



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**PRISCILLA DA COSTA CUNHA ALVES**

**ESTUDOS METABOLÔMICOS ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA DE FOLHAS DE  
CAJUEIRO (*Anacardium Occidentale L.*) À ANTRACNOSE**

**FORTALEZA**

**2016**

PRISCILLA DA COSTA CUNHA ALVES

ESTUDOS METABOLÔMICOS ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA DE FOLHAS DE  
CAJUEIRO (*Anacardium Occidentale L.*) À ANTRACNOSE

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Orientador didático-pedagógico:  
Profa. Dra. Gisele Simone Lopes

Orientador Profissional:  
Dr. Guilherme Julião Zocolo

FORTALEZA

2016

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)

---

- C98e Cunha Alves, Priscilla da Costa.  
Estudos metabolômicos associados a resistência de folhas de cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*) à antracnose / Priscilla da Costa Cunha Alves. – 2017.  
68 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes.  
Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.
1. Cajueiro. 2. Antracnose. 3. Metabólitos secundários. 4. Quimiometria. 5. UPLC-QTOF-MS(MS). I. Título.

CDD 540

---

PRISCILLA DA COSTA CUNHA ALVES

ESTUDOS METABOLÔMICOS ASSOCIADOS A RESISTÊNCIA DE FOLHAS DE  
CAJUEIRO (*Anacardium Occidentale L.*) À ANTRACNOSE

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Aprovada em: 17/01/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Gisele Simone Lopes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Orientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical - EMBRAPA

---

Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva  
Embrapa Agroindústria Tropical - EMBRAPA

Dedico este trabalho a minha família que são  
as pessoas mais importantes da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar ao meu lado e por me dar forças para vencer os obstáculos e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais e familiares, que contribuíram e contribuem para o meu crescimento, agradeço por todo o amor, carinho e suporte sem os quais eu não teria conseguido.

À minha tia Tânia, agradeço imensamente por me acompanhar em cada passo da minha vida, por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial, por ter dedicado um amor de mãe a mim.

Ao meu namorado Sady, por toda paciência, compreensão, carinho e amor, e por me ajudar muitas vezes a achar soluções quando elas pareciam não aparecer. Agradeço por sempre estar ao meu lado e ser um verdadeiro amigo e companheiro.

À Prof. Dra. Gisele Simone Lopes pela orientação, conselhos e por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu iniciasse minhas atividades acadêmicas como bolsista de iniciação científica.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo, pela orientação e por toda a contribuição dada no desenvolvimento desta monografia. Por ter sido além de um excelente orientador, um ótimo amigo.

À Embrapa, pela oportunidade de estágio, pela receptividade e disponibilização da infraestrutura e recursos necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Luis Augusto Serrano por ter fornecido o material vegetal necessário para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMPQN), por toda a ajuda concedida para concretização deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realizar a minha graduação no curso de bacharelado em química e à todos os professores por me proporcionarem o conhecimento necessário para minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de iniciação científica e de graduação sanduíche (CsF).

À todos que mesmo não estando citados foram de extrema importância para minha formação acadêmica, e que me ajudaram a chegar até aqui e concluir este trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

## RESUMO

O cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*) apresenta grande importância econômica para o Nordeste brasileiro, principalmente pelo uso de seu pseudofruto na indústria alimentícia e a comercialização das amêndoas de castanha de caju no mercado mundial de nozes. A evolução tecnológica da exploração, visando o aumento da produtividade, tem propiciado mudanças no impacto de algumas doenças, sobretudo com a introdução de clones resistentes a pragas. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, é a principal doença que afeta a cultura do cajueiro no Brasil, sendo responsável por um número elevado de perdas na produção. A resistência de alguns clones de cajueiro anão-precoce já foi observada e relatada. Entretanto, o mecanismo e, ou, os metabólitos associados a essa resistência ainda não foram identificados. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo metabolômico de quatro clones: CCP 76, BRS 226, BRS 189 e BRS 265 visando o mapeamento de seu metabolismo secundário e, através de análises quimiométricas, encontrar os biomarcadores que possam ser responsáveis pelo comportamento das plantas frente ao ataque da Antracnose. Para isso foi realizada a extração assistida por ultrassom em solução aquosa 70% etanol dos compostos polares das folhas. Os extratos obtidos foram analisados em modo negativo por UPLC-ESI-QTOF-MS(MS). O método utilizado proporcionou a tentativa de identificação de 40 metabólitos secundários. A Análise de Componentes Principais (PCA) mostrou a separação das amostras em grupos distintos indicando que os clones analisados apresentam diferentes perfis metabólicos. Através da Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA) foi possível identificar flavonóides, em sua maioria derivados de quercetinas, e galotaninos como os principais biomarcadores de resistência à antracnose.

*Palavras chaves:* Cajueiro, antracnose, metabólitos secundários, quimiometria, UPLC-QTOF-MS(MS).

## ABSTRACT

The cashew tree (*Anacardium Occidentale L.*) presents great economic importance to the Northeast of Brazil, mainly because of the use of its pseudocarp in the food industry and the commercialization of the cashew nuts in the world nut market. The technological evolution of the crop aimed to increase the productivity, however it has led to changes in the impact of some diseases, especially with the introduction of resistant plants. The Anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* is the main disease that affects the cashew tree in Brazil and it is responsible for several production losses. The resistance of some clones of dwarf cashew has already been observed and described. However, the mechanism and/or the metabolites associated to this resistance have not been identified yet. Therefore, the present research has the purpose of developing a metabolomics study of four clones (CCP 76, BRS 226, BRS 189 and BRS 265) aiming to observe the secondary metabolism and, through chemometrics, identify the biomarkers responsible to the behavior of the plants against the attack by anthracnose. Ultrasonic assisted extraction was performed using an aqueous solution of 70% ethanol to extract the polar compounds of the leaves. The extracts obtained were analyzed in negative mode by UPLC-ESI-QTOF-MS(MS). The proposed method provided the putative identification of forty secondary metabolites. Principal Component Analysis (PCA) showed the separation of the samples into distinct groups indicating that the clones analyzed have different metabolic profiles. The Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis (OPLS-DA) allowed the identification of flavonoids, mainly quercetin derivatives, and gallotannins as the biomarkers of the resistant plants.

**Keywords:** Cashew tree, anthracnose, secondary metabolites, chemometrics, UPLC-QTOF-MS(MS) .

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Tipos de cajueiro: cajueiro comum (1) e cajueiro anão-precoce (2) .....	19
Figura 2	– Partes da planta <i>Anacardium Occidentale L.</i> .....	20
Figura 3	– Propriedades medicinais do cajueiro .....	21
Figura 4	– Sintomas da antracnose no cajueiro .....	25
Figura 5	– Fórmulas estruturais dos metabólitos secundários da tabela 4 .....	28
Figura 6	– Esquema básico de um espectrômetro de massas .....	30
Figura 7	– Esquema da fonte de ionização por electrospray .....	31
Figura 8	– Representação geométrica da diferença entre os modelos PLS-DA e OPLS-DA.	35
Figura 9	– Procedimento de extração .....	39
Figura 10	– Equipamento UPLC-QTOF-MS(MS) .....	40
Figura 11	– Cromatogramas dos diferentes clones de cajueiro anão-precoce analisados .....	43
Figura 12	– Cromatograma do padrão de procianidina tipo B .....	49
Figura 13	– Principais fragmentações de procianidina tipo B dimérica .....	50
Figura 14	– Cromatograma do padrão de catequina .....	51
Figura 15	– Gráfico em 3D da Análise de Componentes Principais para as amostras de <i>Anacardium Occidentale L.</i> analisados por UPLC-QTOF-MS(MS) .....	55
Figura 16	– Gráfico de <i>scores</i> (esquerda) e <i>S-plot</i> da OPLS-DA (direita) para os extratos de folhas da <i>Anacardium Occidentale L.</i> : (A) C1 vs C4 (doente); (B) C2 vs C4 (doente); (C) C3 vs C4 (doente) e (D) C4 (saudável) vs C4 (doente).....	56
Figura 17	– Variação média dos discriminantes do extrato etanólico do clone 1 em relação ao clone 4 (doente) .....	58

Figura 18	–	Varição média dos discriminantes do extrato etanólico do clone 2 em relação ao clone 4 (doente) .....	59
Figura 19	–	Varição média dos discriminantes do extrato etanólico do clone 3 em relação ao clone 4 (doente) .....	60
Figura 20	–	Varição média dos discriminantes do extrato etanólico do clone 4 (saudável) em relação ao clone 4 (doente) .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Produção de castanha de caju nos estados brasileiros em 2015 .....	22
Tabela 2	– Desempenho do agronegócio do caju no Brasil .....	23
Tabela 3	– Principais características de clones de cajueiro anão-precoce cultivados em Pacajus (CE) .....	26
Tabela 4	– Metabólitos secundários identificados na espécie <i>Anacardium Occidentale L.</i> .....	27
Tabela 5	– Padrões analíticos utilizados .....	38
Tabela 6	– Constituintes identificados ou tentativamente identificados em folhas de <i>Anacardium Occidentale L.</i> provenientes das plantas saudáveis (C1, C2, C3, C4_SA) e da planta doente (C4_CA) .....	43
Tabela 7	– Potenciais biomarcadores da planta doente do clone 4 .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESI	Ionização por electrospray
MS	Espectroscopia de Massas
<i>m/z</i>	Razão massa sobre carga
OLPS-DA	Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados Parciais
PCA	Análise de Componentes Principais
QTOF	Quadrupolo – tempo de voo
UPLC	Cromatografia líquida de ultra pressão
LCC	Líquido da Castanha de Caju
C1	Clone 1 de cajueiro anão-precoce: CCP 76
C2	Clone 2 de cajueiro anão-precoce: BRS 226
C3	Clone 3 de cajueiro anão-precoce: BRS 189
C4_CA	Planta doente do clone 4 de cajueiro anão-precoce: BRS 265
C4_SA	Planta saudável do clone 4 de cajueiro anão-precoce: BRS 265
RDA	Retro Diels Alder

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	Cajueiro .....	18
2.1.1	Origem e distribuição geográfica .....	18
2.1.2	Aspectos botânicos .....	18
2.1.3	Cajueiro anão-precoce .....	20
2.1.4	Propriedades terapêuticas .....	21
2.1.5	Importância econômica .....	22
2.2	Antracnose .....	24
2.2.1	A antracnose e os clones de cajueiros anão-precoce .....	25
2.3	Metabólitos secundários .....	26
2.3.1	Metabolômica .....	29
2.4	Métodos analíticos .....	29
2.4.1	UPLC-QTOF-MS(MS) .....	29
2.4.2	Quimiometria .....	32
2.4.2.1	<i>Análise de Componentes Principais</i> .....	32
2.4.2.2	<i>Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)</i> .....	33
2.4.2.2.1	<i>Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA)</i> .....	34
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
3.1	Geral .....	36
3.2	Específicos .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	Materiais .....	37
4.1.1	Instrumentos .....	37
4.1.2	Reagentes e padrões .....	37
4.2	Preparo das amostras .....	38
4.2.1	Procedimento experimental .....	38
4.3	Experimentos em UPLC-QTOF-MS(MS) .....	39
4.3.1	Condições de análise .....	40
4.3.2	Condições do massas de alta resolução - QTOF .....	40

4.4	Identificação molecular .....	40
4.5	Análise quimiométrica .....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
5.1	Perfil químico via UPLC-QTOF-MS(MS) dos extratos de folhas da <i>Anacardium Occidentale L.</i> .....	42
5.2	Análise dos Componentes Principais dos extratos de folhas de <i>Anacardium Occidentale L.</i> .....	54
5.3	Análise OPLS-DA dos extratos de folhas de <i>Anacardium Occidentale L.</i> .....	55
5.3.1	Biomarcadores de resistência .....	57
5.3.2	Biomarcadores de suscetibilidade .....	60
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A metabolômica é uma ciência que tem como objetivo estudar e identificar as moléculas essenciais aos organismos vivos, conhecidos como metabólitos primários, assim como, as de baixo peso molecular, ou metabólitos secundários, que são produzidos por um organismo sob um dado conjunto de condições. O perfil metabólico de uma planta pode ser traçado para que se estude seu comportamento em resposta ao estresse induzido por agentes físicos, químicos ou biológicos. Dessa forma, a compreensão das funções fisiológicas das plantas se torna possível, assim como a descoberta de potenciais biomarcadores de doenças (FUNARI et al., 2013; KRASTANOV, 2010).

A cromatografia a líquido de ultra pressão acoplado a detecção por espectrometria de massas, utilizando o analisador por tempo de voo, (UPLC–QTOF–MS<sup>E</sup>) é uma plataforma bem estabelecida e uma ferramenta analítica poderosa para o desenvolvimento de metodologias para análise de extratos vegetais brutos. A aplicação desse método torna mais rápido o processo de identificação estrutural de metabólitos, otimizando assim, a geração de conhecimento relacionado a dinâmica dos perfis metabolômicos. Portanto, essa técnica amplia o sucesso na triagem de novos compostos biologicamente ativos, principalmente, em estudos contendo uma grande quantidade de amostras.

Dentro dessa ótica, estudos metabolômicos associados a espécies vegetais tais como o cajueiro, são de suma importância pois existe a necessidade de conhecer os perfis metabolômicos principalmente de folhas sujeitas a estresse biótico. A cultura do cajueiro pode ser infectada por mais de 20 doenças, sendo a maioria causada por fungos (FREIRE; CARDOSO; VIANA, 2002). Dentre essas doenças, a antracnose é a mais dispersa, a mais conhecida e a mais grave de todas, podendo causar prejuízos em todos os sistemas de cultivo, pois ocorre em qualquer etapa do desenvolvimento da planta (LUIZ; DANTAS; SAMPAIO, 2009).

A antracnose acontece com maior frequência no período de emissão de novas folhas e no início da floração, que ocorrem em épocas de maior umidade e pluviosidade, sendo temperaturas acima de 25 °C e umidade relativa acima de 90% as condições climáticas ideais para a doença ocorrer (MICHEREFF & BARROS, 2001). Como um mecanismo fisiológico natural de defesa, o cajueiro apresenta um retardamento na emissão foliar durante as estações chuvosas que podem levar a um atraso de até dois meses no início da colheita em algumas regiões produtoras. A quebra da dormência foliar só ocorre na presença de um déficit hídrico, apresentando-se assim como uma condição de estresse essencial a planta (LOPEZ & LUCAS,

2010).

O fungo *Colletotrichum gloesporioides*, é o principal agente causal da antracnose no cajueiro e pertence ao gênero *Colletotrichum*, que é a forma imperfeita do gênero *Glomerella*. Este patógeno afeta diversas espécies tais como cereais, herbáceas, leguminosas, ornamentais e fruteiras e penetra-se na planta através das aberturas naturais ou por ferimentos, podendo subsistir internamente nos tecidos infectados e em sobras da cultura no solo, sendo disseminado, principalmente, pela água de chuvas (autoinfecção) e, também, pelo vento (aloinfecção) (FREEMAN, 2000).

Um meio rápido de diferenciar diversas espécies de uma mesma planta, é a realização de um estudo do metaboloma dos indivíduos. O estudo trata-se de uma combinação de técnicas analíticas, que proporciona grandes conclusões sobre as semelhanças e diferenças da gama dinâmica de metabólitos. Portanto, o objetivo deste trabalho é a utilização da análise metabolômica, visando a identificação de biomarcadores que possam ser responsáveis pelo mecanismo de defesa contra a antracnose, sendo a identificação do perfil químico dessa espécie um avanço substancial para o entendimento do perfil de resistência e suscetibilidade das folhas do cajueiro.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cajueiro

#### 2.1.1 Origem e distribuição geográfica

A *Anacardium Occidentale Linn* é uma planta de cultura tropical, de origem brasileira, onde é popularmente conhecida como cajueiro (SANTOS, 2011). O Brasil é apontado como centro de origem da espécie que é encontrada em grandes extensões de diferentes habitats do país. O centro primário de diversidade genética do gênero *Anacardium* localiza-se na região amazônica e o centro secundário está nos cerrados do Brasil central. No nordeste, verifica-se que há uma maior diversidade e adaptação da espécie cultivada, sendo encontrada em vários ecossistemas, principalmente em zonas costeiras, compondo a vegetação de praias, dunas e restingas (PAIVA; CRISÓSTOMOS; BARROS, 2003).

A capacidade de adaptação do cajueiro às mais diversas condições ambientais despertou o interesse dos colonizadores do Brasil no século 16, levando-os a dispersar essa planta em outros países. Atualmente, o cajueiro encontra-se disseminado em uma grande faixa tropical do mundo, que compreende desde o sudeste da Flórida até a África do Sul (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

#### 2.1.2 Aspectos botânicos

Pertencente à família *Anacardiaceae*, a *Anacardium Occidentale L.* é a única espécie cultivada e a mais dispersa do gênero (SANTOS, 2011). A *Anacardiaceae* é composta por cerca de 76 gêneros e 600 espécies de árvores e arbustos, incluindo espécies frutíferas populares como a manga, o cajá, o umbu, o pistache e a serigueta (CORREIA et al., 2006).

