



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

FRANCISCO OIRAM FILHO

**ISOLAMENTO EM ESCALA PREPARATIVA DE ÁCIDOS ANACÁRDICOS
PROVENIENTES DO LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (LCC)**

FORTALEZA

2017

FRANCISCO OIRAM FILHO

ISOLAMENTO EM ESCALA PREPARATIVA DE ÁCIDOS ANACÁRDICOS
PROVENIENTES DO LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (LCC)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Dr. Edy Sousa de Brito
Co-orientador: Dr. Guilherme Julião Zocolo

FORTALEZA

2017

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

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

- O1i Oiram Filho, Francisco.
Isolamento em Escala Preparativa de Ácidos Anacárdicos Provenientes do Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC) / Francisco Oiram Filho. – 2017.
65 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.
Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.
1. Anacardium occidentale. 2. Cromatografia analítica. 3. Cromatografia preparativa. 4. HPLC. 5. Alquilfenol. I. Título.

CDD 660

FRANCISCO OIRAM FILHO

ISOLAMENTO EM ESCALA PREPARATIVA DE ÁCIDOS ANACÁRDICOS
PROVENIENTES DO LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (LCC)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado em: 29/08/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito (Orientador)

Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Tigressa Helena Soares Rodrigues

Universidade Estadual 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

A 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 e no mestrado.

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

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. Ivanildo José da Silva Junior e Dr^a. Tigressa Helena Soares Rodrigues por aceitarem o convite para participar da banca de defesa de dissertação e ao Dr. Kirley Marques Canuto 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: Dra. Tigressa Helena, Dr. Paulo Ricelli, Dra. Lorena Mara, aos amigos de pós-graduação, Adriana, Carol, Camila, Fátima, Kaline, Regis, Marcelo, Jhony e Márcia.

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

A casca da castanha de caju é matéria-prima para obtenção do líquido da casca da castanha (LCC), uma substância viscosa de coloração amarronzada, com importantes aplicações na indústria química e farmacêutica. Diversos compostos são encontrados no LCC, tais como, cardol, cardanol, metil-cardol e os ácidos anacárdicos (AcAn). Os AcAn são compostos considerados lipídeos fenólicos, pois possuem uma cadeia carbônica longa com diferentes graus de instauração. Estudos em diversas áreas da ciência mostram resultados positivos dos AcAn para tratamento e prevenção de algumas doenças e seus vetores. Portanto, há uma necessidade de estudos mais específicos para monitorar, quantificar e isolar esses compostos no LCC. Nesse trabalho foi desenvolvido um método de separação cromatográfica, capaz de isolar os AcAn presentes no LCC. Também foi executado um fracionamento do LCC para obter uma fração contendo apenas AcAn. Amostras de LCC natural foram solubilizadas em metanol, injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) monitorado a um comprimento de onda de 280 nm, equipado com uma coluna C₁₈, utilizando como fase móvel acetonitrila, H₂O e ácido acético, em modo isocrático. O método cromatográfico desenvolvido apresentou seletividade adequada, sendo capaz de separar os ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1) de maneira eficaz, presentes no LCC nos tempos de retenção de 7,68, 11,09 e 17,85 min, respectivamente. Para as condições cromatográficas em escala preparativa, foi usado um CLAE-UV/VIS monitorado à um comprimento de onda de 280 nm, equipado com uma coluna C₁₈ em escala preparativa, utilizando como fase móvel metanol, H₂O e ácido acético, em modo isocrático. O método em escala preparativa foi ajustado matematicamente para obter maior similaridade com o método analítico. A curva de calibração com intervalo linear (50 a 1000 µg.mL⁻¹) e validação do método analítico, foram feitos a partir do padrão externo do ácido anacárdico (15:3). Os resultados obtidos para validação do método foram satisfatórios, para precisão intra-dia (CV = 0,60 %) e inter-dia (CV = 0,67 %), linearidade ($y = 2670,8x - 26949$, $r^2 > 0,9998$), repetibilidade para o tempo de retenção (CV = 1,02 %) e área (CV = 0,24 %), seletividade e limites de detecção (19,8 µg.mL⁻¹) e quantificação (60,2 µg.mL⁻¹). Os resultados da recuperação do isolamento em escala preparativa dos AcAn foram 94,02, 87,63 e 97,35 %, para os AcAn trieno, dieno e monoeno, respectivamente. Os valores de pureza foram 99,11, 95,56 e 92,59 %, para treino, dieno e monoeno, respectivamente. O consumo de solvente foi de 60,52 e 11,09 mL.mg⁻¹, para escala analítica e preparativa, respectivamente. A produtividade foi de 0,06 e 1,63 g.h⁻¹ por cada g de adsorvente para escala analítica e preparativa, respectivamente. O método cromatográfico desenvolvido e sua respectiva ampliação de escala foram adequados para a quantificação, monitoramento e isolamento dos ácidos anacárdicos presentes no LCC. O método foi validado de acordo com as normas exigidas e o isolamento dos padrões analíticos foi obtido com elevado grau de pureza, recuperação, baixo consumo de solvente e boa produtividade.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*, cromatografia analítica, cromatografia preparativa, HPLC, alquilfenol.

ABSTRACT

The shells of cashew nut are raw material for obtaining cashew nut shell liquid (CNSL), a brownish viscous substance with important applications in the chemical and pharmaceutical industry. Several compounds are found in CNSL, such as cardol, cardanol, methyl-cardol and anacardic acids (AnAc). The AnAc are compounds considered as phenolic lipids, due they have a long carbonic chain with different degrees of instauration. Studies in several scientific areas show positive results of AnAc for the treatment and prevention of some diseases and their vectors. Therefore, there is a need for more specific studies to monitor, quantify and isolate these compounds in the CNSL. In this work a chromatographic separation method was developed, able to isolate the AnAc present in the CNSL. A fractionation of the CNSL was also performed to obtain a fraction containing only AnAc. Samples of CNSL were solubilized in methanol, injected into a high performance liquid chromatograph coupled a diode array detector (HPLC – DAD), monitored at 280 nm, equipped with C₁₈ column, using as the mobile phase acetonitrile, H₂O, acetic acid in isocratic mode. The chromatographic method developed showed adequate selectivity to be able to separate anacardic acids triene (15:3), diene (15:2) and monoene (15:1) efficiently presents in the CNSL at the retention times 7.68, 11.09 and 17.85 min, respectively. For the preparative scale chromatographic conditions was used a HPLC – DAD monitored at wavelength 280 nm, equipped with a C₁₈ column, using as the mobile phase methanol, H₂O, acetic acid in isocratic mode. The method was mathematically adjusted to obtaining a greater similarity with the analytical method. The calibration curve with linear interval (50 to 1000 µg.mL⁻¹) and validation of the analytical method were made from the external anacardic acid standard (15: 3). The results obtained for method validation were satisfactory for intra-day (CV = 0.60 %) and inter-day (CV = 0.67 %) precision, linearity ($y = 2670.8x - 26949$, $r^2 > 0.9998$), repeatability for the retention time (CV = 1.02 %) and area (CV = 0.24 %), selectivity and limits of detection (19,8 µg.mL⁻¹) and quantification (60.2 µg.mL⁻¹). The recovery results obtained by the purification of the anacardic acid on a preparative scale were 94.02, 87.63 and 97.35 %, for the triene, dieno and monoene, respectively. The data for purity were 99.11, 95.56 and 92.59 %, for the triene, diene and monoene, respectively. The solvent consumption was 60.52 and 11.09 mL.mg⁻¹ for analytical and preparative scale, respectively. The productivity was 0.06 and 1.63 g.h⁻¹ by each g of adsorbent to analytical and preparative scale, respectively. The chromatographic method developed and its respective scale-up were adequate for the quantification, monitoring and isolation of the anacardic acids present in the CNSL. The method was validated according to the required standards and the isolation of the analytical standards was obtained with an high degree of purity, recovery, low solvent consumption and good productivity.

Keywords: *Anacardium occidentale*, HPLC, analytical chromatography, preparative chromatography, alkilphenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do ácido salicílico e ácido anacárdico com suas variações na cadeia carbônica.....	16
Figura 2 - Estrutura interna da casca da castanha de caju.....	20
Figura 3 - Estrutura molecular do ácido anacárdico, cardol e cardanol e seus diferentes radicais.	22
Figura 4 - Faca de corte longitudinal com suporte para castanha, para separação entre cascas e amêndoas.	28
Figura 5 - Célula de extração de óleo e prensa hidráulica.	29
Figura 6 - Fluxograma geral do processo.....	32
Figura 7 - (a) Anacardato de cálcio proveniente da primeira etapa de fracionamento do LCC. (b) Fração de LCC purificada contendo apenas ácidos anacárdicos.....	38
Figura 8 - (a) Perfil cromatográfico (analítico) de amostra de LCC (1 mg.mL ⁻¹) contendo (I) cardol, (II) cardanol, ácidos anacárdicos (III) trieno, (IV) dieno e (V) monoeno, monitorado à 280nm. (b) Perfil cromatográfico (analítico) da fração purificada de LCC (1 mg.mL ⁻¹) contendo apenas ácidos anacárdicos (III) trieno, (IV) dieno e (V) monoeno, monitorado à 280nm.	39
Figura 9 - (a) Perfil cromatográfico (analítico) do LCC (1mg.mL ⁻¹) em HPLC – DAD, contendo (I) cardol, (II) cardanol, e AcAn (III) trieno (15:3), (IV) dieno (15:2) e (V) monoeno (15:1). (b) Perfil cromatográfico (analítico) do padrão externo AcAn (III') trieno (15:3) (1mg.mL ⁻¹) em HPLC – DAD, monitorado em 280 nm.	40
Figura 10 - Estrutura molecular dos ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1).....	41
Figura 11 - Espectro de ultravioleta dos ácidos anacárdicos trieno (15:3) (III), dieno (15:2) (IV), monoeno (15:1) (V) e padrão externo (III').....	42
Figura 12 - (a) Curva de calibração do padrão externo, (n=6) intra-dia; (b) Curva de calibração do padrão externo, (n=9) inter-dia.	43
Figura 13 - Perfil cromatográfico (HPLC-UV/VIS preparativo) de LCC (50 mg.mL ⁻¹). (I) cardol, (II) cardanol, (III) AcAn trieno, (IV) AcAn dieno e (V) AcAn monoeno...	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados com diferentes combinações de solventes, ácidos e bases para obtenção de anacardato e regeneração dos ácidos anacárdicos.	23
Tabela 2 - Resultados de rendimento e grau de pureza do extrato de ácido anacárdico proveniente de 100 g de LCC, expressos em (%). Rendimento da obtenção de anacardato de cálcio expresso em (g).....	37
Tabela 3 - Índice de pureza dos picos dos ácidos anacárdicos presentes no LCC.	43
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 %.....	44
Tabela 5 - Resultados estatísticos para precisão e repetibilidade, intra-dia (n=6) e inter-dia (n=9), obtidos através dos pontos da curva de calibração, expressos em valores para coeficiente de variação (CV) e coeficiente de correlação (r^2).	45
Tabela 6 - Identificação dos diferentes ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1), presentes no LCC, via UPLC-QTOF-MS ^E	46
Tabela 7 - Teores dos Ácidos Anacárdicos presentes em diferentes amostras de LCC (1 mg.mL ⁻¹), expressos em µg de ácido anacárdico por mg de LCC.....	47
Tabela 8 - Resultados do isolamento dos diferentes ácidos anacárdicos presente em LCC, via HPLC-UV/VIS em escala preparativa.	49
Tabela 9 - Valores para consumo de solvente orgânico e produtividade, para sistemas de HPLC em escala analítica e preparativa.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
2.1	Ácidos Anacárdicos	16
2.2	Bioatividade dos Ácidos Anacárdicos	17
2.2.1	<i>Atividade Moluscicida</i>	17
2.2.2	<i>Atividade Antimicrobiana e Antiparasitária</i>	17
2.2.3	<i>Inibição Enzimática</i>	18
2.2.4	<i>Atividade Anticâncer</i>	18
2.2.5	<i>Atividade Inseticida</i>	19
2.3	Extração do LCC	20
2.3.1	<i>Extração por Solvente</i>	20
2.3.2	<i>Extração por Prensagem</i>	21
2.4	Fracionamento do LCC	21
2.4.1	<i>Obtenção do Anacardato</i>	22
2.4.2	<i>Regeneração dos Ácidos Anacárdicos</i>	23
2.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	23
2.6	Quantificação de Ácidos Anacárdicos por HPLC	24
2.7	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Escala Preparativa	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Experimento	26
3.1.1	<i>Reagentes e Material</i>	26
3.1.2	<i>Preparação da Solução Padrão e Amostra Real</i>	26
3.1.3	<i>Equipamento Cromatográfico - HPLC Analítico</i>	27
3.1.4	<i>Equipamento Cromatográfico - HPLC Preparativo</i>	27
3.2	Métodos	27
3.2.1	<i>Obtenção do LCC</i>	27
3.2.2	<i>Fracionamento do LCC</i>	29
3.2.3	<i>Desenvolvimento do Método Cromatográfico em HPLC-DAD Analítico</i>	30
3.2.4	<i>Desenvolvimento do Método Cromatográfico em HPLC-UV/VIS Preparativo</i>	30
3.2.5	<i>Consumo de Solvente e Produtividade</i>	32

3.2.6	<i>Confirmação estrutural dos ácidos anacárdicos via UPLC-QTOF-MS^E</i>	33
3.3	Validação do Método Analítico	34
3.3.1	<i>Seletividade</i>	34
3.3.2	<i>Linearidade</i>	35
3.3.3	<i>Precisão</i>	36
3.3.4	<i>Repetibilidade</i>	36
3.3.5	<i>Limite de Detecção e Quantificação</i>	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Fracionamento do LCC	37
4.2	Desenvolvimento do Método Cromatográfico	39
4.3	Validação do Método Analítico	41
4.3.1	<i>Seletividade</i>	41
4.3.2	<i>Linearidade</i>	43
4.3.3	<i>Precisão</i>	44
4.3.4	<i>Repetibilidade</i>	45
4.3.5	<i>Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)</i>	45
4.4	Identificação dos Compostos	46
4.5	Aplicação em Amostra Real	46
4.6	Isolamento dos Ácidos Anacárdicos	48
4.7	Consumo de Solvente e Produtividade	50
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ISOLAMENTO DO ÁCIDO ANACÁRDICO TRIENO (15:3) EM HPLC-DAD, MONITORADO EM 280 nm.	60
	APÊNDICE B - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ISOLAMENTO DO ÁCIDO ANACÁRDICO DIENO (15:2) EM HPLC-DAD, MONITORADO EM 280 nm.	60
	APÊNDICE C - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ISOLAMENTO DO ÁCIDO ANACÁRDICO MONOENO (15:1) EM HPLC-DAD, MONITORADO EM 280 nm.	61
	APÊNDICE D - (A) PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AMOSTRA REAL DE LCC EM UPLC-QTOF-MS^E, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO. (B) PERFIL CROMATOGRÁFICO EXTRAÍDO POR MASSAS DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS DA AMOSTRA REAL DE LCC EM UPLC-QTOF-MS^E, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.	61

APÊNDICE E - ESPECTRO DE MASSAS DO ÁCIDO ANACÁRDICO TRIENO (15:3) ANALISADO NA AMOSTRA REAL, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.	62
APÊNDICE F - ESPECTRO DE MASSAS DO ÁCIDO ANACÁRDICO DIENO (15:2) ANALISADO NA AMOSTRA REAL, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.	62
APÊNDICE G - ESPECTRO DE MASSAS DO ÁCIDO ANACÁRDICO MONOENO (15:1) ANALISADO NA AMOSTRA REAL, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.	63
APÊNDICE H - PUREZA DO PICO CROMATOGRÁFICO DO ÁCIDO ANACÁRDICO TRIENO (15:3) ISOLADO A PARTIR DE AMOSTRA DE LCC.	63
APÊNDICE I - PUREZA DO PICO CROMATOGRÁFICO DO ÁCIDO ANACÁRDICO DIENO (15:2) ISOLADO A PARTIR DE AMOSTRA DE LCC.	64
APÊNDICE J - PUREZA DO PICO CROMATOGRÁFICO DO ÁCIDO ANACÁRDICO MONOENO (15:1) ISOLADO A PARTIR DE AMOSTRA DE LCC.	64

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale*) possui dois principais produtos, seu pseudofruto o caju, destinado à produção de sucos e consumo *in natura* e seu fruto a castanha, de onde se obtém a amêndoa, produto de maior importância comercial para os produtores e mercado mundial. A produção mundial de castanhas vem crescendo na última década. Em 2011, ocorreu um ápice na produção com aproximadamente 4,4 milhões de toneladas de castanhas de caju e em 2014 houve uma queda nos números para aproximadamente 3,8 milhões de toneladas (FAO, 2014), fato que está intimamente relacionado à escassez de chuvas.

