determinação da equação da curva analítica ( $y = 2333,5x + 2956,2$ ;  $R^2 = 0,998$ ), o que está de acordo com os encontrados na literatura e guias de validação (AGIL *et al.*, 2012; BRASIL, 2003). Para verificar a confiabilidade dos dados de calibração da curva e da regressão linear foram utilizados o teste t de Student e o teste F. Os coeficientes angulares e lineares da curva de calibração foram significativos; portanto, ambos os termos desempenham papéis importantes na quantificação dos compostos e devem permanecer na equação. O teste F mostrou que existe uma relação linear entre os eixos x e y porque  $F_{cal}$  foi maior que  $F_{tab}$ .

Tabela 4 - 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 %.

<b>Curva analítica</b> $y = 2333,5x + 2956,2$ $R^2 = 0.998$					
<b>Coefficiente Angular</b>	<b>A</b>	<b>S<sub>a</sub></b>	<b>t<sub>cal</sub></b>	<b>t<sub>tab</sub></b>	<b>Teste t</b>
	2333,5	15,79	147,63	2,009	Significativo
<b>Coefficiente Linear</b>	<b>B</b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>t<sub>cal</sub></b>	<b>t<sub>tab</sub></b>	<b>Teste t</b>
	2956,2	830,91	3,56	2,009	Significativo
<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>tabelado</sub></b>	<b>Teste F</b>			
21812,56	1,576	Significativo			
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>CV (%)</b>			
<b>Intra dia (n = 6)</b>	0,9993	0,20			
<b>Inter dia (n = 9)</b>	0,9979	0,29			
	<b>Tempo de retenção (CV)</b>	<b>Área (CV)</b>			
<b>Teste de Adequação de sistema</b>	0,45	0,30			
	<b>Concentração (µg.mg<sup>-1</sup>)</b>				
<b>LOD</b>	0,18				
<b>LOQ</b>	0,85				

Fonte: Autor

#### 4.3.2 Precisão e Teste de adequação de sistema

A Tabela 4 mostra os valores relacionados à precisão, onde as análises intra dia e inter dia foram avaliadas, os resultados obtidos para coeficientes de correlação e coeficientes de variação foram  $R^2 = 0,999$ ,  $CV = 0,20\%$  e  $R^2 = 0,998$ ,  $CV = 0,29\%$ , respectivamente. Os coeficientes de variação encontrados para o teste de adequação do sistema, executados a partir do ponto mediano da curva analítica, para tempo de retenção e área do pico, foram  $CV = 0,45\%$  e  $0,30\%$ , respectivamente. Todos os valores relacionados à precisão e adequação de sistema estão de acordo com os parâmetros estabelecidos nos diversos guias de validação, coeficientes de correlação  $R^2 \geq 0,99$  e coeficiente de variação aproximadamente  $1,0\%$  (BRASIL, 2003; ICH, 2005; LANÇAS, 2004).

### 4.3.3 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

A Tabela 4 mostra o valor do LOD para conseguir diferenciar um analito de um ruído e também apresenta o valor do LOQ para conseguir quantificar um ácido anacárdico com fidelidade e exatidão, esses valores foram 0,18 e 0,85  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Os valores foram obtidos através das equações 9 e 10 utilizando dados provenientes da regressão linear da curva de calibração e mostraram que o método tem alta sensibilidade para determinação de AcAn.

### 4.3.4 Exatidão ou recuperação

A recuperação do método foi baseada na extração exaustiva da molécula alvo, esta técnica pode ser aplicada quando a amostra não pode ser dopada de forma eficiente para garantir a avaliação correta da exatidão. Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram a quantificação dos AcAn em cada uma das cinco extrações dos diferentes clones estudados. Os resultados em todas as amostras analisadas obtidos na primeira e segunda extração sequencial foram viáveis para quantificação dos compostos. Porém, a partir da terceira extração sequencial as amostras de pedúnculo de caju CCP09, BRS275 e Embrapa 51 apresentaram exaustão dos compostos alvo (trieno e dieno) abaixo do limite de quantificação, o que comprova a viabilidade do método utilizando apenas as duas primeiras extrações sequenciais. Os valores totais da quantidade de cada amostra de AcAn trieno, dieno e monoeno foram 24,40, 18,47 e 127,72  $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  respectivamente, para CCP09; 31,16, 56,87 e 111,96  $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ , respectivamente, para CCP76; 44,76, 37,38 e 134,86  $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ , respectivamente, para BRS265; 29,83, 19,15 e 93,63  $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ , respectivamente, para BRS275; e 19,62, 13,71 e 95,02  $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ , respectivamente, para a Embrapa 51.

O teor de AcAn analisados nas cinco amostras diferentes (Tabela 5) apresentou perfis semelhantes quando comparados aos resultados encontrados na literatura, onde os AcAn majoritários foram monoeno (15:1) e os AcAn minoritários foram trieno (15:3). Um dos trabalhos que avaliou o teor dos alquilfenóis do pedúnculo do caju relatou valores de 22,00, 32,00 e 56,00  $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  para trieno, dieno e monoeno, respectivamente (TREVISAN *et al.*, 2006). Entretanto, os teores de AcAn trieno e dieno relatados na literatura variam entre 19,62 e 44,76  $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  para trieno e

entre 13,71 e 56,87 mg.100 g<sup>-1</sup> para dieno. Por outro lado, o conteúdo do AcAn monoeno variou entre 93,63 e 134,86 mg.100 g<sup>-1</sup> para as amostras BRS275 e BRS265, respectivamente. Essa variação no teor de AcAn se deve à variação genética nos clones analisados.

Tabela 5 - Quantificação de AcAn de trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1) de 5 extrações sequenciais e quantidade total da extração realizada em pedúnculos de caju obtidos de diferentes clones de caju, ambos expressos em mg.100 g<sup>-1</sup>.

Amostra	AcAn	Extração (mg.100 g <sup>-1</sup> )					Quantidade total (mg.100 g <sup>-1</sup> )
		1	2	3	4	5	
CCP 09	15:3	22,07 ± 0,13	2,32 ± 0,01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	24,40 ± 0,14
	15:2	16,66 ± 0,02	1,81 ± 0,04	< LOQ	< LOQ	< LOQ	18,47 ± 0,02
	15:1	109,88 ± 0,42	14,63 ± 0,14	2,39 ± 0,09	0,81 ± 0,02	< LOQ	127,72 ± 0,48
CCP 76	15:3	23,16 ± 0,06	6,34 ± 0,07	1,65 ± 0,01	< LOQ	< LOQ	31,16 ± 0,11
	15:2	41,22 ± 0,41	12,01 ± 0,09	3,62 ± 0,05	< LOQ	< LOQ	56,87 ± 0,34
	15:1	79,98 ± 0,28	24,07 ± 0,33	7,74 ± 0,31	0,16 ± 0,04	< LOQ	111,96 ± 0,29
BRS 265	15:3	39,88 ± 0,31	4,64 ± 0,06	0,23 ± 0,02	< LOQ	< LOQ	44,76 ± 0,32
	15:2	33,29 ± 0,19	3,99 ± 0,03	0,10 ± 0,01	< LOQ	< LOQ	37,38 ± 0,22
	15:1	115,26 ± 0,65	16,14 ± 0,04	2,33 ± 0,10	1,12 ± 0,89	< LOQ	134,86 ± 1,14
BRS 275	15:3	26,88 ± 0,25	2,95 ± 0,06	< LOQ	< LOQ	< LOQ	29,83 ± 0,29
	15:2	17,51 ± 0,11	1,64 ± 0,10	< LOQ	< LOQ	< LOQ	19,15 ± 0,04
	15:1	81,26 ± 2,04	10,45 ± 0,19	1,42 ± 0,15	0,49 ± 0,18	< LOQ	93,63 ± 2,01
Embrapa 51	15:3	16,56 ± 0,08	3,05 ± 0,01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	19,62 ± 0,07
	15:2	11,66 ± 0,05	2,05 ± 0,03	< LOQ	< LOQ	< LOQ	13,71 ± 0,06
	15:1	75,95 ± 0,82	16,56 ± 0,58	2,09 ± 0,03	0,40 ± 0,06	< LOQ	95,02 ± 1,10

< LOQ: Valores abaixo do limite que quantificação.

Fonte: Autor

A Tabela 6 mostra a recuperação de cada uma das cinco extrações para todos os clones analisados. Os percentuais de recuperação das duas primeiras extrações foram as seguintes: CCP09 — 96,77, 96,15 e 96,24 % de trieno, dieno e monoeno, respectivamente; CCP76 — 92,22, 91,90 e 91,83 %, respectivamente; BRS265 — 96,59, 96,73 e 96,38 %, respectivamente; BRS275 — 95,89, 95,60 e 96,31 %, respectivamente; e Embrapa 51 — 95,91, 95,80 e 95,75 %, respectivamente.

A porcentagem de recuperação (Tabela 6) mostra que a primeira extração obteve valores entre 70,25 % e 85,35 % para as amostras CCP76 e CCP09, respectivamente. Valores entre 70 % e 130 % são exigidos pelos padrões internacionais de validação utilizados (EMA, 2011; FDA, 1995; ICH, 2005). Porém, a segunda extração representa uma parcela significativa da recuperação de cada ácido anacárdico. Os valores de recuperação para a segunda extração variaram entre 11,19 % e 21,58 % para as amostras BRS275 e CCP76, respectivamente. Assim, o método apresentou excelente recuperação dos compostos, variando entre 91,84 e 96,77 % para as amostras CCP76 e CCP09, respectivamente, utilizando duas extrações sequenciais. Estas percentagens são semelhantes às obtidas por outros métodos de validação (CRAWFORD *et al.*, 2018; DE PAEPE *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2017).

Tabela 6 - Percentual de recuperação de AcAn trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1) de todas as cinco extrações sequenciais nos diferentes pedúnculos de caju.

Amostra	AcAn	Recuperação (%)				
		1	2	3	4	5
CCP09	15:3	85,35 ± 0,49	11,42 ± 0,05	2,18 ± 0,16	0,93 ± 0,05	0,11 ± 0,05
	15:2	83,88 ± 0,13	12,27 ± 0,22	2,56 ± 0,06	1,14 ± 0,06	0,13 ± 0,06
	15:1	84,51 ± 0,32	11,73 ± 0,11	2,18 ± 0,07	1,17 ± 0,02	0,19 ± 0,06
CCP76	15:3	71,17 ± 0,19	21,05 ± 0,22	7,06 ± 0,04	0,66 ± 0,05	0,03 ± 0,02
	15:2	70,48 ± 0,70	21,42 ± 0,15	7,30 ± 0,09	0,78 ± 0,10	0,02 ± 0,02
	15:1	70,25 ± 0,25	21,58 ± 0,29	7,36 ± 0,27	0,77 ± 0,03	0,02 ± 0,01
BRS265	15:3	85,33 ± 0,66	11,26 ± 0,13	2,00 ± 0,05	1,33 ± 0,77	0,05 ± 0,04
	15:2	84,97 ± 0,48	11,76 ± 0,08	2,03 ± 0,03	1,16 ± 0,74	0,06 ± 0,03
	15:1	84,15 ± 0,47	12,23 ± 0,03	2,21 ± 0,07	1,33 ± 0,65	0,06 ± 0,01
BRS275	15:3	84,56 ± 0,79	11,33 ± 0,20	2,34 ± 0,10	1,54 ± 0,05	0,22 ± 0,05
	15:2	84,41 ± 0,51	11,19 ± 0,47	1,90 ± 0,23	1,31 ± 0,07	0,18 ± 0,07
	15:1	84,73 ± 2,11	11,58 ± 0,19	2,24 ± 0,16	1,29 ± 0,19	0,15 ± 0,04
Embrapa51	15:3	78,67 ± 0,36	17,24 ± 0,05	2,74 ± 0,03	1,17 ± 0,18	0,17 ± 0,02
	15:2	78,24 ± 0,30	17,56 ± 0,18	2,73 ± 0,14	1,17 ± 0,20	0,28 ± 0,32
	15:1	78,13 ± 0,84	17,62 ± 0,59	2,88 ± 0,03	1,15 ± 0,06	0,20 ± 0,05

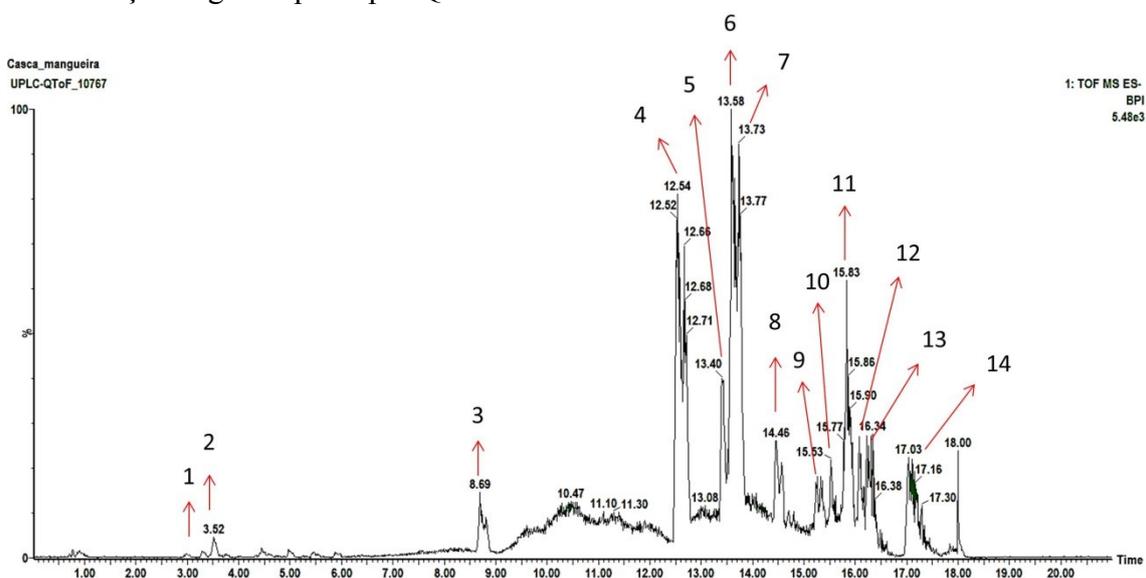
Todos os resultados da Tabela 6 foram obtidos a partir da Equação 9.

Fonte: Autor.

*Mangifera indica***4.4 Identificação estrutural dos compostos da casca da mangueira via Uplc-Qtof-MS<sup>E</sup>**

A Figura 14 mostra o perfil cromatográfico do extrato bruto da casca da mangueira analisado em modo negativo de ionização. Os picos foram enumerados de acordo com a ordem de eluição, e os compostos foram tentativamente identificados por interpretação dos seus espectros de massas (MS e MS/MS), detectados por Qtof-MS e analisados pelo software Masslynx<sup>®</sup>. A Tabela 7 mostra os dados de massas e compostos tentativamente identificados, incluindo os valores de m/z obtidas e calculadas de acordo com as respectivas fórmulas moleculares, erro, fragmentos obtidos por MS/MS, bem como o nome proposto do composto para cada pico. Os espectros de massa e as estruturas moleculares de cada composto relatado são apresentados nos apêndices A ao L.

Figura 14 - Perfil cromatográfico do extrato da casca da mangueira. Analisado em modo de ionização negativa por Uplc-Qtof-MS<sup>E</sup>.



Fonte: Autor

Tabela 7 - Anotação dos compostos presentes na casca da mangueira via UPLC-Qtof-MSE.