O cajueiro é uma planta perene, adaptado ao clima quente e seco, com ramificação baixa e tronco tortuoso. Apresenta como condições adequadas para o cultivo: altas temperaturas, sendo a média de 27 °C a mais apropriada, umidade relativa do ar entre 70 e 80%, e regime pluviométrico de 800 a 1600 mm anuais distribuídos de cinco a sete meses e, nos demais meses, pouca intensidade de chuva. Uma estação seca bem definida se constitui a condição básica para floração, polinização e formação de frutos do cajueiro (BARROS et al., 1993).

Na natureza há dois tipos de cajueiros classificados de acordo com o seu porte,

denominados de cajueiro comum e anão-precoce. A planta do cajueiro comum, também conhecido como gigante, é a mais difundida e se caracteriza pelo grande porte, com altura variando entre 8 e 15 m e envergadura de copa atingindo até 20 m. O cajueiro anão-precoce apresenta porte baixo, com uma altura inferior a 4 m, copa homogênea e diâmetro do caule e envergadura de copa inferiores ao do tipo comum (CRISÓSTOMO et al., 2001). Na Figura 1, têm-se apresentado as duas plantas.

**Figura 1** - Tipos de cajueiro: cajueiro comum (1) e cajueiro anão-precoce (2).

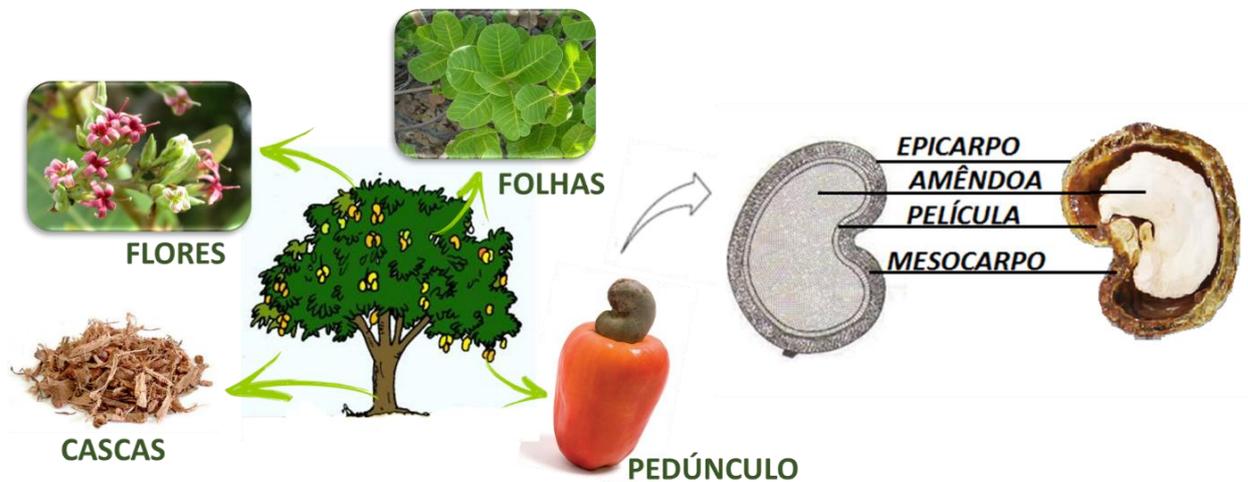


Fonte: Elaborada pelo autor.

Segundo SANTOS-SEREJO (2009) as duas plantas apresentam folhas simples, inteiras, alternas, com textura subcoriácea, glabras e pecíolo curto, com dimensões que variam de 10 a 20 cm de comprimento e de 6 a 12 cm de largura. Essa espécie apresenta inflorescência do tipo panícula terminal com flores masculinas (estaminadas) e hermafroditas. As flores são pequenas, com pedicelos curtos, ramificadas, com colorações que variam de avermelhadas a púrpuras. A primeira floração do cajueiro comum ocorre entre 2 a 5 anos e a do cajueiro anão entre 6 a 18 meses, caracterizando uma precocidade em relação ao do tipo comum (CAVALCANTI et al., 2013).

O fruto do cajueiro, popularmente conhecido como castanha de caju, é um aquênio reniforme que consiste de epicarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoa. O mesocarpo é espesso, alveolado e repleto de um líquido escuro, viscoso, cáustico e inflamável, chamado de líquido da castanha do caju (LCC). A amêndoa da castanha de caju (ACC), parte comestível do fruto, é constituída de dois cotilédones carnosos e oleosos, como mostra a Figura 2 (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). O pseudofruto é o resultado de uma hipertrofia sofrida pelo pedúnculo floral, que o torna carnoso e nutritivo (BARROS et al., 1993).

**Figura 2** – Partes da planta *Anacardium Occidentale L.*



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 2.1.3 Cajueiro anão-precoce

O cultivo do cajueiro anão-precoce tem se desenvolvido devido ao seu pequeno porte e a sua produção precoce e elevada. A produção desses clones é feita, inicialmente, através do melhoramento da base genética natural com posterior clonagem dos indivíduos que apresentam características desejáveis utilizando a propagação vegetativa de partes da planta, tais como células, tecidos, órgãos ou propágulos (JÚNIOR & CHAVES, 2001).

O cajueiro do tipo anão-precoce representa um avanço na modernização desta cultura e é utilizado como alternativa ao cajueiro do comum que apresenta baixa produtividade e dificuldades na colheita devido a fatores como: multiplicação por semente, polinização cruzada e alta estatura, que dificulta as práticas culturais como poda e controle fitossanitário. Com a expansão do cultivo do cajueiro anão é possível favorecer todos os segmentos do agronegócio do caju, visto que obtém-se um incremento na produtividade dos pomares e na uniformidade do produto cultivado (CRISÓSTOMO et al., 2001).

Entretanto, a expansão desta cultura tem como consequência a quebra do equilíbrio biológico, devido a substituição da elevada diversificação genética dos cajueiros comuns por uma maior homogeneidade e vulnerabilidade das plantas selecionadas para melhoramento genético. Como resultado há uma tendência para o surgimento de novas doenças e pragas, assim como o incremento das já existentes, que vêm se multiplicando devido a existência de genótipos susceptíveis na população (GHINI; HAMADA; BETTIOL, 2011).

### 2.1.4 Propriedades terapêuticas

As plantas medicinais com propriedades terapêuticas são de grande relevância em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento, pois apresentam-se como alternativas de baixo custo e de fácil acesso (SILVA et al., 2007). Dentre essas plantas, o cajueiro é descrito há muitos anos como uma fonte fitoterápica importante devido à grande quantidade de compostos fenólicos que o compõe (SANTOS et al., 2013).

Em países da América do Sul e da África Ocidental, o cajueiro é amplamente utilizado na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, dermatites, problemas respiratórios, dores de cabeça e doenças infecciosas. A literatura relata atividades farmacológicas comprovadas definindo a *Anacardium Occidentale L.* como uma planta anti-inflamatória, antidiabética, antisséptica, anti-hemorragica e anti-hipertensiva (JARDIM et al., 2005; SILVA et al., 2007; LEITE et al., 2016). A Figura 3, relaciona as partes da planta com os seus respectivos efeitos medicinais.

**Figura 3** – Propriedades medicinais do cajueiro.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 2.1.5 Importância Econômica

O principal produto de exploração do cajueiro é a castanha, que representa 90% da renda gerada pelo processamento e beneficiamento do caju no Brasil. É da castanha que se obtêm a amêndoa que apresenta alto valor econômico no mercado internacional de nozes e destina-se tradicionalmente ao mercado externo, gerando divisas na ordem de 220 milhões de dólares anuais ao mercado brasileiro. Os principais países consumidores dessa castanha são os Estados Unidos, a Holanda e o Canadá, que respondem por 70% das importações (BARRETO et al., 2014).

O LCC, oriundo do mesocarpo, também é produto de exportação, e é utilizado na fabricação de resinas e polímeros (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). O pedúnculo pode ser consumido in natura e possui amplo potencial de aproveitamento na indústria alimentícia sendo utilizado para a fabricação de polpas, sucos, geleias, doces, vinhos, aguardentes e refrigerantes, tanto em escala industrial como artesanal (PAIVA et al., 2006; BARRETO et al., 2014).

No Brasil, o cajueiro é cultivado em cerca de 650 mil hectares sendo os principais produtores os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Piauí e Bahia que juntos concentram 98% da produção nacional, como pode ser observado na Tabela 1. Segundo CRISÓSTOMO et al (2001) a expansão da cultura nesses estados, deve-se, principalmente, às condições climáticas favoráveis, ao baixo preço das terras, a maior concentração de indústrias de beneficiamento de castanhas e pedúnculos e ao grande incentivo proporcionado pelo governo federal, através da Sudene (Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste).

**Tabela 1** – Produção de castanha de caju nos estados brasileiros em 2015.

<b>Estados Brasileiros</b>	<b>Área Plantada (ha)</b>	<b>Área Colhida (ha)</b>	<b>Produção (ton)</b>	<b>Rendimento (kg/ha)</b>
Pará	3.110	2.945	1.651	561
Ceará	402.215	374.423	52.118	139
Rio Grande do Norte	96.841	78.755	22.337	284
Piauí	91.120	87.377	12.751	146
Bahia	20.898	20.778	6.367	306
Mato Grosso	883	652	256	393

A agroindústria do caju também tem um importante papel social, principalmente no Nordeste, visto que promove a expressiva geração de empregos diretos e indiretos. São mais de 200 mil empregos gerados no campo em épocas de colheita e cerca de 15 mil na indústria. Dessa forma, a flutuação de renda no período de entressafra das demais espécies cultivadas na região, tais como o feijão e o milho, é reduzida (LIMA, 2013).

Os estados do Pará e Mato Grosso apresentam um número reduzido de áreas plantadas devido, principalmente, as condições adversas à exploração comercial do cajueiro. Porém observa-se que essas regiões possuem um maior rendimento do produto cultivado do que a região nordeste. Isso se deve, principalmente, a severidade das doenças e pragas que atacam as plantas do Nordeste brasileiro, causando grandes perdas na produção. Essas perdas tendem a ser mais elevadas quando uma grande quantidade de plantas são cultivadas em uma mesma área (GHINI, 2011).

A produção de castanha de caju e a extensão de áreas plantadas e colhidas têm diminuído no Brasil (Tabela 2) como um todo. Isso é resultado de fatores como extensos períodos de seca, que levam a morte de um elevado número de plantas de cajueiro comum, e problemas fitossanitários ligados a doenças e pragas. A chamada “chuva do caju” é essencial para que ocorra a elevação da umidade, característica fundamental para que haja a fecundação das flores, evitando, assim, o abortamento. Além disso, doenças como a antracnose são responsáveis por comprometer o rendimento e qualidade dos produtos obtidos do cajueiro, e pode causar até 40% de perdas (FREIRE; CARDOSO; VIANA, 2002).

**Tabela 2** – Desempenho do agronegócio do caju no Brasil.

ANO	ÁREA PLANTADA (ha)	ÁREA COLHIDA (ha)	PRODUÇÃO OBTIDA (t)
2013	708.808	695.289	109.679
2014	656.463	627.137	107.713
2015	638.294	585.966	104.475

Fonte: IBGE – 2016 – posição: Agosto/2016

O panorama mundial do mercado de caju envolve cerca de 40 países produtores, no qual o Sudeste da Ásia e a África ocidental destacam-se por produzirem, juntos, cerca de 3 milhões de toneladas de castanha de caju, o que representa 90% da produção mundial. No ranking mundial de produtores, o Brasil ocupa a sétima posição. A grande maioria dos países

que competem com o Brasil na produção de castanha de caju dispõem de mão-de-obra de baixo custo e empregam um processo manual com alto desempenho, que garantem a qualidade e quantidade das castanhas produzidas. Além disso, o número de terras disponíveis para plantação nesses países é bastante elevado (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009; RABANY; RULLIER; RICAU, 2015).

## 2.2 Antracnose

O cajueiro é uma cultura que pode ser infectada por mais de 20 doenças, sendo a maioria causada por fungos. Dentre essas doenças, a antracnose é a mais dispersa, a mais conhecida e a mais grave de todas, podendo causar prejuízos em todos os sistemas de cultivo, pois ocorre em qualquer etapa do desenvolvimento da planta (FREIRE et al., 2002).

A antracnose acontece com maior frequência no período de emissão de novas folhas e no início da floração, que ocorrem em épocas de maior umidade e pluviosidade, sendo temperaturas acima de 25 °C e umidade relativa acima de 90% as condições climáticas ideais para a doença ocorrer (MICHEREFF & BARROS, 2001). Como um mecanismo fisiológico natural de defesa, o cajueiro apresenta um retardamento na emissão foliar durante as estações chuvosas que podem levar a um atraso de até dois meses no início da colheita em algumas regiões produtoras. A quebra da dormência foliar só ocorre na presença de um déficit hídrico, apresentando-se assim como uma condição de estresse essencial a planta (LOPEZ & LUCAS, 2010).

O fungo *Colletotrichum gloesporioides*, é o principal agente causal da antracnose no cajueiro. Pertence ao gênero *Colletotrichum*, que é a forma imperfeita do gênero *Glomerella*. Este patógeno afeta diversas espécies tais como cereais, herbáceas, leguminosas, ornamentais e fruteiras e penetra-se na planta através das aberturas naturais ou por ferimentos, podendo subsistir internamente nos tecidos infectados e em sobras da cultura no solo, sendo disseminado, principalmente, pela água de chuvas (autoinfecção) e, também, pelo vento (aloinfecção) (FREEMAN, 2000).

Os sintomas da antracnose podem ser observados em toda a parte aérea da planta, entretanto, são mais comumente encontrados nas folhas. Uma planta que é suscetível a antracnose exibe os seguintes sintomas da doença: lesões necróticas que são irregulares e apresentam-se inicialmente com uma cor parda em folhas jovens, tornando-se avermelhadas à medida que as folhas envelhecem. Quando o ataque é severo, as folhas tendem a ficar enegrecidas e retorcidas, como se tivessem sofrido a ação do fogo, e tendem a cair

posteriormente. Os frutos também são afetados e causam grandes prejuízos ao pomar (CARDOSO et al., 2015). Os sintomas citados são representados na Figura 4.

**Figura 4** – Sintomas da antracnose no cajueiro.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As principais medidas de controle da doença são feitas antes da progressão da mesma no pomar, visando reduzir o inoculo inicial. Tais medidas consistem em eliminar os restos culturais, realizar frequentes podas de limpeza e controle químico preventivo através do uso de fungicidas à base de oxiclóreto de cobre. Apesar do crescente número de patógenos e pragas que surgiram após o estabelecimento de extensos plantios de clones de cajueiro anão-precoce, justificando a necessidade do uso de defensivos a fim de evitar danos a planta, a maioria dos pedúnculos produzidos atualmente são comercializados livres de fungicidas (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

### 2.2.1 A antracnose e os clones de cajueiro anão-precoce.

Na Tabela 3 as características dos quatro clones de cajueiro anão-precoce são apresentadas, incluindo a resistência das plantas à antracnose. Estão especificadas na tabela as quatro espécies que serão estudadas para possível identificação dos metabólitos responsáveis pela resistência do cajueiro à antracnose.

**Tabela 3** – Principais características de clones de cajueiro anão-precoce cultivados em Pacajus (CE).

CARACTERÍSTICAS	CLONES DE CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE			
	Clone 1 CCP 76	Clone 2 BRS 226	Clone 3 BRS 189	Clone 4 BRS 265
Altura da planta (m)	2,70	1,40	3,20	2,55
Produtividade (kg/ha)	1237 <sup>(1)</sup>	470 <sup>(2)</sup>	562 <sup>(3)</sup>	1155 <sup>(3)</sup>
Coloração do pedúnculo	Laranja	Laranja	Vermelha	Vermelha
Exploração comercial (cultivo)	Sequeiro e irrigado	Sequeiro	Irrigado	Sequeiro
Resistência à antracnose	Resistente	Resistente	Resistente	Suscetível

(1) Produtividade no sétimo ano de idade; (2) Produtividade no quarto ano das plantas no município de Pio IX, PI; (3) Produtividade no sexto ano de idade.

Fonte: Cavalcanti & Barros (2009)

De acordo com os dados da tabela, identifica-se que fatores como produtividade, coloração do pedúnculo e tipo de cultivo podem não possuir influência sobre a resistência ou suscetibilidade do cajueiro à antracnose. Portanto, o estudo metabolômico das plantas é necessário para que se determine quais os possíveis fatores, tais como produção de metabólitos secundários, que estão relacionados a essa característica presente, em apenas, alguns clones de cajueiro anão-precoce.

### 2.3 Metabólitos secundários

Ao conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente dentro de cada célula dá-se o nome de metabolismo. Essas reações têm sua direção definida por enzimas específicas através de rotas metabólicas e os compostos químicos produzidos, degradados ou simplesmente transformados por elas são chamados de metabólitos, que por sua vez são divididos em duas grandes classes: metabólitos primários e metabólitos secundários. Apesar de serem classificadas separadamente, as reações bioquímicas não ocorrem independentemente dentro do organismo (SIMÕES et al., 2003).