Neste sentido, o Brasil segue entre os maiores produtores mundiais de castanhas (107.713 t) segundo dados da FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations, porém respondendo por aproximadamente 1/8 do que produz a Nigéria (894.368 t). Por outro lado, o beneficiamento dessas castanhas resulta em uma grande quantidade de cascas, em torno de 8 % do peso da castanha é de casca, que inicialmente são consideradas subprodutos para indústria.

A casca da castanha de caju possui uma estrutura interna chamada pericarpo que se assemelha a favos de mel, onde está presente um líquido viscoso de coloração marrom escuro, chamado de líquido da casca da castanha de caju (LCC) (Gandhi *et al.*, 2012). O LCC é um óleo rico em compostos fenólicos e pode ser classificado como Natural e Técnico.

As cascas que são provenientes de processos sob altas temperaturas, geram o LCC-Técnico, caracterizado pela conversão dos ácidos anacárdicos em cardol e cardanol por meio de uma descarboxilação (Paramashivappa *et al.*, 2001) e são destinados para produção de uma ampla faixa de produtos, desde lonas de freio, tintas, primers, resinas, até a produção de revestimentos e cimentos (Philip *et al.*, 2008). No entanto, o LCC-Natural advém de cascas, as quais não foram submetidas a temperaturas elevadas, conservando assim as estruturas químicas dos compostos presentes nele (Rodrigues *et al.*, 2011), evitando a conversão dos ácidos anacárdicos por meio da descarboxilação.

Existe um interesse da indústria química em agregar valor comercial ao LCC, devido à presença de compostos fenólicos insaturados de cadeia longa em sua composição química. Os compostos comumente encontrados no LCC são ácidos anacárdicos, cardol, cardanol e alguns isômeros (Yuliana *et al.*, 2012).

Compostos fenólicos estão presentes em vários frutos e vegetais e possuem várias atividades biológicas, tais como, modular a homeostase celular, atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (Faria *et al.*, 2014). Contudo, estudos recentes mostram resultados positivos dos ácidos anacárdicos (AcAn) em tratamentos e prevenções de doenças.

São atribuídas aos AcAn algumas atividades biológicas, tais como: atividade anticarcinogênica (Huang *et al.*, 2014), tratamento para doença de Alzheimer (Lemes *et al.*, 2016), doença de Chagas (De Oliveira *et al.*, 2014), tratamento em infecções causadas por bactérias (Hollands *et al.*, 2016), atividade antioxidante (Masuoka *et al.*, 2013), são algumas atividades biológicas estudadas. Contudo, há uma necessidade de estudos mais específicos para identificação, monitoramento, quantificação e isolamento dos ácidos anacárdicos. Portanto, o isolamento de cada ácido anacárdico fornece a possibilidade de um estudo direcionado, onde possa ser mostrado o potencial de cada composto isoladamente nas mais variadas áreas de estudo.

Para executar os estudos em questão, o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma alternativa promissora, pois é capaz de reproduzir resultados de maneira eficiente e precisa, utilizando-se da escala analítica e preparativa para tal. Portanto, para alcançar o objetivo de isolar os ácidos anacárdicos é necessário inicialmente desenvolver um método cromatográfico capaz de monitorar, quantificar e por fim, isolar os ácidos anacárdicos presentes no LCC.

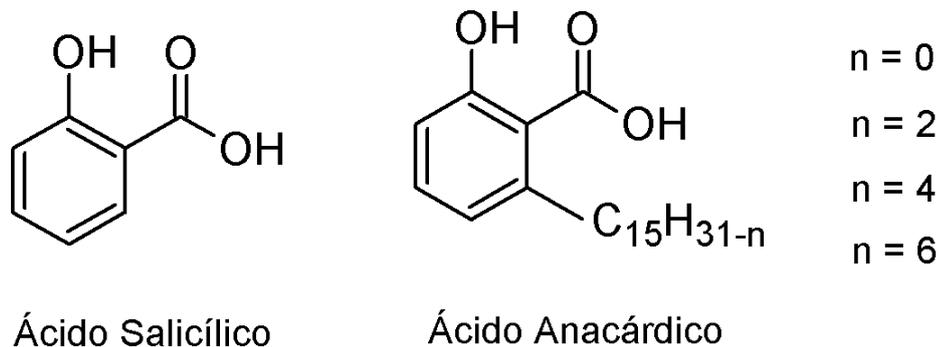
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Ácidos Anacárdicos

Ácidos anacárdicos são compostos fenólicos derivados do ácido salicílico, apresentam caráter lipídico devido sua cadeia carbônica lateral. Possuem nomenclatura como ácido 2-hidroxi-6-pentadecil-benzóico (Seong *et al.*, 2014) (Figura 1), e são encontrados em grande parte do cajueiro e de seu fruto. No entanto, os ácidos anacárdicos estão presentes em maior quantidade no líquido da casca da castanha do caju (LCC) (Neto *et al.*, 2014).

Os ácidos anacárdicos são compostos apolares devido aos diferentes tamanhos da sua cadeia alifática, podendo variar entre 2 e 17 o número de carbonos (Česla *et al.*, 2006; Hemshekhar *et al.*, 2012; Jerz *et al.*, 2012), no entanto cadeias longas compostas por 15 carbonos são comumente majoritárias no LCC e em outras partes do caju. Outra característica estrutural importante da molécula de ácidos anacárdico é o grau de insaturação de sua cadeia carbônica, variando de nenhuma (saturado) até 3 insaturações (Trevisan *et al.*, 2006), essas diferenças nas cadeias laterais também refletem no grau de polaridade das moléculas. O tamanho da cadeia lateral e a variação das insaturações influenciam diretamente na atividade biológica dos ácidos anacárdicos, mostrando maior, menor ou nenhuma eficácia para uma determinada aplicação (Kubo *et al.*, 2005; Morais *et al.*, 2017).

Figura 1 - Estrutura molecular do ácido salicílico e ácido anacárdico com suas variações na cadeia carbônica.



(Fonte: Autor)

2.2 Bioatividade dos Ácidos Anacárdicos

2.2.1 Atividade Moluscicida

A atividade moluscicida do Líquido da Castanha do Caju (LCC) sobre o caramujo *Biomphalaria glabrata*, que é responsável por grande parte das contaminações em lagos e rios de água doce, foi demonstrada pela primeira vez em laboratório e em campo, por Pereira e Souza (1974) e posteriormente por, Sullivan *et al.* (1982). Os autores evidenciaram a solução metanólicas contendo o componente trieno (3 insaturações) do ácido anacárdico apresentou para *Biomphalaria. glabrata* as concentrações letais (CL50 = 0,35 e CL90 = 0,67 ppm) em doses mais baixas que o dieno (2 insaturações), o monoeno (1 insaturação) e o ácido anacárdico de cadeia saturada.

O uso do ácido anacárdico como alternativa para o controle de infestações em rios e lagos, de caramujos transmissores de esquistossomose, torna-se viável uma vez que testes laboratoriais foram capazes de comprovar a eficácia de 100% na atividade moluscicida com uso de uma solução metanólica em concentração de 8 ppm (Mendes *et al.*, 1990).

2.2.2 Atividade Antimicrobiana e Antiparasitária

Estudos *in vitro* na área da odontologia mostraram que, os resultados do emprego dos ácidos anacárdicos no controle de infecções bacterianas, com *Enterococcus faecalis*, são similares às soluções bactericidas comumente usadas com 2 % de clorexidina. Portanto, os resultados evidenciaram o uso dos ácidos anacárdicos como um bactericida alternativo de origem natural. (Ballal *et al.*, 2013). Além do mais, também foi relatado eficácia de extratos contendo compostos fenólicos, provenientes de folhas e casca do cajueiro contra *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Candida albicans* (Ayepola e Ishola, 2009). Os ácidos anacárdicos também estão presentes na amêndoa, pseudofruto, cascas e folhas do cajueiro (Toyomizu *et al.*, 1999; Barcelos, Shimabukuro, Mori, *et al.*, 2007; Konan e Bacchi, 2007).

A atividade antiparasitária dos ácidos anacárdicos foi observada em estudo contra larvas de um besouro da batata, *Trypanosoma cruzi* e pequenas pragas como pulgões e ácaros. Os efeitos do ácido anacárdico sobre as larvas do besouro da batata, com base na preferência alimentar, evidenciaram menor taxa de alimentação do besouro em substratos contendo ácido anacárdico. Portanto, a pulverização de plantas com produtos contendo ácidos anacárdicos

pode proporcionar uma nova ferramenta contra essas pragas, visando minimizar os danos causados por elas e maximizar a produção das culturas (Schultz *et al.*, 2006).

2.2.3 Inibição Enzimática

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima chave envolvida na via glicolítica dos protozoários parasitas, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania sp*; respectivos agentes causadores das doença de Chagas, doença do sono e a leishmaniose. A enzima GAPDH desempenha um papel central no controle da produção de ATP, com isso, a GAPDH tem sido considerada um importante alvo para o desenvolvimento de drogas contra estes parasitas. Derivados de ácidos anacárdicos mostraram grande inibição contra a GAPDH (Pereira *et al.*, 2008).

Histona-acetiltransferases (HATs) é um grupo de enzimas que desempenham um papel significativo na regulação da expressão do gene. Estas são covalentemente modificadas a resíduos de lisina N-terminal de histonas por meio da adição de grupos acetil a partir de acetil-CoA. A disfunção dessa enzima é frequentemente associada com a manifestação de inúmeras doenças fisiopatológicas, em destaque o câncer. O ácido anacárdico foi usado como um ótimo inibidor não competitivo para HATs, agindo diretamente na transcrição do DNA e inibindo fortemente a enzima (Balasubramanyam *et al.*, 2003).

2.2.4 Atividade Anticâncer

Em função da inibição da atividade da HATs, estudos analisaram a atividade antitumoral do LCC e ácidos anacárdicos. Alguns tipos de ácidos anacárdicos de comprimento de cadeia variada, (C12:0 e C15:1) mostraram citotoxicidade em várias linhagens de células cancerígenas *in vitro*. O efeito citotóxico dos diferentes ácidos anacárdicos é bem similar em relação às linhagens estudadas, não remetendo nenhum caráter qualitativo em função da insaturação. No entanto, ácidos anacárdicos de cadeias mais longas contendo 15 átomos de carbonos apresentam melhor capacidade citotóxica, assim relacionando o tamanho da cadeia lateral em função da atividade antitumoral (Kubo *et al.*, 2005).

Além do mais, foi demonstrado que o ácido anacárdico suprimiu o crescimento endotelial vascular de angiogênese, resultando em uma inibição do crescimento de tumores. Sua atividade tem sido mostrada em melanomas do cólon, da mama, do pulmão, do colo do

útero, dos rins e outros cânceres. Também pode inibir o crescimento de tumores que dependem da atividade hormonal, por meio da supressão de receptores de androgênos e estrogênos (Legut *et al.*, 2014).

Estudos mostram atividade antimutagênica e antígenotóxica, a partir de extratos metanólicos provenientes da pele do pedúnculo do caju, contendo ácidos anacárdicos, reforçando assim as propriedades terapêuticas destes compostos fenólicos (Barcelos, Shimabukuro, Maciel, *et al.*, 2007; Barcelos, Shimabukuro, Mori, *et al.*, 2007).

O LCC também é um potente agente de captura de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Trevisan *et al.*, 2006) conferindo assim uma proteção contra danos ao DNA (Cavalcante *et al.*, 2003). Portanto, devido essa característica os ácidos anacárdicos presentes no LCC têm sido descritos como o principal componente responsável por essa ação protetora (Carvalho *et al.*, 2011).

Além de todos os estudos voltados para os compostos derivados do caju, estudos envolvendo ácido anacárdico como medicamento com atividade anti-inflamatória, controle de doenças do trato gastrointestinal, hipertensão, também são relatados (Mota *et al.*, 1985; Cavalcante *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2011).

2.2.5 Atividade Inseticida

O uso de larvicidas organofosfatados e organofosforados é uma das maneiras de reduzir a incidência de doenças transmitidas por mosquitos, no entanto estes larvicidas podem ser nocivos aos seres humanos, animais em geral e ao meio ambiente, além do mais algumas linhagens de mosquitos podem desenvolver resistência a esses inseticidas (Farias *et al.*, 2009). Portanto, o uso dos ácidos anacárdicos na forma de anacardato de cálcio pode ser uma ferramenta alternativa para eliminar e controlar as diferentes fases de crescimento (ovo, pupas e larvas) do mosquito *Aedes aegypti* L..

O anacardato (sal básico) obtido a partir do LCC é solubilizado em uma solução estoque preparada a partir de um hidróxido (cálcio, sódio, potássio, dentre outros), dessa maneira se tornando viável para aplicação *in vivo* sem demonstrar efeitos adversos (Farias *et al.*, 2009).

2.3 Extração do LCC

2.3.1 Extração por Solvente

Para obtenção do líquido da casca da castanha (LCC), deve se tomar algumas medidas preventivas quanto ao procedimento para evitar alterações na composição do LCC. Temperaturas acima de 100 °C e uma exposição prolongada dos ácidos anacárdicos à oxidação atmosférica são situações prejudiciais ao processo (Izzo e Dawson, 1949).

O LCC contido nas regiões internas das cascas das castanhas (Figura 2) pode ser inicialmente extraído com o uso de um solvente orgânico, por meio de imersão das cascas íntegras ou maceradas (Izzo e Dawson, 1949; Toyomizu *et al.*, 2003), diversos tipos de solventes podem ser utilizados, tais como o éter de petróleo, hexano, metanol, pentano, éter dietílico (Izzo e Dawson, 1949; Tyman, 1973; Shobha e Ravindranath, 1991; Toyomizu *et al.*, 2003; Cavalcante, 2014) entre outros.

Figura 2 - Estrutura interna da casca da castanha de caju.



(Fonte: Autor)

O processo de extração ocorre devido às interações entre soluto e solvente em função da polaridade do composto a ser extraído, sendo esse um fator primordial para escolha do melhor solvente (Azmir *et al.*, 2013), pois uma extração eficiente depende da escolha certa do solvente (Cowan, 1999). O percentual de extração do LCC pode variar entre 28 % a 38 % (Tyman *et al.*, 1989; Yuliana *et al.*, 2012; Cavalcante, 2014), dependendo do método de extração utilizado. No entanto existem métodos de extração não convencionais que podem otimizar a extração, diminuindo o tempo gasto e aumentando o rendimento da extração dos compostos, dentre eles podem ser citados, fluido supercrítico e solvente pressurizado (Azmir *et al.*, 2013).

2.3.2 Extração por Prensagem

O processo de extração de LCC por prensagem possui algumas vantagens quando comparado à extração por solvente, pois elimina algumas etapas no processo de obtenção e por conseqüente diminui o tempo de processamento. Contudo, uma etapa preliminar de secagem deve ser adicionada ao procedimento com objetivo de eliminar possíveis alterações, causadas pelo teor de umidade (Pighinelli *et al.*, 2009) presente na casca *in natura*.

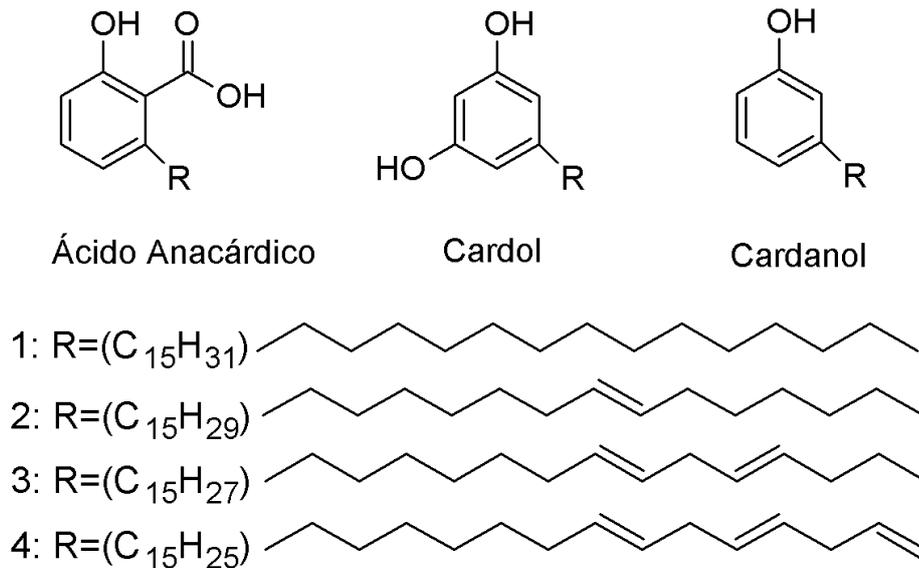
Durante o processo de secagem, o calor fornecido pela estufa auxilia na quebra das células de óleo na região interna da casca, facilitando a saída do óleo durante a prensagem, bem como na redução da umidade, minimizando a quantidade de óleo residual na torta (Singh *et al.*, 2002). Valores altos de umidade acarretam na redução da fricção durante a prensagem causando um rendimento baixo, enquanto que valores demasiados baixos podem prejudicar o funcionamento da prensa (Reuber, 1992; Singh *et al.*, 2002). Portanto, para um melhor rendimento da prensagem, uma combinação adequada entre fatores como, pressão, temperatura e umidade (Ohlson, 1992; Cavalcante, 2014), são de extrema importância. Para o binômio umidade x temperatura, teores baixos de umidade associado a uma temperatura mais elevada incrementam o rendimento de extração (Singh *et al.*, 2002).