<b>Pico no.</b>	<b>t<sub>R</sub> Min</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup> Observada</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup> Calculada</b>	<b>Produto Ions (MS/MS)</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Ppm (erro)</b>	<b>Composto</b>	<b>Ref</b>
1	3,29	421,0793	421,0771	331,0452; 301,0356	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	5,2	Mangiferina (Isômero I)	1
2	3,52	421,0778	421,0771	331,0457; 301,0372	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	1,7	Mangiferina (Isômero II)	1
3	-	-	-	-	-	-	Não identificado	-
4	12,52	471,3464	471,3474	339,1996	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>4</sub>	-2,1	Ácido hidroxí isomangiferólico (Isômero I)	2; 3
5	13,40	471,3429	471,3474	339,1980	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>4</sub>	-9,5	Ácido hidroxí isomangiferólico (Isômero II)	2; 3
6	13,59	469,3359	469,3318	339,1885	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>4</sub>	8,7	Ácido hidroxí isomangiferônico (Isômero I)	2; 3
7	13,72	469,3344	469,3318	339,1988	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>4</sub>	5,5	Ácido hidroxí isomangiferônico (Isômero II)	2; 3
8	14,45	471,3429	471,3474	339,1984	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>4</sub>	-9,5	Ácido hidroxí isomangiferólico (Isômero III)	2; 3
9	15,26	469,3653	469,3682	451,3228; 417,3008; 339,1997	C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> O <sub>3</sub>	-6,2	Ácido ambólico	2; 3
10	15,53	369,2398	369,2430	325,2519	C <sub>24</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub>	-8,7	Ácido anacárdico (17:3)	4
11	15,83	467,3488	467,3525	339,1979	C <sub>31</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	-7,9	Ácido ambônico	2; 3

<b>12</b>	16,07	345,2398	345,2430	301,2519	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub>	-9,3	Ácido anacárdico (15:3)	5
<b>13</b>	16,26	371,2550	371,2586	327,2620	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> O <sub>3</sub>	-9,7	Ácido anacárdico (17:2)	4
<b>14</b>	17,03	373,2739	373,2743	329,2835	C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> O <sub>3</sub>	-1,1	Ácido anacárdico (17:1)	4

1 TREVISAN *et al.* (2016); 2 ESCOBEDO-MARTÍNEZ *et al.* (2012); 3 ANJANEYULU e RADHIKA (2000); 4 JERZ *et al.* (2012)

Fonte: Autor

Pico 1 (Tr. 3,29) e pico 2 (Tr. 3,52) foi tentativamente identificado como mangiferina e seu isômero. Esse composto apresentou íon precursor de  $m/z$  421,0793  $[M-H]^-$  em MS e o espectro MS/MS apresentou fragmentos 331,0452  $[M-H-90]^-$  e 301,0356  $[M-H-120]^-$  indicando a presença de hexose como um monossacarídeo. O mesmo padrão de fragmentação também foi relatado na literatura (AJILA *et al.*, 2007; GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2016; MEDLICOTT; THOMPSON, 1985).

Pico 3 (Tr. 8,69) não foi identificado. Pico 4 (Tr. 12,52), 5 (Tr. 13,40) e 8 (Tr. 14,45) são referentes a um composto da classes dos triterpenos, que apresentou íon precursor  $m/z$  471,3464  $[M-H]^-$  em MS e um fragmento 339,1996  $[M-H-132]^-$  referente a perda de massa molecular de um pentosídeo. Os picos são representativos ao composto ácido hidroxí isomangiferólico, também exposto e relatado anteriormente em extratos de *Mangifera indica* (ANJANEYULU *et al.*, 1994; ANJANEYULU; RADHIKA, 2000; ANJANEYULU *et al.*, 1989; ESCOBEDO-MARTÍNEZ *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 1994).

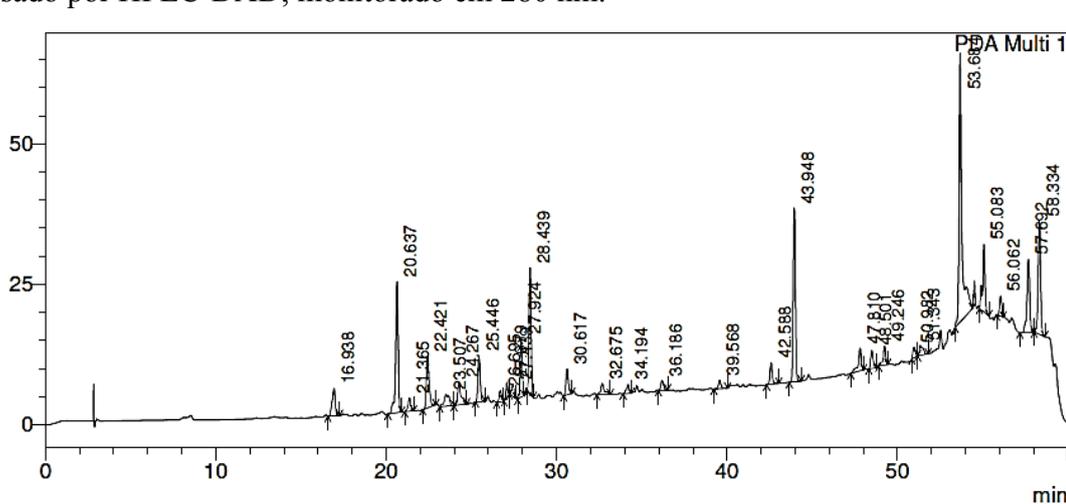
Pico 6 (Tr. 13,40), pico 7 (Tr. 13,72), pico 9 (Tr. 15,26) e pico 11 (Tr. 15,83) são representativos de triterpenos identificados como ácido hidroxí mangiferônico e seu isômero, ácido ambólico e ácido ambônico, respectivamente, onde o padrão de fragmentação desses compostos já foi relatado na literatura com perdas 128 e 132 Da, referentes a um glicosídeo triterpénico (LING *et al.*, 2023; POPOV *et al.*, 2023).

Pico 10 (Tr. 15,53), pico 12 (Tr. 16,07), pico 13 (Tr. 16,26) e pico 14 (Tr. 17,03) são referentes a ácidos anacárdicos (17:3), (15:3), (17:2) e (17:1) respectivamente, onde os quatros compostos apresentaram um padrão fragmentação compatíveis ao relatado na literatura, com perdas de  $[M-H-44]^-$  referente à clivagem de uma molécula de  $CO_2$  presente na estrutura molecular de todos os ácidos anacárdicos (ERSAN *et al.*, 2016; JERZ *et al.*, 2012; OIRAM FILHO *et al.*, 2018; TREVISAN *et al.*, 2006).

#### 4.5 Perfil exploratório HPLC analítico para o extrato casca mangueira

O cromatograma analítico (Figura 15) do extrato da casca da mangueira apresentou um perfil de separação exploratório que mostra um grande número de compostos, assim mostrando a capacidade do método de separar previamente os diferentes compostos e/ou grupos de compostos presente numa mistura.

Figura 15 - Perfil cromatográfico do extrato bruto da casca da mangueira ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) analisado por HPLC-DAD, monitorado em 280 nm.



Fonte: Autor

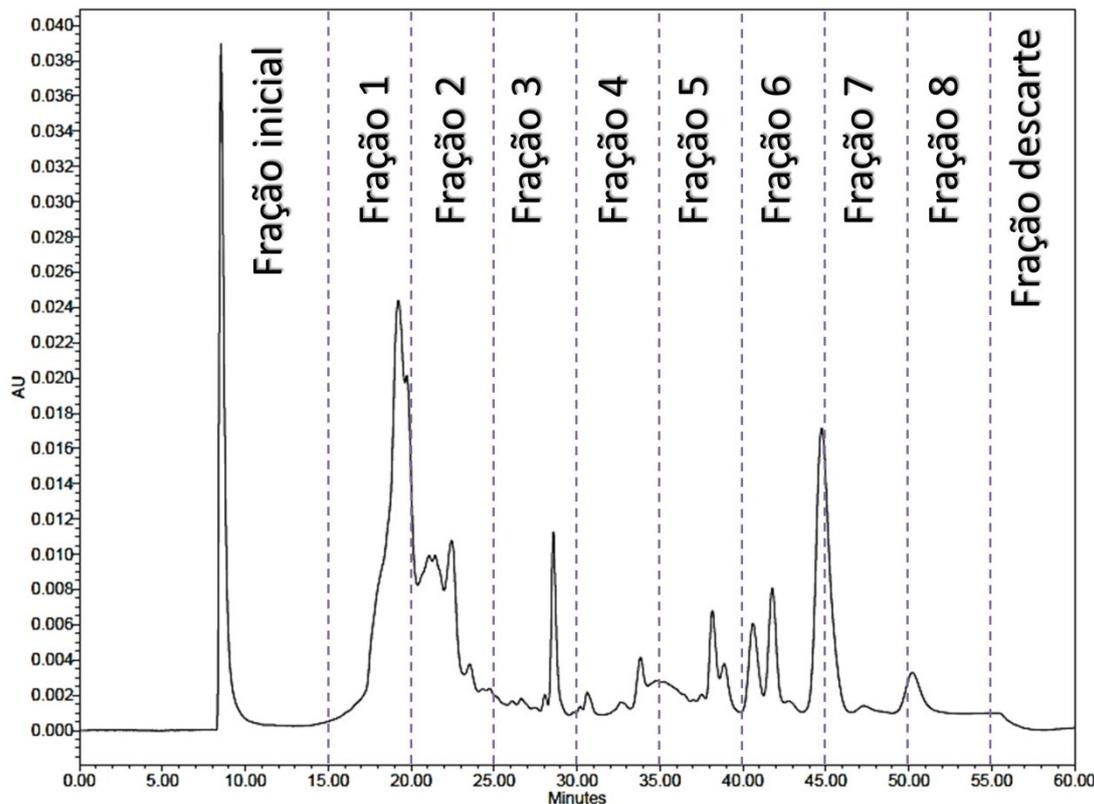
Essa avaliação do perfil exploratório mostra compostos com características de polaridades diferentes, baseado na interação com fase estacionária da coluna cromatográfica usada, sendo ela fase normal ou reversa (SNYDER *et al.*, 2012). Portanto, a Figura 15 mostra uma variação entre compostos mais polares para os mais apolares do início ao final da corrida cromatográfica, devido ao incremento no percentual de metanol usado durante a análise e o uso da coluna de fase reversa. Essa abordagem auxilia a otimização de um método cromatográfico na separação de compostos em um extrato complexo, utilizando proporções corretas de solvente na fase móvel (BURIN *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2015) de acordo com as características dos compostos e/ou grupo de compostos presentes no extrato. Além do mais, o resultado apresentado nesse perfil cromatográfico permite uma ampliação de escala, da analítica para escala preparativa na tentativa de obter a separação desses compostos em quantidades maiores.

#### 4.6 Fracionamento do extrato da casca da mangueira em escala preparativa

A partir do método exploratório foi desenvolvido um método de fracionamento do extrato da casca da mangueira onde a fração inicial foi composta pelos primeiros 15 min de corrida cromatográfica, seguido de 8 frações de 5 min cada e a porção final do cromatograma foi considerada descarte (Figura 16). As frações representativas do início da corrida (F in, F1, F2 e F3) são as frações mais polares compreendendo o tempo de 0

a 30 min. O restante das frações representam as frações mais apolares (F4, F5, F6, F7 e F8) compreendendo a porção de 30 a 55 min.

Figura 16 - Perfil cromatográfico do extrato da casca da mangueira por HPLC preparativo e respectivo fracionamento, monitorado em 280 nm.



Fonte: Autor

Devido à complexidade da amostra e os diferentes níveis de polaridade dos compostos, executar um fracionamento do extrato é uma alternativa amplamente empregada em trabalhos de purificação, assim essa técnica auxilia no isolamento bioguiado dos compostos com atividade citotóxica (BRILLATZ *et al.*, 2016; JIAO *et al.*, 2017; MBEKEANI *et al.*, 2019).

As frações obtidas neste fracionamento foram analisadas via espectrometria de massas, avaliando a eficiência do fracionamento, monitoramento dos compostos presentes em cada fração, bem como o fornecimento de dados para intensidades dessas moléculas presentes em cada fração (Tabela 8), os respectivos cromatogramas estão expostos nos apêndices M ao U.

Tabela 8 - Dados de detecção dos compostos identificados nas frações analisadas, juntamente com a intensidade de cada composto nas respectivas frações.

Composto	Fração / intensidade (+)								
	In.	1	2	3	4	5	6	7	8
Mangiferina		(+++)	(+)						
Ácido Hidroxi- isomangiferólico					(++)	(+++)			
Ácido Hidroxi- mangiferónico						(+++)	(++)	(+)	
Ácido Ambólico							(+++)		
Ácido Anacárdico (17:3)							(++)		
Ácido Ambônico							(+)	(+++)	(+)
Ácido Anacárdico (15:3)							(+++)	(+)	
Ácido Anacárdico (17:2)							(++)	(+++)	(+)
Ácido Anacárdico (17:1)							(+)	(++)	(+++)

(+) entre 150 e 999; (++) entre  $1,00 \times 10^3$  e  $2,99 \times 10^3$ ; (+++) acima de  $3,00 \times 10^3$ .

Fonte: Autor

#### 4.7 Atividade citotóxica in vitro

De acordo com a Tabela 9, o extrato bruto (EB) de manga apresentou inibição do crescimento (IC%) variando de 67,9 a 85,2 % para as linhagens tumorais e 98,7 % de inibição para a linhagem não tumoral. As frações F1, F2 e F3 não apresentaram citotoxicidade para nenhuma das linhagens testadas. As frações F4, F5 e F6, contendo majoritariamente os triterpenoides, foram citotóxicas para todas as linhagens cancerígenas, bem como para células saudáveis, atingindo um percentual de inibição acima de 75 %. A fração F7, contendo em sua composição principal ácidos anacárdicos de 17 carbonos (17:2 e 17:1) e um triterpeno ácido ambônico, apresentou alto potencial citotóxico para as linhagens PC3 (Próstata), HCT-116 (Carcinoma de colón – humano) e SNB-19 (Astrocitoma). O ácido anacárdico 17:1 foi o composto majoritário na fração F8 que foi citotóxica para as linhagens HCT-116 e SNB-19. As frações F7 e F8 não apresentaram inibição do crescimento acima de 75 % para a linhagem não tumoral (L929), mostrando um percentual menor que 50 % na inibição de crescimento para L929, considerando assim, de acordo com a escala de intensidade sem efeito citotóxico

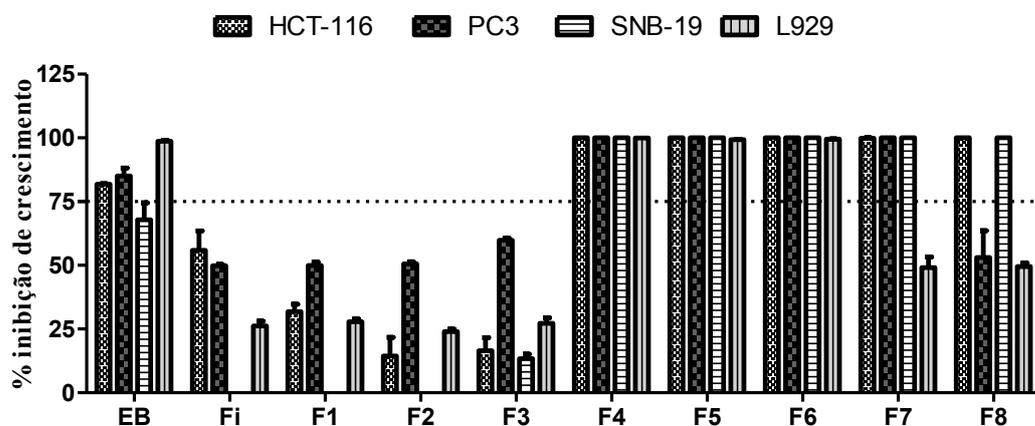
para as células saudáveis (FOUCHÉ *et al.*, 2008). Um fator importante a ser relatado é a diferença da composição majoritária entre a F6 e F7 (Tabela 8), que fica evidenciado a presença do ácido ambólico na F6 e sua ausência na F7, que pode ser o composto responsável ao efeito danoso às células sadias em F6. Os dados detalhados da atividade citotóxica das amostras testadas estão representados na Tabela 9 e Gráfico 2.