O metabolismo primário envolve processos de síntese e utilização de espécies químicas essenciais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos, tendo como precursor a fotossíntese. É portanto parte fundamental de todos os seres vivos e têm como principal função garantir o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências

fundamentais das células (CASTRO et al., 2004).

Os compostos secundários são produzidos de forma restrita na natureza, como resultado da especialização celular e suas manifestações durante certas fases do desenvolvimento do organismo produtor. Sua presença está limitada a uma espécie ou a espécies relacionadas, e são resultado da adaptação às condições ambientais na sobrevivência e perpetuação dos indivíduos. Esses metabólitos podem ser divididos em três grupos quimicamente diferentes, sendo eles: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (CASTRO et al., 2004; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Para as plantas os compostos secundários desempenham funções ecológicas importantes, tais como a proteção contra herbívoros e microrganismos patogênicos, a atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, e a atuação na competição planta-planta e nas simbioses plantas-organismos (TAIZ & ZEIGER, 2013). Variações nos metabólitos secundários de uma planta podem ocorrer e são induzidas por fatores como sazonalidade, estágio de desenvolvimento e idade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade de água, radiação UV, altitude, composição da atmosfera e nutrientes dos solos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Com base na literatura, a Tabela 4 foi montada contendo os principais metabólitos secundários presentes na espécie *Anacardium Occidentale L.* As fórmulas estruturais dos metabólitos descritos são representadas na Figura 5.

**Tabela 4** – Metabólitos secundários identificados na espécie *Anacardium Occidentale L.*

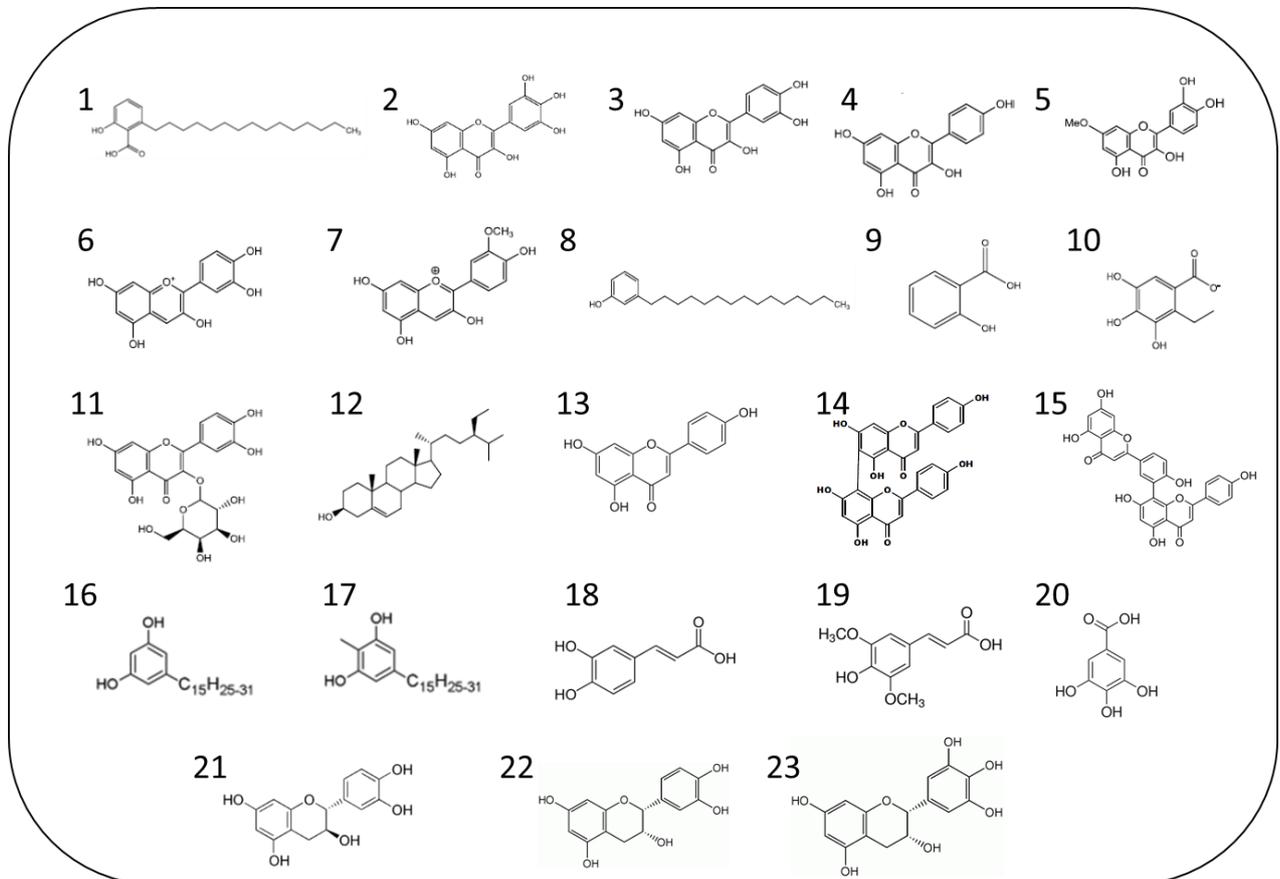
	Metabólito secundário	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Órgão vegetal	Referência
1	Ácido 2-hidroxi-6-pentadecil benzoico (ácido anacárdico)	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	348,51	Pedúnculo; Castanha (fruto); LCC	(FADEYI et al, 2015; MAZZETTO, 2009)
2	Miricetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	318,24	Pedúnculo; Folhas	(FADEYI et al, 2015)
3	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302,24	Pedúnculo; Folhas	(FADEYI et al, 2015); (CHAVES et al., 2010)
4	Camferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286,23	Pedúnculo	(FADEYI et al, 2015)
5	Ramnetina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	316,26	Pedúnculo	(FADEYI et al, 2015)
6	Cianidina	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287,24	Pedúnculo	(FADEYI et al, 2015)
7	Peonidina	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	301,27	Pedúnculo	(FADEYI et al, 2015)
8	Cardanol	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O	304,50	Castanha (fruto); LCC	(FADEYI et al, 2015; MAZZETTO, 2009)
9	Ácido Salicílico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138,12	Castanha (fruto)	(FADEYI et al, 2015)
10	Etil Galato (EG)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197,16	Flores	(FADEYI et al, 2015)

**Tabela 4 continuação** – Metabólitos secundários identificados na espécie *Anacardium Occidentale L.*

11	Quercetina-3-galactosídeo	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	459,33	Flores	(FADEYI et al, 2015)
12	Beta-sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414,70	Folhas	(FADEYI et al, 2015)
13	Apigenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,23	Folhas	(CHAVES et al., 2010)
14	Agatisflavona	C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	540,46	Folhas	(CHAVES et al., 2010)
15	Amentoflavona	C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	537,44	Folhas	(CHAVES et al., 2010)
16	Cardol	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	320,50	LCC	(MAZZETTO, 2009)
17	2-metilcardol	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	334,52	LCC	(MAZZETTO, 2009)
18	Ácido cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180,16	Frutos (Vermelho e amarelo)	(LEITE et al., 2016)
19	Ácido sinapínico	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	224,21	Frutos (Vermelho e amarelo)	(LEITE et al., 2016)
20	Ácido gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170,12	Frutos (Vermelho e amarelo); casca	(LEITE et al., 2016)
21	Catequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,26	Casca	(VILAR et al., 2016)
22	Epicatequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,26	Casca	(VILAR et al., 2016)
23	Epigalocatequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	458,372	Casca	(VILAR et al., 2016)

Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 5** – Fórmulas estruturais dos metabólitos secundários da Tabela 4.



Fonte: Elaborada pelo autor

### **2.3.1 Metabolômica**

A importância da demanda por constituintes do metabolismo secundário das plantas tem aumentado e estimulado a procura por novos compostos que possuem atividades biológicas e terapêuticas (SANTOS et al., 2013). A metabolômica é uma ciência que tem como objetivo a identificação e quantificação do conjunto de metabólitos totais produzidos ou modificados por um determinado sistema (célula, tecido ou organismo) sob um dado conjunto de condições (FRAIGE, 2012; KRASTANOV, 2010).

O perfil metabólico de uma planta pode ser traçado para que se estude seu comportamento em resposta ao estresse induzido por agentes físicos (luz UV, calor, desidratação), químicos (fármacos e agroquímicos) ou biológicos (patógenos). Dessa forma, a compreensão das funções fisiológicas das plantas se torna possível, assim como a descoberta de potenciais biomarcadores de doenças (FUNARI et al., 2013; KRASTANOV, 2010).

Os estudos metabolômicos baseiam-se em análises comparativas sobre perfis metabólicos individuais obtidos para diferentes amostras. Portanto, a metabolômica demonstra ser bastante útil na investigação metabólica de variedades de interesse agrícola e pode ser utilizada para comparação de plantas geneticamente modificadas (FUNARI et al., 2013). O interesse por esse novo campo de pesquisa também está na sua capacidade de descobrir compostos ativos, que não são passíveis de serem identificados por métodos convencionais, em extratos de plantas complexos (ERNST et al., 2014).

Uma preocupação em todos estudos metabolômicos é a aquisição de dados de alta qualidade. Isso envolve o cuidadoso planejamento de experimentos, medições analíticas e aplicação de métodos estatísticos no processamento dos dados. Por isso, neste trabalho se faz a associação de técnicas analíticas eficientes para o estudo da metabolômica como a espectrometria de massas e a posterior análise dos dados obtidos utilizando técnicas quimiométricas.

## **2.4 Métodos Analíticos**

### **2.4.1 UPLC-ESI-QTOF-MS(MS)**

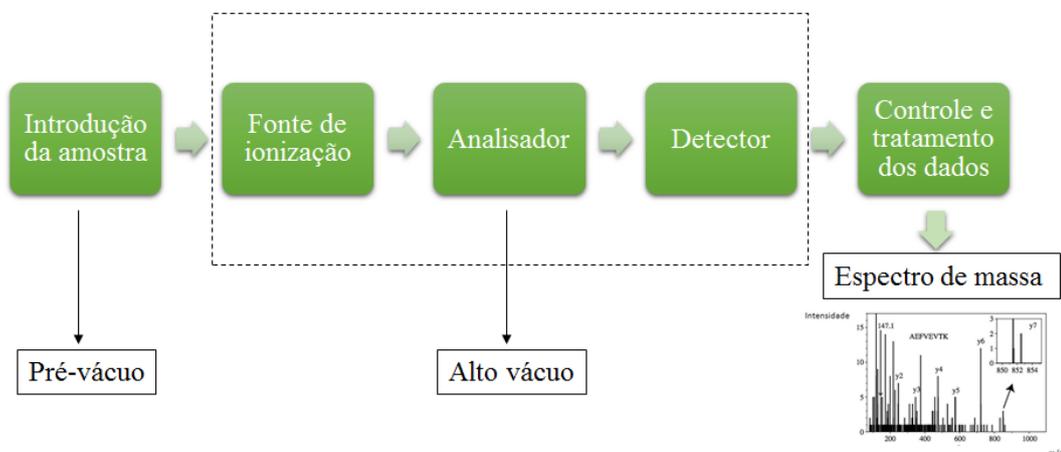
A cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC) foi desenvolvida como alternativa ao sistema convencional de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), a fim de se obter uma maior eficiência na separação cromatográfica dos compostos. Esta técnica permite a

utilização de colunas de menor comprimento, empacotadas com fases estacionárias contendo partículas de tamanho inferior a 2  $\mu\text{m}$  que conferem maior resolução cromatográfica e facilitam a separação de analitos dos interferentes proporcionando uma maior sensibilidade de detecção (IGLESIAS, 2012).

À coluna cromatográfica é aplicada uma alta pressão, que minimiza o tempo de análise fazendo com que os analitos eluam da coluna mais rapidamente, concentrando-se na fonte de ionização e contribuindo, assim, para a obtenção de limites de detecção consideravelmente mais baixos. A alta pressão também contribui para a redução do consumo de solvente. Devido a essas características o UPLC é largamente utilizado para análises de produtos naturais e medicamentos à base de plantas, que possuem matrizes complexas (REDDY; BALAMMAL; KUMAR, 2012).

A espectrometria de massas (MS), apresentada no esquema da Figura 6, é amplamente utilizada como detector em cromatografia, pois permite a obtenção de informações tanto qualitativas quanto quantitativas, sendo altamente seletivo aos compostos de interesse (HARRIS C., 2012). Destaca-se também pelo seu caráter universal, onde a condição básica para um analito ser analisado é a capacidade de ser ionizado, e por sua versatilidade que permite o acoplamento de diferentes tipos de sistemas de inserção de amostras. No espectrômetro de massas a caracterização das moléculas é feita através da razão massa sobre carga ( $m/z$ ) dos íons, determinando o peso molecular e informações importantes sobre a fragmentação das estruturas químicas das mesmas (IGLESIAS, 2012).

**Figura 6** – Esquema básico de um Espectrômetro de Massas.

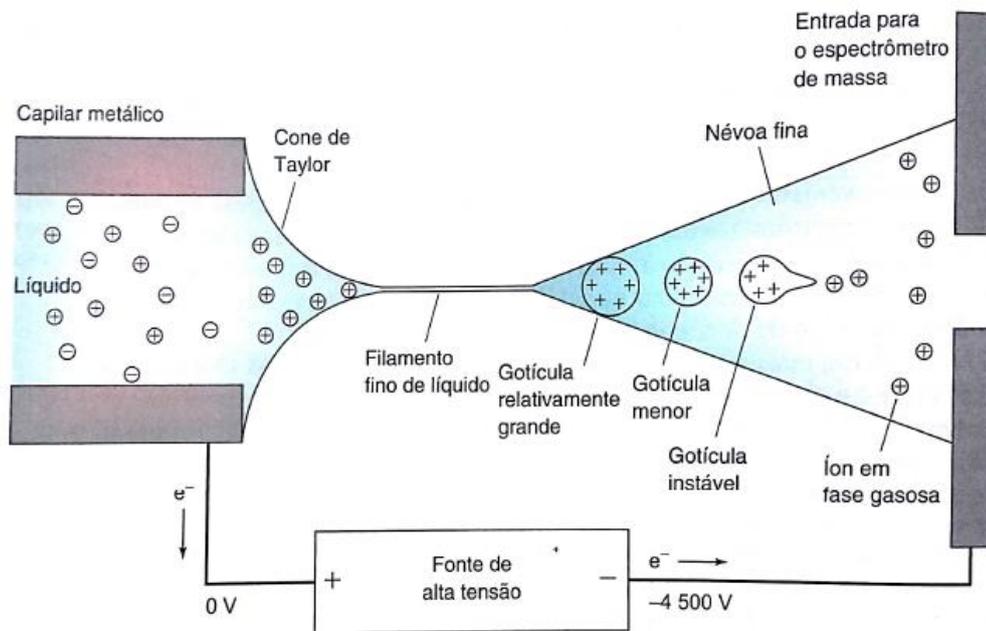


Fonte: Adaptação de Daniel C. Harris, 2012.

O modo de ionização utilizado nesse estudo foi o electrospray. Nesta técnica a amostra líquida proveniente da coluna cromatográfica entra no capilar do nebulizador juntamente com

um fluxo contínuo de gás  $N_2(g)$ , onde é aplicada uma alta tensão. O potencial elétrico aplicado dá origem a um excesso de carga na fase líquida através de reações redox, gerando um forte campo elétrico na saída do nebulizador que, combinado com o fluxo de gás inerte, cria um fino aerosol com partículas carregadas positiva ou negativamente, dependendo do potencial aplicado (REDDY; BALAMMAL; KUMAR, 2012). As gotículas carregadas começam a diminuir de tamanho devido à evaporação do solvente, até o momento em que são obtidos os íons de interesse. A ESI se aplica muito bem a compostos de polaridade média a alta e por esta razão tem extensa aplicabilidade nos campos farmacêutico, de alimentos e produtos naturais. A Figura 7 ilustra o processo de formação de íons numa fonte de electrospray (HARRIS C., 2012).

**Figura 7** – Esquema da fonte de ionização por electrospray.



Fonte: Daniel C. Harris, 2012.

O analisador de massas utilizado para separar os íons de acordo com sua relação  $m/z$  foi o quadrupolo – tempo de voo (Q-ToF), uma união dos analisadores quadrupolo e tempo de voo (TOF). O quadrupolo é formado por quatro barras paralelas, onde as barras opostas são conectadas ao mesmo potencial elétrico. Uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf) é aplicada nas barras e essas voltagens podem ser ajustadas para permitir a transmissão de somente um íon de interesse (modo seleção) ou de modo a se obter um espectro de massas (modo varredura) a partir do monitoramento dos íons que atingem a extremidade do quadrupolo sem tocar nos polos.