2.4 Fracionamento do LCC

Os ácidos anacárdicos estão presentes no LCC, normalmente em uma proporção de 60 %, juntamente com outros compostos fenólicos, tais como cardol e cardanol (Figura 3), estes por sua vez, são compostos utilizados comumente na indústria química, para produção

de vernizes, esmaltes, tintas, componentes para freios de veículos automotivos dentre outros (Philip *et al.*, 2008). No entanto, procedimentos químicos permitem a obtenção de uma fração contendo apenas ácidos anacárdicos por meio de um fracionamento do LCC, em apenas duas etapas. A primeira etapa consiste na obtenção de um sal básico chamado anacardato e uma segunda etapa na qual ocorre a regeneração dos ácidos anacárdicos.

Figura 3 - Estrutura molecular do ácido anacárdico, cardol e cardanol e seus diferentes radicais.



(Fonte: Autor)

2.4.1 Obtenção do Anacardato

O LCC contendo ácidos anacárdicos, cardol, cardanol é submetido a uma reação química com um hidróxido em um meio contendo um solvente orgânico, onde o grupo carboxílico presente no anel aromático da estrutura molecular dos ácidos anacárdicos reage com esse hidróxido formando um sal básico, chamado de anacardato. Dessa forma garantindo total separação entre cardois e cardanois dos ácidos anacárdicos (Farias *et al.*, 2009).

Essa reação pode ocorrer de diversas maneiras, de acordo com o solvente orgânico e com o respectivo sal usado, levando um período de 3 horas sob agitação (1000 rpm) e temperatura variando entre 50° C e 60° C, podendo ser usado como solvente, metanol, etanol, álcool isopropílico, diclorometano, entre outros, e como base o hidróxido de sódio, cálcio, bário ou potássio (Tabela 1). (Karl e Novotny, 1943; Tyman *et al.*, 1989; Paramashivappa *et al.*, 2001; Farias *et al.*, 2009; Gandhi *et al.*, 2013).

2.4.2 Regeneração dos Ácidos Anacárdicos

Para completar o fracionamento do LCC e purificação dos ácidos anacárdicos, o anacardato obtido na primeira etapa é solubilizado em solução ácida, podendo ser ácido sulfúrico, nítrico ou clorídrico (Tabela 1). Essa etapa necessita de 1 hora sob agitação para que os ácidos anacárdicos em forma de anacardato, entrem em contato com o ácido, assim regenerando a forma ácida dos ácidos anacárdicos (Kremers, 1947). Uma partição líquido-líquido, com acetado de etila é feita em seguida e a fase orgânica, agora contendo os ácidos anacárdicos deve ser submetida a uma destilação sob baixas pressões, a fim de eliminar por completo o solvente usado, obtendo um produto final do fracionamento contendo apenas os lipídios fenólicos.

Tabela 1 - Dados com diferentes combinações de solventes, ácidos e bases para obtenção de anacardato e regeneração dos ácidos anacárdicos.

Solvente orgânico	Base	Ácido	Rendimento (%)	Referência
MeOH	Ca(OH) ₂	HCl	60	(Paramashivappa <i>et al.</i> , 2001)
Isopropanol	Ca(OH) ₂	H ₂ SO ₄	63,5	(Kremers, 1947)
EtOH	Ca(OH) ₂	HNO ₃	64,5	(Tyman <i>et al.</i> , 1989)
CH ₂ Cl ₂	NaOH	-----	-----	(Farias <i>et al.</i> , 2009)
MeOH/EtOH/PropOH	KOH	-----	-----	(Karl e Novotny, 1943)
Metil Isobutil Cetona	Ba(OH) ₂	HCl	70	(Gandhi <i>et al.</i> , 2013)

(Fonte: Autor)

2.5 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) (Vitolo, 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 C₈ ou C₁₈ (cadeias carbônica) 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.*, 2012a), assim a ordem de eluição dos compostos separados é diferente em cada processo.

2.6 Quantificação de Ácidos Anacárdicos por HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma ferramenta usual para a quantificação de diversos compostos. A quantificação é feita por meio de uma curva analítica preparada com pontos de concentração diferentes a partir do padrão analítico do composto a ser quantificado (Snyder *et al.*, 2012a).

Os ácidos anacárdicos podem ser quantificados a partir de diferentes amostras, folhas, pedúnculo, amêndoas e LCC são matrizes que contem ácidos anacárdicos, sendo o LCC a matriz com o maior teor de ácidos anacárdicos. A concentração de ácidos anacárdicos presentes no LCC, descritas na literatura atual variam entre 60 a 75 % do total de LCC (Česla *et al.*, 2006; Trevisan *et al.*, 2006; Philip *et al.*, 2008). No passado alguns ácidos anacárdicos minoritários não eram identificados como tal, ou não haviam técnicas capazes de identificá-los, com isso não entravam na contabilidade percentual do LCC, gerando assim um percentual de aproximadamente 50 % do LCC (Sletzinger e Dawson, 1949; Tyman, 1973).

2.7 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 (Golshan-Shirazi e Guiochon, 1989; García Palacios *et al.*, 2009), 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 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, com isso limitando o uso de alguns parâmetros da cromatografia analítica, tais como resolução e tempo de retenção (Jin *et al.*, 2016).

Nos dias atuais, o uso da escala preparativa para isolamento de ácidos anacárdicos não tem sido explorada, gerando uma grande escassez de trabalhos voltados para esses compostos, onde os trabalhos disponíveis foram publicados há décadas (Lloyd *et al.*, 1980; Kubo *et al.*, 1986).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento

3.1.1 Reagentes e Material

O LCC natural foi obtido por meio de prensagem das cascas das castanhas, fornecidas pela mini-fábrica de beneficiamento de castanhas de caju do Campo Experimental Pacajus/CE da Embrapa Agroindústria Tropical. Os reagentes usados foram Acetonitrila grau HPLC (pureza $\geq 99,9\%$), obtido da Tedia (Fairfield, Ohio, EUA); Ácido Acético Glacial P.A. (pureza $\geq 99,7\%$) e Metanol P.A. (pureza $\geq 99,8\%$), obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA); e água purificada com sistema Mili Q (Millipore, São Paulo, Brasil). O padrão externo usado foi o ácido anarcárdico (15:3) (pureza $\geq 98,5$) doado gentilmente por Maria Teresa Trevisan (Departamento de Química da Universidade Federal do Estado do Ceará – UFC) ao laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical.

3.1.2 Preparação da Solução Padrão e Amostra Real

O padrão externo foi preparado a partir de solução estoque de ácido anacárdico (15:3) com concentração conhecida (1 mg.mL^{-1}), pureza de 98,5 % e diluído em metanol em 7 diferentes concentrações (50; 100; 200; 400; 600; 800 e $1000 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Para quantificação dos ácidos anacárdicos, cinco amostras de LCC provenientes de cascas de castanhas de caju oriundas do Programa de Melhoramento Genético do Cajueiro, desenvolvido pela Embrapa Agroindústria Tropical, obtidas através da prensagem das cascas das castanhas dos diferentes acessos de clones. As diferentes amostras de LCC (LCC_701, LCC_704, LCC_709, LCC_710 e LCC_715) foram pesadas e solubilizadas em metanol em uma concentração de 1 mg.mL^{-1} . Uma curva de calibração com 7 diferentes concentrações foi utilizada para a quantificação dos ácidos anacárdicos presentes nas amostras de LCC.

3.1.3 Equipamento Cromatográfico - HPLC Analítico

O sistema cromatográfico utilizado foi composto por um cromatógrafo Shimadzu LC-20AB Prominence acoplado a um detector de arranjo de diodo Shimadzu SPD-M20A Prominence e com um autosampler Shimadzu SIL-20AC Prominence (Quioto, Quioto, Japão). O controle instrumental da análise e o processamento dos dados foram tratados com o uso do software Shimadzu LC Solution.

3.1.4 Equipamento Cromatográfico - HPLC Preparativo

O sistema cromatográfico em escala preparativa foi composto por um cromatógrafo Waters 2555 – Quaternary Gradiente Module acoplado a um detector UV visível Waters 2489 e com um coletor de fração Waters Fraction Collector III (Dublin, Leinster, Irlanda). Tanto o controle do equipamento quanto o processamento dos dados foi feito através do software Empower Pro.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do LCC

As castanhas foram fornecidas pela Embrapa Agroindústria Tropical, provenientes do campo experimental de Pacajus-CE. Inicialmente as castanhas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar, à 40° C de temperatura, por 96 horas, para evitar os problemas devido a umidade. Após a secagem as castanhas foram cortadas de forma longitudinal em uma faca de corte mecânica (Figura 4). As bandas das cascas da castanha foram separadas das amêndoas e película, deixando-se apenas a casca.

Figura 4 - Faca de corte longitudinal com suporte para castanha, para separação entre cascas e amêndoas.



(Fonte: Autor)

Para a extração do LCC por prensagem foi utilizado uma prensa hidráulica (Marconi MA/098/50A/I) com o auxílio de uma célula de extração de óleo (Figura 5) e uma bandeja coletora. A prensa foi ajustada para uma pressão de 15 MPa a 40° C. O tempo de prensagem foi de 5 minutos, nos quais o primeiro e último minuto são referentes apenas à ajuste do equipamento, e os outros 3 minutos para a prensagem (Cavalcante, 2014). A célula de extração foi equipada com uma malha Mesh, atuando como uma peneira e alimentada com aproximadamente 40 g de cascas de castanha. O LCC extraído foi coletado na bandeja e em seguida armazenado em frasco de vidro de cor âmbar.

Figura 5 - Célula de extração de óleo e prensa hidráulica.



(Fonte: Autor)

3.2.2 Fracionamento do LCC

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

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

3.2.3 Desenvolvimento do Método Cromatográfico em HPLC-DAD Analítico

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

3.2.4 Desenvolvimento do Método Cromatográfico em HPLC-UV/VIS Preparativo

O método cromatográfico foi conduzido usando uma coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFire Prep C18 OBD (100 x 19 mm x 5 µm). A fase móvel foi usada de maneira isocrática utilizando como solventes, metanol, água e ácido acético, na proporção (90:10:1), tempo de corrida de 40 min, fluxo de eluição de 10 mL.min⁻¹, à temperatura de 25 °C, volume de injeção de 1 mL e concentração de 50 mg.mL⁻¹. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm.

A utilização de uma fase móvel diferente da utilizada na cromatografia analítica, pela escolha do metanol como solvente orgânico, foi embasada na interpolação de valores disponíveis no Nomograma de Snyder (Snyder *et al.*, 2012b), que apresenta proporções de equivalências entre os solventes de diferentes polaridades. Portanto, a mudança da fase móvel nas proporções adequadas não altera a ordem de eluição dos compostos. Além disso, fatores econômicos e ambientais também foram de grande influência na escolha do solvente para escala preparativa.

O volume de injeção foi calculado de acordo com as equações (Guillarme *et al.*, 2007; Aubin e Cleary, 2009) abaixo e otimizado em função do equipamento, onde o volume de injeção foi descrito de acordo com as equações 1.

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot \frac{dc_2^2}{dc_1^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (1)$$

Onde, 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 calculado de acordo com a equação 2 descrita abaixo e ajustado em função de fatores de viabilidade de execução e econômicas, expresso na equação.

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

Onde, 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. Para o isolamento dos ácidos anacárdicos foram executadas 9 corridas (n=9) e as frações do isolamento dos picos de cada ácido anacárdico foram coletadas com o auxílio de um coletor automático.

A recuperação dos três ácidos anacárdicos (trieno, dieno e monoeno), isolados em escala preparativa, provenientes do LCC foi calculada a partir da equação 3, que mostra os valores teóricos em escala preparativa, obtidos a partir da quantificação feita via HPLC-DAD para 1 mg de LCC,

$$m_{teo.pr.} = m_{an.} \cdot C_{inj.pr.} \quad (3)$$

Onde, $m_{teo.pr.}$ é a massa teórica de cada ácido anacárdico em escala preparativa, $m_{an.}$ é a massa de cada ácido anacárdico para 1 mg de LCC, quantificada via HPLC-DAD e $C_{inj.pr.}$ é a carga de injeção usado na escala preparativa. A equação 4 mostra os valores reais recuperados de cada ácido anacárdico via HPLC em escala preparativa, expresso em porcentagem (%),

$$(\%)R_{pr.} = \frac{m_{obt.pr.}}{m_{teo.pr.}} \cdot 100 \quad (4)$$

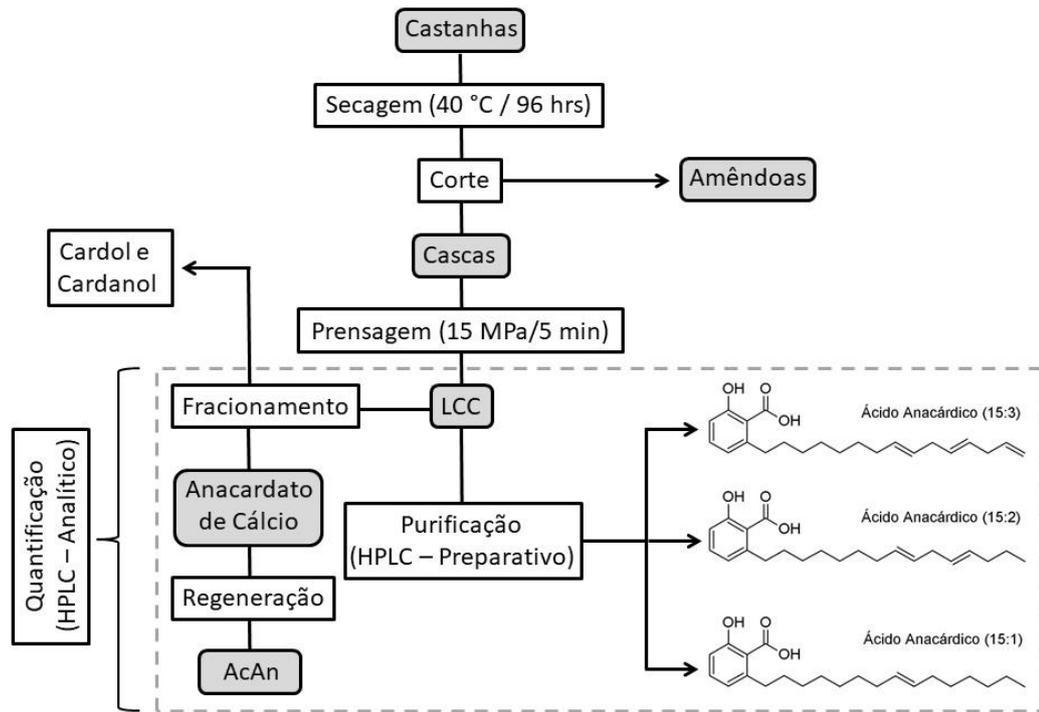
Onde, $(\%)R_{pr.}$ é a recuperação de cada ácido anacárdico obtido em escala preparativa, expresso em porcentagem (%), $m_{obt.pr.}$ é a massa obtida de cada ácido anacárdico em escala preparativa e $m_{teo.pr.}$ é a massa teórica de cada ácido anacárdico em escala preparativa.

O rendimento total para cada ácido anacárdico foi calculado de acordo com o somatório das massas e médias obtidas das corridas cromatográficas (n=9) em escala preparativa, expressos em $g \cdot Kg^{-1}$ com seus respectivos desvios.

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

A Figura 6 mostra o fluxograma geral do processo, desde a obtenção das cascas para extração do LCC até o isolamento dos diferentes ácidos anacárdicos.

Figura 6 - Fluxograma geral do processo.