Tabela 9 - Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC %) das amostras na concentração única de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Frações	Inibição do crescimento celular (IC %)			
	HCT-116	PC3	SNB19	L929
EB	81,9 $\pm$ 0,2	85,1 $\pm$ 4,3	67,9 $\pm$ 9,4	98,7 $\pm$ 0,5
Fi	55,9 $\pm$ 10,8	49,9 $\pm$ 0,9	0,0 $\pm$ 0,0	26,2 $\pm$ 3,2
F1	31,8 $\pm$ 5,2	50,0 $\pm$ 2,3	0,0 $\pm$ 0,0	27,8 $\pm$ 1,9
F2	14,4 $\pm$ 12,5	50,5 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	24,0 $\pm$ 1,6
F3	16,6 $\pm$ 8,8	59,8 $\pm$ 1,5	13,4 $\pm$ 3,2	27,2 $\pm$ 3,9
F4	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,1
F5	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	99,3 $\pm$ 0,2
F6	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	99,6 $\pm$ 0,1
F7	99,9 $\pm$ 0,2	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	49,1 $\pm$ 7,2
F8	100,0 $\pm$ 0,0	53,1 $\pm$ 14,8	100,0 $\pm$ 0,0	49,5 $\pm$ 2,5

Fonte: Autor

Gráfico 2 - Representação gráfica da média do percentual de inibição do crescimento (IC) do extrato e frações de manga na concentração de a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



Fonte: Autor

Após análises de concentração única ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), analisou a concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) dos compostos com percentual acima de 75% de inibição em pelo menos duas linhagens tumorais (Tabela 8).

O EB apresentou  $CI_{50}$  de  $50,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apenas para a linhagem de colorretal (HCT-116), nas demais linhagens o extrato apresentou  $CI_{50}$  maior que  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As frações apresentaram  $CI_{50}$  variando de 18,06 a  $95,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A fração 6 apresentou melhores percentuais de inibitórios médios frente as linhagens de cólon e próstata, com  $CI_{50}$  18,06 e  $21,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. A fração 7 apresentou segundo melhor resultado quanto a  $CI_{50}$ , apresentando resultado  $CI_{50}$  de  $29,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a linhagem HCT-116 (Tabela 10).

Tabela 10 - Avaliação da concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) dos compostos frente às linhagens tumorais.

Amostra	MTT $CI_{50} \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Intervalo)		
	PC3	SNB-19	HCT-116
EB	>100	>100	50,81 41,76 - 61,83
F4	46,09 32,77 - 64,81	83,18 74,11 - 93,37	51,12 44,50 - 58,73
F5	41,77 34,37 - 50,77	70,30 58,78 - 84,06	36,85 31,60 - 42,98
F6	21,48 18,27 - 25,26	47,81 44,82 - 50,99	18,06 15,01 - 21,73
F7	59,49 43,02 - 82,26	>100	29,05 19,08 - 44,22
F8	95,11 79,86 - 113,3	>100	>100

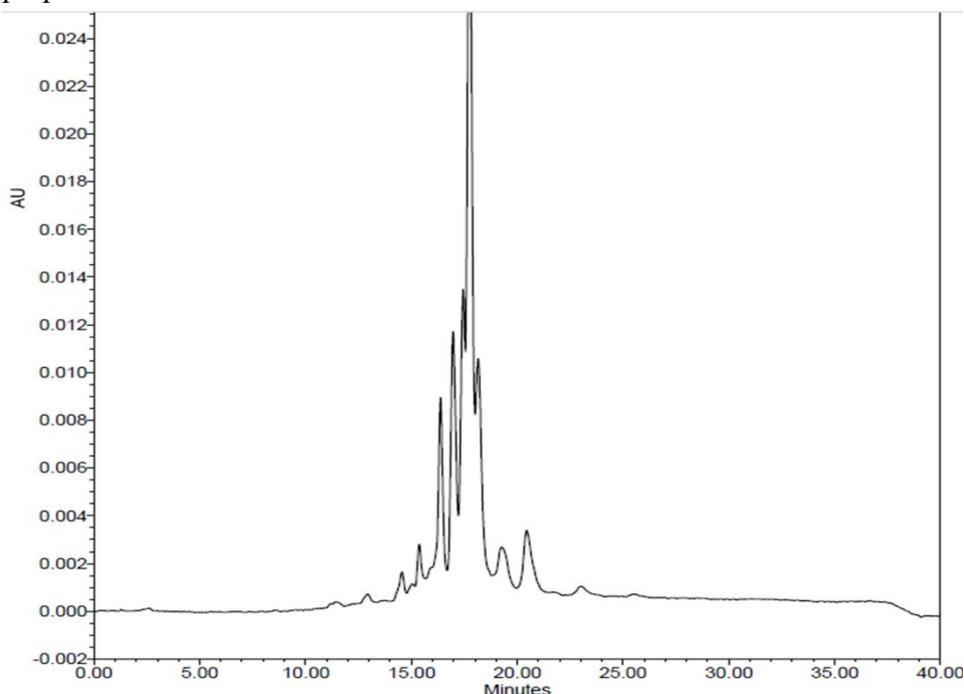
Fonte: Autor

#### 4.8 Isolamento bioguiado dos compostos presentes nas frações ativas

As frações biologicamente ativas (F4, F5, F6, F7 e F8) e com respostas positivas contra as linhagens de câncer (SNB-19, HCT-116 e PC3), foram isoladas em escala preparativa. As frações coletadas minuto a minuto, contendo analitos foram avaliadas via HPLC e UPLC para confirmação do isolamento, identificação e respectiva pureza de pico. A Figura 17 mostra o perfil cromatográfico dos compostos presentes nas frações bioativas (F4, F5, F6, F7 e F8) analisados em escala preparativa, de acordo com

as análises prévias, são compostos das classes dos triterpenos e ácidos anacárdicos identificados nas Tabelas 7 e 8.

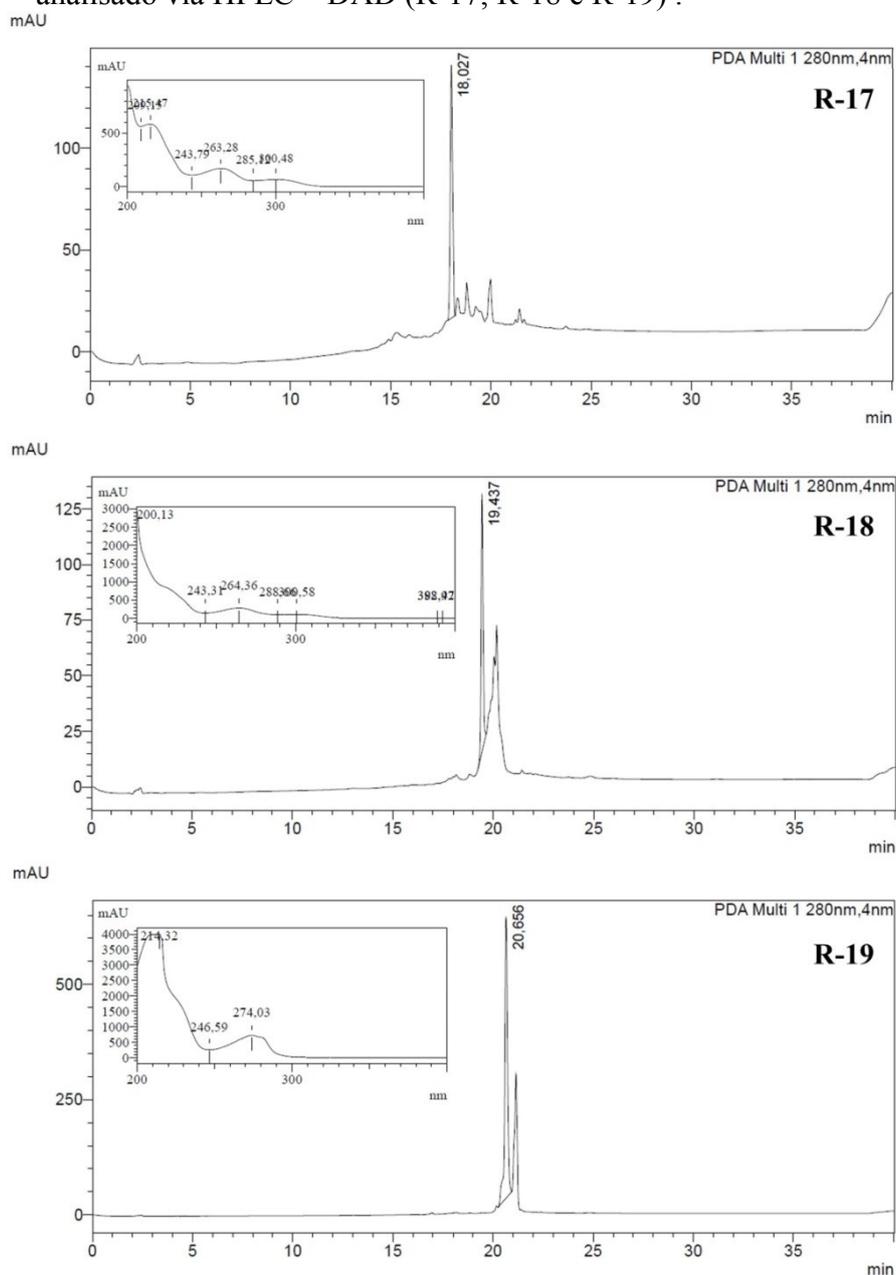
Figura 17 - Perfil cromatográfico das frações biologicamente ativas (F4, F5, F6, F7 e F8) proveniente do extrato da casca da mangueira, analisado pro HPLC - UV/VIS preparativo.



Fonte: Autor

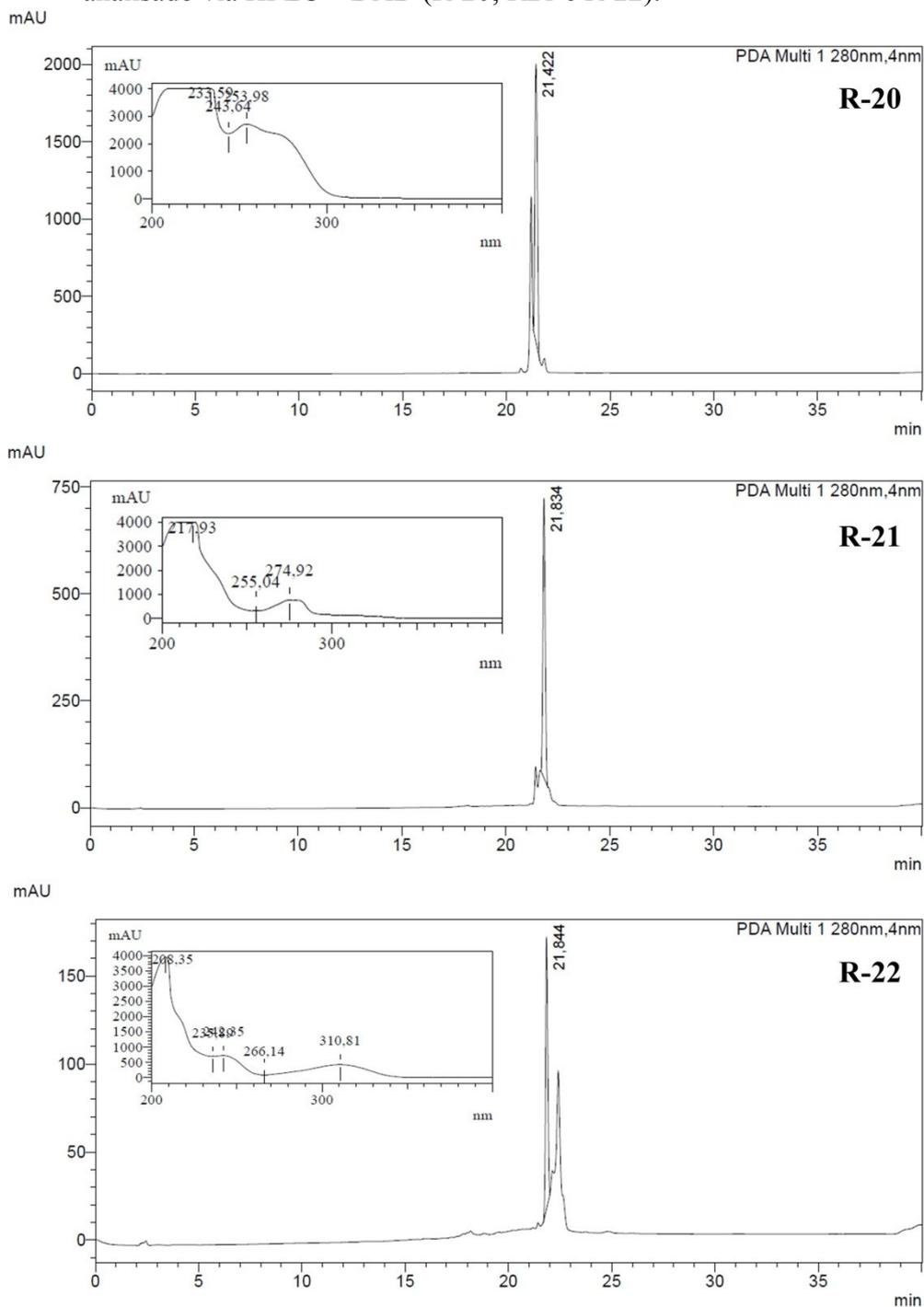
O isolamento bioguiado conduzido gerou 40 frações, onde apenas as frações dentro das faixas contendo picos cromatográficos foram analisadas. A Figura 18 mostra as subfrações contendo três compostos da classe dos triterpenos (R-17, R-18 e R-19). A Figura 19 apresenta a sequência do isolamento bioguiado (R-20, R-21 e R-22), onde é exposto a presença de ácidos anacárdicos devido o comportamento da absorção do espectro UV do composto na Figura 19 (R-22), o mesmo comportamento foi avaliado por OIRAM FILHO *et al.* (2018).

Figura 18 - Perfil cromatográfico e respectivo espectro UV do isolamento bioguiado dos compostos proveniente das frações biologicamente ativas, analisado via HPLC – DAD (R-17; R-18 e R-19) .



Fonte: Autor

Figura 19 - Perfil cromatográfico e respectivo espectro UV do isolamento bioguiado dos compostos proveniente das frações biologicamente ativas, analisado via HPLC – DAD (R-20; R21 e R-22).

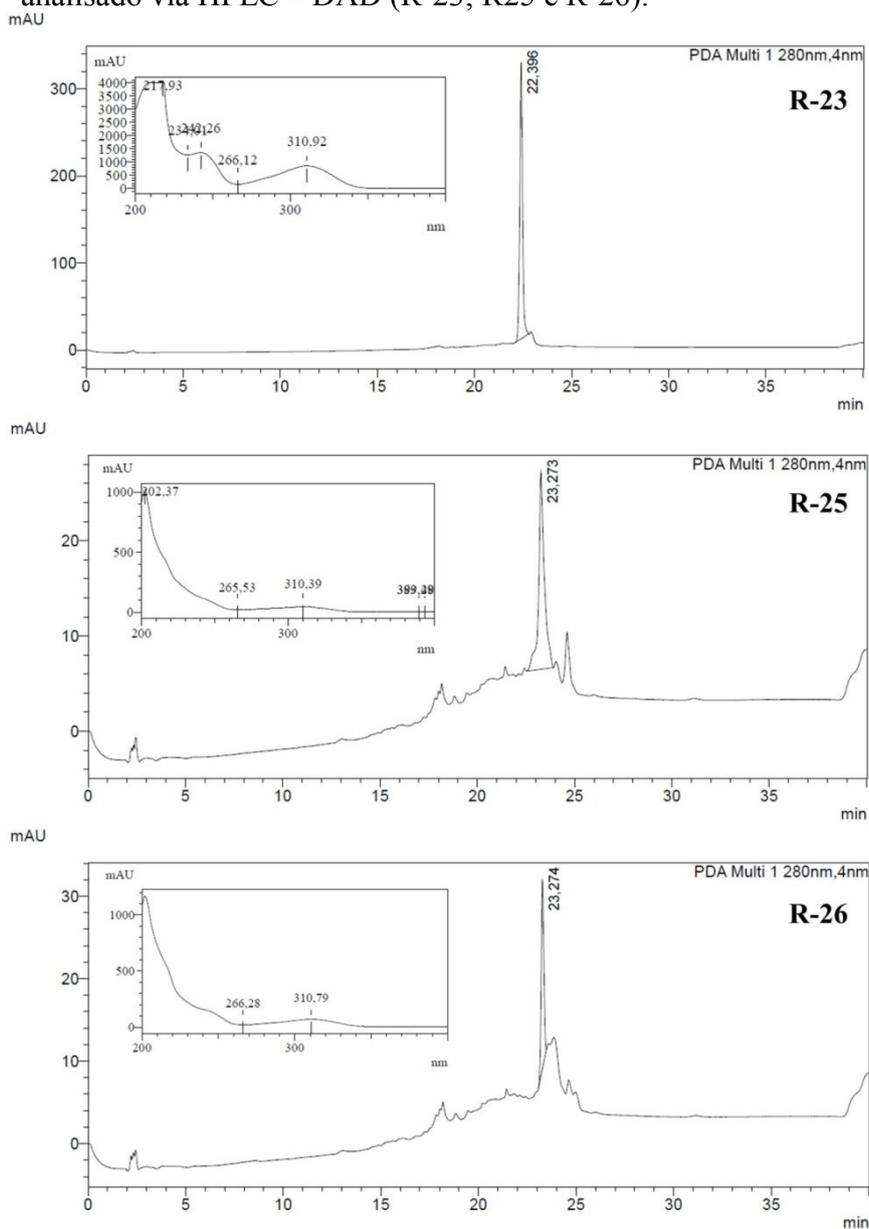


Fonte: Autor

Os cromatogramas R-23, R-25 e R-26 expressos na Figura 20, todos são representativos de ácidos anacárdicos, pois também apresentam o mesmo perfil de absorção de UV que a subfração R-22, indicando AcAn. Apesar de serem AcAn

distintos, o cromóforo estrutural do composto é o mesmo, diferenciando apenas a cadeia alifática lateral, com isso suas absorções no espectro UV se tornam similares entre si. Devido a similaridade estrutural dos AcAn, suas absorções no espectro UV são as mesmas. Os percentuais de pureza avaliados para cada pico estão expostos na Tabela 11.