Os analisadores *time of flight* (TOFs) são formados por tubos metálicos sob vácuo e isolados do campo externo. Os íons, ao entrarem no analisador, são acelerados em direção ao detector por meio de um potencial repulsivo aplicado no início do TOF e são levados com uma energia cinética igual a  $\frac{1}{2} mv^2$ , na qual “m” é a massa do íon e “v” a sua velocidade. Desse modo, sendo a energia cinética a mesma e a massa diferente, os íons mais leves se deslocaram mais rapidamente que os íons mais pesados, se deslocando em direção ao detector em ordem crescente de massa (IGLESIAS, 2013; LANÇAS, 2013).

## 2.4.2 Quimiometria

O estudo metabolômico das plantas associado às técnicas analíticas modernas gera uma grande quantidade de dados complexos que são difíceis de resumir e interpretar sem o uso de ferramentas estatísticas adequadas. O uso de ferramentas quimiométricas, por exemplo, Análise de Componentes Principais (PCA), Mínimos Quadrados Parciais para Estruturas Latentes (PLS) e PLS ortogonais (OPLS) são, portanto, de grande importância para que se possa fazer uma melhor avaliação desses conjuntos de dados e assim obter informações relevantes a partir deles (ERNST et al., 2014; WIKLUND et al., 2008).

A quimiometria pode ser definida como uma área da química que utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para planejar e otimizar procedimentos experimentais, bem como, extrair o máximo de informação química relevante com a análise dos dados de natureza multivariada (FERREIRA, 2015).

A aplicação dos diferentes métodos quimiométricos depende do conjunto de dados que está sendo submetido à análise. O primeiro passo para a análise quimiométrica consiste em realizar a análise exploratória num espaço multivariado de dados, que ocorre sem o prévio conhecimento sobre a natureza da amostra ou o grupo à qual pertence (ROUSSEL et al., 2014). Esse método é amplamente utilizado para detectar regularidades e padrões de associação numa matriz de dados (FERREIRA, 2015).

### 2.4.2.1 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA é um método de análise multivariada que tem como objetivo reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados que possuem certa colinearidade entre si, ou seja, que são correlacionados e apresentam-se redundantes. Essas colinearidades demonstram que a matriz X de dados apresenta algum tipo de variabilidade dominante que engloba a maioria da

informação disponível. Tais redundâncias e pequenas variabilidades devem ser removidas e, para isso, a PCA expressa as informações mais significativas contidas nas variáveis originais em um menor número de novas variáveis, denominadas componentes principais ou PCs de X (ROUSSEL et al., 2014; WIKLUND et al., 2008).

As PCs são formadas a partir da combinação linear das variáveis originais de forma que a primeira componente principal, PC1, descreve a variação máxima da matriz de dados, ou seja, contém o máximo de informações significativas dos dados originais e pode ser definida como o melhor ajuste da reta no espaço multidimensional. A segunda componente principal é ortogonal a primeira e captura a variância comum em sua direção, porém em menor quantidade que a primeira. As próximas componentes principais são calculadas em ordem decrescente de significância (WEHRENS, 2011).

Dessa forma as informações relevantes dentro de um conjunto de dados são separadas e a sua visualização se torna mais fácil, sendo possível descobrir e interpretar as diferenças existentes entre as variáveis e examinar as relações que podem existir entre as amostras (FERREIRA, 2015).

As componentes principais de X podem ser calculadas através de uma grande variedade de algoritmos, porém a decomposição por valores singulares (SDV) é o mais empregado (WIKLUND et al., 2008). Neste algoritmo, a matriz de dados X (I x J), onde as I linhas são as amostras e as J colunas as variáveis, é decomposta como produto de duas novas matrizes ortogonais entre si, a matriz de *scores* T e a matriz de *loadings* P, mais uma matriz de resíduos (ruídos estatísticos). Assim, a equação pode ser escrita na forma:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde T contém as coordenadas das amostras no eixo das componentes, contendo o mesmo número de linhas da matriz original, usualmente o número de amostras. A matriz P contém a informação de como as variáveis originais estão relacionadas às componentes. Nessa última matriz, o número de colunas é igual ao número de colunas na matriz original, usualmente relacionado ao número de variáveis (KHAKIMOV et al., 2015).

#### ***2.4.2.2 Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)***

A regressão por mínimos quadrados parciais pode ser entendida como uma extensão da PCA e trabalha com duas matrizes, X e Y, sendo a primeira a matriz de variáveis

independentes e a outra, a matriz de variáveis respostas. Seus principais objetivos são aproximar essas duas matrizes e moderar a relação entre elas, através do uso de fatores (FERREIRA, 2015).

Nesse método de calibração multivariada, a matriz de dados  $X$  é decomposta num novo espaço, chamado de variáveis latentes (LVs), contendo a matriz de *scores*  $T$  e *loadings*  $P$  (equação 2), que explicam a máxima variância dos espectros originais. As variáveis dependentes  $Y$  intervêm diretamente na decomposição em componentes principais das variáveis independentes  $X$ . Essas duas matrizes são decompostas simultaneamente em uma soma de variáveis, através das equações 2 e 3. Dessa forma, cada componente principal, que relaciona  $X$  e a propriedade de interesse  $Y$ , é obtida maximizando a covariância entre os *scores*  $T$ , da matriz  $X$ , e  $Y$  (FERREIRA, 2015; WIKLUND et al., 2008).

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E} \quad (\text{eq. 2})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad (\text{eq. 3})$$

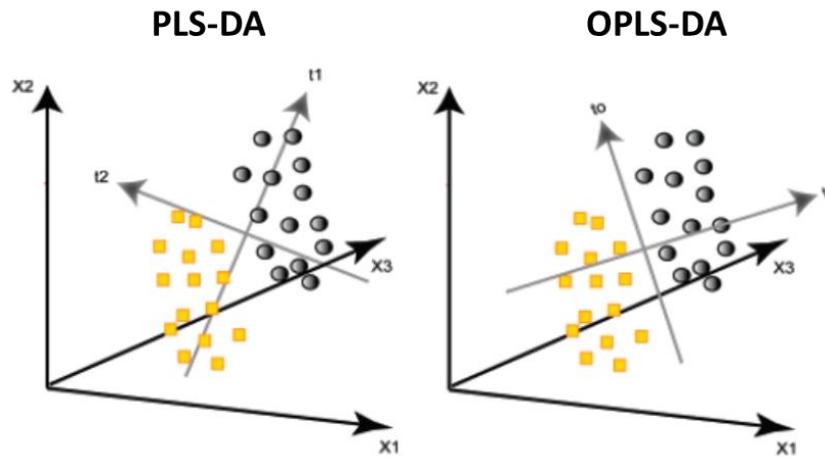
Na equação 3,  $U$  representa a matriz de *scores*,  $Q'$  a matriz de *loadings* e  $F$  são os resíduos da matriz  $Y$ . A PLS é, as vezes, subdividido em análise de regressão e análise discriminante, a PLS-DA. Na análise discriminante, as amostras são alocadas em classes discretas apropriadas (WIKLUND et al., 2008).

#### **2.4.2.2.1 Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA)**

O conceito de filtração ortogonal foi recentemente introduzido ao modelo PLS, como sendo a remoção da variância ortogonal à variação de interesse. Esse filtro tem a função de retirar da matriz  $X$  as informações não relacionadas com  $Y$  (TRYGG; WOLD, 2002).

A vantagem da OPLS em relação a PLS é que o modelo é rotacionado de modo que a separação de classes é encontrada na primeira componente preditiva, tp, também referida como a variação correlacionada, e a variação não relacionada a separação das classes é observada em componentes ortogonais, também referidas como variação não correlacionada. Essa separação entre os componentes preditivas e ortogonais facilita a interpretação do modelo. Na Figura 8, está representada a diferenciação entre os modelos PLS-DA e OPLS-DA (WIKLUND et al., 2008).

**Figura 8** – Representação geométrica da diferença entre os modelos PLS-DA e OPLS-DA.



Fonte: WIKLUND et al., 2008.

O S-plot visualiza a influência de determinadas variáveis em um modelo. É um gráfico de dispersão que combina a covariância e a correlação de gráficos de *loadings* resultantes de um modelo baseado em projeção, por exemplo, o componente preditivo  $tp$ , de um modelo OPLS-DA. Isto corresponde à combinação da contribuição ou magnitude (covariância) com o efeito e confiabilidade (correlação) para as variáveis do modelo com relação aos componentes do gráfico de *scores* (WIKLUND et al., 2008). Segundo GOMES (2013) o *S-plot* torna mais fácil a visualização de biomarcadores únicos de uma amostra em uma comparação entre duas amostras diferentes e, por esta razão, é amplamente utilizado em estudos metabolômicos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ❖ Realizar um estudo metabolômico para avaliar quais são os biomarcadores responsáveis pela resistência de cajueiro à antracnose (Infecção por *Colletotrichum gloesporioides*) empregando UPLC-QTOF-MS(MS).

#### 3.2 Específicos

- ❖ Obter um *fingerprint* metabólico, impressão digital, para identificar as variações de expressão metabolômica entre diferentes clones de cajueiro anão-precoce (*Anacardium Occidentale L.*);
- ❖ A partir de métodos quimiométricos de análise multivariada (PCA, OPLS-DA e *S-Plot*), determinar biomarcadores de resistência e suscetibilidade à antracnose.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

- ❖ Tubos de ensaio de 15 mL com tampa
- ❖ Estante para tubos de ensaio
- ❖ Espátulas
- ❖ Seringa de vidro com agulha
- ❖ Pipeta automática de 5000  $\mu\text{L}$  com ponteiros
- ❖ Pipetas de Pasteur de vidro
- ❖ Vials para UPLC-MS
- ❖ Filtros de PTFE de tamanho de poro 0,22  $\mu\text{m}$
- ❖ Vidrarias auxiliares: proveta, becker, erlenmeyer e balão volumétrico
- ❖ Água de osmose reversa
- ❖ Água Milli-Q

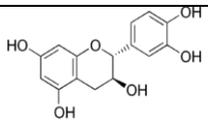
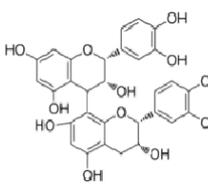
#### 4.1.1 Instrumentos

- ❖ Balança analítica
- ❖ Vórtex para agitação de tubos de ensaio
- ❖ Banho ultrassom de potência fixa de 135 W
- ❖ Centrífuga
- ❖ UPLC-MS

#### 4.1.2 Reagentes e padrões

Nos procedimentos de extração foram utilizados solventes provenientes da Vetec Química e Tedia High Purity Solvents. Na análise das amostras via UPLC, os solventes utilizados foram oriundos da LiChrosolv e da Aldrich Chemical Company. A água de alta pureza empregada nos procedimentos foi produzida pelo sistema Milli-Q Integral Purification System da Merck Millipore. O padrão de (+)-catequina (Lote BCBF0735V) foi obtido na Sigma –EUA e o padrão de Procianidina B2 (Lote 13021848) foi obtida na Extrasynthese – França (Tabela 5).

**Tabela 5** – Padrões analíticos utilizados.

Nome	Nome IUPAC	Massa Molar (g/mol)	Classe	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural
Catequina	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -cromone-3,5,7-triol	290,24	Flavanóide	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
Procianidina Tipo B	(2 <i>R</i> ,2' <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-2,2'-bis(3,4-dihidroxifenil)-3,3',4,4'-tetrahidro-2 <i>H</i> ,2' <i>H</i> -4,8'-bi cromeno-3,3',5,5',7,7'-hexol	578,52	Flavanóide	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 Preparo das amostras

Para o estudo metabolômico da resistência e suscetibilidade, foram comparados acessos de cajueiro resistentes e susceptíveis à antracnose. Dessa forma, foram utilizadas amostras de folhas de clone de cajueiro anão-precoce, provenientes de um pomar implantado no Campo Experimental de Pacajus, pertencente à Embrapa. O pomar foi implantado em maio de 2011, em espaçamento 8 m x 6 m, sob regime de sequeiro, com 16 linhas com 30 cajueiros em cada. As 16 linhas do pomar foram divididas em quatro blocos (delineamento de blocos casualizados), sendo cada uma das linhas constituídas por um clone de cajueiro-anão da Embrapa: CCP 76, BRS 189, BRS 226 e BRS 265.

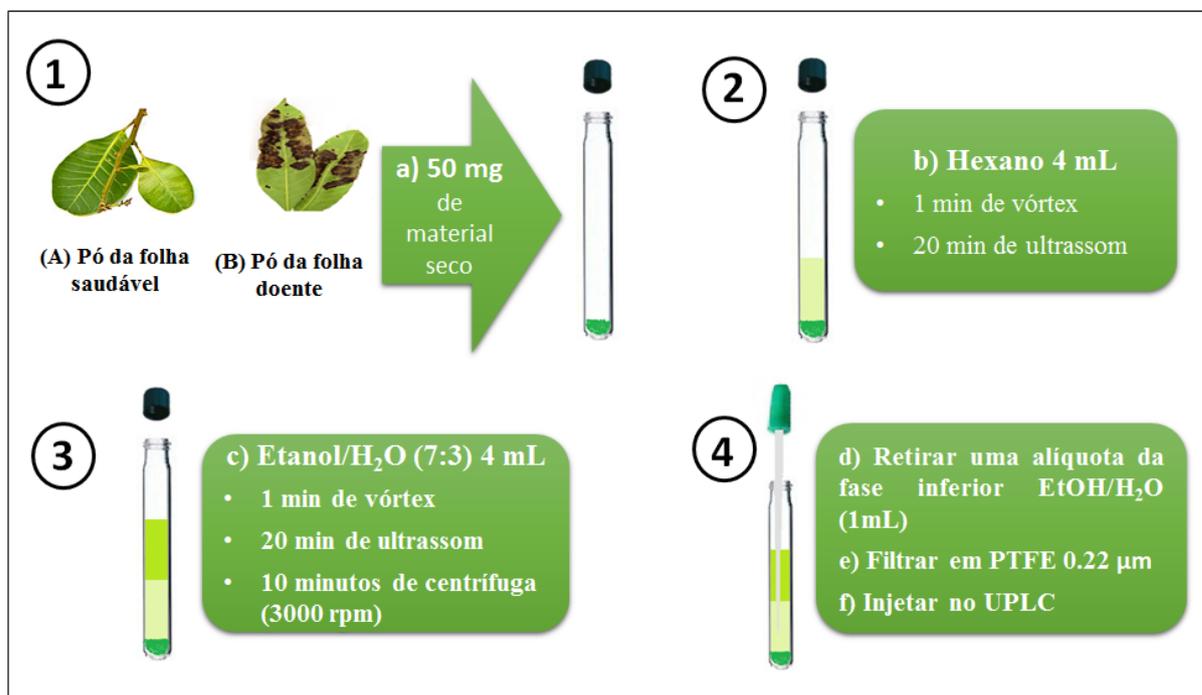
Em cada linha do pomar, foram amostradas seis plantas, sendo retiradas em cada planta duas folhas sadias por quadrante, totalizando oito folhas por planta e 48 folhas por amostra (bloco). As folhas foram retiradas de ramos sem inflorescência e correspondiam ao primeiro par de folhas maduras a partir do ápice do ramo. Adicionalmente, foram retiradas no clone suscetível à doença (BRS 265) amostras de folhas atacadas pela antracnose, infectado pelo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O clone BRS 265 foi o único clone a apresentar a doença dentro do grupo analisado. Durante todo o ano de 2016 não foi realizada nenhuma pulverização com defensivos químicos no pomar.

As amostras recebidas já estavam previamente secas e trituradas, prontas para extração e análise. Até o momento da análise em UPLC-ESI-QTOF-MS(MS) estas amostras foram armazenadas em sala desumidificada para evitar qualquer contaminação e perdas.

#### 4.2.1 Procedimento experimental

A preparação dos extratos de cajueiros foi realizada por método de partição líquido-líquido utilizando ultrassom. Uma amostra de 50 mg da folha da planta (saudável e doente) foi pesada dentro de tubo de ensaio de 15 mL em uma balança analítica. Logo após, foi adicionado 4 mL de hexano PA e a mistura foi levada para homogeneização em vórtex por 1 minuto. A extração dos compostos apolares foi realizada em banho ultrassônico por 20 minutos com potência fixa de 135 W. Em seguida, foi adicionado 4 mL de solução etanol/água (7:3), preparada previamente utilizando 140 mL de etanol PA e 60 mL de água ultrapura, à mistura. Novamente, a homogeneização da mistura foi feita em vórtex durante 1 minuto e realizada a extração dos compostos polares em banho ultrassônico por 20 minutos. Posteriormente, os tubos de ensaio foram levados a centrífuga para decantar o material vegetal não dissolvido à 3000 rpm por 10 minutos. Ao final do procedimento, uma alíquota de 1 mL da fase inferior polar (etanol/água) foi retirada e filtrada em filtro de PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ , sendo o filtrado recolhido em vial para UPLC-MS e encaminhado para análise em UPLC. A metodologia adaptada de CHAGAS-PAULA et al (2015) e NEHME et al (2008) é ilustrada na Figura 9.

**Figura 9** – Procedimento de extração.



Fonte: Adaptado de CHAGAS-PAULA et al., 2015 e NEHME et al., 2008.