(Fonte: Autor)

3.2.5 Consumo de Solvente e Produtividade

As equações utilizadas para os cálculos de consumo de solvente e produtividade foram adaptadas a partir de trabalhos relatados na literatura (Silva Jr *et al.*, 2006; Arcanjo *et al.*, 2015). Foram realizados os cálculos para os dois sistemas cromatográficos utilizados (analítico e preparativo), em função dos seguintes parâmetros, vazão volumétrica, tempo de corrida, percentual do solvente orgânico e massa dos produtos obtidos, expresso em mL.mg⁻¹, assim como mostram as equações 5 e 6:

$$CS_{an.} = \frac{t_{cor} \cdot Q_{an.} \cdot \%_{sol}}{m_{AcAn}} \quad (5)$$

$$CS_{pr.} = \frac{t_{cor} \cdot Q_{pr.} \cdot \%_{sol}}{m'_{AcAn}} \quad (6)$$

Onde, $CS_{an.}$ é o consumo de solvente em escala analítica, expresso em mL.mg⁻¹ de ácidos anacárdicos, t_{cor} é o tempo da corrida cromatográfica, $Q_{an.}$ é a vazão volumétrica (mL.min⁻¹)

do sistema analítico, $\%_{sol}$ é o percentual de solvente orgânico presente na fase móvel e m_{AcAn} a massa de ácidos anacárdicos presente em 1 mg de LCC. Na equação 6, $CS_{pr.}$ é o consumo de solvente em escala preparativa, expresso em mL.mg⁻¹ de ácidos anacárdicos, t_{cor} é o tempo da corrida cromatográfica, $Q_{pr.}$ é a vazão volumétrica (mL.min⁻¹) do sistema preparativo, $\%_{sol}$ é o percentual de solvente orgânico presente na fase móvel e m'_{AcAn} a massa de ácidos anacárdicos presente em 50 mg de LCC.

A produtividade dos sistemas analítico e preparativo, expressa em g.h⁻¹ por g de adsorvente, foi calculada levando em consideração parâmetros específicos de cada sistema, vazões volumétricas, volumes de adsorvente das colunas utilizadas e a concentração dos produtos obtidos, assim como mostram as equações 7 e 8.

$$P_{an.} = \frac{Q_{an.} \cdot C_{AcAn}}{V_{(an.)}} \quad (7)$$

$$P_{pr.} = \frac{Q_{pr.} \cdot C'_{AcAn}}{V_{(pr.)}} \quad (8)$$

Onde, $P_{an.}$ é a produtividade para o sistema analítico, $Q_{an.}$ é a vazão volumétrica (mL.min⁻¹) do sistema analítico, C_{AcAn} é a concentração de ácidos anacárdicos presentes em uma solução de LCC (1 mg.mL⁻¹), $V_{(an.)}$ é o volume de adsorvente da coluna analítica. Na equação 8 temos que, $P_{pr.}$ é a produtividade para o sistema preparativo, $Q_{pr.}$ é a vazão volumétrica (mL.min⁻¹) do sistema preparativo, C'_{AcAn} é a concentração de ácidos anacárdicos presentes em uma solução de LCC (50 mg.mL⁻¹), $V_{(pr.)}$ é o volume de adsorvente da coluna preparativa.

3.2.6 Confirmação estrutural dos ácidos anacárdicos via UPLC-QTOF-MS^E

Para que a quantificação relativa dos três AcAn (15:3), (15:2) e (15:1), fosse realizada com exatidão no sistema HPLC-DAD, foi realizada análise em um sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) para realizar a identificação inequívoca dos três diferentes ácidos anacárdicos presentes no LCC. As separações foram realizadas em coluna C₁₈ (Waters Acquity UPLC C₁₈, 150 mm x 2,1 mm, 1,7 μm). O perfil dos metabólitos contidos no LCC foram obtidos inicialmente por um gradiente exploratório, sendo a fase móvel composta por: H₂O (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 do LCC 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 °C, temperatura de solvatação 330 °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 (microcanaís tensão da placa) – detector a 1900 V.

A identificação estrutural dos metabólitos presentes no LCC 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 de AcAn foram realizadas com os dados de MS/MS, por meio do estabelecimento de padrões de fragmentação (Yuliana *et al.*, 2013; Bouslimani *et al.*, 2014).

3.3 Validação do Método Analítico

O protocolo de validação foi estabelecido de acordo com o método proposto pela ANVISA (Brasil, 2003), baseado em valores definidos para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (intra-dia e inter-dia), repetibilidade, limites de detecção e quantificação. Com o objetivo de monitorar e quantificar os ácidos anacárdicos presentes em amostras de LCC, de maneira precisa e eficiente, levando em consideração todos os parâmetros avaliados.

3.3.1 Seletividade

Esse parâmetro é capaz de determinar de maneira inequívoca a presença de um analito e outras substâncias que possam interferir na determinação. A determinação da pureza dos picos de ácidos anacárdicos foi avaliada através da comparação dos espectros de ultravioleta obtidos dos picos cromatográficos, por meio do software Shimadzu LC Solution. Picos com espectros de ultravioleta (254 a 400 nm) com similaridade maior que 95% foram considerados puros.

3.3.2 Linearidade

Para determinação da linearidade foi usado o coeficiente de correlação (r^2) obtido pela regressão linear da concentração de ácido anacárdico (15:3). Para a construção da curva analítica foi usado um padrão externo, com sete diferentes pontos de concentração (50; 100; 200; 400; 600; 800 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata. Gerando uma equação da reta

$$y = ax + b \quad (9)$$

Onde, y é a variável dependente; x a variável independente, a o coeficiente angular e b o coeficiente linear.

Foram aplicados os testes estatísticos t-Student e teste F a um nível de confiança de 95 %, para dar maior confiabilidade aos dados da calibração da curva e regressão linear. Os cálculos estatísticos foram conduzidos através das equações 10,11 e 12.

$$S^2a = \frac{S^2y \cdot n}{D} \quad (10)$$

$$S^2b = \frac{S^2y \cdot \sum(x^2i)}{D} \quad (11)$$

$$S^2y = \frac{\sum(d^2i)}{n - 2} \quad (12)$$

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

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

A partir dos cálculos dos diferentes desvios padrões, foram calculados os valores de $t_{\text{calc}(a)}$, $t_{\text{calc}(b)}$ e F_{calc} de acordo com as equações 13,14 e 15

$$t_{\text{calc}(a)} = \frac{|1 - a|}{S_a} \quad (13)$$

$$t_{\text{calc}(b)} = \frac{|b|}{S_b} \quad (14)$$

$$F_{\text{calc}} = \frac{\frac{S_y}{1}}{\frac{\sum d_i}{3}} \quad (15)$$

Se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ o parâmetro é significativo a um nível de confiança de 95 % e deve permanecer na equação da curva, porém se $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ o parâmetro não possui significância e pode ser excluído da equação da curva sem nenhum prejuízo. Todavia, o mesmo procedimento é aplicado ao teste F, onde valores de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ são valores

significativos a um nível de 95 % de confiança para regressão linear, valores de $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ não possuem significância, portanto não existe relação linear entre os eixos x e y , independente de valores para o coeficiente de correlação (r^2).

3.3.3 Precisão

Para determinação da precisão do método usando padrão externo, foi avaliada a reprodutividade dos 7 diferentes pontos de concentração (50; 100; 200; 400; 600; 800 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A repetibilidade dos pontos intra-dia foi determinada em triplicata e suas médias analisadas no mesmo dia e posteriormente analisada em dias diferentes (inter-dia). A precisão foi obtida em função dos desvios padrões e coeficientes de variação, de acordo com as equações 16 e 17,

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (16)$$

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (17)$$

Onde S é o desvio padrão, n o número de medidas, x_i é a diferença entre cada valor medido e \bar{x} é a média.

3.3.4 Repetibilidade

A repetibilidade expressa o quão fiel é o método nas mesmas condições operacionais em curto intervalo de tempo. Um ponto intermediário da curva de calibração, de concentração conhecida, foi injetado 10 vezes seguido. Os tempos de retenção e as áreas obtidas foram usados para calcular o desvio padrão e os coeficientes de variação.

3.3.5 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados de acordo com a concentração mínima para cada parâmetro, seguindo as equações 18 e 19. Portanto, para o limite de detecção (LOD) foi estabelecida uma concentração que consegue diferenciar um analito de um ruído. Para o limite de quantificação (LOQ) a concentração mínima estabelecida é aquela capaz de quantificar com exatidão e fidelidade um analito.

$$LOD = 3,3 \cdot \frac{S_b}{a} \quad (18)$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{S_b}{a} \quad (19)$$

Onde, S_b é o desvio padrão da interseção do eixo Y e a é o coeficiente angular da curva da calibração (Ribani *et al.*, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fracionamento do LCC

A partir do fracionamento do LCC foi obtida uma porção purificada, livre de cardol e cardanol, em seguida injetada em HPLC-DAD analítico, para um controle de qualidade do processo. Os resultados do fracionamento do LCC e obtenção dos ácidos anacárdicos purificados por meio de processos químicos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de rendimento e grau de pureza do extrato de ácido anacárdico proveniente de 100 g de LCC, expressos em (%). Rendimento da obtenção de anacardato de cálcio expresso em (g).

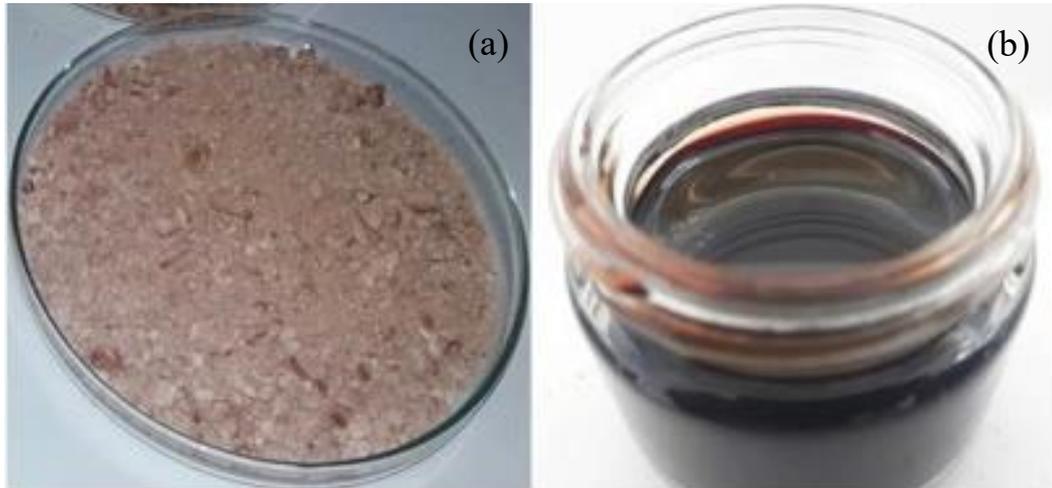
Produto	V_{referência}[*] (g)	Massa (g)	Rendimento (%)	Pureza (%)
Anacardato	-----	95,74	-----	-----
Ext. AcAn	69,46 g	42,59	61,31	97,12

*Quantidade teórica quantificada via HPLC-DAD de ácidos anacárdicos para 100 g de LCC.

(Fonte: Autor)

Foi obtido uma quantidade de 95,74 g de anacardato de cálcio (Figura 7.a), valores esses, próximos aos obtidos por Paramashivappa *et al.* (2001) na etapa de obtenção do anacardato (110 g). No entanto, o valor do rendimento do extrato bruto de ácidos anacárdicos (Figura 7.b) foi de 42,59 g. Essa quantidade quando comparada ao valor teórico quantificado via HPLC-DAD está abaixo do valor de referência, pois o valor teórico quantificado dos ácidos anacárdicos presentes 100 g LCC é de 69,47 g. Essa perda no rendimento pode ser explicada pelo fato de que durante a separação líquido – líquido, ocorreu a formação de uma fase emulsionada com a solução ácida contendo uma parcela residual de ácidos anacárdicos.

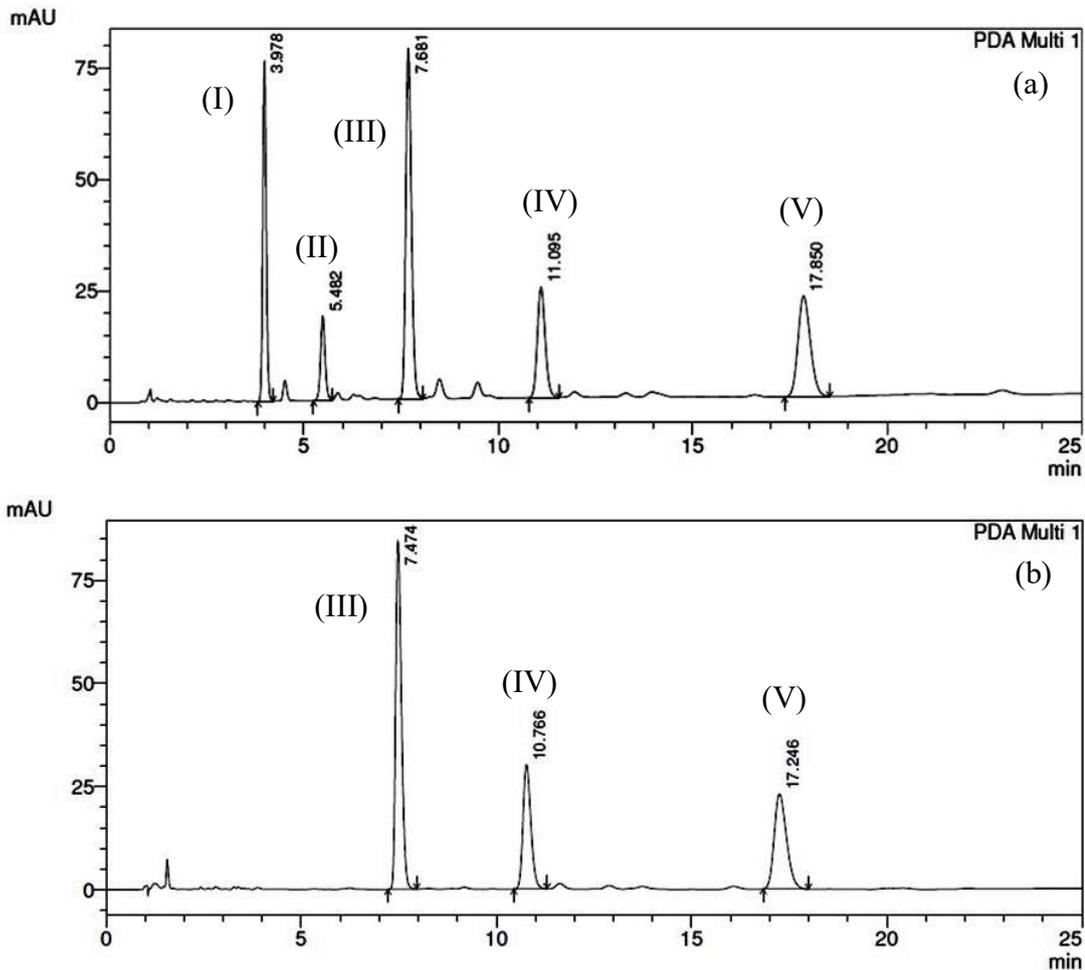
Figura 7 - (a) Anacardato de cálcio proveniente da primeira etapa de fracionamento do LCC. (b) Fração de LCC purificada contendo apenas ácidos anacárdicos.



(Fonte:Autor)

De acordo com a Figura 8, o processo de extração dos ácidos anacárdicos se mostrou eficaz, obtendo um grau de pureza de 97,1 %. O perfil cromatográfico (Figura 8.b) obtido da amostra proveniente do fracionamento, não apresentou nenhum pico representativo de interferentes como cardol e cardanol que estão presentes no LCC sem fracionamento (Figura 8.a). O mesmo resultado também foi observado por Trevisan *et al.* (2006) durante a extração dos AcAn em LCC.

Figura 8 - (a) Perfil cromatográfico (analítico) de amostra de LCC (1 mg.mL^{-1}) contendo (I) cardol, (II) cardanol, ácidos anacárdicos (III) trieno, (IV) dieno e (V) monoeno, monitorado à 280nm. (b) Perfil cromatográfico (analítico) da fração purificada de LCC (1 mg.mL^{-1}) contendo apenas ácidos anacárdicos (III) trieno, (IV) dieno e (V) monoeno, monitorado à 280nm.