Figura 20 - Perfil cromatográfico e respectivo espectro UV do isolamento bioguiado dos compostos proveniente das frações biologicamente ativas, analisado via HPLC – DAD (R-23; R25 e R-26).



Fonte: Autor

Tabela 11 - Percentual da pureza dos picos do isolamento bioguiado das frações biologicamente ativas, analisados via HPLC-DAD.

Classe de composto	t <sub>R</sub> (min)	Pureza (%)
Triterpeno	18,027	98,45
Triterpeno	19,437	89,51
Triterpeno	20,656	94,52
Triterpeno	21,422	93,77
Triterpeno	21,834	94,52
Ácido ancárdico	21,844	99,05
Ácido ancárdico	22,396	98,24
Ácido ancárdico	23,273	97,57
Ácido ancárdico	23,274	99,91

Fonte: Autor

#### 4.9 Parâmetros de desempenho e sobrecarga da coluna

O ensaio de sobrecarga de coluna apresentou resultados para as cargas de 200, 400, 600, 800 e 1000 mg. Os valores em massa (Tabela 12) obtidos do fracionamento mostraram um comportamento crescente em função das cargas injetadas praticamente em todas as frações, onde apenas a fração 1, 2, 3 e 4 não seguiram esse padrão, o que pode ser explicado devido ao caráter polar dessas frações associado com a ampliação da carga das injeções, gerando uma perda na recuperação de massa fracionada. No entanto, as frações F.in, F5, F6, F7 e F8, obtiveram incremento de massa à medida que se aumentou a carga de injeção.

Tabela 12 - Dados de sobrecarga da coluna obtidos com fracionamento do extrato bruto da casca da mangueira em função das diferentes cargas injetadas, expresso em massa (mg).

Frações	Carga de Injeção (mg)				
	200	400	600	800	1000
<b>Inicial</b>	10,77 ± 0,64	38,67 ± 1,51	86,97 ± 1,91	120,30 ± 2,16	135,40 ± 2,17
<b>1</b>	7,07 ± 0,91	12,70 ± 2,25	3,60 ± 1,87	3,47 ± 1,25	3,90 ± 0,26
<b>2</b>	7,13 ± 1,71	13,30 ± 2,45	7,57 ± 1,47	14,23 ± 1,50	17,93 ± 0,94
<b>3</b>	4,10 ± 0,50	5,70 ± 0,26	7,27 ± 1,98	31,73 ± 1,02	10,80 ± 2,07
<b>4</b>	6,13 ± 1,15	10,50 ± 1,01	44,20 ± 2,39	39,10 ± 1,73	50,50 ± 2,18
<b>5</b>	18,80 ± 1,13	25,17 ± 1,65	53,03 ± 2,05	85,23 ± 1,68	146,20 ± 2,27
<b>6</b>	22,03 ± 1,18	32,23 ± 2,19	66,63 ± 1,57	115,50 ± 2,01	161,93 ± 2,65
<b>7</b>	11,30 ± 0,53	17,37 ± 0,85	31,60 ± 1,67	58,77 ± 1,97	79,77 ± 1,46
<b>8</b>	6,03 ± 0,40	9,30 ± 0,45	15,92 ± 1,92	34,33 ± 1,45	44,27 ± 1,35

Fonte: Autor

A produtividade do sistema em relação às frações obtidas está de acordo com os valores de massas apresentados uma vez que estes resultados estão intimamente ligados. À medida que se aumenta a carga de injeção no sistema preparativo a produtividade também deve ser incrementada, assim, enquanto ocorrer um aumento de produtividade linear e proporcional em função do aumento de carga, a coluna ainda não está saturada. Os resultados expressos na Tabela 13 mostram um aumento na produtividade compatível com os valores de massa obtidos, ocorrendo um ganho de produtividade em quase todas as frações, ficando apenas as frações 1 e 2 nas cargas 600 e 800 mg, fração 4 na carga 800 mg e frações 1 e 3 na carga 1000 mg, sem apresentar esse comportamento crescente. No entanto, os resultados para ampliação de carga são satisfatórios até a carga 1000 mg, apresentando bons números e proporcionalidade no incremento da produtividade. Contudo, para definir o limite de sobrecarga da coluna usando o parâmetro de produtividade os valores precisam se manter estáveis ou ocorrer um decréscimo nos valores (OIRAM FILHO *et al.*, 2019). Portanto, apenas os valores apresentados para produtividade não podem definir o limite ótimo de sobrecarga da coluna.

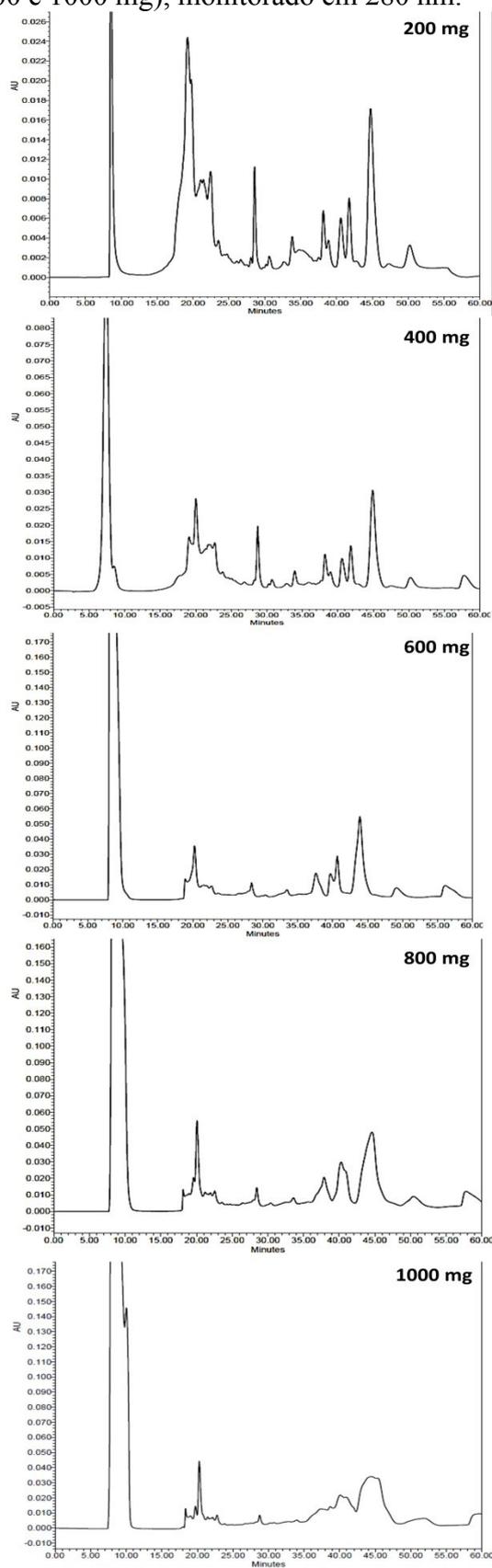
Tabela 13 - Resultados de produtividade e consumo de solvente para o sistema HPLC preparativo para cada fração resultante do fracionamento do extrato da casca da mangueira.

Carga de injeção	Produtividade (g.dia <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )								
	F.in.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
200 mg	1.38	0.91	0.92	0.53	0.79	2.41	2.83	1.45	0.77
400 mg	4.97	1.63	1.71	0.73	1.35	3.23	4.14	2.23	1.19
600 mg	11.17	0.46	0.97	0.93	5.68	6.81	8.56	4.06	2.04
800 mg	15.45	0.45	1.43	4.08	5.02	10.95	14.83	7.55	4.41
1000 mg	17.39	0.50	2.30	1.39	6.49	18.78	20.80	10.24	5.68
Carga de injeção	Consumo de solvente (mL.mg <sup>-1</sup> )								
	F.in.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
200 mg	30.88	47.05	46.61	81.09	54.21	17.68	15.09	29.42	55.11
400 mg	8.60	26.18	25.00	58.33	31.66	13.21	10.31	19.14	35.75
600mg	3.82	92.35	43.94	45.75	7.52	6.27	4.99	10.52	20.88
800 mg	2.76	95.91	23.36	10.48	8.50	3.90	2.88	5.66	9.68
1000 mg	2.46	85.25	18.54	30.78	6.58	2.27	2.05	4.17	7.51

Fonte: Autor

Os resultados de consumo de solvente são inversamente proporcionais aos valores de produtividade, à medida que se aumenta a produtividade de um sistema, ocorre um decréscimo no consumo de solvente, e esse decréscimo deve ser proporcional ao aumento de carga injetada. Todas as frações tiveram resultados satisfatórios em praticamente em todas as cargas, sendo exceções apenas as frações F1 nas cargas de 600, 800 e 1000 mg, F2 na carga 600 mg, F3 na carga de 1000 mg e F4 na carga de 800 mg. Contudo, os resultados para as frações F5 até F8 apresentam em todas as cargas injetadas um decréscimo habitual referente ao incremento de carga injetada, no entanto, a proporcionalidade desejada não foi obtida entre as cargas de 800 mg e 1000 mg. Associado aos resultados dos parâmetros de desempenho, a avaliação dos cromatogramas da sobrecarga de injeção (Figura 21), para verificação dos alargamentos e deformações de picos causadas pelo excedente de carga injetada no sistema preparativo, são importantes para definição do limite de carga para o processo cromatográfico. O perfil de eluição e o comportamento dos picos entre a carga de 800 e 1000 mg mostram deformação e alargamento dos picos, da mesma forma foi evidenciado por OIRAM FILHO *et al.* (2019). Assim podendo ser definida a carga de 800 mg como limite de sobrecarga da coluna e condição ótima de carga a ser injetada no sistema cromatográfico.

Figura 21 - Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato da casca da mangueira em escala preparativa com diferentes cargas de injeção (200, 400, 600, 800 e 1000 mg), monitorado em 280 nm.



Fonte: Autor

## 5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que os pedúnculos de cajus dos diferentes clones estudados podem ser uma boa fonte fornecedora de ácidos anacárdicos, principalmente quando se trata do monoeno (15:1), se tornando assim uma boa fonte de compostos com bioatividade. No processo de extração por exaustão dos compostos presentes nos pedúnculos, apenas duas extrações foram capazes de recuperar mais 96 % dos ácidos anacárdicos, dando ênfase para a amostra BRS265 como melhor fonte de AcAn, pois apresentou maior teor desses compostos. Além disso, o método validado para quantificação dos ácidos anacárdicos entregou com fidelidade e eficiência à comunidade científica dados robustos para quantificação dos AcAn em pedúnculo de caju. Assim, os dados obtidos da extração dos AcAn mostram a viabilidade de um processo alternativo para o aproveitamento de cajus não conformes para o mercado *in natura*, gerando também um maior valor agregado para o essa matriz residual.

Concluimos também que o extrato da casca da mangueira pode ser uma fonte de obtenção de compostos com atividade biológica. Onde os resultados relacionados à citotoxicidade desse extrato, comprovam que a partir da fração F4 até F8, frações estas compostas por triterpenos e AcAn, houve resultado positivo quanto à inibição do crescimento das culturas celulares testadas, incluindo células saudáveis. No entanto, vale destacar as frações F7 e F8 que obtiveram efeitos positivos contra algumas linhagens celulares de câncer, F7 inibindo linhagens HCT-116, PC3 e SNB-19, F8 inibindo HCT-116 e SNB-19, sem prejudicar as células saudáveis. Assim, conduzindo o estudo de forma bioguiada para compostos presentes nestas frações. O processo mostra um fracionamento eficiente com uma carga de injeção de 800 mg, definindo como limite ótimo de processo está carga, sendo capaz de operar com a coluna cromatográfica com boa produtividade e baixo consumo de solvente no processo de isolamento. Além do mais, o isolamento bioguiado permitiu isolar duas classes de compostos de interesse, sendo elas os triterpenos e ácidos anacárdicos, com uma pureza de pico entre 89 e 99 % para os compostos isolados. Diante disso, podemos afirmar que o isolamento bioguiado de compostos biologicamente ativos é eficiente para matrizes residuais de casca de mangueira com baixo valor agregado, onde os AcAn apresentam promissoras atividades citotóxicas.

## REFERÊNCIAS

ABRAFRUTAS. **Manga foi a fruta mais exportada pelo Brasil em 2021**. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados. 2022.

AGIL, R.; OOMAH, D.B.; MAZZA, G.; HOSSEINIAN, F.S. Optimization of alkylresorcinols extraction from triticale bran using response surface methodology. **Food and Bioprocess Technology**. Estados Unidos. v. 5, n. 7, p. 2655-2664, 2012.

AJILA, C.M.; NAIDU, K.A.; BHAT, S.G.; RAO, U.J.S.P. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**. Reino Unido. v. 105, n. 3, p. 982-988, 2007.

AKYEREKO, Y.G.; YEBOAH, G.B.; WIREKO-MANU, F.D.; ALEMAWOR, F. *et al.* Nutritional value and health benefits of cashew apple. **JSFA Reports**. Reino Unido. v. 3, n. 3, p. 110-118, 2023.

ALI, A.H. High-performance liquid chromatography (HPLC): a review. **Annal of Advances in Chemistry**. Estados Unidos. v. 6, p. 010-020, 2022.

ANJANEYULU, V.; BABU, J.S.; CONNOLLY, J.D. 29-Hydroxymangiferonic acid from *Mangifera indica*. **Phytochemistry**. Reino Unido. v. 35, n. 5, p. 1301-1303, 1994.

ANJANEYULU, V.; RADHIKA, P. The triterpenoids and steroids from *Mangifera indica* Linn. **Indian Journal of Chemistry**. Índia. v. 39B, p. 883 - 893, 2000.

ANJANEYULU, V.; RAVI, K.; PRASAD, K.H.; CONNOLLY, J.D. Triterpenoids from *Mangifera indica*. **Phytochemistry**. Reino Unido. v. 28, n. 5, p. 1471-1477, 1989.

ANJUM, M.M.; PATEL, K.K.; DEHARI, D.; PANDEY, N. *et al.* Anacardic acid encapsulated solid lipid nanoparticles for *Staphylococcus aureus* biofilm therapy: Chitosan and DNase coating improves antimicrobial activity. **Drug Delivery and Translational Research**. Estados Unidos. v. 11, p. 305-317, 2021.

ARCANJO, M.R.A.; FERNANDES, F.A.N.; SILVA JR, I.J. Separation of lactic acid produced by hydrothermal conversion of glycerol using ion-exchange chromatography. **Adsorption Science & Technology**. Reino Unido. v. 33, n. 2, p. 139-151, 2015.

ASSIS, A.C.R.; GASPARINO, E.C.; SABA, M.D. Pollen morphology of selected species of *Anacardiaceae* and its taxonomic significance. **Rodriguésia**. Brasil. v. 72, p. 1-18, 2021.