### 4.3 Experimentos em UPLC-QTOF-MS(MS)

As análises foram realizadas num sistema Waters Acquity de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) acoplado a um analisador Tempo-de-Voo (TOF) Waters Micromass LCT espectrometria de massas equipado com uma interface electrospray (ESI), pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A Figura 10 ilustra o sistema utilizado.

**Figura 10** – Equipamento UPLC-QTOF-MS(MS).



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.3.1 Condições de análise

As análises cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 milímetros x 2,1 milímetros, 1,7  $\mu\text{m}$ ), em temperatura fixa de 40 °C. Os perfis metabólicos dos extratos foram obtidos utilizando um gradiente exploratório com as seguintes fases móveis: água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B). As amostras foram submetidas a um gradiente variando de 2% a 95% B (15 minutos), vazão de 0,4 mL  $\text{min}^{-1}$  e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ .

#### 4.3.2 Condições do massas de alta resolução – QTOF

As análises dos extratos foram realizadas em modo de ionização negativo, na faixa de 110-1180 Da. As condições ESI foram definidas como: temperatura da fonte fixa a 120 °C,

temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V e voltagem capilar de 2,6 kV. A leucina encefalina foi utilizada como *lock mass*. O modo de aquisição foi MS(MS). O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

#### 4.4 Identificação molecular

Os dados gerados pelas análises foram processados utilizando o software MassLynx versão 4.1. A comparação de todos os picos no cromatograma de massas foi feita baseando-se numa tolerância de  $\pm 0,05$  min para o tempo de retenção e  $\pm 0,05$  Da para a massa exata. Todas as possíveis fórmulas moleculares foram extraídas (elementos C, H, O e tolerância de 10 ppm) usando a ferramenta *Elemental Composition* do MassLynx. A fórmula molecular extraída foi corrigida adicionando-se um hidrogênio (em modo negativo) para futura pesquisa na literatura.

#### 4.5 Análise quimiométrica

O software MarkerLynx foi utilizado para as análises quimiométricas dos dados gerados pelo *fingerprint* metabolômico das amostras. O método utilizado para gerar o PCA foi centrado na média, indicado para dados espectroscópicos, pois desconsidera ruídos nos espectros. O software realiza a comparação das amostras em duas dimensões, por esta razão a análise de OPLS-DA e *S-Plot* foi feita comparando sempre dois conjuntos de clones de cajueiro anão-precoce.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil químico via UPLC-ESI-QTOF-MS(MS) dos extratos de folhas da *Anacardium Occidentale L.*

No presente estudo, as análises cromatográficas por UPLC-ESI-QTOF-MS(MS) foram realizadas no modo de ionização negativa. Um conjunto de cromatogramas e espectros de massas foi gerado para cada um dos clones de cajueiro anão-precoce analisados. Na Figura 11, os cinco cromatogramas foram sobrepostos e numerados de acordo com os dados da Tabela 6, a fim de auxiliar na interpretação do comportamento do perfil químico de cada amostra analisada.

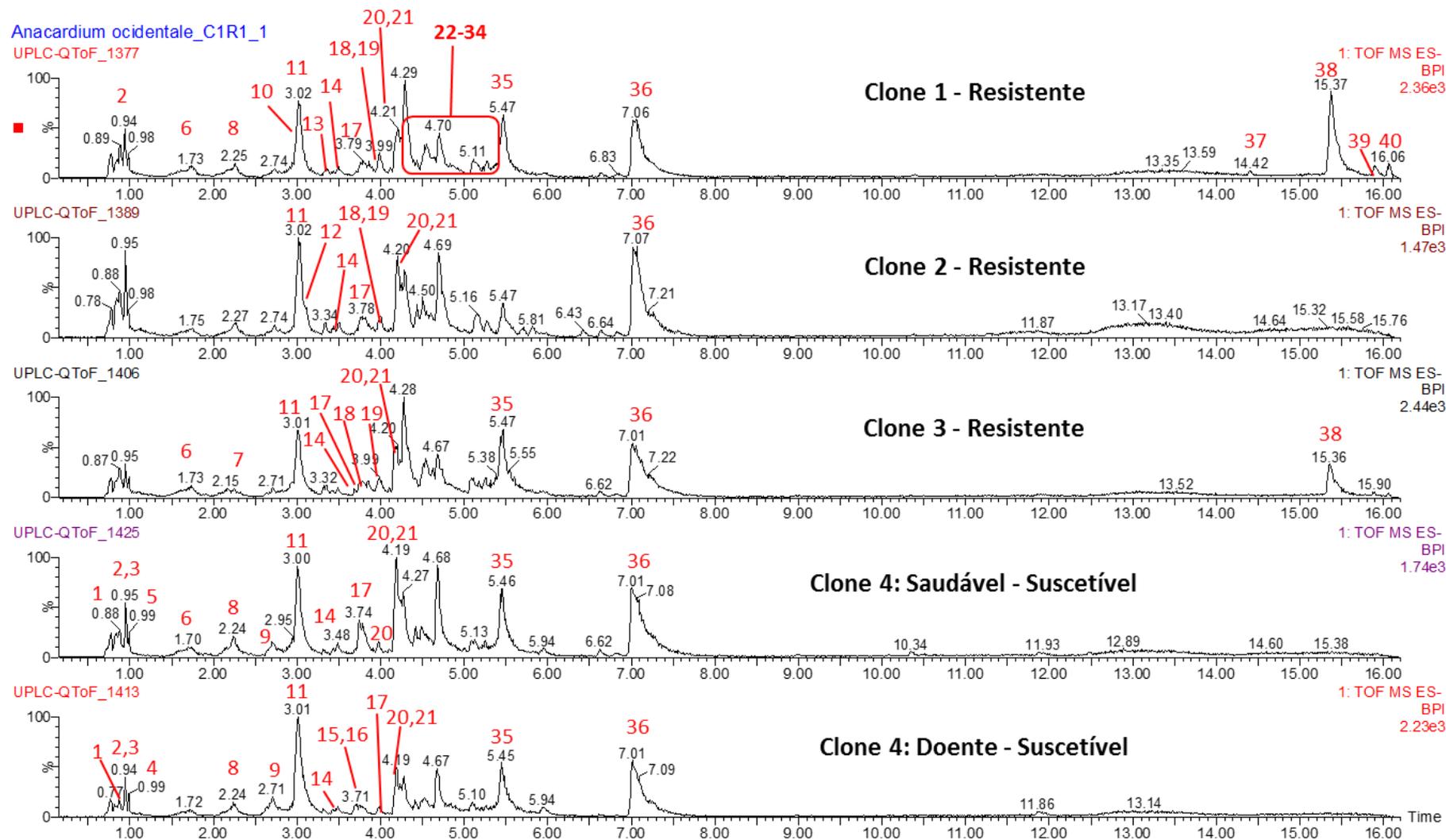
A tabela 6 apresenta uma lista dos 40 compostos tentativamente identificados através dos experimentos de UPLC-ESI-QTOF-MS(MS) juntamente com seus tempos de retenção, massa observada e detectada, fórmula molecular, erro em ppm, assim como os fragmentos característicos em MS<sup>2</sup>. O erro em ppm (parte por milhão) apresenta a precisão da massa do composto observada no espectro em MS, quanto menor o erro mais precisa foi a análise realizada. O erro em ppm é calculado pela seguinte equação que leva em consideração a massa observada no espectrômetro de massas e a massa calculada pela ferramenta composição elementar do software MassLynx.

$$\frac{(\text{Massa Observada} - \text{Massa Calculada})}{\text{Massa Observada}} \times 10^6 \quad (\text{eq. 4})$$

Os clones analisados apresentaram diferenças e semelhanças em sua composição. Por esta razão, foram atribuídos a cada metabólito e clone de cajueiro os sinais (+) ou (-), que representam a confirmação ou negação da existência daquele composto no determinado clone.

A caracterização de cada composto foi feita através da comparação das informações obtidas através da análise por UPLC-QTOF-MS(MS) com dados de referências bibliográficas, informações sobre compostos provenientes de base de dados como *PubChem* e *ChemSpider*, e padrões analíticos autênticos obtidos comercialmente. Os fitoquímicos anteriormente identificados na sessão 2.3, da mesma família ou espécie botânica, também foram utilizados como base para a identificação. Os compostos que não foram caracterizados, são denominados com a sigla N.I. que significa “não identificado”.

**Figura 11** – Cromatogramas dos diferentes clones de cajueiro anão-precoce analisados.



Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 6** – Constituintes identificados ou tentativamente identificados em folhas de *Anacardium Occidentale L.* das plantas saudáveis (C1, C2, C3, C4\_SA) e da planta doente (C4\_CA).

Pico no.	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> Calculado	[M-H] <sup>-</sup> Observado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro ppm	Tentativa Identificação	Referências	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4 Saudável	Clone 4 Doente
1	0,87	377,0873	377,0836	191,0555;267,0721; 165,0398	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-9,8	N.I.		-	-	-	+	+
2	0,93	341,1084	341,1083	179,0550;161,0450; 143,0354; 89,0252	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	-0,3	α-D-glucopiranosídeo	(KIM et al., 2011)	+	-	-	+	+
3	0,96	173,0450	173,0433	165,0397; 111,0480	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-9,8	Ácido chiquímico	(AVULA et al., 2008)	-	-	-	+	+
4	0,98	191,0192	191,0181	173,0407; 111,0100	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	-5,8	Ácido cítrico	(NG et al., 2004)	-	-	-	-	+
5	0,99	331,0665	331,0660	169,0141; 125,0222	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	-1,5	Galoil hexosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015)	-	-	-	+	-
6	1,71	169,0137	169,0141	125,0244	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	2,4	Ácido gálico	(DORTA et al., 2014)	+	-	+	+	-
7	2,22	325,0560	325,0558	169,0133; 125,0234	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	-0,6	Ácido galoil chiquímico	(ERŞAN et al., 2016)	-	-	+	-	-
8	2,25	305,0661	305,0672	219,0645;179,0369; 165,0190;139,0390; 137,0242	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	3,6	Galocatequina ou epigalocatequina	(HOKKANEN et al., 2009)	+	-	-	+	+
9	2,74	577,1371	577,1366	451,1066 425,0876; 407,0826;289,0735;	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	3,5	Procianidina tipo-B dímero	(YAN et al., 2014)	-	-	-	+	+
10	2,96	321,0247	321,0270	169,0126; 125,0238	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	7,2	Ácido digálico	(ABU-REIDAH et al., 2015)	+	-	-	-	-
11	3,01	289,0712	289,0705	245,0827; 205,0511	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	-2,4	Catequina	Padrão*	+	+	+	+	+

Fonte: Elaborada pelo autor.

\*Identificado através de comparação com o padrão

**Tabela 6 continuação** – Constituintes identificados ou tentativamente identificados em folhas de *Anacardium Occidentale L.* das plantas saudáveis (C1, C2, C3, C4\_SA) e da planta doente (C4\_CA).

Pico no.	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> Calculado	[M-H] <sup>-</sup> Observado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro ppm	Tentativa Identificação	Referências	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4 Saudável	Clone 4 Doente
12	3,09	453,1033	453,1048	313,0577;179,0357; 169,0161; 125,0243	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	3,3	Hidroxi-metoxifenil- <i>O</i> -( <i>O</i> -galoil)-hexose	(ABU-REIDAH et al., 2015)	-	+	-	-	-
13	3,35	635,0884	635,0923	465,0686;313,0607; 169,0130; 125,0231	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub>	6,1	Trigaloil glicose	(LI et al., 2016)	+	-	-	-	-
14	3,51	457,0771	457,0772	169,0122; 125,0241	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	0,2	Epigalocatequina galato	(LIU et al., 2016)	+	+	+	+	+
15	3,69	577,1346	577,1325	451,1097;425,0824; 407,0746; 289,0709	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	-3,6	Procianidina tipo B - Dímero	(YAN et al., 2014; ROCKENBACH et al., 2012)	-	-	-	-	+
16	3,74	729,1456	729,1520	407,0810; 289,0728	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	8,8	Monogalato de dímero de procianidina	(YAN et al., 2014; ROCKENBACH et al., 2012)	-	-	-	-	+
17	3,79	479,0826	479,0833	317,0307;316,0222;	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	1,5	Miricetina 3- <i>O</i> -glucosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015)	+	+	+	+	+
18	3,85	631,0935	631,0975	479,0862;317,0317; 169,0145; 125,0215	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>17</sub>	6,3	Miricetina galoil-hexosídeo	(ERŞAN et al., 2016; SALDANHA et al., 2013)	+	+	+	-	-
19	3,98	787,0994	787,1033	635,0886;617,0876; 465,0759;169,0122; 125,0252	C <sub>34</sub> H <sub>28</sub> O <sub>22</sub>	5,0	Tetra- <i>O</i> -galoil-glucosídeo	(DORTA et al., 2014)	+	+	+	+	-
20	4,17	463,0877	463,0880	317,0286; 316,0216	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-0,6	Miricetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo	(ERŞAN et al., 2016; SHUKRI & ALAN, 2010)	+	+	+	+	+

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 6 continuação** – Constituintes identificados ou tentativamente identificados em folhas de *Anacardium Occidentale L.* das plantas saudáveis (C1, C2, C3, C4\_SA) e da planta doente (C4\_CA).

Pico no.	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> Calculado	[M-H] <sup>-</sup> Observado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro ppm	Tentativa Identificação	Referências	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4 Saudável	Clone 4 Doente
21	4,17	463,0877	463,0880	301,0257; 300,0305	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-0,6	Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo	(SHUKRI & ALAN, 2010; DORTA et al., 2014)	+	+	+	+	+
22	4,23	463,0877	463,0858	301,0317; 300,0278	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-4,1	Quercetina 3- <i>O</i> -glucosídeo	(SHUKRI & ALAN, 2010; DORTA et al., 2014)	+	+	-	+	+
23	4,25	615,0986	615,0997	463,0883; 301,0328	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>16</sub>	1,8	Quercetina galoil hexosídeo	(ERŞAN et al., 2016)	+	+	+	-	+
24	4,28	939,1104	939,1106	770,1005; 769,0918; 617,0865; 169,0112; 125,0230	C <sub>41</sub> H <sub>32</sub> O <sub>26</sub>	0,2	Pentagaloil hexosídeo	(DORTA et al., 2014)	+	+	+	+	+
25	4,43	433,0771	433,0774	301,0350; 300,0270	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	0,7	Quercetina 3- <i>O</i> -xilósídeo	(SHIEBER et al., 2003)	+	+	-	-	+
26	4,49	447,0927	447,0915	285,0402; 284,0315	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-2,7	Canferol 3- <i>O</i> -glucosídeo	(SHUKRI & ALAN, 2010; SHIEBER et al., 2003)	-	-	-	+	+
27	4,49	433,0771	433,0771	301,0350; 300,0276	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	0,0	Quercetina 3- <i>O</i> -arabinopiranosídeo	(SHUKRI & ALAN, 2010; SHIEBER et al., 2003)	-	+	-	+	+
28	4,54	433,0771	433,0771	301,0361; 300,0297	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	0,0	Quercetina 3- <i>O</i> -arabinofuranosídeo	(SHUKRI & ALAN, 2010)	-	+	-	+	-
29	4,55	447,0927	447,0920	285,0386; 284,0287	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-1,6	Canferol 3- <i>O</i> -glucosídeo dímero	(SHIEBER et al., 2003)	+	+	+	+	+

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 6 continuação** – Constituintes identificados ou tentativamente identificados em folhas de *Anacardium Occidentale L.* das plantas saudáveis (C1, C2, C3, C4\_SA) e da planta doente (C4\_CA).

Pico no.	t <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> Calculado	[M-H] <sup>-</sup> Observado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro ppm	Tentativa Identificação	Referências	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4 Saudável	Clone 4 Doente
30	4,57	1091,1213	1091,1285	939,1167;769,0932; 617,0867; 169.0123	C <sub>48</sub> H <sub>36</sub> O <sub>30</sub>	6,6	Hexagaloil hexosídeo	(GRACE et al., 2016; ERŞAN et al., 2016)	+	+	+	+	+
31	4,59	599,1037	599,1074	285,0398;169,0123; 125,0252	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub>	6,2	Cianidina 3- <i>O</i> -(2'' galoil)-galactosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015)	-	+	-	-	-
32	4,69	447,0927	447,0909	301,0343; 300,0271	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-4,0	Quercetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015)	+	+	+	+	+
33	4,75	585,0880	585,0923	301,0341; 169,0125	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub>	7,3	Quercetina galoil pentosídeo	(ERŞAN et al., 2016)	+	+	+	+	+
34	5,27	585,0880	585,0912	301,0350; 169,0152	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub>	5,5	Quercetina galoil pentosídeo dímero	(ABU-REIDAH et al., 2015)	-	+	-	-	-
35	5,44	349,0560	349,0562	198,0495;197,0426; 169,0128; 124,0166	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	0,6	2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxibenzoil) oxibenzoato de etilo	(DORTA et al., 2014)	+	-	+	+	+
36	7,02	537,0822	537,0809	417,0616; 375,0501	C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	-2,4	Amentoflavona ou agatisflavona	(ABU-REIDAH et al., 2015)	+	+	+	+	+
37	14,41	341,2117	341,3125	297,2204;119,0514; 106,0428	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	5,3	Ácido anacárdico (15:3)	(ERŞAN et al., 2016)	+	-	-	-	-
38	15,38	369,2430	369,2406	325,2503	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	-6,5	Ácido anacárdico (17:3)	(ERŞAN et al., 2016)	+	-	+	-	-
39	15,90	345,2430	345,2428	301,2550	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	-0,6	Ácido anacárdico (15:1)	(ERŞAN et al., 2016)	+	-	-	-	-
40	16,06	371,2586	371,2582	327,2686	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	-1,1	Ácido anacárdico (17:2)	(ERŞAN et al., 2016)	+	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com base em artigos referentes, principalmente, à espécie, gênero e família, contendo informações sobre as fragmentações dos compostos analisados nesse estudo, identificou-se as perdas sofridas pelas moléculas que geraram os íons fragmentos observados no espectro de massas em MS<sup>2</sup>.