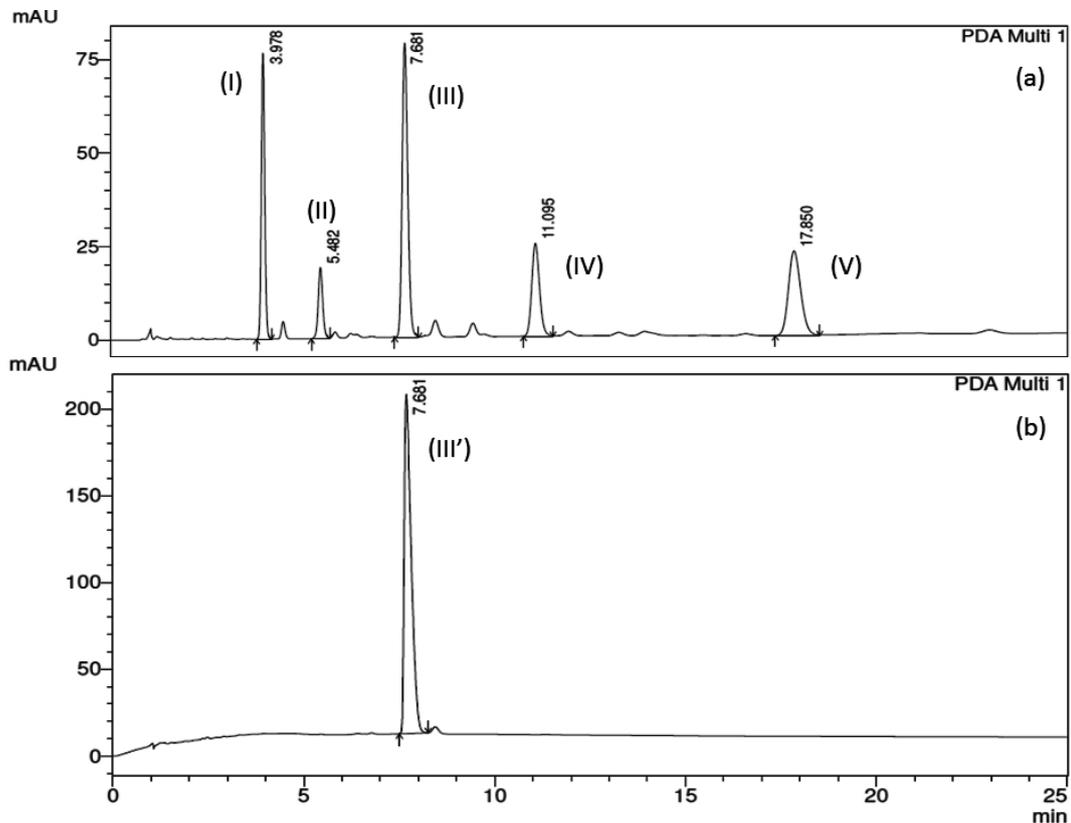


(Fonte: Autor)

4.2 Desenvolvimento do Método Cromatográfico

O método cromatográfico foi otimizado e validado a partir das condições de separação previamente estabelecido por Paramashivappa *et al.* (2001), a fim de avaliar os alquil fenóis presentes no LCC. Os picos foram identificados usando os tempos de retenção e espectros UV dos compostos encontrados, e comparados aos obtidos anteriormente por Paramashivappa *et al.* (2001) no LCC. A Figura 9.a mostra o perfil cromatográfico onde foram identificados os picos de I a V, cardol (I), cardanol (II), ácidos anacárdicos trieno (III), dieno (IV) e monoeno (V).

Figura 9 - (a) Perfil cromatográfico (analítico) do LCC ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em HPLC – DAD, contendo (I) cardol, (II) cardanol, e AcAn (III) trieno (15:3), (IV) dieno (15:2) e (V) monoeno (15:1). (b) Perfil cromatográfico (analítico) do padrão externo AcAn (III') trieno (15:3) ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em HPLC – DAD, monitorado em 280 nm.

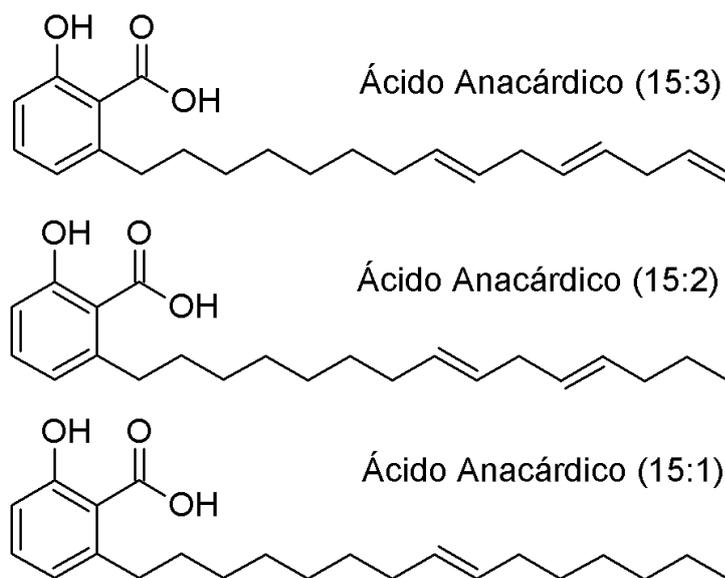


(Fonte: Autor)

O desenvolvimento do método cromatográfico foi satisfatório e eficaz em monitorar e quantificar os ácidos anacárdicos presentes no LCC utilizando um padrão externo do ácido anacárdico trieno (III') (Figura 9.b) assim como encontrados em outros trabalhos de validação de método cromatográfico (Lu *et al.*, 2014; Klimczak e Gliszczynska-Świągło, 2015; Padilha *et al.*, 2017).

A quantificação dos ácidos anacárdicos foi conduzida de maneira indireta devido à similaridade estrutural entre os compostos quantificados e o padrão utilizado, e os espectros de ultravioleta obtidos dos AcAn analisados tem comportamento e absorção máxima igual ao padrão externo usado (Wang *et al.*, 2015). A similaridade das bandas de absorção analisadas pelo espectro ultravioleta se dá em função dos cromóforos estruturais dos ácidos anacárdicos serem o mesmo, diferenciando-se apenas na quantidade de insaturações presentes na cadeia lateral do composto (Figura 10).

Figura 10 - Estrutura molecular dos ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1).



(Fonte: Autor)

4.3 Validação do Método Analítico

A validação do método foi conduzida baseada nos princípios e parâmetros fornecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 2003) e os resultados obtidos para seletividade, linearidade, precisão, repetibilidade, limites de quantificação e detecção foram de acordo com as normas exigidas para cada parâmetro citado. Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados mostram uma metodologia desenvolvida em HPLC-DAD, capaz de monitorar e quantificar os ácidos anacárdicos contidos no LCC.

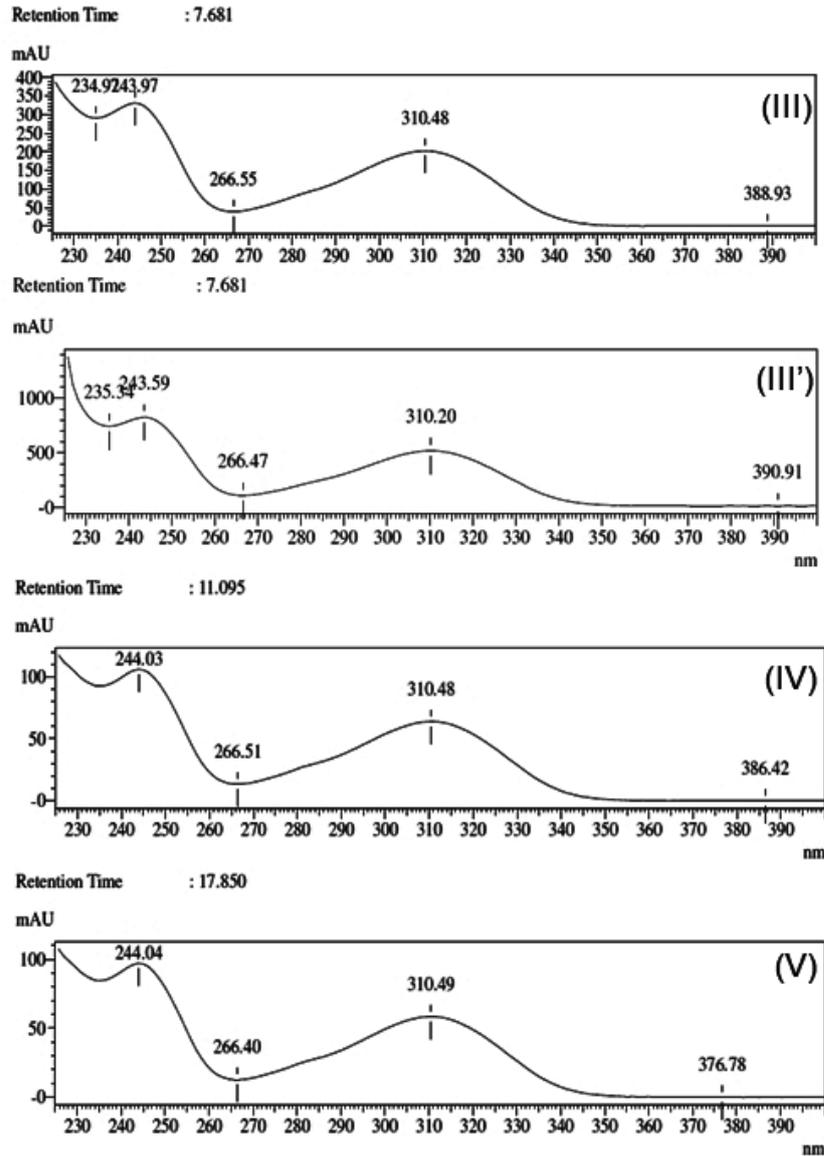
O método validado se destaca por apresentar menores custos quando comparado a outros sistemas que utilizam cromatografia líquida, como por exemplo, cromatografia líquida acoplada a um espectrometro de massas. O método apresentou níveis de detecção adequados às concentrações dos ácidos anacárdicos de interesse, fornecendo dados confiáveis, precisos, de maneira rápida e de uso adequado às necessidades laboratoriais (Snyder *et al.*, 2012a).

4.3.1 Seletividade

A pureza do pico dos Ácidos Anacárdicos foi confirmada pelo espectro UV (Figura 11) e os índices de pureza dos picos (Tabela 3). A seletividade foi avaliada analisando

o espectro UV do padrão externo usado. Ao longo de todo cromatograma nenhum interferente foi detectado.

Figura 11 - Espectro de ultravioleta dos ácidos anacárdicos trieno (15:3) (III), dieno (15:2) (IV), monoeno (15:1) (V) e padrão externo (III').



(Fonte: Autor)

Tabela 3 - Índice de pureza dos picos dos ácidos anacárdicos presentes no LCC.

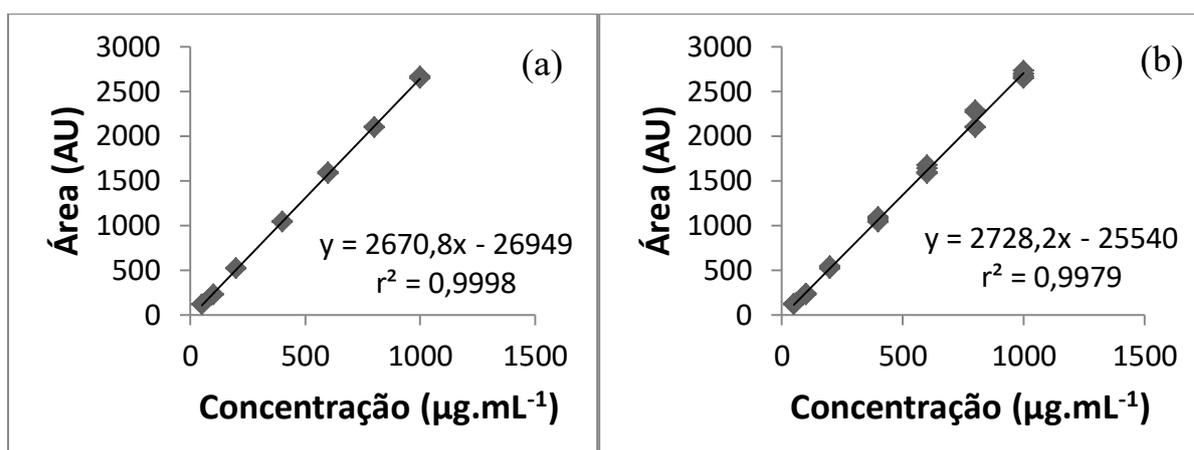
Ácido Anacárdico	T. Retenção (min)	Índice de pureza (%)
(15:3)	7,681	99,98
(15:2)	11,095	99,98
(15:1)	17,850	99,97

(Fonte: Autor)

4.3.2 Linearidade

A curva analítica de calibração foi construída com 7 diferentes pontos de concentração (50 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de ácido anacárdico (15:3). A Figura 12a. e 12b. mostram a boa linearidade dentro do intervalo analisado, que foi confirmada pelo valor do coeficiente de correlação da equação da curva analítica do padrão intra-dia ($y = 2670,8x - 26949$; $r^2 = 0,9998$) e inter-dia ($y = 2728,2x - 25540$; $r^2 = 0,9979$). O coeficiente de correlação encontrado está de acordo com o valor aceito ($r^2 \geq 0,99$) (Brasil, 2003).

Figura 12 - (a) Curva de calibração do padrão externo, (n=6) intra-dia; (b) Curva de calibração do padrão externo, (n=9) inter-dia.



(Fonte: Autor)

A Tabela 4 mostra a significância do teste t-Student para os parâmetros de calibração da curva, bem como a significância do teste F para regressão linear, conferindo maior confiabilidade aos dados da curva. O teste t-Student e teste F foram analisados a um nível de confiança de 95 %.

O teste t-Student foi significativo para os coeficientes linear e angular, evidenciando influencia direta de que cada um deles nos valores de quantificação, assim ambos devem permanecer na equação da reta. O resultado do teste F também foi significativo, mostrando que existe uma relação linear entre os eixos X e Y, assim dando mais confiança aos dados gerados pela curva (Danzer e Currie, 1998; Chui *et al.*, 2001; Guedes, 2014).

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 %.

Padrão	Coeficiente Angular				Curva Analítica
	a	S _a	t _{cal}	t _{tab}	
Ácido Anacárdico (15:3)	2670,8	9,88	270,03	2,179	Significativo
	Coeficiente Linear				y = 2670,8x - 26949
	b	S _b	t _{cal}	t _{tab}	
	-26949	5558,48	4,85	2,179	Significativo
	F _{calculado}		F _{tabelado}		Teste F
	72973,58		2,69		Significativo

(Fonte: Autor)

4.3.3 Precisão

A precisão foi avaliada de acordo com os coeficientes de variação (CV) e coeficiente de correlação (r^2) obtidos através dos valores dos tempos de retenção do padrão e dos dados das curvas obtidas nos ensaios inter-dia e intra-dia. Na Tabela 5 observam-se os valores de coeficientes de correlação e os coeficientes de variação das injeções intra-dia e inter-dia de $r^2 = 0,9998$; CV = 0,60 % e $r^2 = 0,9979$; CV = 0,67 %, respectivamente. Todos os coeficientes de variação estão de acordo com os valores estabelecidos pela ANVISA (Brasil, 2003).

Tabela 5 - Resultados estatísticos para precisão e repetibilidade, intra-dia (n=6) e inter-dia (n=9), obtidos através dos pontos da curva de calibração, expressos em valores para coeficiente de variação (CV) e coeficiente de correlação (r^2).

Padrão	Intra-dia (n=6)		Inter-dia (n=9)	
	r^2	CV (%)	r^2	CV (%)
Ácido Anacárdico (15:3)	0,9998	0,60	0,9979	0,67
	Repetibilidade			
	Tempo de Retenção		Área	
	CV (%)		CV (%)	
	1,02		0,24	

(Fonte: Autor)

4.3.4 Repetibilidade

Os valores dos coeficientes de variação (CV) obtidos a partir das 10 injeções consecutivas do mesmo ponto com concentração conhecida podem ser observados na Tabela 5. Para os parâmetros, tempo de retenção e área do pico, foram obtidos CV de 1,02 e 0,24 %, respectivamente. No entanto, não há uma regra geral para os desvios, porém desvios com valores próximos de 1 % no tempo de retenção e área são mais aceitáveis (Fabre, 1999; Lanças, 2004).

4.3.5 Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

O LOD para conseguir diferenciar um analito de um ruído e o LOQ para conseguir quantificar um ácido anacárdico com fidelidade e exatidão, foram 19,8 e 60,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os valores foram obtidos através da regressão linear da curva de calibração, seguindo as equações 19 e 20 e mostraram que o método tem alta sensibilidade para determinação de AcAn.