ATTRI, B.L. Effect of initial sugar concentration on the physico-chemical characteristics and sensory qualities of cashew apple wine. **Natural Product Radiance**. Índia. v. 8, p. 374-379, 2009.

AUBIN, A.; CLEARY, R. Analytical HPLC to preparative HPLC: scale-up techniques using a natural product extract. **Waters Application Note 720003120EN**. 2009.

- AYEPOLA, O.O.; ISHOLA, R.O. Evaluation of antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* (Linn.). **Advances in Medical and Dental Sciences**. Reino Unido. v. 3, n. 1, p. 1-3, 2009.
- BALLAL, N.V.; PRAKASH, P.Y.; SARASWATHI, M.V.; BHAT, K.S. Evaluation of antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* leaves against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **International Journal of Clinical Dentistry**. Estados Unidos. v. 6, n. 2, 2013.
- BANERJEE, J.; PATTI, A.F.; MACFARLANE, D. *et al.* Effect of drying methods and extraction time-temperature regime on mango kernel lipids. **International Journal of Food and Nutritional Science**. Índia. v. 3, n. 1, p. 87-97, 2016.
- BANERJEE, J.; VIJAYARAGHAVAN, R.; ARORA, A.; MACFARLANE, D.R. *et al.* Lemon juice based extraction of pectin from mango peels: waste to wealth by sustainable approaches. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. Estados Unidos. v. 4, n. 11, p. 5915-5920, 2016.
- BARCELOS, G.R.M.; SHIMABUKURO, F.; MORI, M.P.; MACIEL, M.A.M. *et al.* Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew stem bark methanolic extract in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. Irlanda. v. 114, n. 2, p. 268-273, 2007.
- BARTWAL, A.; MALL, R.; LOHANI, P.; GURU, S.K. *et al.* Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. **Journal of Plant Growth Regulation**. Estados Unidos. v. 32, p. 216-232, 2013.
- BOJAPPA, K.M.; SINGH, R.N. Root activity of mango by radiotracer technique using  $^{32}\text{P}$ . **Indian Journal of Agricultural Science**. Índia. v. 44, n. 4, p. 175-185, 1974.
- BOUSLIMANI, A.; SANCHEZ, L.M.; GARG, N.; DORRESTEIN, P.C. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural Product Reports**. Reino Unido. v. 31, n. 6, p. 718-729, 2014.
- BOYOM, F.F.; MADIESTE, E.K.; BANKEU, J.J.; TSOUH, V.P. *et al.* Falcipain 2 inhibitors and antiplasmodial compounds from a bio-guided fractionation of the fruits of *Sorindeia juglandifolia* A. Rich. (Anacardiaceae) growing in Cameroon. **Malaria Journal**. Reino Unido. v. 9, p. 1-2, 2010.
- BRASIL. ANVISA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Brasília. 2003.
- BRILLATZ, T.; QUEIROZ, E.F.; MARCOURT, L.; JACMIN, M. *et al.* Anticonvulsant agents from *Boswellia sacra* identified by zebrafish bioassay-guided fractionation. **Planta Medica**. Alemanha. v. 82, n. S 01, p. P483, 2016.
- BUCAR, F.; WUBE, A.; SCHMID, M. Natural product isolation—how to get from biological material to pure compounds. **Natural Product Reports**. Reino Unido. v. 30, n. 4, p. 525-545, 2013.

BURIN, V.M.; ARCARI, S.G.; BORDIGNON, L.; MARILDE, T. *et al.* Determination of some phenolic compounds in red wine by RP-HPLC: method development and validation. **Journal of Chromatographic Science**. Estados Unidos. v. 49, n. 8, p. 647-651, 2011.

CANNELL, R.J.P. Natural products isolation. Totowa, Nova Jersey. Editora: **Springer Science & Business Media**, 1998.

CRAWFORD, L.M.; HOLSTEGE, D.M.; WANG, S.C. High-throughput extraction method for phenolic compounds in olive fruit (*Olea europaea*). **Journal of Food Composition and Analysis**. Estados Unidos. v. 66, p. 136-144, 2018.

CRISCUOLO, A.; ZELLER, M.; COOK, K.; ANGELIDOU, G. *et al.* Rational selection of reverse phase columns for high throughput LC-MS lipidomics. **Chemistry and Physics of Lipids**. Irlanda. v. 221, p. 120-127, 2019.

CUNHA, A.G.; BRITO, E.S.; MOURA, C.F.H.; RIBEIRO, P.R.V. *et al.* 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**. Holanda. v. 1051, p. 24-32, 2017.

DA SILVA, G.G.; DE OLIVEIRA BRAGA, L.E.; DE OLIVEIRA, E.C.S.; TINTI, S.V. *et al.* Cashew apple byproduct: Gastroprotective effects of standardized extract. **Journal of Ethnopharmacology**. Irlanda. v. 269, p. 113744, 2021.

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

DE PAEPE, D.; SERVAES, K.; NOTEN, B.; DIELS, L. *et al.* An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. **Food Chemistry**. Reino Unido. v. 136, n. 2, p. 368-375, 2013.

DENARDIN, C.C.; HIRSCH, G.E.; DA ROCHA, R.F.; VIZZOTTO, M. *et al.* Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**. Taiwan. v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.

DIAS, A.L.S.; ROZET, E.; LARONDELLE, Y.; HUBERT, P. *et al.* Development and validation of an UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method for non-anthocyanin flavonoids quantification in Euterpe oleracea juice. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Alemanha. v. 405, n. 28, p. 9235-9249, 2013.

ELSHAFIE, H.S.; CAMELE, I.; MOHAMED, A.A. A Comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. **International Journal of Molecular Sciences**. Suíça. v. 24, n. 4, p. 3266, 2023.

EMA. **Guideline on bioanalytical method validation**. European Medicines Agency. 2011.

EMBRAPA. **Produção de manga do Brasil**. Brasília. 2022. Agropensa.

EMBRAPA. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Caju**. Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/caju>. Acesso em: 5 fev. 2023.

ERŞAN, S.; GUÇLUÜSTÜNDAG, Ö.; CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. M. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera L.*) hulls (exo-and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS n. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Estados Unidos. v. 64, n. 26, p. 5334-5344, 2016.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C.; CONCEPCIÓN LOZADA, M.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S.; VILLARREAL, M.L. *et al.* 1H and 13C NMR characterization of new cycloartane triterpenes from *Mangifera indica*. **Magnetic Resonance in Chemistry**. Reino Unido. v. 50, n. 1, p. 52-57, 2012.

ESPARZA, I.; JIMÉNEZ-MORENO, N.; BIMBELA, F.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. *et al.* Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. **Journal of Environmental Management**. Estados Unidos. v. 265, p. 110510, 2020.

FAO. **Statistic Division**. Quebec, Canadá. 2022a. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat>. Acesso em: 13 mar. 2022.

FAO. **Voluntary code of conduct for food loss and waste reduction**. Quebec, Canadá. 2022b. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat>. Acesso em: 15 mar. 2022.

FAO. **World production / yield quantities of cashewapple in World 2021**. 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 12 jan. 2024.

FDA. International conference on harmonisation. Guideline on validation of analytical procedures: definitions and terminology. **Federal Register**. v. 60, n. 40, p. 11259-11262, 1995.

FENG, W.; ZHU, X.; ZHANG, L.; GENG, X. Retention behaviour of proteins under conditions of column overload in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**. Holanda. v. 729, n. 1-2, p. 43-47, 1996.

FONSECA, N.; DA CUNHA, G.A.P.; DO NASCIMENTO, A.S.; SANTOS FILHO, H.P. A cultura da manga. Brasília, **DF: Embrapa Informação Tecnológica**. 2006.

FOUCHÉ, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N. *et al.* In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**. Irlanda. v. 119, n. 3, p. 455-461, 2008.

GALOT-LINALDI, J.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, K.M.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; VEGA, L. Anacardic acids from *Amphipterygium adstringens* confer cytoprotection against 5-fluorouracil and carboplatin induced blood cell toxicity while increasing antitumoral activity and survival in an animal model of breast cancer. **Molecules**. Suíça. v. 26, n. 11, p. 3241, 2021.

GARCÍA PALACIOS, J.; KASPEREIT, M.; ZIOMEK, G.; ANTOS, D. *et al.* Optimization and analysis of possible column arrangements for multicomponent separations by preparative chromatography. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. Estados Unidos. v. 48, n. 24, p. 11148-11157, 2009.

GNANAPRAKASAM, J.N.R.; LÓPEZ-BAÑUELOS, L.; VEGA, L. Anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces apoptosis in breast cancer tumor cells, immunostimulation in the host and decreases blood toxic effects of taxol in an animal model. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Estados Unidos. v. 410, p. 115359, 2021.

GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GUIOCHON, G. Theory of optimization of the experimental conditions of preparative elution chromatography: optimization of the column efficiency. **Analytical Chemistry**. Estados Unidos. v. 61, n. 13, p. 1368-1382, 1989.

GOMES, E.B.; RAMALHO, S.A.; GUALBERTO, N.C.; DE MIRANDA, R.C.M. *et al.* A rapid method for determination of some phenolic acids in brazilian tropical fruits of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Camara) by UPLC. **Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation**. Estados Unidos. v. 3, n. 03, p. 1, 2013.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; LÓPEZ-COBO, A.; VERARDO, V.; SEGURA-CARRETERO, A. *et al.* HPLC-DAD-q-TOF-MS as a powerful platform for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part of mango and its by-products (peel, seed, and seed husk). **Electrophoresis**. Alemanha. v. 37, n. 7-8, p. 1072-1084, 2016.

GRASEL, F.S.; FERRÃO, M.F. A rapid and non-invasive method for the classification of natural tannin extracts by near-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Analytical Methods**. Reino Unido. v. 8, n. 3, p. 644-649, 2016.

GUEDES, J.A.C.; SANTIAGO, Y.G.; LUZ, L.R.; SILVA, M.F.S. *et al.* Comparative analyses of metabolic fingerprint integrated with cytotoxic activity and in silico approaches of the leaves extract of *Spondias mombin* L. and *Spondias tuberosa* Arr. Cam. from Northeast, Brazil. **Phytochemistry Letters**. Holanda. v. 40, p. 26-36, 2020.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D.T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Holanda. v. 66, n. 3, p. 475-482, 2007.

HILL, R.A.; CONNOLLY, J.D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**. Reino Unido. v. 28, n. 6, p. 1087-1117, 2011.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. Preparative chromatography techniques. Santa Clara, California. ed. 2. **Springer**, 1998.

HUANG, Y.; LU, W.; CHEN, B.; WU, M. *et al.* Determination of 13 phenolic compounds in rice wine by high-performance liquid chromatography. **Food Analytical Methods**. Estados Unidos. v. 8, n. 4, p. 825-832, 2015.

IBGE. **Produção de manga**. Brasília. 2021.

ICH, **ICH Harmonized Tripartite: Validation of analytical procedures: text and methodology**. Genebra, Suíça. v. 1, 2005.

JANDERA, P.; KOMERS, D.; GUIOCHON, G. Effects of the gradient profile on the production rate in reversed-phase gradient elution overloaded chromatography. **Journal of Chromatography A**. Holanda. v. 760, n. 1, p. 25-39, 1997.

JERZ, G.; MURILLO-VELÁSQUEZ, J. A.; SKRJABIN, I.; GÖK, R. *et al.* Anacardic acid profiling in cashew nuts by direct coupling of preparative high-speed countercurrent chromatography and mass spectrometry (prep HSCCC-ESI-/APCI-MS/MS). *In*: RECENT Advances in the Analysis of Food and Flavors. Washington, Estados Unidos. editora: **ACS Publications**, 2012. p. 145-165.

JIAO, L.; TAO, Y.; WANG, W.; SHAO, Y. *et al.* Preparative isolation of flavonoid glycosides from *Sphaerophysa salsula* using hydrophilic interaction solid-phase extraction coupled with two-dimensional preparative liquid chromatography. **Journal of Separation Science**. Alemanha. v. 40, n. 19, p. 3808-3816, 2017.

JIN, G.; GUO, Z.; XIAO, Y.; YAN, J. *et al.* Practical method for the definition of chromatographic peak parameters in preparative liquid chromatography. **Journal of Separation Science**. Alemanha. v. 39, n. 20, p. 3917-3926, 2016.

JOHN, O.R.; YAHAYA, A.A.; EMMANUEL, A. Aqueous ethanolic extract of *Mangifera indica* stem bark effect on the biochemical and haematological parameters of albino rats. **Archives of Applied Science Research**. Estados Unidos. v. 4, n. 4, p. 1618-1622, 2012.

KABERA, J.N.; SEMANA, E.; MUSSA, A.R.; HE, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. Reino Unido. v. 2, p. 377-392, 2014.

KHAN, M.A.; NIZAMI, S.S.; KHAN, M.N.I.; AZEEM, S.W. *et al.* New triterpenes from *Mangifera indica*. **Journal of Natural Products**. Estados Unidos. v. 57, n. 7, p. 988-991, 1994.

KONAN, N.A.; BACCHI, E.M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. Irlanda. v. 112, n. 2, p. 237-242, 2007.

KUMAR, M.; SAURABH, V.; TOMAR, M.; HASAN, M. *et al.* Mango (*Mangifera indica* L.) leaves: Nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting bioactivities. **Antioxidants**. Suíça. v. 10, n. 2, p. 299, 2021.

KUMAR, S.; SINGH, A.; BAJPAI, V.; SINGH, B. *et al.* Development of a UHPLC–MS/MS method for the quantitation of bioactive compounds in *Phyllanthus* species and its herbal formulations. **Journal of Separation Science**. Alemanha. v. 40, n. 17, p. 3422-3429, 2017.

LAI, X.; LIU, J.; XU, X.; LI, J. *et al.* Ultrasensitive high-performance liquid chromatography determination of tetracycline antibiotics and their 4-epimer derivatives based on dual effect of methanesulfonic acid. **Journal of Separation Science**. Alemanha. v. 43, n. 2, p. 398-405, 2020.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. *In: Métodos Cromatográficos de Análise: Rima*, 2004. v. 6.

LANÇAS, F.M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Campinas: **Átomo**. p. 184-215, 2009.

LEGUT, M.; LIPKA, D.; FILIPCZAK, N.; PIWONI, A. *et al.* Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines—in vitro studies. **International Journal of Nanomedicine**. Nova Zelândia. v. 9, p. 653, 2014.

LI, S.; KUO, H.C.D.; YIN, R.; WU, R. *et al.* Epigenetics/epigenomics of triterpenoids in cancer prevention and in health. **Biochemical Pharmacology**. Estados Unidos. v. 175, p. 113890, 2020.

LI, Z.; XIONG, K.; WEN, W.; LI, L. *et al.* Functional endophytes regulating plant secondary metabolism: current status, prospects and applications. **International Journal of Molecular Sciences**. Suíça. v. 24, n. 2, p. 1153, 2023.

LING, Y.; OUYANG, Y.; XUE, Y.; YU, J. *et al.* In-depth excavation and screening of triterpene saponins from the rhizome of *Panax japonicus* using high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**. Alemanha. p. bmad014, 2023.

MADIKIZELA, B.; ADEROGBA, M.A.; VAN STADEN, J. Isolation and characterization of antimicrobial constituents of *Searsia chirindensis* L.(Anacardiaceae) leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. Irlanda. v. 150, n. 2, p. 609-613, 2013.

MBEKEANI, A.J.; JONES, R.S.; LLORENS, M.B.; ELLIOT, J. *et al.* Mining for natural product antileishmanials in a fungal extract library. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. Holanda. v. 11, p. 118-128, 2019.

MEDLICOTT, A.P.; THOMPSON, A.K. Analysis of sugars and organic acids in ripening mango fruits (*Mangifera indica* L. var Keitt) by high performance liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Reino Unido. v. 36, n. 7, p. 561-566, 1985.

MENDES, N.M.; DE OLIVEIRA, A.B.; GUIMARÃES, J.E.; PEREIRA, J.P. *et al.* Atividade moluscicida da mistura de ácidos 6-n-alquil salicílicos (ácido anacárdico) e dos seus complexos com cobre (II) e chumbo (II). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasil. v. 23, n. 4, p. 217-224, 1990.