O composto 1 ( $t_R = 0,87$  min), trata-se de uma molécula não identificada de [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z$  377,0873 Da e não citada em referências bibliográficas. A única fórmula molecular relacionada a esta massa monoisotópica foi identificada pelo MassLynx como sendo C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>, com um erro em ppm de -9,8. Os principais íons fragmento em MS<sup>2</sup> foram  $m/z$  269,0721 Da, 191,0555 Da e 165,0398 Da. Tais fragmentos são característicos de compostos contendo frações de galoil.

O pico 2 ( $t_R = 0,93$  min) mostrou um íon [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z$  341,1084 Da com espectro em MS<sup>2</sup> produzindo íons fragmento em  $m/z$  179,0550 Da exibido devido a perda de uma unidade de hexose,  $m/z$  161,0450 Da dado a perda de uma molécula de água,  $m/z$  143,0354 Da e 89,0252 Da. A identificação desse composto foi feita com base no padrão de fragmentação dos espectros de massas descrito por KIM et al (2011) que sugeriu este pico como  $\alpha$ -D-glucopiranosídeo.

O pico 3 ( $t_R = 0,96$  min) mostrou um íon [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z$  173,0450 Da e foi identificado como ácido chiquímico. Como descrito no artigo de AVULA et al (2008), o composto apresentou fragmentos característicos em MS<sup>2</sup> como  $m/z$  165,0397 Da e 111,0480 Da.

O pico 4 ( $t_R = 0,98$  min), descrito por NG et al (2004), é o ácido cítrico, com [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z$  191,0192 Da. Esse composto apresentou dois fragmentos importantes, sendo o primeiro  $m/z$  165,0397 referente a perda de uma molécula de água e o outro pico em  $m/z$  111,0100 Da correspondente a [M-H-CO<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>.

O pico 5 ( $t_R = 0,99$  min) apresentou [M-H]<sup>-</sup> com  $m/z$  331,0660 Da, indicando que o composto corresponde ao galoil hexosídeo (ABU-REIDAH et al., 2014). O espectro em MS<sup>2</sup> apresentou fragmentos em  $m/z$  169,0141 Da, referente ao ácido gálico e gerado devido a perda de uma unidade de hexose (162 Da), e  $m/z$  125,0222 Da que é produto da perda de uma molécula de CO<sub>2</sub> (44 Da).

O pico 6 ( $t_R = 1,71$  min) foi identificado como ácido gálico com [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z$  169,0237 Da e foi descrito no artigo de DORTA et al (2014). O espectro em MS<sup>2</sup> produziu um fragmento principal em  $m/z$  125,0244 Da como resultado da perda de uma molécula de CO<sub>2</sub>.

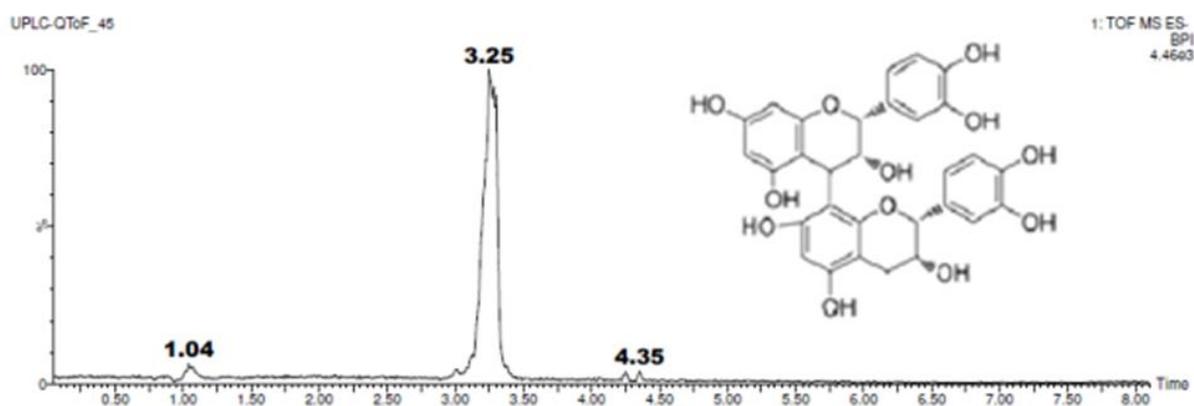
O pico 7 ( $t_R = 2,22$  min) mostrou um íon [M-H]<sup>-</sup> em  $m/z$  341,1084 Da. O espectro em MS<sup>2</sup> produziu um fragmento em  $m/z$  169,0133 Da, referente a perda de 156 Da, e um íon

em  $m/z$  125,0234 Da dado a perda de um molécula de  $\text{CO}_2$  [ $\text{M-H-156-44}$ ]<sup>-</sup>. A identificação desse composto foi feita com base no padrão de fragmentação dos espectros de massas relatado por ERŞAN et al (2016), que sugerem este pico como ácido galoil chiquímico.

Pico 8 ( $t_R = 2,25$  min) apresentou um íon [ $\text{M-H}$ ]<sup>-</sup> em  $m/z$  305,0661 Da, que gerou em  $\text{MS}^2$  os íons fragmentos  $m/z$  219,0645 Da, 179,0369 Da e 165,0190 Da em consonância com a perda de um  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$  e  $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3$ , respectivamente. Os fragmentos foram gerados devido a clivagem do anel A de flavon-3-ol, a fissão do anel heterocíclico (HRF) e através de uma reação retro-Diels-Alder (RDA). De acordo com o artigo de DOU et al (2007), esse composto pode ser identificado como galocatequina ou epigalocatequina.

Os picos 9 ( $t_R = 2,74$  min) e 15 ( $t_R = 3,69$  min) geraram íons [ $\text{M-H}$ ]<sup>-</sup> em  $m/z$  577,1371 Da consistentes com dímeros de procianidina do tipo B, descritos no artigo de YAN et al (2014). A confirmação dessa caracterização foi feita utilizando um padrão autêntico de procianidina do tipo B, que apresentou tempo de retenção igual a 3,25 minutos (Figura 12). Além disso, foi observado que o perfil de massas e de fragmentação das procianidinas identificadas nos extratos de folhas de cajueiro assemelham-se aos do padrão.

**Figura 12 - Cromatograma do padrão procianidina tipo B.**

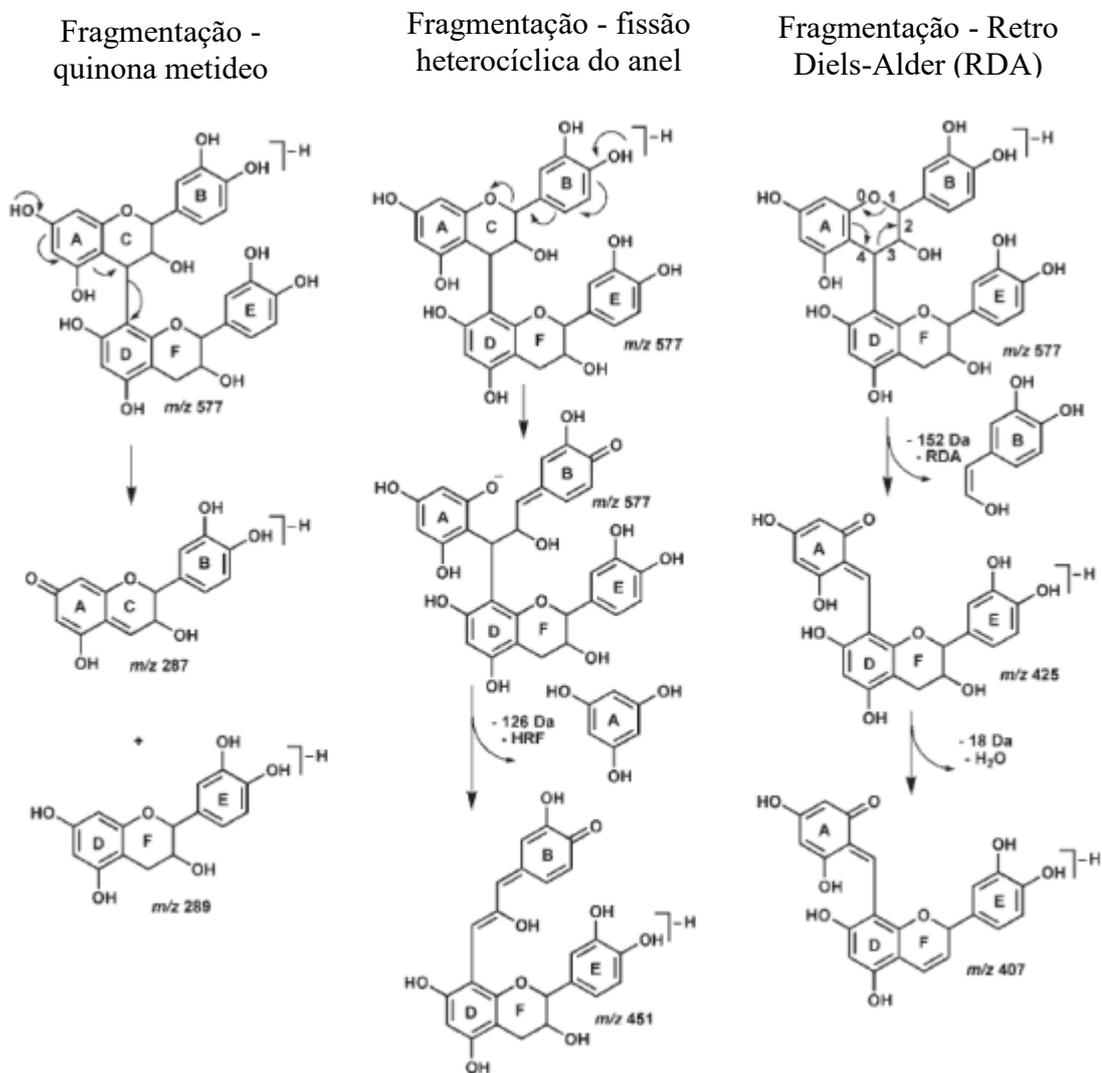


Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 13, representa a proposta de fragmentação para esses compostos apresentada por Rodrigues et al (2007), com íons fragmentos em  $m/z$  289,0709 [ $\text{M-H-288}$ ]<sup>-</sup>, gerado pela fissão quinona metídeo (QM), onde ocorre a perda de (epi)catequina formada pela ligação interflavonóica;  $m/z$  451 [ $\text{M-H-126}$ ]<sup>-</sup> é gerado pela fissão heterocíclica do anel B e saída do 1,3,5-triidroxibenzeno;  $m/z$  425 [ $\text{M-H-125}$ ]<sup>-</sup> é formado pela fragmentação de Retro Diels-Alder de uma unidade de (epi)catequina superior e perda do grupo B e  $m/z$  407,0746 [ $\text{M-H-18}$ ]<sup>-</sup>

refere-se a eliminação de uma molécula de água do anel F.

**Figura 13** – Principais fragmentações de procianidina do tipo B dimérica.



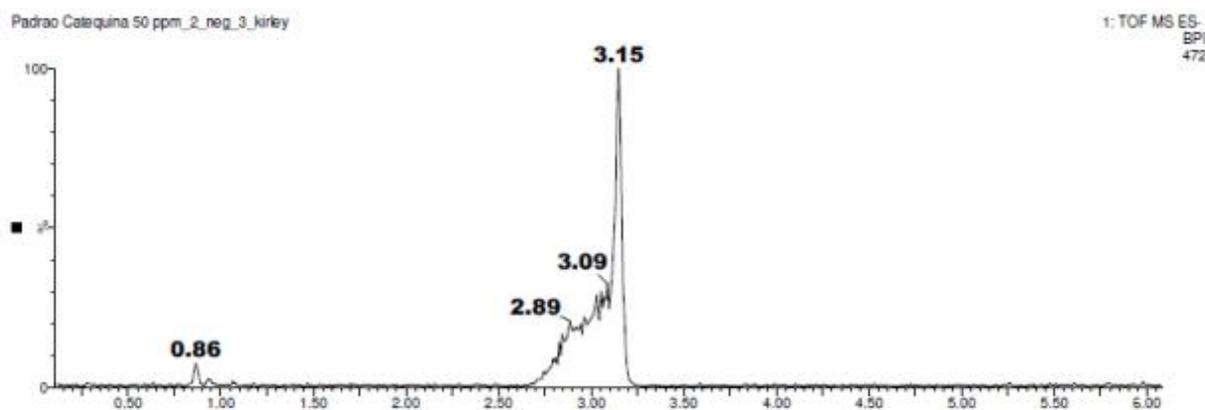
Fonte: Baseado no trabalho de RODRIGUES et al., 2007.

O pico 10 ( $t_R = 2,96$  min) foi identificado como ácido digálico, de acordo com o seu íon precursor em  $m/z$  321,0247 Da, citado no artigo de ABU-REIDAH et al (2015). No espectro de  $MS^2$ , esse composto produziu o íon fragmento em  $m/z$  169,0126 Da (ácido gálico), devido a perda de uma fração de galoil  $[M-H-152]^-$ , e um íon fragmento em  $m/z$  125,0238 Da que representa a perda de uma molécula de  $CO_2$  pelo ácido gálico.

Pico 11 ( $t_R = 3,01$  min) mostrou um íon  $[M-H]^-$  em  $m/z$  289,0712 Da e foi identificado como catequina pela comparação com o tempo de retenção e o espectro de massas acurado de um padrão autêntico, apresentado na Figura 14. O espectro em  $MS^2$  produziu íons

fragmentos em  $m/z$  245,0829 e 205,0511 Da correspondentes a perda de  $\text{CO}_2$  e  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2$ , respectivamente. O fragmento em  $m/z$  205 foi gerado devido a clivagem do anel A de flavon-3-ol (DOU et al., 2007).

**Figura 14** – Cromatograma do padrão analítico de catequina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O pico 12 ( $t_R = 3,09$  min) foi identificado como Hidroxi-metoxifenil-*O*-(*O*-galoil)-hexose de acordo com o seu íon precursor  $[\text{M}-\text{H}]^-$  em  $m/z$  453,1033 Da, citado no artigo de ABU-REIDAH et al (2015). O espectro em  $\text{MS}^2$  apresentou íons fragmento em  $m/z$  313,0577 Da, 179,0357 Da, 169,0161 Da e 125,0243 Da.

O pico 13 ( $t_R = 3,35$  min) apresentou um íon  $[\text{M}-\text{H}]^-$  em  $m/z$  635,0884 Da e foi identificado como trigaloil glicose. O espectro em  $\text{MS}^2$  gerou íons em  $m/z$  465,0686 Da, 313,0607 Da e 169,0130 Da (LI et al., 2016).

O pico 14 ( $t_R = 3,51$  min) foi identificado através do seu íon precursor em  $m/z$  457,0771, descrito pelo artigo de LIU et al (2016). O composto apresentou íons fragmento em  $m/z$  169,0122 Da (ácido gálico) e  $m/z$  125,0241 Da.

O pico 16 ( $t_R = 3,74$  min) de  $[\text{M}-\text{H}]^-$  em  $m/z$  729,1456 Da gerou um espectro em  $\text{MS}^2$  com dois fragmentos importantes. O primeiro fragmento em  $m/z$  407,0810 Da corresponde a perda de um grupo galoil  $[\text{M}-\text{H}-152]^-$ . O segundo em  $m/z$  289,0728 Da foi gerado pela perda de um grupo galoil seguida da perda de uma molécula de epicatequina  $[\text{M}-\text{H}-152-288]^-$  ou da perda de uma fração de epicatequina galato  $[\text{M}-\text{H}-441]^-$ . Com base nesses dados o composto foi tentativamente identificado como um monogalato de procianidina tipo B (ROCKENBACH et al., 2012).