4.4 Identificação dos Compostos

A confirmação da identificação dos ácidos anacárdicos foi realizada por espectrometria de massas, através das massas moleculares e seus respectivos fragmentos. A Tabela 6 mostra identificação dos três diferentes AcAn que foram quantificados nas amostras analisadas. Foram confirmados os AcAn trieno, dieno e monoeno, de acordo com suas massas e respectivos fragmentos de ionização.

O ácido anacárdico (15:3) foi identificado a partir de sua massa $[M-H]^-$ 341,2094 Da, e um íon fragmento de m/z 297,2222 Da; o ácido anacárdico (15:2) foi identificado com $[M-H]^-$ 343,2245 Da e um íon fragmento de m/z 299,2355 Da; o ácido anacárdico (15:1) foi identificado mediante uma massa $[M-H]^-$ 345,2409 Da, juntamente com um íon de fragmentação de m/z 301,2534 Da. Os espectros de massa apresentam uma fragmentação de $[M-H-44]^-$ comum aos 3 compostos identificados. Essa massa é derivada da perda de uma molécula de CO_2 proveniente da clivagem do grupo carboxílico (Jerz *et al.*, 2012; ErşAn *et al.*, 2016).

Tabela 6 - Identificação dos diferentes ácidos anacárdicos trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1), presentes no LCC, via UPLC-QTOF-MS^E.

Nº	Nome do Composto	$[M-H]^-$ Experimental	$[M-H]^-$ Teórica	Erro (ppm)	Fragmento (m/z)	Formula Molecular
1	AcAn (15:3)	341,2094	341,2117	2,3	297,2222	$C_{22}H_{30}O_3$
2	AcAn (15:2)	343,2245	343,2273	8,2	299,2355	$C_{22}H_{32}O_3$
3	AcAn (15:1)	345,2409	345,2430	6,1	301,2534	$C_{22}H_{34}O_3$

(Fonte: Autor)

4.5 Aplicação em Amostra Real

As cinco amostras de LCC (LCC_701, LCC_704, LCC_709, LCC_710 e LCC_715) provenientes do Programa de Melhoramento Genético do Cajueiro, foram quantificadas de forma indireta com base no padrão externo (Figura 9.b) para quantificar os ácidos anacárdicos presentes nas amostras mediante a confirmação dos respectivos espectros

ultravioletas (Figura 11) e espectrometria de massas (Tabela 6). A Tabela 7 mostra os valores encontrados para os ácidos anacárdicos contidos nas cinco diferentes amostras de LCC analisadas. A amostra LCC 701 apresentou 351,2, 133,7 e 221,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para AcAn trieno, dieno e monoeno, respectivamente. O LCC 704 com concentrações de 326,5, 273,2 e 255,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para os AcAn trieno, dieno e monoeno, respectivamente. A amostra LCC 709 apresentou para os mesmo AcAn trieno, dieno e monoeno, uma concentração de 299,9, 231,6 e 203,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente. A quantificação dos AcAn na amostra LCC 710 foi de 308,0, 141,4 e 198,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para AcAn trieno (15:3), dieno (15:2) e monoeno (15:1), respectivamente. As concentrações encontradas na amostra LCC 715 foram de 311,2, 221,6 e 187,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para os AcAn trieno, dieno e monoeno, respectivamente.

Tabela 7 - Teores dos Ácidos Anacárdicos presentes em diferentes amostras de LCC ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), expressos em μg de ácido anacárdico por mg de LCC.

Amostras	Ácidos Anacárdicos \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)			
	(15:3)	(15:2)	(15:1)	(Σ)
LCC_701	351,2 \pm 0,80	133,7 \pm 0,74	221,1 \pm 2,73	706,0
LCC_704	326,5 \pm 0,22	273,2 \pm 1,70	255,0 \pm 1,77	854,7
LCC_709	299,9 \pm 2,73	231,6 \pm 2,39	203,9 \pm 2,60	735,4
LCC_710	308,0 \pm 1,23	141,4 \pm 2,25	198,8 \pm 2,94	648,2
LCC_715	311,2 \pm 3,34	221,6 \pm 2,27	187,2 \pm 3,97	720,0

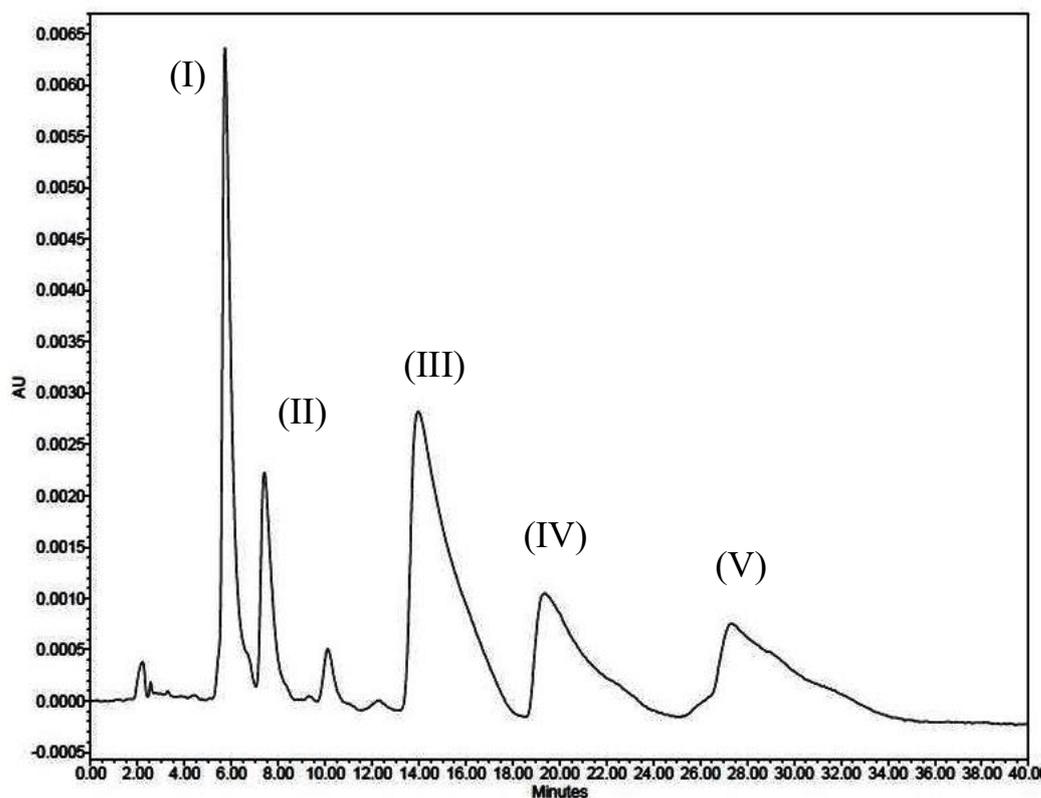
(Fonte: Autor)

A concentração do AcAn trieno (15:3) encontrada em todas as cinco amostras avaliadas foi maior quando comparados ao AcAn dieno (15:2) e monoeno (15:1), esse resultado também foi observado por Trevisan *et al.* (2006) em estudo com LCC, tanto quantitativamente como qualitativamente. Por outro lado, Jerz *et al.* (2012) obtiveram resultados similares apenas para os AcAn trieno e dieno, com concentrações de 318 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ e 221 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente. Contudo, o AcAn majoritário encontrado por Jerz *et al.* (2012) foi o AcAn saturado (15:0) com concentrações de 416 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, essa variação dos teores e da composição química de cada LCC pode ser justificada devido as cascas das castanhas serem provenientes de diferentes variedades de caju.

4.6 Isolamento dos Ácidos Anacárdicos

O perfil cromatográfico da separação dos compostos presentes na injeção de 50 mg de LCC, executada por HPLC em escala preparativa está exposto na Figura 13, onde estão descritos: (I) cardol, (II) cardanol, (III) AcAn trieno, (IV) AcAn dieno e (V) AcAn monoeno. A ordem de eluição dos compostos isolados ocorre em função da polaridade de cada um deles. No caso dos AcAn's o fator preponderante para ordem de eluição é o grau de insaturação presente na cadeia lateral.

Figura 13 - Perfil cromatográfico (HPLC-UV/VIS preparativo) de LCC (50 mg.mL⁻¹). (I) cardol, (II) cardanol, (III) AcAn trieno, (IV) AcAn dieno e (V) AcAn monoeno.



(Fonte: Autor)

O isolamento das 9 corridas (n=9) foi obtido de maneira satisfatória e, os ácidos anacárdicos foram isolados nos seguintes tempos de retenção, de 13,2 min a 17,9 min, de 18,6 min a 24,2 min e de 26,6 min a 34,5 min, para os ácidos anacárdicos trieno, dieno e monoeno, respectivamente.

Os valores do rendimento em massa de cada composto isolado, expressos em g.Kg^{-1} estão apresentados na Tabela 8. As médias das massas obtidas foram 311,6, 146,0 e 191,4 g.Kg^{-1} , para AcAn trieno, dieno e monoeno, respectivamente. A mesma quantidade também foi obtida para os mesmos AcAn isolados em escala preparativa por Lloyd *et al.* (1980), onde os valores calculados foram 358,3, 144,1 e 202,0 g.Kg^{-1} em 80 minutos de corrida, o que ocasiona em uma baixa produtividade do produto. No entanto, valores obtidos neste trabalho foram maiores que os reportados por Kubo *et al.* (1986). Contudo, o somatório das massas obtidas dos três diferentes ácidos anacárdicos está de acordo com os valores reportados na literatura (Paramashivappa *et al.*, 2001; Trevisan *et al.*, 2006; Gandhi *et al.*, 2013). O rendimento do processo quando relacionado a fatores econômicos mostra uma grande viabilidade se comparado aos produtos disponíveis no mercado na atualidade.

Tabela 8 - Resultados do isolamento dos diferentes ácidos anacárdicos presente em LCC, via HPLC-UV/VIS em escala preparativa.

Composto	Rendimento (g.Kg^{-1})	Recuperação (%)	Pureza (%)
AcAn (15:3)	311,60 ± 37,20	94,02 ± 0,61	99,11 ± 0,49
AcAn (15:2)	146,00 ± 17,40	87,63 ± 3,83	95,56 ± 1,23
AcAn (15:1)	191,40 ± 33,20	97,35 ± 0,57	92,59 ± 0,71

(Fonte: Autor)

Os dados para recuperação de cada ácido anacárdico em função dos valores teóricos previamente quantificados no LCC via HPLC-DAD, expressos em percentual, estão expostos na Tabela 8. Os valores percentuais obtidos foram 94,02, 87,63 e 97,35 %, para trieno, dieno e monoeno, respectivamente. Os resultados obtidos estão próximos aos resultados de Lloyd *et al.* (1980), que conseguiu recuperar pouco mais que 96 % dos AcAn's. No entanto, existe uma carência muito grande relacionada a trabalhos envolvendo isolamento de ácidos anacárdicos em escala preparativa, assim diminuindo a amplitude das discussões do processo aplicado nesse trabalho. Com isso, os resultados obtidos neste mostram relevância em fornecer dados atuais provenientes de métodos otimizados.

A pureza de cada composto está exposta na Tabela 8 que contém os seguintes resultados, 99,11, 95,56 e 92,59 %, para trieno, dieno e monoeno, respectivamente, os resultados obtidos quando comparados aos valores reportados na literatura são considerados satisfatórios, pois os percentuais de pureza em isolamento de compostos fenólicos em alguns trabalhos publicados variam entre 75 e 99 % (Fang *et al.*, 2017; Shaheen *et al.*, 2017).

Outros ácidos anacárdicos de cadeias carbônicas diferentes de 15 carbonos formam a pequena parcela de interferentes presentes nos compostos isolados. Ácidos anacárdicos com cadeias contendo 12, 13 e 17 carbonos são comumente encontrados em LCC (Česla *et al.*, 2006; Jerz *et al.*, 2012), e podem ser co-eluídos devido à polaridade ser semelhante (Yuliana *et al.*, 2014), devido a variações no tamanho da cadeia e grau de insaturação.

4.7 Consumo de Solvente e Produtividade

De acordo com os dados dos sistemas e parâmetros utilizados, os resultados obtidos a partir das equações 5 a 8, fornecem valores para consumo de solvente e produtividade em função da concentração de ácidos anacárdicos, calculadas para os dois sistemas, analítico e preparativo.

Os resultados expostos na Tabela 9 mostram o consumo de solvente orgânico para o HPLC analítico, que foi de 60,52 mL.mg⁻¹ de ácidos anacárdicos. Em contra partida, os valores obtidos no consumo de solvente para o HPLC preparativo foram de 11,09 mL.mg⁻¹ de ácidos anacárdicos, mostrando um decréscimo bastante acentuado. O consumo de solvente na escala preparativa é aproximadamente seis vezes menor quando comparado à escala analítica, sendo uma excelente opção para isolamento de compostos em larga escala (Snyder *et al.*, 2012b).

A quantidade de solvente consumida na escala preparativa é uma quantidade razoável, quando comparada a outros resultados que giram em torno de uma faixa bastante ampla (0,5 até 17 mL.mg⁻¹), de acordo com cada molécula alvo isolada (Miller *et al.*, 2003; Grill *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2006).

Os valores de produtividade (Tabela 9) também se mostram mais satisfatórios na escala preparativa quando comparados à escala analítica, onde os resultados foram 0,06 e 1,63 g.h⁻¹ por g de adsorvente para o sistema analítico e preparativo, respectivamente. No entanto, não existem trabalhos na literatura atual que relatem valores para os parâmetros de produtividade e consumo de solvente em sistema de HPLC analítico e preparativo, assim esses resultados são de grande relevância para futuros estudos. Por outro lado, estudos cromatográficos em sistemas contracorrente comumente analisam esses parâmetros, porém os valores são mais elevados, pois esses sistemas potencializam a transferência de massa e por consequente aumentam a produtividade do processo (Biressi *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2014).

Tabela 9 - Valores para consumo de solvente orgânico e produtividade, para sistemas de HPLC em escala analítica e preparativa.

Sistema HPLC	Consumo de Solvente (mL.mg⁻¹)	Produtividade (g.h⁻¹/g adsorvente)
Analítico	60,52	0,06
Preparativo	11,09	1,63

(Fonte: Autor)

5 CONCLUSÃO

O isolamento dos ácidos anacárdicos trieno, dieno e monoeno, foi obtido de maneira satisfatória com excelente grau de pureza, ótimos percentuais de recuperação e alto rendimento, gerando assim um banco de padrões analíticos para estudos futuros. Além do mais, o processo de isolamento dos ácidos anacárdicos resultou em um baixo consumo de solvente e uma produtividade bastante atrativa.

A ampliação de escala executada conseguiu reproduzir um perfil cromatográfico bastante similar ao perfil analítico, com a mesma ordem de eluição dos compostos, resultando assim em método viável para o isolamento dos ácidos anacárdicos, de modo rápido e menos agressivo quanto ao solvente utilizado.

O fracionamento do LCC foi eficiente no que diz respeito ao rendimento e grau de pureza da fração obtida contendo apenas ácidos anacárdicos, uma vez que foram eliminados os compostos cardol e cardanol, sem deixar qualquer resíduo dos mesmos na fração final.

O método cromatográfico desenvolvido em HPLC analítico foi eficaz em monitorar e quantificar todos os alquil fenóis presentes nas amostras de LCC, de maneira mais rápida e menos onerosa quando comparado a outros métodos reportados na literatura. A validação do método foi alcançada com adequação de todos os parâmetros analisados de acordo com a agência de normatização nacional em cromatografia, conferindo ao método uma garantia de qualidade na geração dos dados e nos produtos gerados durante o processo.

REFERÊNCIAS

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**, v. 33, n. 2, p. 139-151, 2015. ISSN 0263-6174.

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**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2009. ISSN 1995-0764.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013. ISSN 0260-8774.

BAE, Y.; MOON, J.; LEE, C. Effects of feed concentration on the startup and performance behaviors of simulated moving bed chromatography. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 2, p. 777-790, 2006. ISSN 0888-5885.

BALASUBRAMANYAM, K. et al. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19134-19140, 2003. ISSN 0021-9258.

BALLAL, N. V. et al. Evaluation of antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* leaves against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **International Journal of Clinical Dentistry**, v. 6, n. 2, 2013. ISSN 1939-5833.

BARCELOS, G. R. M. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1468-1475, 2007. ISSN 0887-2333.

BARCELOS, G. R. M. et al. Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew stem bark methanolic extract in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 268-273, 2007. ISSN 0378-8741.

BIRESSI, G. et al. Design and optimisation of a simulated moving bed unit: role of deviations from equilibrium theory. **Journal of Chromatography A**, v. 876, n. 1, p. 3-15, 2000. ISSN 0021-9673.

BOUSLIMANI, A. et al. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 718-729, 2014.

BRASIL. **Guia para Validação de Métodos Analíticos**. Resolução RE. nº 899, de 29 de maio de 2003 2003.