MITCHELL, J.D.; PELL, S.K.; BACHELIER, J.B.; WARSCHESKY, E.J. *et al.* Neotropical *Anacardiaceae* (cashew family). **Brazilian Journal of Botany**. Brasil. v. 45, n. 1, p. 139-180, 2022.

MOORE, N.; HAMZA, N.; BERKE, B.; UMAR, A. News from Tartary: an ethnopharmacological approach to drug and therapeutic discovery. **British Journal of Clinical Pharmacology**. Reino Unido. v. 83, n. 1, p. 33-37, 2017.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. Holanda. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUCO, M.A. do C. Cultivo da mangueira. **Infoteca EMBRAPA**. 2010.

NEVES, A.M.; DOS SANTOS FONTENELLE, R.O.; LOPES, F.S.; MENDES, J.F.S. *et al.* Phenolic profile, antioxidant and antifungal activity of extracts from four medicinal plants of the *Anacardiaceae* family. **Research, Society and Development**. Servia. v. 10, n. 8, p. e44510817421-e44510817421, 2021.

OIRAM FILHO, F.; ALCÂNTRA, D.B.; RODRIGUES, T.H.S.; SILVA, L.M.A. *et al.* Development and validation of reversed phase HPLC method for determination of anacardic acids in cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell liquid. **Journal of Chromatographic Science**. Estados Unidos. v. 56, p. 300-306, 2018.

OIRAM FILHO, F.; MITRI, M.P.; ZOCCOLO, G.J.; CANUTO, K.M. *et al.* Validation of a method for anacardic acid quantification in cashew peduncles via high-performance liquid chromatography coupled to a diode-array detector. **Foods**. Suíça. v. 12, n. 14, p. 2759, 2023.

OIRAM FILHO, F.; ZOCCOLO, G.J.; CANUTO, K.M.; DA SILVA JUNIOR, I.J. *et al.* Productivity of a preparative high-performance liquid chromatography isolation of anacardic acids from cashew nut shell liquid. **Separation Science Plus**. Estados Unidos. v. 2, n. 6, p. 192-199, 2019.

ONU. **Food waste index report** Ambiente. 2021.

ÖZDEMİR, Z.; WIMMER, Z. Selected plant triterpenoids and their amide derivatives in cancer treatment: A review. **Phytochemistry**. Reino Unido. v. 203, p. 113-126, 2022.

PALMEIRA, S.M.V.; GOIS, L.M.; SOUZA, L.D. Extraction of phenolic compounds from mango peels. **Latin American Applied Research**. Argentina. v. 42, n. 1, p. 77-81, 2012.

PAN, J.; YI, X.; ZHANG, S.; CHENG, J. *et al.* Bioactive phenolics from mango leaves (*Mangifera indica* L.). **Industrial Crops and Products**. Holanda. v. 111, p. 400-406, 2018.

PARK, M.; UPTON, D.; BLACKMON, M.; DIXON, V. *et al.* Anacardic acid inhibits pancreatic cancer cell growth, and potentiates chemotherapeutic effect by Chmp1A-ATM-p53 signaling pathway. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Reino Unido. v. 18, p. 1-10, 2018.

PARVEZ, G.M.M. Pharmacological activities of mango (*Mangifera indica*): A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. Servia. v. 5, n. 3, p. 01-07, 2016a.

PARVEZ, G.M.M. Pharmacological activities of mango (*Mangifera Indica*): A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. Servia. v. 5, n. 3, p. 1, 2016b.

PELL, S.K.; MITCHELL, J.D.; MILLER, A.J.; LOBOVA, T.A. *Anacardiaceae*. **Flowering plants. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae**. p. 7-50, 2011.

PEREIRA, J.M.; SEVERINO, R.P.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. *et al.* Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Reino Unido. v. 16, n. 19, p. 8889-8895, 2008.

POPOV, R.S.; IVANCHINA, N.V.; SILCHENKO, A.S.; AVILOV, S.A. *et al.* A mass spectrometry database for sea cucumber triterpene glycosides. **Metabolites**. Suíça. v. 13, n. 7, p. 783, 2023.

QING, Z.; ZHAO, H.; TANG, Q.; MO, C. *et al.* Systematic identification of flavonols, flavonol glycosides, triterpene and siraitic acid glycosides from *Siraitia grosvenorii* using high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with a screening strategy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Holanda. v. 138, p. 240-248, 2017.

RODRIGUES, F.A.M.; GIFFONY, P.S.; DOS SANTOS, S.B.F.; GUEDES, J.A.C. *et al.* *Spondias purpurea* L. stem bark extract: Antioxidant and in vitro photoprotective activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Brasil. v. 32, p. 1918-1930, 2021.

ROLLINGER, J.M.; LANGER, T.; STUPPNER, H. Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. **Current Medicinal Chemistry**. Emirados Arabes. v. 13, n. 13, p. 1491-1507, 2006.

RUFINO, M.D.S.M.; ALVES, R.E.; DE BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. Reino Unido. v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

RUNJALA, S.; KELLA, L. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) therapeutic benefits, processing and product development: An overview. **The Pharma Innovation**. Índia. v. 6, n. 7, Part D, p. 260, 2017.

SALEHI, B.; GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M.; KIRKIN, C.; ÖZÇELİK, B. *et al.* Anacardium plants: chemical, nutritional composition and biotechnological applications. **Biomolecules**. Suíça. v. 9, n. 9, p. 465, 2019.

SEQUEDA-CASTAÑEDA, L.G.; CELIS-ZAMBRANO, C.A.; TORRENEGRA, R.D. Bioassay-guided fractionation in *Anacardium excelsum* (bert. & balb. ex kunth) skeels (*Anacardiaceae*). **Pharmacologyonline**. Itália. v. 1, p. 426-446, 2021.

SHAH, K.A.; PATEL, M.B.; PATEL, R.J.; PARMAR, P.K. *Mangifera indica* (mango). **Pharmacognosy Reviews**. Índia. v. 4, n. 7, p. 42, 2010.

SHANMUGAM, M.K.; DHARMARAJAN, A.; WARRIER, S.; BISHAYEE, A. *et al.* Role of histone acetyltransferase inhibitors in cancer therapy. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. Estados Unidos. v. 125, p. 149-191, 2021.

SHANMUGAM, M.K.; NGUYEN, A.H.; KUMAR, A.P.; TAN, B.K.H. *et al.* Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. **Cancer Letters**. Irlanda. v. 320, n. 2, p. 158-170, 2012.

SILVA JR, I.J.; VEREDAS, V.; SANTOS, M.A.G.; SANTANA, C.C. *et al.* Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. **Química Nova**. Brasil. v. 29, n. 5, p. 1027-1037, 2006.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. **John Wiley & Sons**, 2011. 1118210395.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC Method Development. **John Wiley & Sons**, 2012. 1118591518.

SOUSA, Â.; SOUSA, F.; QUEIROZ, J.A. Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification. **Journal of Separation Science**. Alemanha. v. 35, n. 22, p. 3046-3058, 2012.

SOUSA, A.D.; MAIA, A.I.V.; RODRIGUES, T.H.S.; CANUTO, K.M. *et al.* Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. **Industrial Crops and Products**. Holanda. v. 79, p. 91-103, 2016.

SOUZA, C.G. Produção e processo de downstream de lipopeptídeos fungicidas produzidos pelo *Bacillus subtilis* CNPMS 22. **Repositorio Institucional**. 2019.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo. editora: Plantarum. v. 1, p. 640, 2005.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Reports**. Reino Unido. v. 25, n. 3, p. 517-554, 2008.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Analytical method development and validation. Boca Raton, Florida. **CRC Press**, 2018.

TACIAS-PASCACIO, V.G.; CASTAÑEDA-VALBUENA, D.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; BERENGUER-MURCIA, Á. *et al.* Phenolic compounds in mango fruit: A review. **Journal of Food Measurement and Characterization**. Estados Unidos. p. 1-18, 2022.

TENG, H.; CHEN, L.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors from seed oil: A review of liposoluble substance to treat diabetes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Reino Unido. v. 57, n. 16, p. 3438-3448, 2017.

TENG, H.; YUAN, B.; GOTHAI, S.; ARULSELVAN, P. *et al.* Dietary triterpenes in the treatment of type 2 diabetes: To date. **Trends in Food Science & Technology**. Reino Unido. v. 72, p. 34-44, 2018.

THIMMAPPA, R.; GEISLER, K.; LOUVEAU, T.; O'MAILLE, P. *et al.* Triterpene biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**. Estados Unidos. v. 65, p. 225-257, 2014.

TOMASIAK, P.; JANISIAK, J.; ROGIŃSKA, D.; PERUŻYŃSKA, M. *et al.* Garcinol and anacardic acid, natural inhibitors of histone acetyltransferases, inhibit rhabdomyosarcoma growth and proliferation. **Molecules**. Suíça. v. 28, n. 14, p. 5292, 2023.

TREVISAN, M. T. S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G. *et al.* Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**. Reino Unido. v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

TREVISAN, M.T.S.; FARIAS DE ALMEIDA, R.; SOTO, G.; DE MELO VIRGINIO FILHO, E. *et al.* Quantitation by HPLC-UV of mangiferin and isomangiferin in coffee (*Coffea arabica*) leaves from Brazil and Costa Rica after solvent extraction and infusion. **Food Analytical Methods**. Estados Unidos. v. 9, p. 2649-2655, 2016.

TRISCIUOGLIO, D.; DI MARTILE, M.; DEL BUFALO, D. Emerging role of histone acetyltransferase in stem cells and cancer. **Stem Cells International**. Estados Unidos. editora: Frontiers. v. 5. 2018.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J. F.; DANZER, K. *et al.* Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**. Estados Unidos. v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

VITOLO, M. Purificação de produtos biotecnológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Brasil. v. 41, n. 1, p. 120-120, 2005.

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**. Suíça. v. 2, n. 3, p. 251-286, 2015.

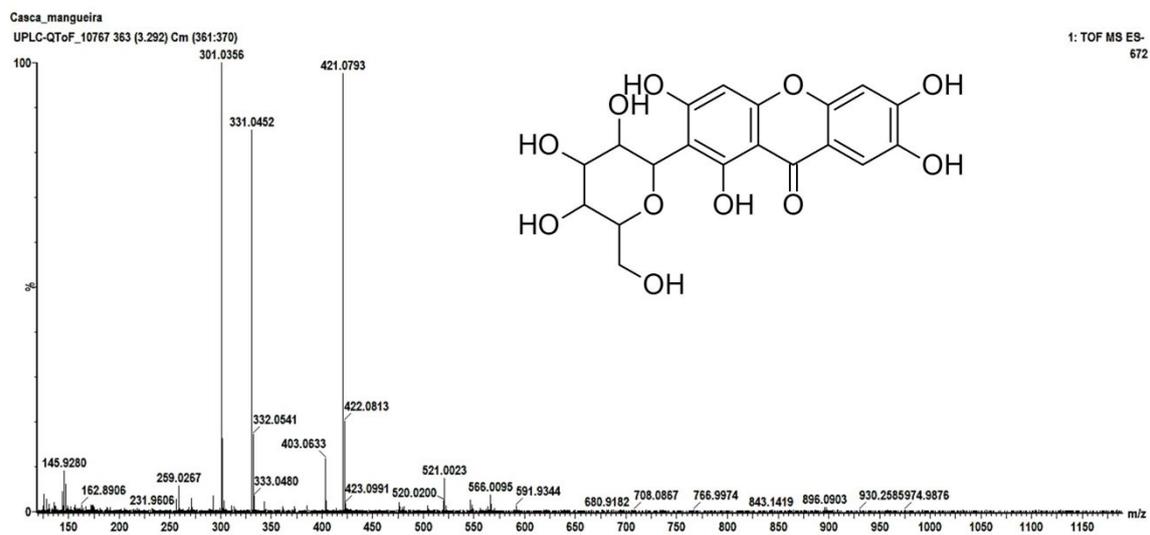
YADAV, D.; YADAV, K.S.; SINGH, S.P. Mango: Taxonomy and botany. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. Índia. v. 7, n. 2, p. 3253-3258, 2018.

YAHIA, E.M.; CARRILLO-LOPEZ, A. Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. **Woodhead Publishing**, 2018. 0128132795.

YULIANA, N.D.; JAHANGIR, M. ; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**. Holanda. v. 12, n. 2, p. 293-304, 2013.

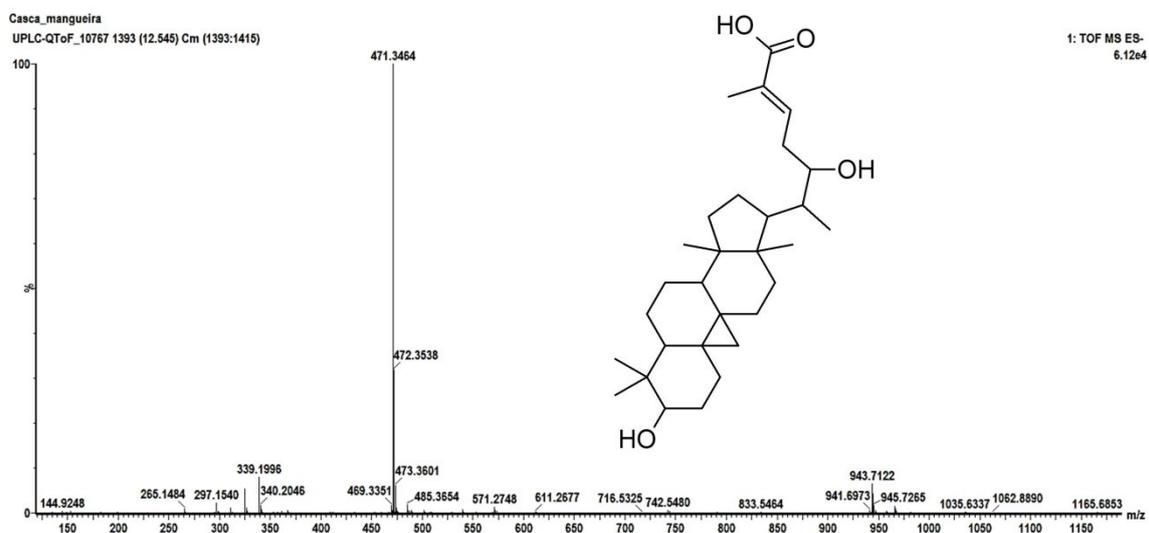
ZHAO, Q.; ZHANG, X.; CAI, H.; ZHANG, P. *et al.* Anticancer effects of plant derived anacardic acid on human breast cancer MDA-MB-231 cells. **American Journal of Translational Research**. Estados Unidos. v. 10, n. 8, p. 2424, 2018.