Os picos 17 ( $t_R = 3,79$  min), 18 ( $t_R = 3,85$  min) e 20 ( $t_R = 4,17$  min) foram

identificados como derivados de miricetina, descritos no artigo de SHUKRI & ALAN (2010). A ordem de eluição dos três compostos foi indicada pela comparação com o artigo citado. O pico 17 com um íon  $[M-H]^-$  em  $m/z$  479,0826 foi identificado como miricetina-3-*O*-glucosídeo e apresentou fragmentos em  $m/z$  317,0307 Da devido a perda de uma unidade de glucose (162 Da) e  $m/z$  316,0222 Da ( $[M-2H]^-$ ). O pico 20, de  $[M-H]^-$  463,0877 Da, apresentou uma fragmentação similar e foi identificado como miricetina-3-*O*-ramnosídeo devido a perda de uma unidade de ramnose (146 Da) para gerar o fragmento em  $m/z$  317,0286 Da. O pico 18 com  $[M-H]^-$  631,0935 Da diferenciou-se dos demais por apresentar fragmentos em  $m/z$  479,0862 devido a perda de uma unidade galoil (152 Da) e  $m/z$  169,0145 Da (ácido gálico), sendo identificado como miricetina galoil-hexosídeo.

O pico 19 ( $t_R = 3,98$  min) foi identificado como tetra-*O*-galoil-glucosídeo de acordo com o seu íon precursor em  $m/z$  787,0994 Da, como descrito no artigo de DORTA et al (2014). O cromatograma em  $MS^2$  mostrou um íon fragmento em  $m/z$  635,0886 D causado pela perda uma fração galoil (152 Da) e 617,0876 Da provocado pela perda de uma molécula de ácido gálico neutro (170 Da). O fragmento em  $m/z$  465,0759 Da é gerado pela perda sucessiva de  $[M-H-152-162]^-$ .

Os picos 21 ( $t_R = 4,17$  min) e 22 ( $t_R = 4,23$  min) deram o mesmo íon  $[M-H]^-$  em  $m/z$  463,0877 Da e ambos mostraram fragmentos típicos de glicosídeos de quercetina com íons fragmento em  $m/z$  301, que é atribuído a perda de uma fração hexose ( $[M-H-162]^-$ ). Baseado no artigo de SHUKRI & ALAN (2010), os compostos foram identificados como Quercetina 3-*O*-galactosídeo e Quercetina 3-*O*-glucosídeo, respectivamente.

Os picos 23 ( $t_R = 4,25$  min) e 33 ( $t_R = 4,75$  min) foram caracterizados como glicosídeos de quercetina galoilados de acordo com os seus íons precursores em  $m/z$  615,0986 Da e  $m/z$  585,0880 Da, descritos no artigo de ERŞAN et al (2016). O pico 23 foi identificado como quercetina galoil hexosídeo e produziu íons fragmentos em  $m/z$  463,0883 Da que corresponde a perda de uma fração galoil e  $m/z$  301,0328 Da que se refere a quercetina. O pico 33 foi identificado como quercetina galoil pentosídeo e apresentou dois íons fragmentos em  $m/z$  301,0350 Da e 169,0152 Da, gerados pela perda sucessiva de frações de pentosídeo.

Os picos 24 ( $t_R = 4,28$  min) e 30 ( $t_R = 4,57$  min) foram identificados como penta e hexagaloil hexosídeos com íons precursores em  $m/z$  939,1104 Da e 1091,1213 Da. Os dois compostos apresentaram íons fragmentos similares em  $m/z$  769 e 617, correspondentes a perda de uma molécula de ácido gálico neutra e uma fração de galoil (DORTA et al., 2014; ERŞAN et al., 2016).

Os picos 25 ( $t_R = 4,43$  min), 27 ( $t_R = 4,49$  min) e 28 ( $t_R = 4,54$  min) apresentaram

$[M-H]^-$  similares em  $m/z$  433,0771 Da e o espectro em  $MS^2$  mostrou um fragmento em  $m/z$  301, correspondente ao radical ânion de quercetina aglicona, caracterizando assim os compostos como quercetinas pentosídeos. A identificação dos picos foi feita com base na análise do tempo de retenção das espécies descritas por SHUKRI & ALAN (2010), como sendo Quercetina-3-*O*-xilósídeo, Quercetina-3-*O*-arabinopiranosídeo e Quercetina-3-*O*-arabinofuranosídeo.

Os picos 26 ( $t_R = 4,43$  min) e 29 ( $t_R = 4,55$  min) apresentaram o mesmo íon precursor em  $m/z$  447,0927 Da e foram identificados como canferol-3-*O*-glucosídeo, descrito no artigo de SHUKRI & ALAN (2010). O espectro em  $MS^2$  produziu fragmentos característicos de canferol em  $m/z$  284 Da e  $m/z$  285, gerado pela perda de uma unidade de glucose (162 Da).

O pico 31 ( $t_R = 4,59$  min) apresentou um íon  $[M-H]^-$  em  $m/z$  599,1037 Da. O espectro em  $MS^2$  mostrou um íon fragmento em  $m/z$  285,0398 Da indicativo de cianidina na estrutura. Os fragmentos em  $m/z$  169,0123 Da referente ao ácido gálico e  $m/z$  125,0252 Da produto da perda de  $CO_2$  (44 Da) do ácido gálico. Baseado no artigo de ABU-REIDAH et al (2015) o composto foi identificado como Cianidina 3-*O*-(2'' galoil)-galactosídeo.

O pico 32 ( $t_R = 4,69$  min) foi identificado como Quercetina 3-*O*-ramnosídeo de acordo com o seu íon precursor em  $m/z$  447,0927 Da, descrito no artigo de ABU-REIDAH et al (2015). O cromatograma em  $MS^2$  apresentou íons fragmentos em  $m/z$  301,0343 Da e 300,0271 Da.

O pico 35 ( $t_R = 5,44$  min) mostrou um íon  $[M-H]^-$  em  $m/z$  349,0560 e íons fragmentos em  $m/z$  197,0426 e 169,0128 Da. Esses fragmentos indicam a presença de etil galato e ácido gálico, respectivamente, e são gerados devido a perda de uma fração galoil e uma molécula de água neutra. Esse composto foi identificado como 2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxibenzoil) oxibenzoato de etilo de acordo com o artigo de DORTA et al (2014).

O pico 36 ( $t_R = 7,02$  min) apresentou um íon precursor em  $m/z$  537,0822 Da e fragmentos em  $m/z$  417,0616 Da e 375,05501 Da. Esse composto já havia sido encontrado em folhas de cajueiro e descrito por CHAVES et al (2010) como sendo amentoflavona ou agatisflavona. A diferenciação entre os dois compostos só poderia ser feita com uma análise mais detalhada, visto que os dois possuem a mesma fórmula molecular e fragmentam-se da mesma forma.

Um total de cinco ácidos anacárdicos com diferentes comprimentos de cadeias alquílicas (C15, C17) e diferentes graus de saturação (totalmente saturadas ou mono-, di- ou tri-insaturadas) foram identificados nos clones de cajueiro anão-precoce. Eles eluíram tardiamente, ao final da corrida cromatográfica, devido a sua cadeia lateral lipofílica de

alk(en)il. Os compostos foram determinados de acordo com o comprimento da sua cadeia lateral e o número de ligações duplas na cadeia lateral.

O pico 37 ( $t_R = 14,41$  min),  $[M-H]^-$  341,2117, foi identificado como o ácido anacárdico (15:3) de acordo com o artigo de ERŞAN et al (2016). O espectro em  $MS^2$  apresentou picos em  $m/z$  297,2204 Da, 119,0514 Da e 106,0428 Da. Os fragmentos foram produzidos pela perda de uma molécula de  $CO_2$  do grupo carboxilo fenólico, pela fragmentação na posição alilo do ácido anacárdico não saturado e pela eliminação de um grupo fenol, respectivamente.

Os picos 38 ( $t_R = 15,38$  min), 39 ( $t_R = 15,90$  min) e 40 ( $t_R = 16,06$  min) foram descritos por ERŞAN et al (2016) e identificados de acordo com seus íons precursores,  $m/z$  369,2430 Da, 345,2430 Da e 371,2586 Da, como ácidos anacárdicos 17:3, 15:1 e 17:2, respectivamente. Seus espectros em  $MS^2$  mostraram íons fragmento  $[M-H-44]^-$  em comum, indicando a perda de  $CO_2$  do grupo carboxilo fenólico.

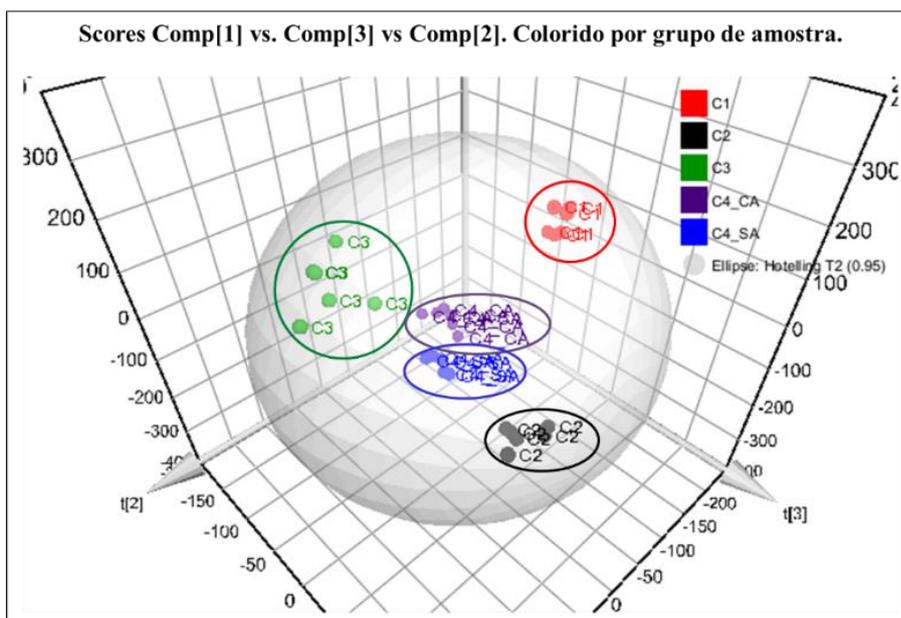
## **5.2 Análise dos Componentes Principais dos extratos de folhas da *Anacardium Occidentale* L.**

Na identificação de compostos fixos das folhas de cajueiro, notou-se que os clones analisados apresentam diferenças relativas a sua composição metabólica. Para dar suporte a essa observação, utilizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA). Os dados obtidos a partir de um modelo PCA indicam tendências sistemáticas dentro da matriz de dados, tais como agrupamentos. Esta técnica permite a visualização dos dados gerados pelo estudo metabólico dos cajueiros baseado nas semelhanças e diferenças inerentes às amostras (WIKLUND et al., 2008). Portanto, aquelas amostras que apresentam composição metabólica semelhantes tendem a se agruparem.

O gráfico em 3D da PCA (Figura 15) exibiu a formação de cinco conjuntos majoritários, representados por C1 (CCP 76), C2 (BRS 226), C3 (BRS 189), englobando ainda a diferenciação entre as plantas doente e saudável do clone 4 (BRS 265), que possuem um perfil metabólico muito semelhante, o que possivelmente contribui para que haja uma susceptibilidade acentuada para esse clone. Conclui-se então que os demais clones de cajueiro analisados realmente possuem diferentes perfis metabólicos e que a separação entre os grupos de amostras do clone 4 indica que a planta doente produz determinados metabólicos secundários que a diferencia da planta saudável. O modelo gerado apresentou discriminação

das amostras igual a 64,82% ( $R^2X[1] = 0,4284$  e  $R^2X[2] = 0,2198$ ).

**Figura 15** – Gráfico em 3D da Análise de Componentes Principais para as amostras de *Anacardium Occidentale L.*, clones C1 (CCP 76), C2 (BRS 226), C3 (BRS 189) e C4 (BRS265), analisados por UPLC-ESI-QTOF-MS(MS).



Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.3 Análise OPLS-DA dos extratos de folhas de *Anacardium Occidentale L.*

O modelo OPLS-DA foi utilizado para comparar as amostras dos clones saudáveis com a amostra do clone doente, a fim de encontrar os principais biomarcadores que podem estar relacionados aos diferentes comportamentos destas plantas frente a antracnose. Para isto foram utilizados gráficos de *scores* e gráficos de dispersão (*S-plot*).

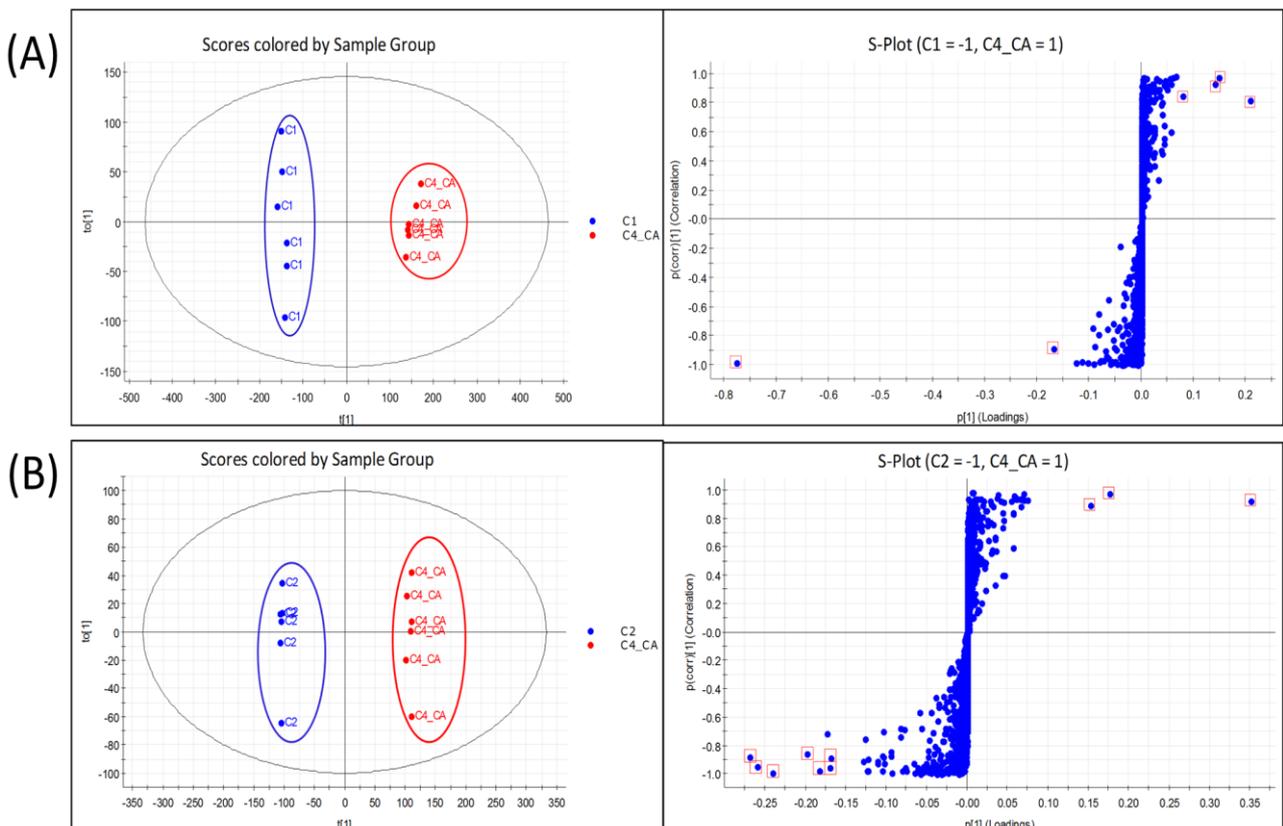
Para verificar a precisão e a confiabilidade do modelo OPLS-DA são utilizados dois parâmetros: a variável  $R^2Y$ , denominada variação explicada e a variável  $Q^2$ , dita variação predita. Em resumo,  $R^2Y$  fornece uma medida de ajuste do modelo para os dados originais, enquanto que  $Q^2$  fornece uma medida interna de consistência entre os dados originais e de previsão da validação cruzada. Os modelos com parâmetros  $R^2Y$  e  $Q^2$  próximos a 1 são considerados excelentes, embora valores acima de 0,5 sejam aceitos quando os componentes das amostras apresentam alta complexidade (CHAGAS-PAULA et al., 2015).

O gráfico de dispersão *S-plot* mostra a integração e classificação das variáveis com maior correlação e variância entre os grupos, evidenciando os metabólitos de maior relevância

no estudo. Neste gráfico cada ponto se refere a um íon, contendo informações sobre seus tempos de retenção ( $t_r$ ) e razão massa sobre carga ( $m/z$ ). Na Figura 16, os gráficos de *scores* são encontrados juntamente aos gráficos de dispersão (*S-plot*) para que assim se possa visualizar as variáveis responsáveis pela separação entre os grupos observada. Os íons discriminantes, ou seja, aqueles que se encontram nos extremos do eixo do gráfico e longe do centro que é comum aos dois grupos de amostras, são destacados em vermelho.