CARVALHO, A. L. N. et al. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011. ISSN 0378-8741.

CAVALCANTE, A. A. M. et al. Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, n. 5, p. 360-369, 2003. ISSN 1098-2280.

CAVALCANTE, J. M. **Extração de alquilfenóis da casca, fenólicos da película e efeito do processamento industrial sobre constituintes da amêndoa de castanha de caju**. 2014.

ČESLA, P. et al. Characterization of anacardic acids by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, n. 1, p. 253-259, 2006. ISSN 0021-9673.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999. ISSN 0893-8512.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998. ISSN 1365-3075.

DE OLIVEIRA, V. M. et al. New treatments for Chagas disease and the relationship between chagasic patients and cancers. **Cancer Research Journal**, v. 2, n. 6-1, p. 11-29, 2014.

ERŞAN, S. et al. 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**, v. 64, n. 26, p. 5334-5344, 2016. ISSN 0021-8561.

FABRE, H. Validation des méthodes d'électrophorèse capillaire appliquées à l'analyse des composés pharmaceutiques. **Analisis**, v. 27, n. 2, p. 155-155, 1999. ISSN 0365-4877.

FANG, Y. et al. Isolation and purification of phenolic acids from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds by pH-zone-refining counter-current chromatography and their antioxidant activity evaluation. **Food Analytical Methods**, p. 1-9, 2017. ISSN 1936-9751.

FAO. **Statistic Division**. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2014.

FARIA, A. et al. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. **Food Chemistry**, v. 149, p. 190-196, 2014. ISSN 0308-8146.

FARIAS, D. F. et al. Insecticidal action of sodium anacardate from brazilian cashew nut shell liquid against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 3, p. 386-389, 2009.

FENG, W. et al. Retention behaviour of proteins under conditions of column overload in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 729, n. 1-2, p. 43-47, 1996. ISSN 0021-9673.

GANDHI, T.; PATEL, M.; DHOLAKIYA, B. Studies on effect of various solvents on extraction of cashew nut shell liquid (CNSL) and isolation of major phenolic constituents from extracted CNSL. **Journal of Natural Products Plant Resource**, v. 2, n. 1, p. 135, 2012.

GANDHI, T. S.; DHOLAKIYA, B. Z.; PATEL, M. R. Extraction protocol for isolation of CNSL by using protic and aprotic solvents from cashew nut and study of their physico-chemical parameter. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 15, n. 4, p. 24-27, 2013. ISSN 1899-4741.

GARCÍA PALACIOS, J. et al. Optimization and analysis of possible column arrangements for multicomponent separations by preparative chromatography. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 24, p. 11148-11157, 2009. ISSN 0888-5885.

GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GUIOCHON, G. Theory of optimization of the experimental conditions of preparative elution chromatography: optimization of the column efficiency. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 1368-1382, 1989. ISSN 0003-2700.

GRILL, C. M.; MILLER, L.; YAN, T. Q. Resolution of a racemic pharmaceutical intermediate: A comparison of preparative HPLC, steady state recycling, and simulated moving bed. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1, p. 101-108, 2004. ISSN 0021-9673.

GUEDES, J. A. C. **Validação de método analítico empregando QuEChERS e CG-EM para determinação multirresíduo de agrotóxico em goiaba**. 2014.

GUILLARME, D. et al. 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**, v. 66, n. 3, p. 475-482, 2007. ISSN 0939-6411.

HEMSHEKHAR, M. et al. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012. ISSN 1742-7843.

HOLLANDS, A. et al. Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates neutrophil extracellular trap production and bactericidal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 27, p. 13964-13973, 2016. ISSN 0021-9258.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative chromatography techniques**. Second. Springer, 1998. ISBN 3540624597.

HUANG, H. et al. Anacardic acid induces cell apoptosis associated with induction of ATF4-dependent endoplasmic reticulum stress. **Toxicology Letters**, v. 228, n. 3, p. 170-178, 2014. ISSN 0378-4274.

IZZO, P. T.; DAWSON, C. R. Cashew nut shell liquid. VI. The olefinic nature of anacardic acid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 1039-1047, 1949. ISSN 0022-3263.

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**, v. 760, n. 1, p. 25-39, 1997. ISSN 0021-9673.

JERZ, G. 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: (Ed.). **Recent Advances in the Analysis of Food and Flavors**: ACS Publications, 2012. p.145-165. ISBN 1947-5918.

JIN, G. et al. Practical method for the definition of chromatographic peak parameters in preparative liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 20, p. 3917-3926, 2016. ISSN 1615-9314.

KARL, V. G.; NOVOTNY, E. E. **Art of preparing derivatives of anacardic material**: Google Patents 1943.

KLIMCZAK, I.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. **Food Chemistry**, v. 175, p. 100-105, 2015. ISSN 0308-8146.

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**, v. 112, n. 2, p. 237-242, 2007. ISSN 0378-8741.

KREMERS, R. E. **Process of treating cashew nut shell liquid**: Google Patents 1947.

KUBO, I.; KOMATSU, S.; OCHI, M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 970-973, 1986. ISSN 0021-8561.

KUBO, I. et al. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 555-562, 2005. ISSN 0308-8146.

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

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

LEGUT, M. et al. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines—in vitro studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 653, 2014.

LEMES, L. F. N. et al. Cardanol-derived AChE inhibitors: towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 687-700, 2016. ISSN 0223-5234.

LLOYD, H. A.; DENNY, C.; KRISHNA, G. A simple liquid chromatographic method for analysis and isolation of the unsaturated components of anacardic acid. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 3, n. 10, p. 1497-1504, 1980. ISSN 0148-3919.

LU, W. et al. Simultaneous HPLC quantification of five major triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran oil using a single reference standard. **Food Chemistry**, v. 148, p. 329-334, 2014. ISSN 0308-8146.

MASUOKA, N.; SHIMIZU, K.; KUBO, I. Antioxidant activity of anacardic acids. In: (Ed.). **Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants**: Cabi, Nosworthy Way, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE UK, 2013. p.137-147.

MENDES, N. M. et al. Atividade moluscicida da mistura de ácidos 6-n-alkil salicílicos (ácido anacárdico) e dos seus complexos com cobre (II) e chumbo (II). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 217-224, 1990. ISSN 0037-8682.

MILLER, L. et al. Batch and simulated moving bed chromatographic resolution of a pharmaceutical racemate. **Journal of Chromatography A**, v. 1006, n. 1, p. 267-280, 2003. ISSN 0021-9673.

MORAIS, S. M. et al. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 1, p. 31, 2017.

MOTA, M. L.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 3, p. 289-300, 1985.

NETO, L. et al. Characterization of cytotoxic activity of compounds derived from anacardic acid, cardanol and cardol in oral squamous cell carcinoma. 2014, BioMed Central. p.P30.

OHLSON, R. Modern processing of rapeseed. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 3, p. 195-198, 1992. ISSN 0003-021X.

PADILHA, C. V. S. et al. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: method validation and characterization of commercial products of the new brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106-115, 2017. ISSN 0308-8146.

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

PEREIRA, J. M. et al. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 19, p. 8889-8895, 2008. ISSN 0968-0896.

PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P. Ensaios preliminares com *Anacardium occidentale* como moluscicida. **Ciencia e Cultura**, v. 26, n. 1, p. 1054-1057, 1974.

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

PIGHINELLI, A. L. M. T. et al. Otimização da prensagem de grãos de girassol e sua caracterização. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 2009. ISSN 1415-4366.

REUBER, M. A. **New technologies for processing *Crambe abyssinica***. 1992.

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

RODRIGUES, F. H. A. et al. Comparison between physico-chemical properties of the technical cashew nut shell liquid (CNSL) and those natural extracted from solvent and pressing. **Polímeros**, v. 21, n. 2, p. 156-160, 2011. ISSN 0104-1428.

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

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

SHAHEEN, N. et al. Isolation of four phenolic compounds from *Mangifera indica* L. flowers by using normal phase combined with elution extrusion two-step high speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1046, p. 211-217, 2017. ISSN 1570-0232.

SHOBHA, S. V.; RAVINDRANATH, B. Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of the phenolic lipids of cashew nut (*Anacardium occidentale*) shells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2214-2217, 1991. ISSN 0021-8561.

SILVA JR, I. J. et al. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1027-1037, 2006.

SINGH, K. K. et al. Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 2, p. 165-170, 2002. ISSN 0003-021X.

SLETZINGER, M.; DAWSON, C. R. Cashew nut shell liquid. IV. On the heterogeneous nature of the monophenolic fraction of cashew nut shell liquid. The structure of the mono-olefinic component. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 670-679, 1949. ISSN 0022-3263.

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

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

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

SOUSA, Â.; SOUSA, F.; QUEIROZ, J. A. Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 22, p. 3046-3058, 2012. ISSN 1615-9314.

SULLIVAN, J. T. et al. Anacardic acid: molluscicide in cashew nut shell liquid. **Planta Medica**, v. 44, n. 03, p. 175-177, 1982. ISSN 0032-0943.

TONG, S.; ITO, Y.; MA, Y. Enantioseparation of DL-tryptophan by spiral tube assembly counter-current chromatography and evaluation of mass transfer rate for enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 1374, p. 77-84, 2014. ISSN 0021-9673.

TOYOMIZU, M. et al. Uncoupling effect of anacardic acids from cashew nut shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. **Life Sciences**, v. 66, n. 3, p. 229-234, 1999. ISSN 0024-3205.

TOYOMIZU, M. et al. Reducing effect of dietary anacardic acid on body fat pads in rats. **Animal Science Journal**, v. 74, n. 6, p. 499-504, 2003. ISSN 1740-0929.

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

TYMAN, J. H. P. Long-chain phenols. Part III. Identification of the components of a novel phenolic fraction in *Anacardium occidentale* (cashew nut-shell liquid) and synthesis of the saturated member. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1639-1647, 1973.

TYMAN, J. H. P. et al. The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium occidentale*). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 66, n. 4, p. 553-557, 1989. ISSN 0003-021X.

VITOLLO, M. Purificação de produtos biotecnológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 120-120, 2005. ISSN 1516-9332.

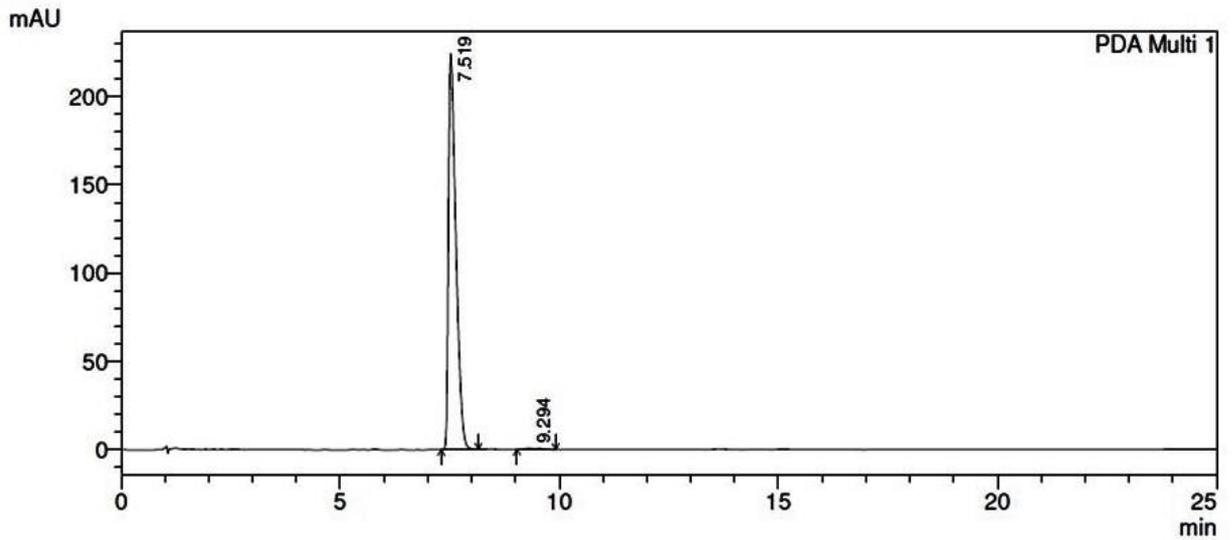
WANG, R. et al. HPLC quantification of all five ginkgolic acid derivatives in ginkgo biloba extracts using 13: 0 ginkgolic acid as a single marker compound. **Planta Medica**, v. 81, n. 01, p. 71-78, 2015. ISSN 0032-0943.

YULIANA, M. et al. Separation and purification of cardol, cardanol and anacardic acid from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut-shell liquid using a simple two-step column chromatography. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 5, p. 2187-2193, 2014. ISSN 1876-1070.

YULIANA, M.; TRAN-THI, N. Y.; JU, Y. Effect of extraction methods on characteristic and composition of Indonesian cashew nut shell liquid. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 230-236, 2012. ISSN 0926-6690.

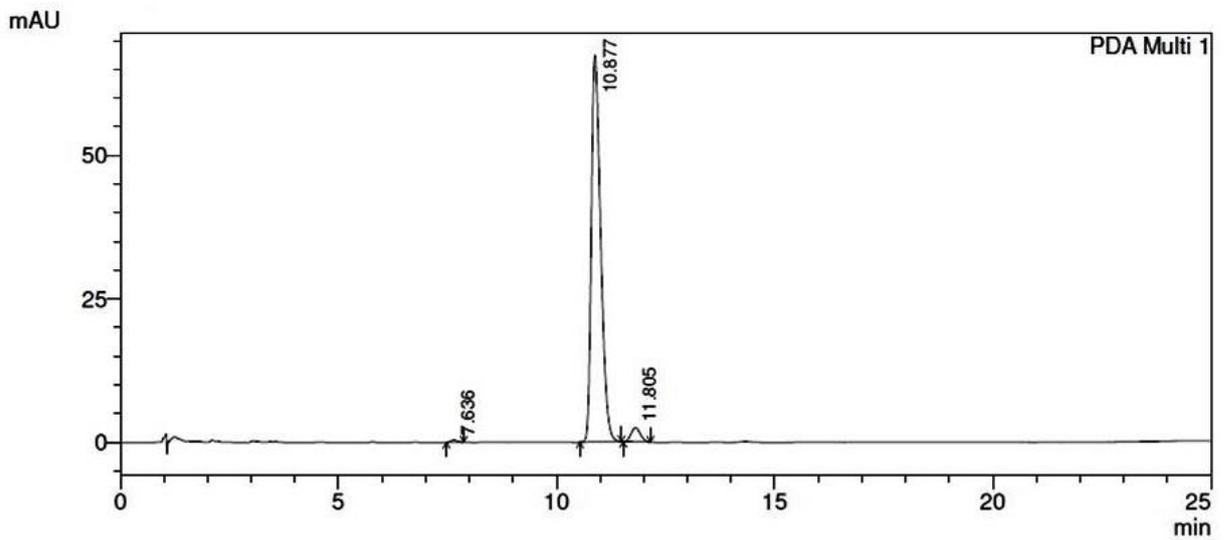
YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry reviews**, v. 12, n. 2, p. 293-304, 2013. ISSN 1568-7767.

APÊNDICE A - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ISOLAMENTO DO ÁCIDO ANACÁRDICO TRIENO (15:3) EM HPLC-DAD, MONITORADO EM 280 NM.



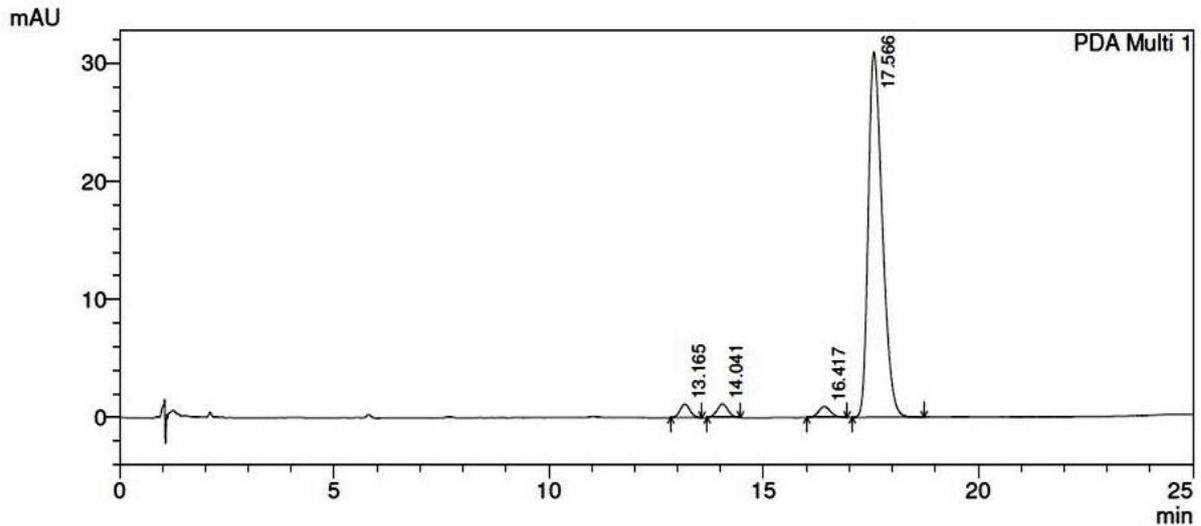
(Fonte: Autor)

APÊNDICE B - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ISOLAMENTO DO ÁCIDO ANACÁRDICO DIENO (15:2) EM HPLC-DAD, MONITORADO EM 280 NM.