**APENDICE A – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 1 (MANGIFERINA).**



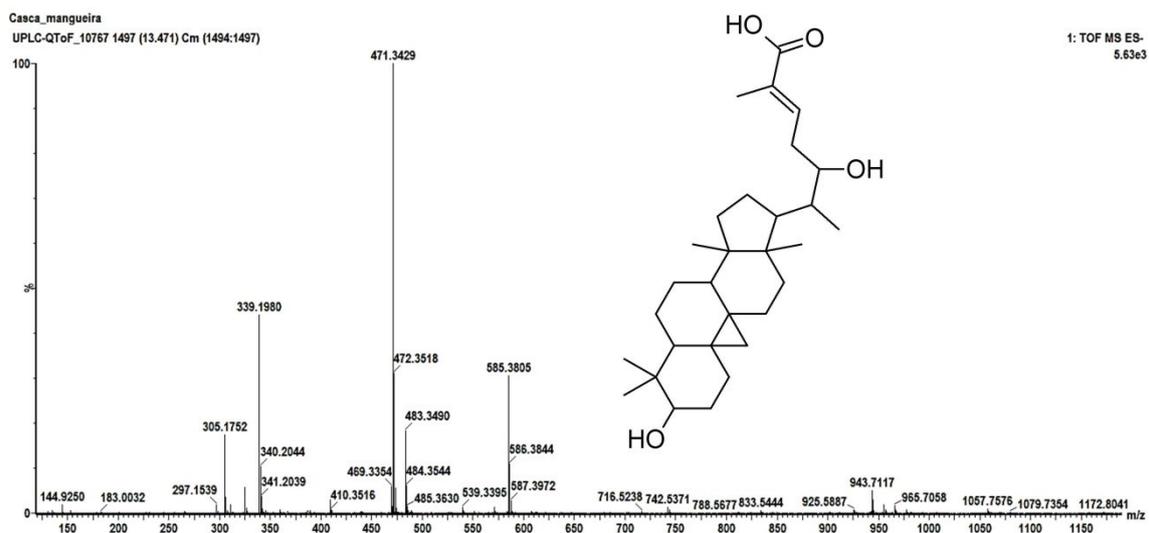
Fonte: Autor

**APENDICE B – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 4 (ÁCIDO HIDROXI ISOMANGIFERÓLICO).**



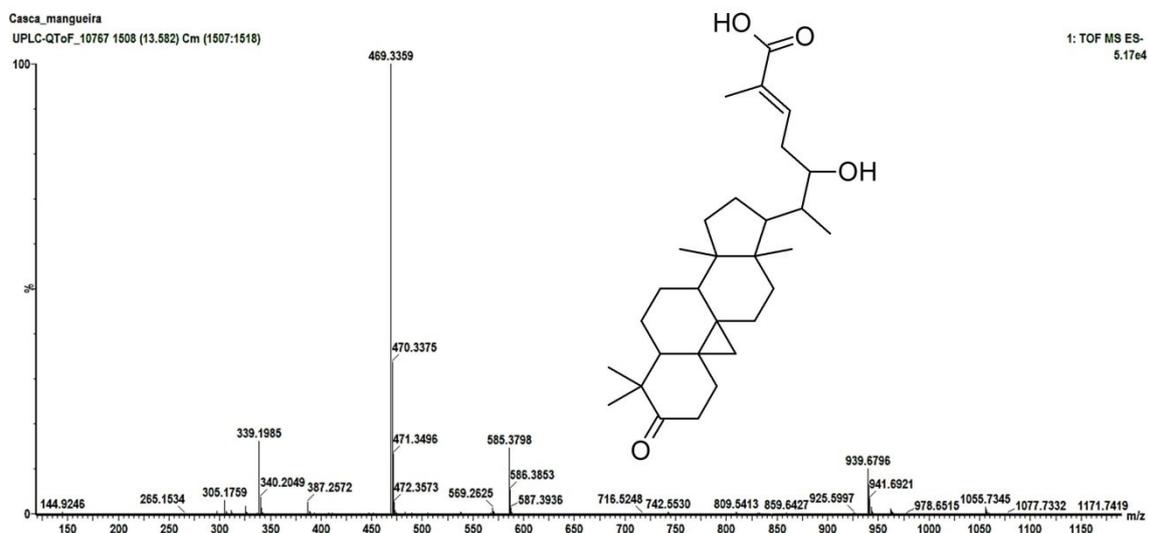
Fonte: Autor

**APENDICE C – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 5 (ÁCIDO HIDROXI ISOMANGIFERÓLICO - ISÔMERO).**



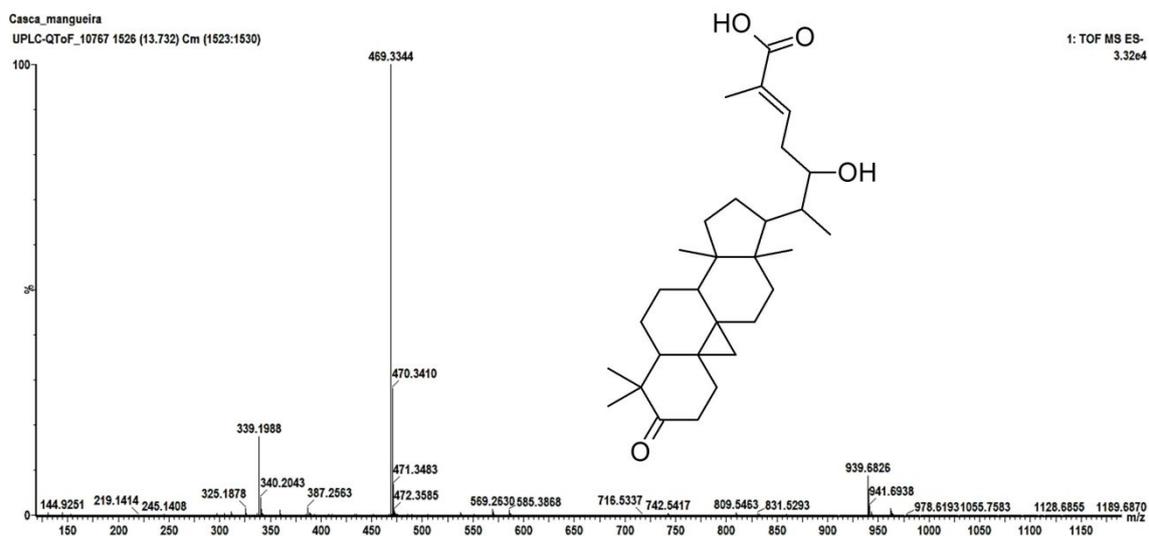
Fonte: Autor

**APENDICE D – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 6 (ÁCIDO HIDROXI ISOMANGIFERÔNICO).**



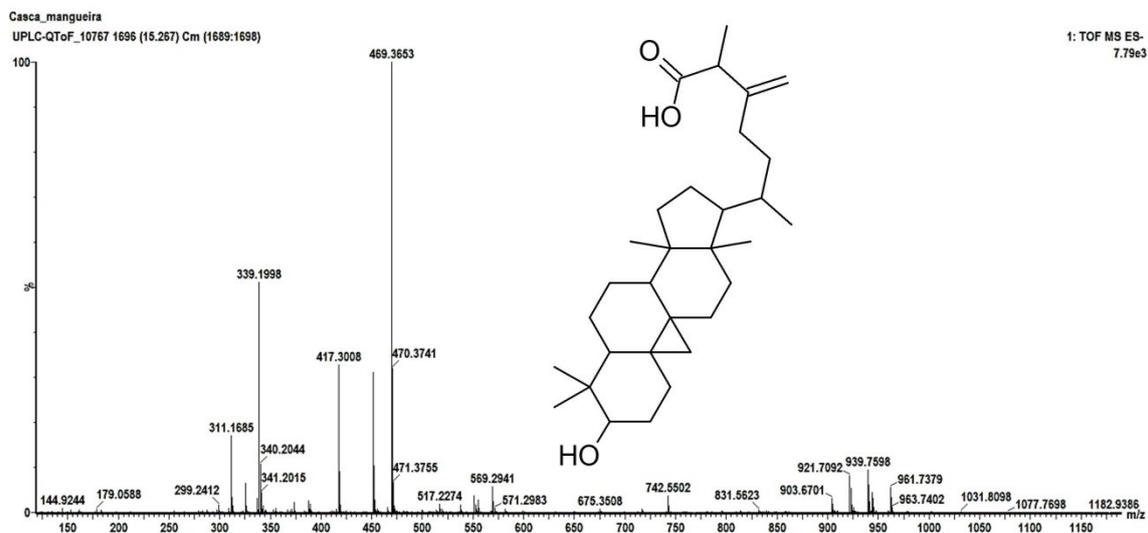
Fonte: Autor

**APENDICE E – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 7 (ÁCIDO HIDROXI ISOMANGIFERÔNICO - ISÔMERO).**



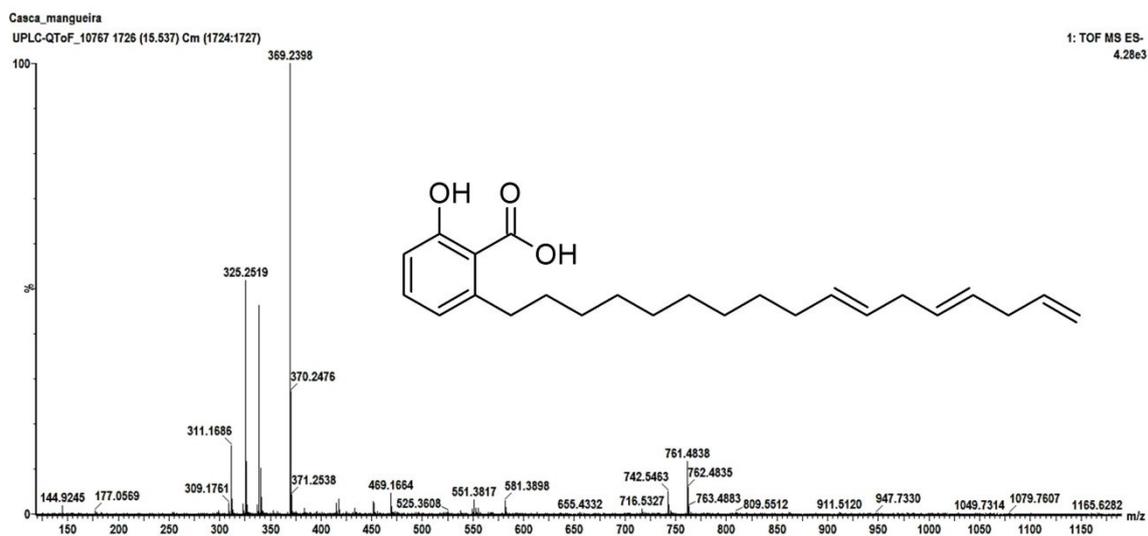
Fonte: Autor

**APENDICE F – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 9 (ÁCIDO AMBÓLICO).**



Fonte: Autor

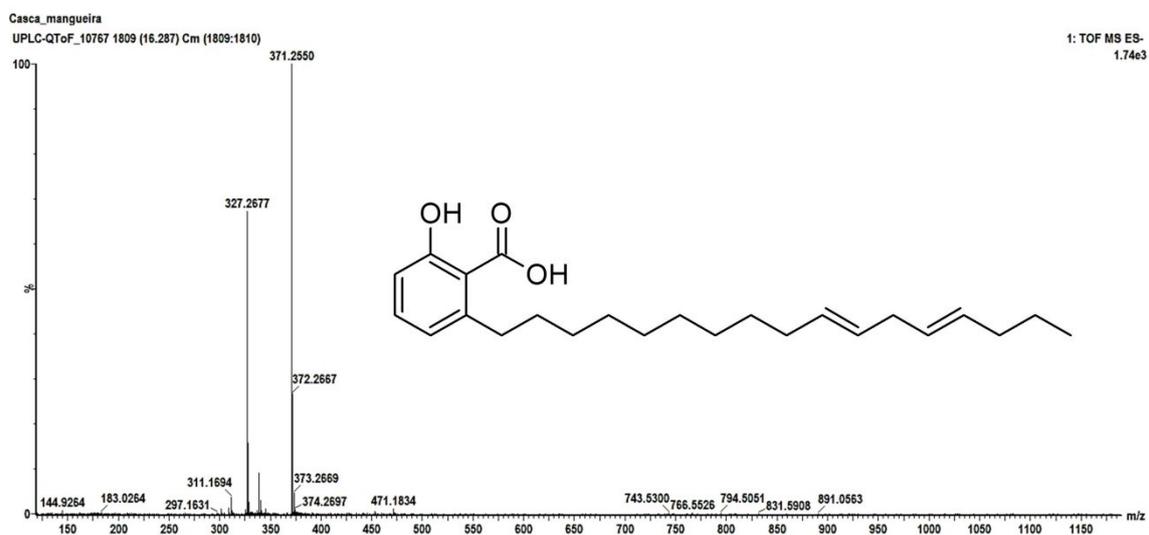
**APENDICE G – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 10 (ÁCIDO ANACÁRDICO - 17:3).**



Fonte: Autor

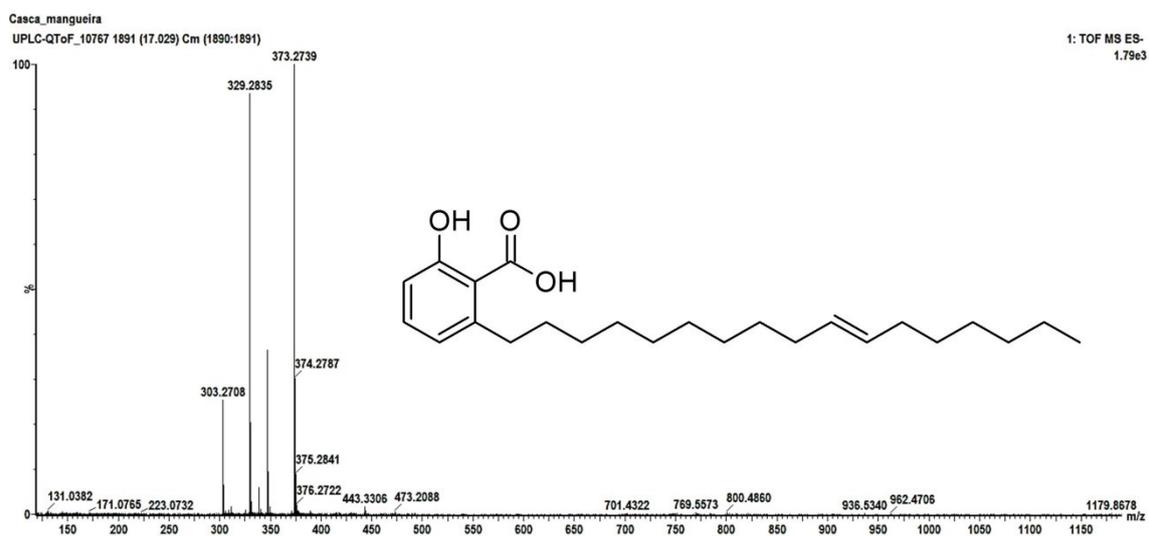


**APENDICE J – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 13 (ÁCIDO ANACÁRDICO - 17:2).**



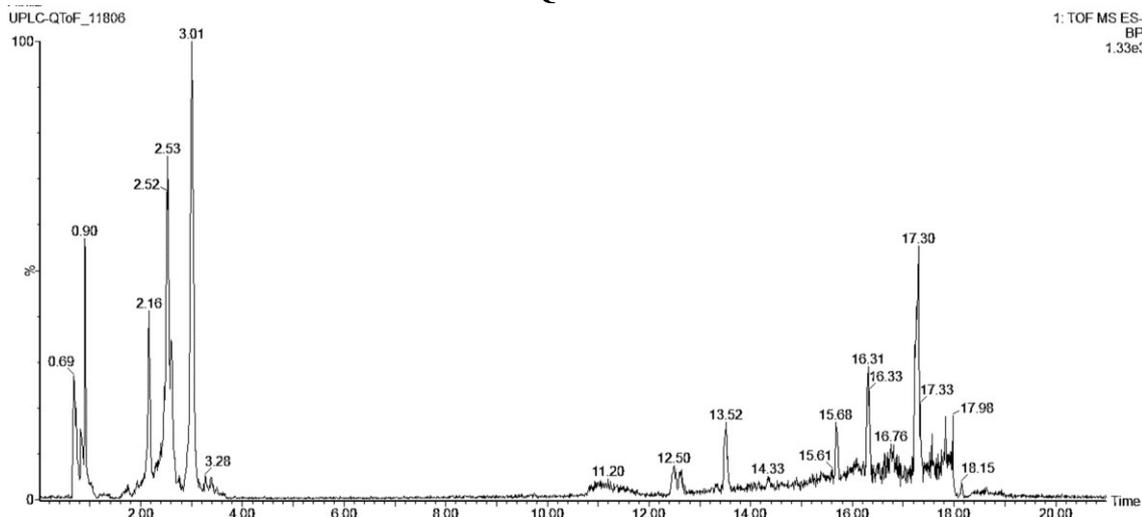
Fonte: Autor

**APENDICE L – ESPECTRO DE MASSA EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> DO COMPOSTO 13 (ÁCIDO ANACÁRDICO - 17:1).**



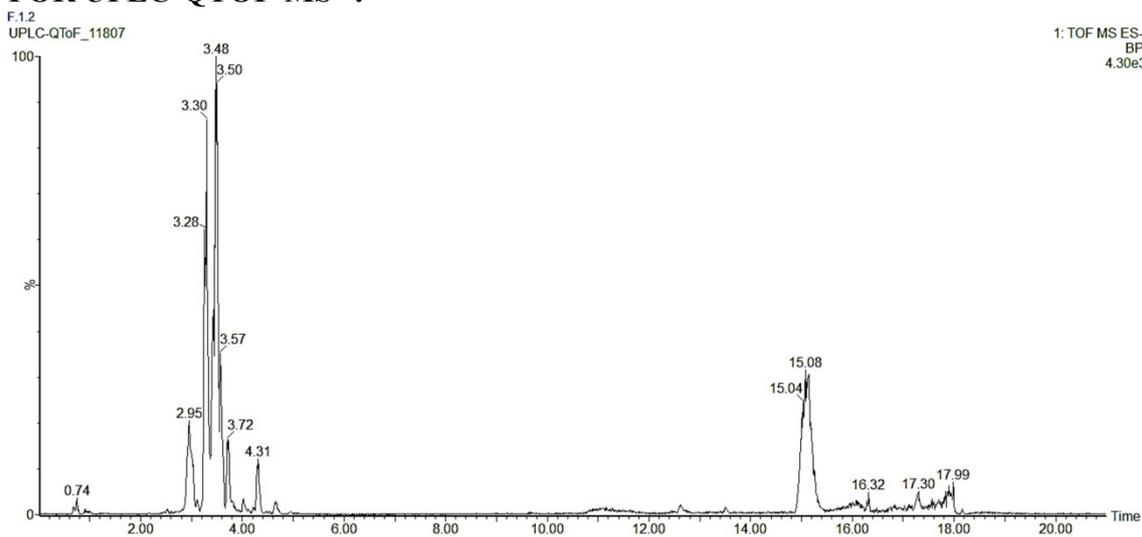
Fonte: Autor

**APENDICE M – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO INICIAL  
OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA  
MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



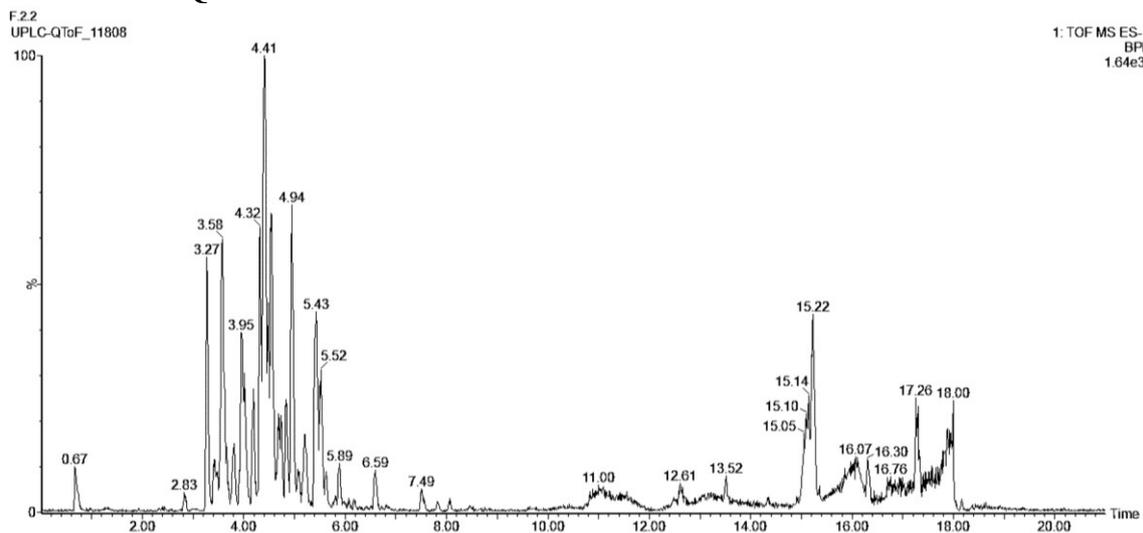
Fonte: Autor

**APENDICE N – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 1  
OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA  
MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



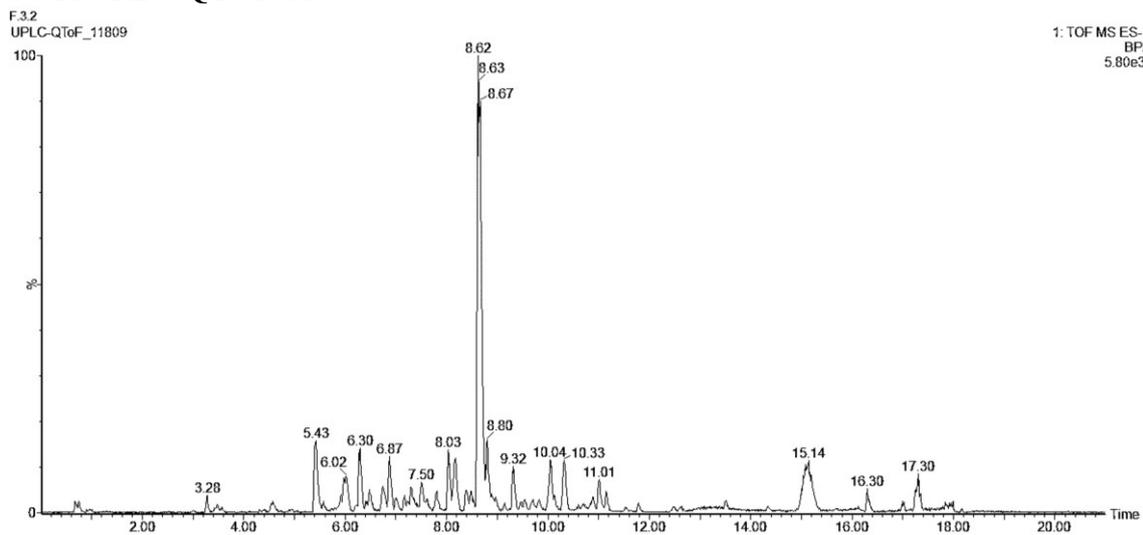
Fonte: Autor

**APENDICE O – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 2 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



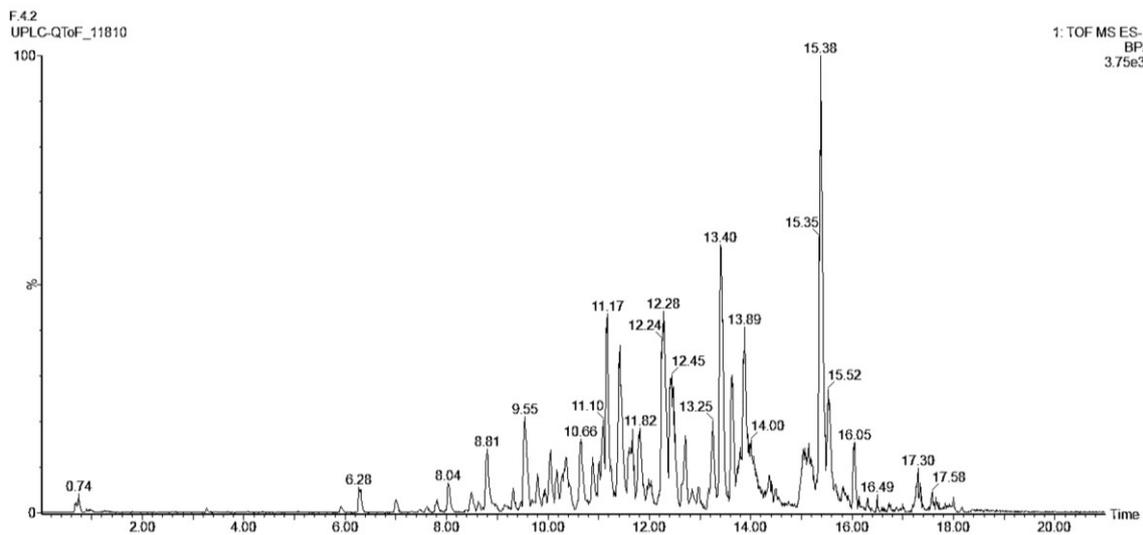
Fonte: Autor

**APENDICE P – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 3 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



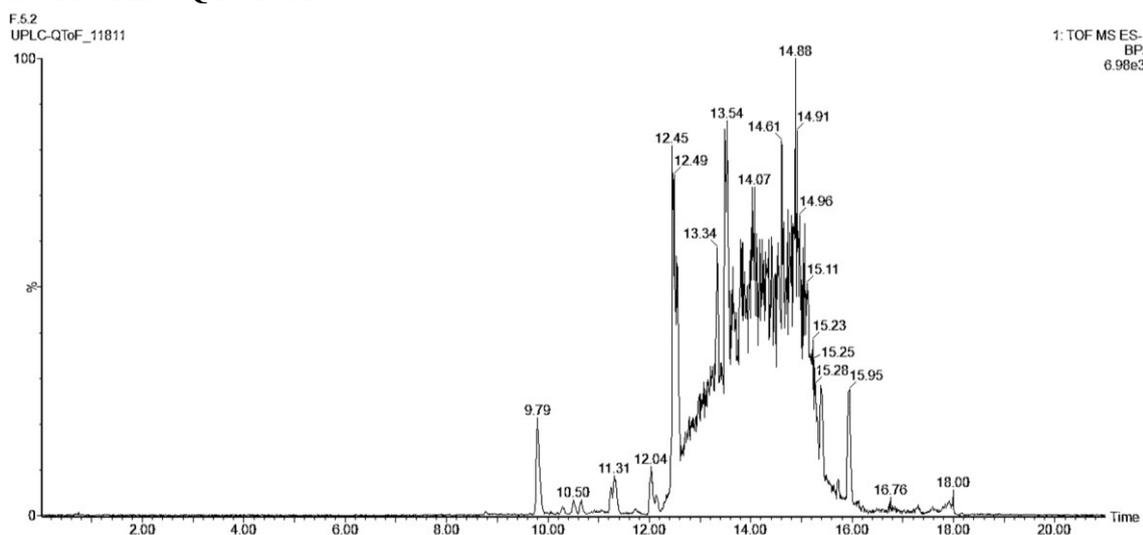
Fonte: Autor

**APENDICE Q – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 4 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



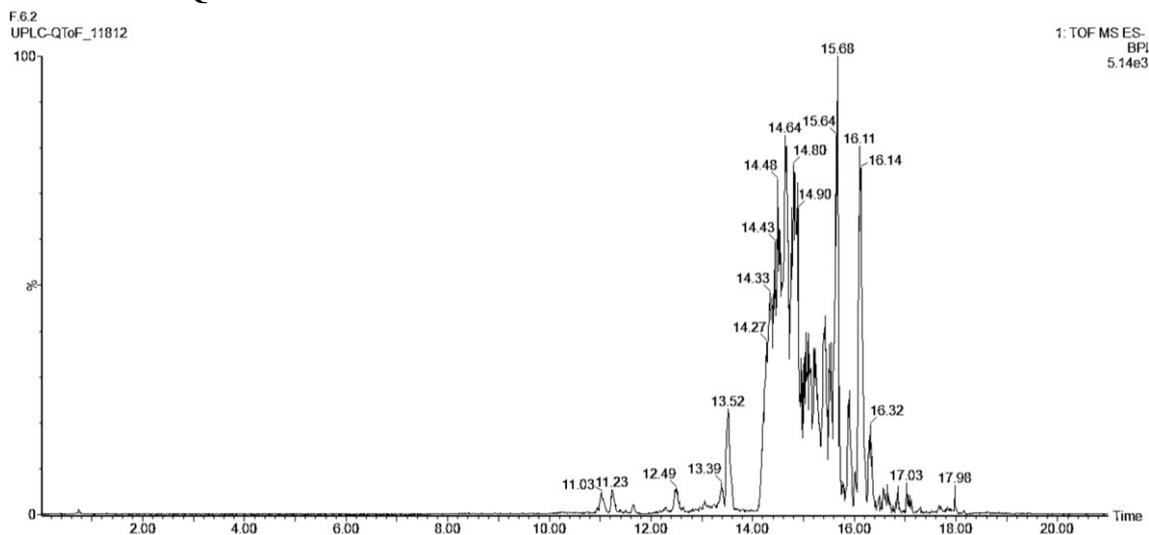
Fonte: Autor

**APENDICE R – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 5 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



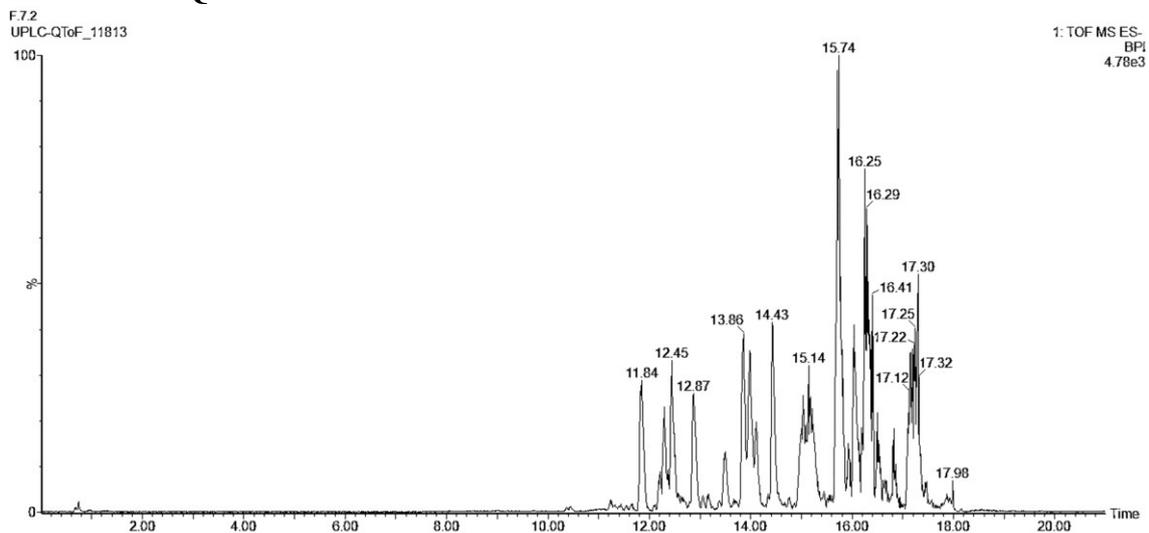
Fonte: Autor

**APENDICE S – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 6 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



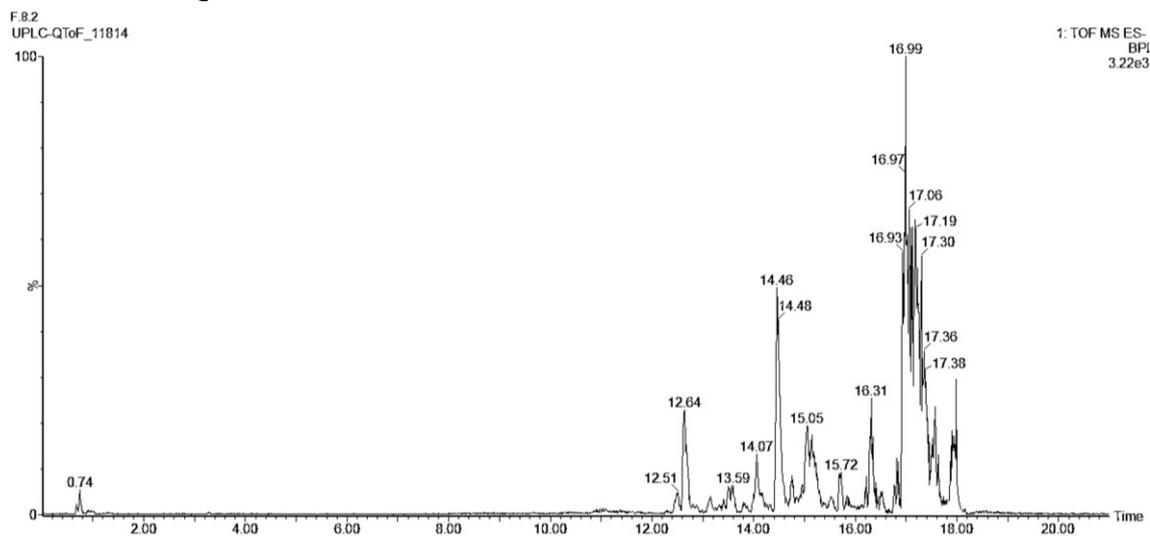
Fonte: Autor

**APENDICE T – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 7 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



Fonte: Autor

**APENDICE U – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 8 OBTIDA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA CASCA DA MANGUEIRA OBTIDO POR UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.**



Fonte: Autor