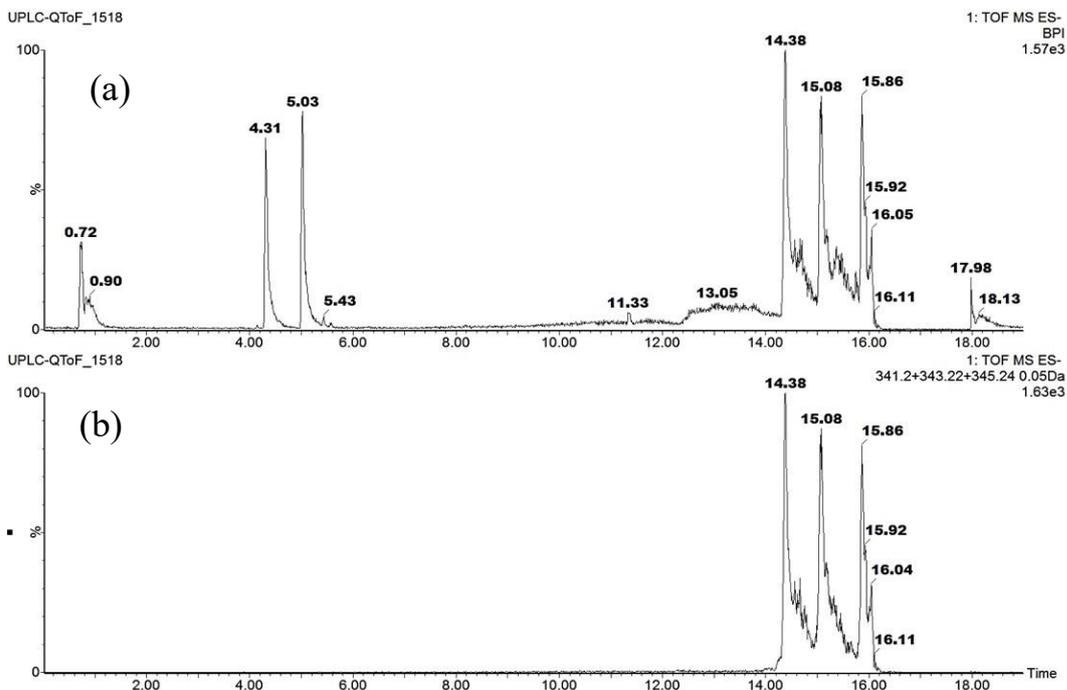
(Fonte: Autor)

APÊNDICE C - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO ISOLAMENTO DO ÁCIDO ANACÁRDICO MONOENO (15:1) EM HPLC-DAD, MONITORADO EM 280 NM.



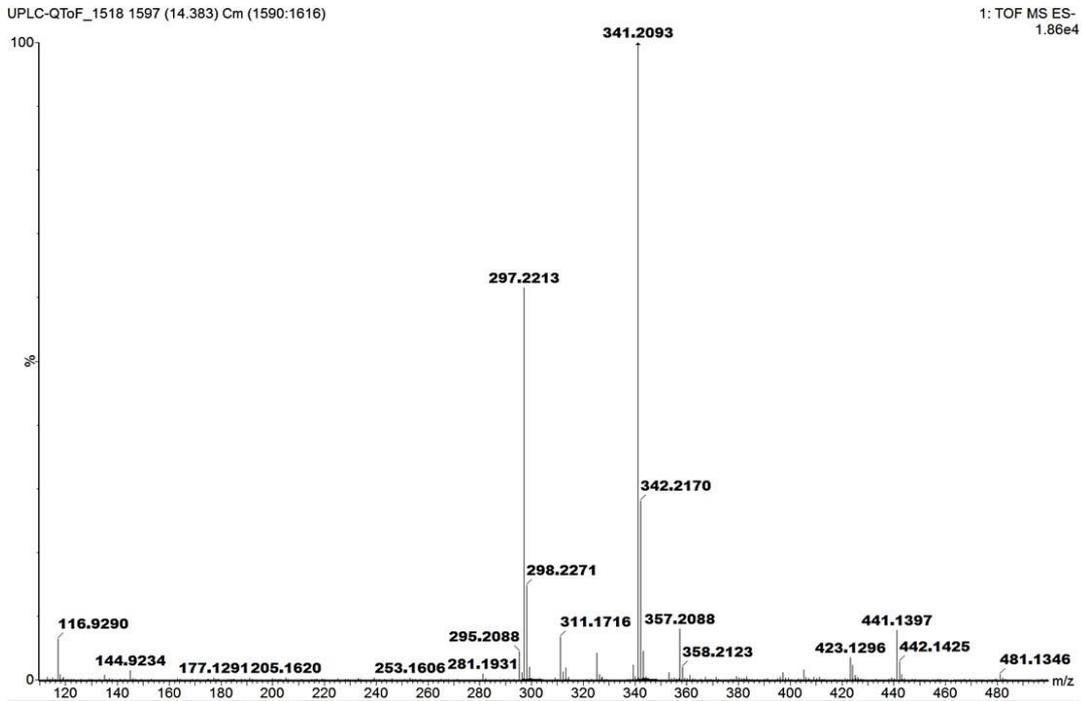
(Fonte: Autor)

APÊNDICE D - (A) PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AMOSTRA REAL DE LCC EM UPLC-QTOF-MS^E, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO. (B) PERFIL CROMATOGRÁFICO EXTRAÍDO POR MASSAS DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS DA AMOSTRA REAL DE LCC EM UPLC-QTOF-MS^E, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.



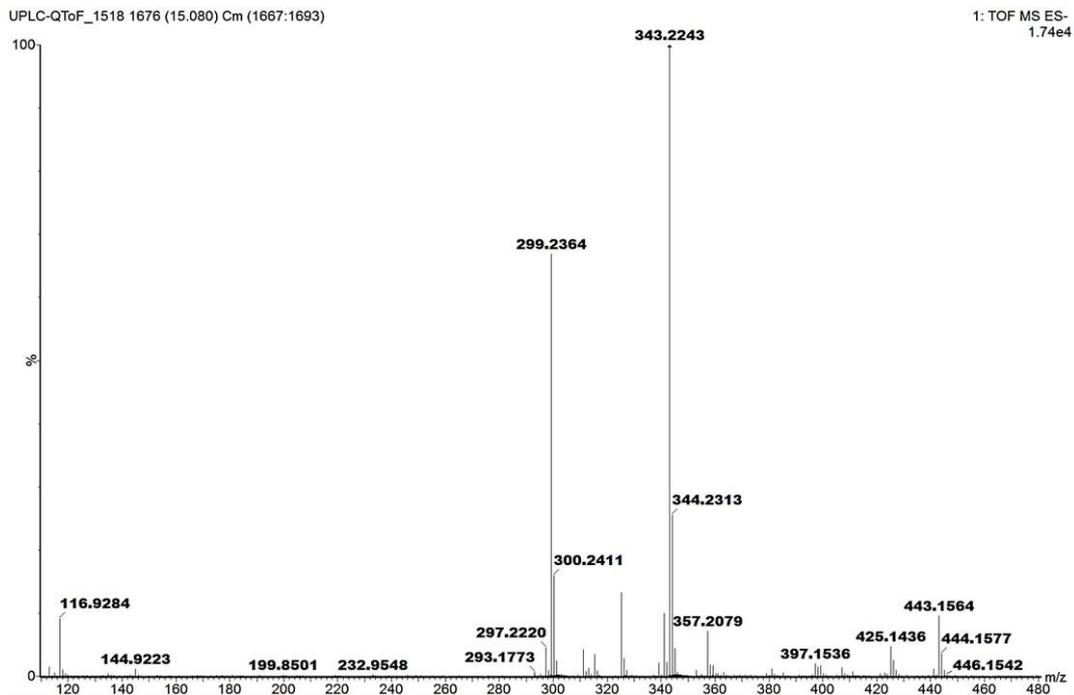
(Fonte: Autor)

**APÊNDICE E - ESPECTRO DE MASSAS DO ÁCIDO ANACÁRDICO TRIENO (15:3)
ANALISADO NA AMOSTRA REAL, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.**



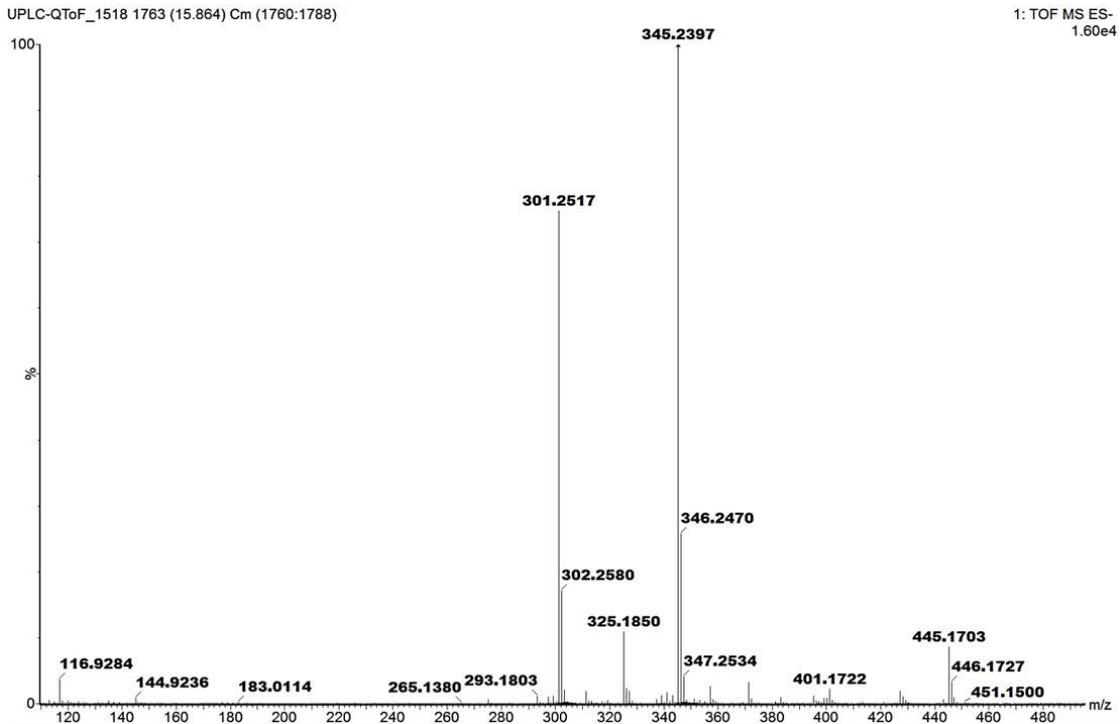
(Fonte: Autor)

**APÊNDICE F - ESPECTRO DE MASSAS DO ÁCIDO ANACÁRDICO DIENO (15:2)
ANALISADO NA AMOSTRA REAL, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.**



(Fonte: Autor)

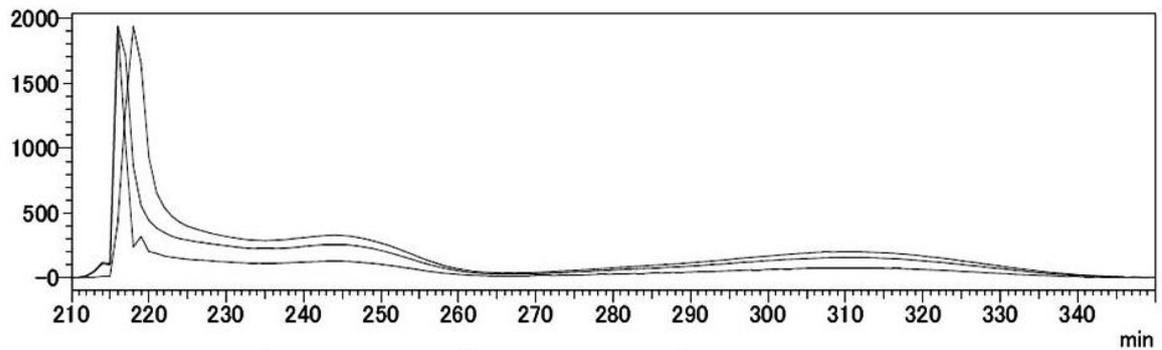
APÊNDICE G - ESPECTRO DE MASSAS DO ÁCIDO ANACÁRDICO MONOENO (15:1) ANALISADO NA AMOSTRA REAL, EM MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVO.



(Fonte: Autor)

APÊNDICE H - PUREZA DO PICO CROMATOGRÁFICO DO ÁCIDO ANACÁRDICO TRIENO (15:3) ISOLADO A PARTIR DE AMOSTRA DE LCC.

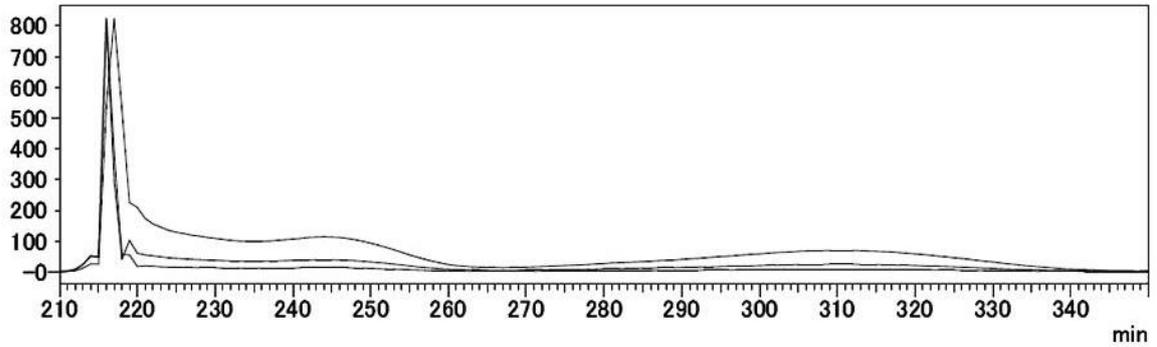
Retention Time : 7.681



(Fonte: Autor)

APÊNDICE I - PUREZA DO PICO CROMATOGRÁFICO DO ÁCIDO ANACÁRDICO DIENO (15:2) ISOLADO A PARTIR DE AMOSTRA DE LCC.

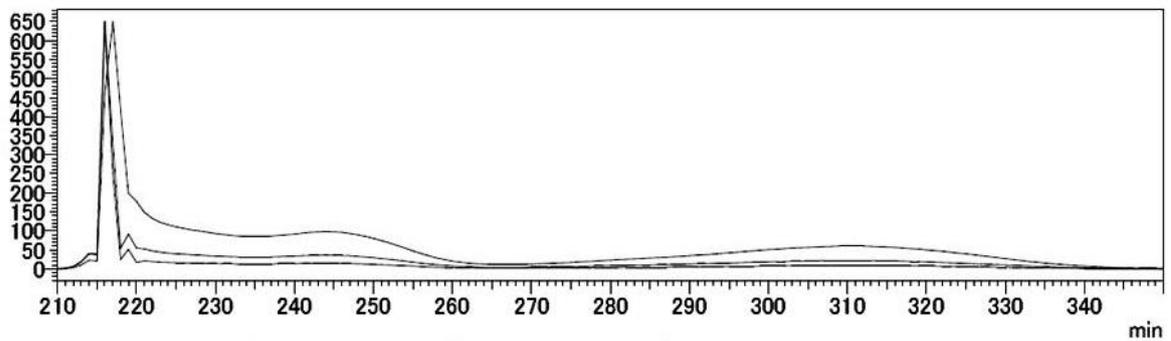
Retention Time : 11.095



(Fonte: Autor)

APÊNDICE J - PUREZA DO PICO CROMATOGRÁFICO DO ÁCIDO ANACÁRDICO MONOENO (15:1) ISOLADO A PARTIR DE AMOSTRA DE LCC.

Retention Time : 17.850



(Fonte: Autor)