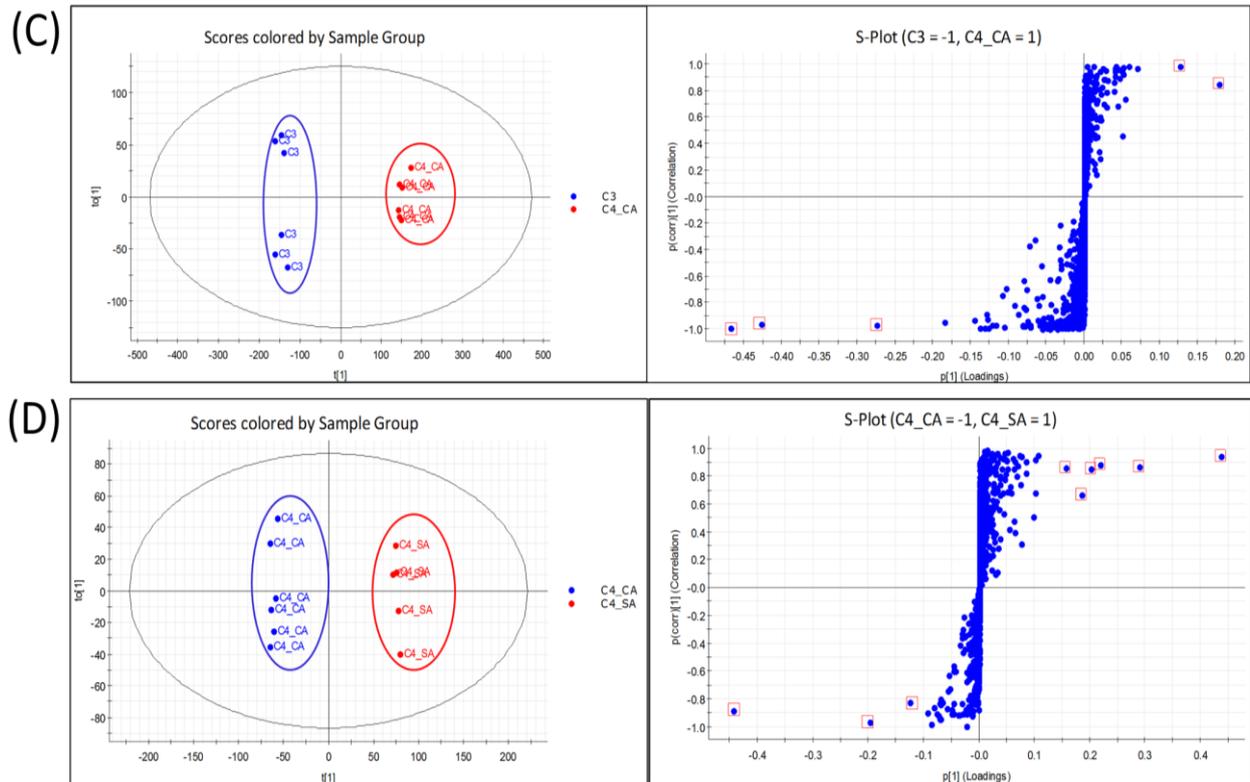
No eixo negativo dos gráficos de dispersão *s-plot* (A), (B) e (C) estão os íons responsáveis pela discriminação dos clones resistentes, ao passo que no eixo positivo estão os do clone suscetível (doente). Na comparação entre as plantas do clone 4 (D), os biomarcadores ligados a planta saudável estão no eixo superior, e no eixo inferior aqueles relacionados a planta doente. A identificação dos íons foi feita através dos seus valores de tempo de retenção–razão massa/carga ( $t_r$ - $m/z$ ) relacionando-os aos compostos previamente identificados na sessão 5.1.

**Figura 16** - Gráfico de *scores* (esquerda) e *S-plot* da OPLS-DA (direita) para os extratos de folhas da *Anacardium Occidentale L.*: (A) C1 vs C4 (doente); (B) C2 vs C4 (doente); (C) C3 vs C4 (doente) e (D) C4 (saudável) vs C4 (doente).



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 16 continuação-** Gráfico de *scores* (esquerda) e *S-plot* da OPLS-DA (direita) para os extratos de folhas da *Anacardium Occidentale L.*: (A) C1 vs C4 (doente); (B) C2 vs C4 (doente); (C) C3 vs C4 (doente) e (D) C4 (saudável) vs C4 (doente).



Fonte: Elaborada pelo autor

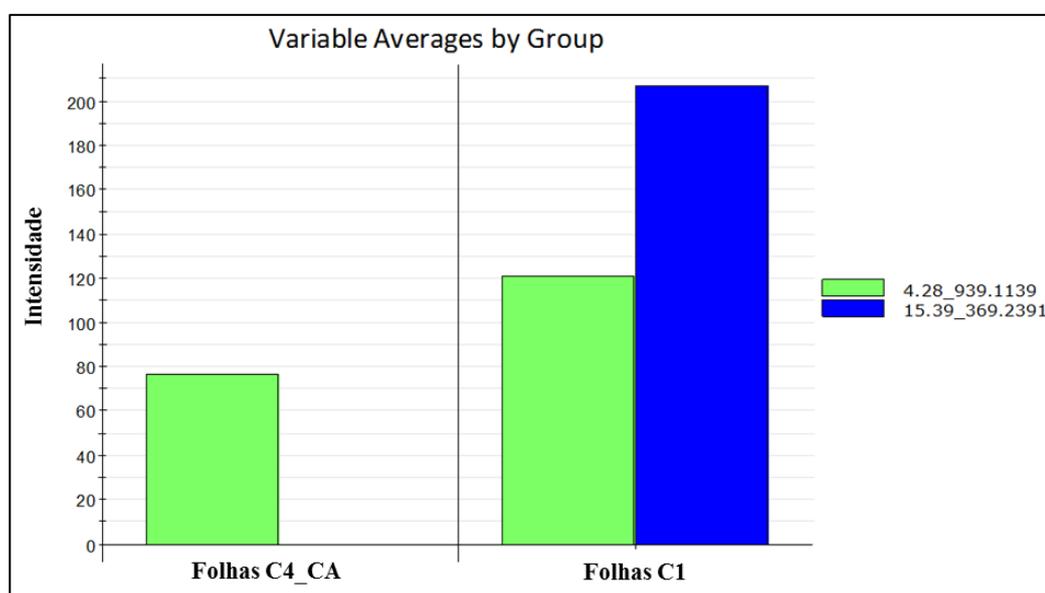
Os gráficos de *scores* da OPLS-DA, apresentados na Figura 16, mostram que todas as amostras de plantas saudáveis diferenciaram-se da planta doente, explicado pela formação de dois grupos claramente separados entre as comparações. Os valores para ambos parâmetros de qualidade do modelo foram satisfatórios (A:  $R^2Y=0,99$  e  $Q^2=0,99$ ; B:  $R^2Y=0,99$  e  $Q^2=0,99$ ; C:  $R^2Y=0,99$  e  $Q^2=0,98$ ; D:  $R^2Y=0,99$  e  $Q^2=0,97$ ), sugerindo que há uma diferença estatística significativa entre as composições metabólicas das amostras analisadas e que os resultados são robustos.

### 5.3.1 Biomarcadores de resistência

Os compostos penta-*O*-galoil-glucosídeo ( $t_R=4,28$  e  $m/z$  939,1139) e o ácido anacárdico 17:3 ( $t_R=15,39$  e  $m/z$  369,2391) foram os responsáveis pela diferenciação do clone 1 em relação ao clone 4 (doente). A contribuição deste último para a planta doente foi

inexistente (figura 17), mostrando que esse composto é um potencial biomarcador de resistência do clone 1. MUZAFFAR et al (2016) conseguiu utilizar ácidos anacárdicos provenientes do LCC para inibir a germinação de conídios e o crescimento micelial do fungo *Magnaporthe oryzae* presente em amostras de arroz, comprovando assim que a presença desses compostos pode conferir as plantas proteção natural contra o ataque de fungos.

**Figura 17** - Variação média dos discriminantes do extrato etanólico do clone 1 em relação ao clone 4 (doente).



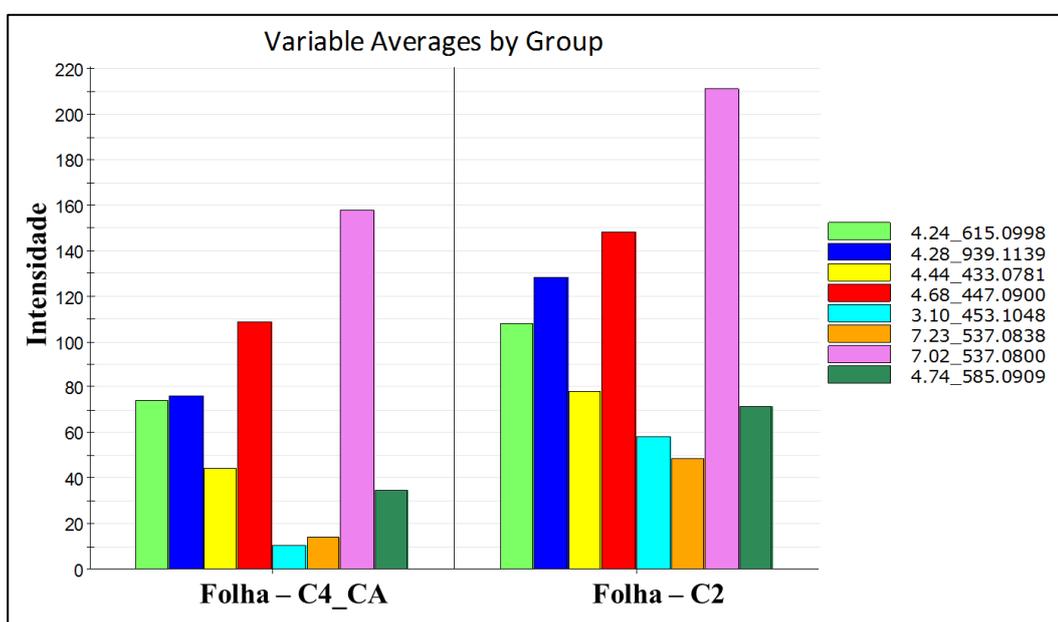
Fonte: Elaborada pelo autor

A diferenciação do clone 2 em relação a planta doente do clone 4 (Figura 16 - B) deu-se pela presença de um total de 7 biomarcadores, sendo em sua maioria derivados de quercetina, tais como: quercetina galoil hexosídeo ( $t_R = 4,25$ ), quercetina-3-*O*-xilósídeo ( $t_R = 4,43$ ), quercetina-3-*O*-raminosídeo ( $t_R = 4,69$ ) e quercetina galoil pentosídeo ( $t_R = 4,75$ ). As quercetinas são flavonóides que apresentam uma ampla capacidade em inibir a germinação de esporos patogênicos em plantas, devido principalmente a sua natureza lipofílica que é capaz de romper as membranas dos fungos (SIMÕES et al., 2003; ARIF et al., 2011). Portanto, a presença desses compostos pode estar contribuindo diretamente na resistência deste clone ao fungo *Colletotrichum Gloeosporioides*.

Os compostos penta-*O*-galoil-glucosídeo ( $t_R = 4,28$  e  $m/z = 939,1139$ ), hidroximetoxifenil-*O*-(*O*-galoil)-hexose ( $t_R = 3,09$  e  $m/z = 453,4048$ ) e amentoflavona/agatisflavona ( $t_R = 7,02$  e  $m/z = 537,0800$ ) também foram relacionados a discriminação do clone 2.

Entretanto, a amentoflavona ou agatisflavona foi o biomarcador que apresentou a maior contribuição para a planta saudável, como mostra a Figura 18, indicando que este composto pode ser o principal responsável pela resistência deste clone. A atividade antifúngica da amentoflavona contra diversas linhas de fungos patogênicos já foi citada por JUNG et al (2006).

**Figura 18** - Variação média dos discriminantes do extrato etanólico do clone 2 em relação ao clone 4 (doente).

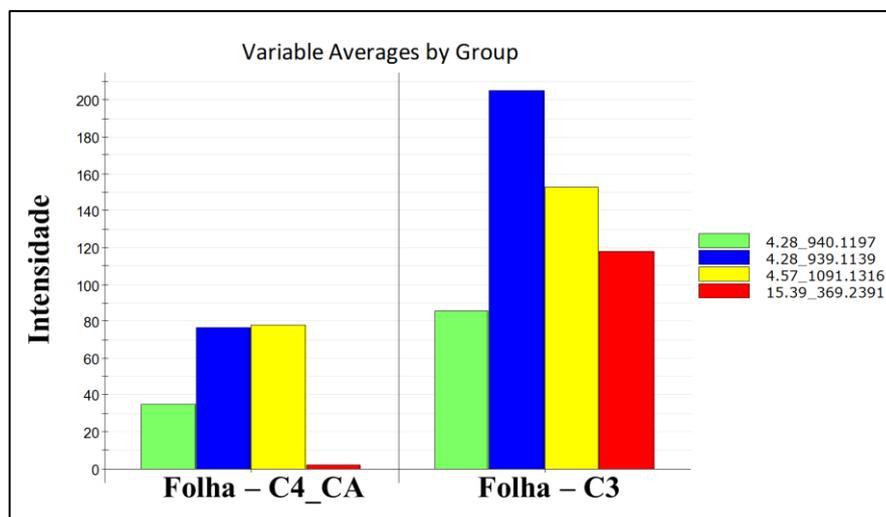


\*N.I ( $m/z$  537,0838); Quercetina Galoil Hexosídeo ( $m/z$  615,0998 Da); Penta-*O*-galoil-glucosídeo ( $m/z$  939,1139 Da); Quercetina-3-*O*-xilósídeo ( $m/z$  433,0781 Da); Quercetina-3-*O*-rhaminosídeo ( $m/z$  447,0900); Hidroximetoxifenil- *O*-(*O*-galoil)-hexose ( $m/z$  453,1045 Da); Amentoflavona ou agatisflavona ( $m/z$  537,0800 Da); Quercetina galoil pentosídeo ( $m/z$  585,0909 Da).

Fonte: Elaborada pelo autor

Os compostos ligados a diferenciação da planta saudável do clone 3 em relação a planta doente do clone 4 (Figura 16 – C) foram os galotaninos penta-*O*-galoil-glucosídeo e hexagaloil hexosídeo, além do ácido anacárdico (17:3). A Figura 19 mostra o gráfico de variação da intensidade dos compostos da folha do clone 3 com relação as folhas do clone 4 (doente), onde é possível observar que apesar do clone doente também apresentar o penta-*O*-galoil-glucosídeo e o hexagaloil hexosídeo em sua composição, a intensidade dos mesmos é inferior. O mesmo acontece para o ácido anacárdico (17:3), em uma maneira muito mais pronunciada. É possível concluir então que a presença desses compostos pode estar diretamente relacionada a resistência apresentada pelo clone 3.

**Figura 19** - Variação média dos discriminantes do extrato etanólico do clone 3 em relação ao clone 4 (doente).



\*N.I ( $m/z$  940,1197); Penta-*O*-galoil-glucosídeo ( $m/z$  939,1139 Da); Hexagaloil glucosídeo ( $m/z$  10991,1316 Da); Ácido anacárdico (17:3) ( $m/z$  433,0781 Da)

Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.3.1 Biomarcadores de suscetibilidade

Os modelos de OPLS-DA gerados para comparar as amostras dos diferentes clones de cajueiro anão-precoce mostraram uma diferenciação entre os clones, inclusive entre as plantas doente e saudável do clone 4. Apesar de ambas as amostras serem da mesma planta e terem sido coletadas a partir de uma mesma região, a diferenciação entre as mesmas ocorre, como mostrado na Figura 16 - D. Isso é devido as amostras da planta doente estarem expostas ao estresse biótico causado pelo fungo tendo como consequência a produção de metabólitos secundários que têm como função proteger a planta.

As folhas da planta saudável do clone 4 apresentaram comportamento semelhante as do clone 2, diferenciando-se da planta doente pela presença de derivados de quercetina e penta-*O*-galoil-hexosídeo como biomarcadores. A miricitina-3-*O*-glucosídeo também foi identificada como responsável pela diferenciação da planta saudável. Como citado na sessão anterior, a presença desses compostos confere a planta proteção natural contra microrganismos invasores, portanto eles podem ter contribuído para que esta planta não fosse infectada pelo fungo.

Os íons responsáveis pela diferenciação da planta doente do clone 4 de todas as outras plantas saudáveis são considerados potenciais biomarcadores desta planta e encontram-

se representados na Tabela 7:

**Tabela 7** – Potenciais biomarcadores da planta doente do clone 4.

	Compostos	Tempo de retenção	Massa
<b>C1 vs C4_CA</b>	Monogalato de dímero de procianidina tipo B	3,71	729,1516
	Procianidina tipo B - dímero	2,74	577,1382
	2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxibenzoil) oxibenzoato de etilo	5,44	349,0543
	Catequina	3,01	289,0669
<b>C2 vs C4_CA</b>	Catequina	3,01	289,0669
	Dímero de procianidina tipo B	2,74	577,1382
	2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxibenzoil) oxibenzoato de etilo	5,44	349,0543
<b>C3 vs C4_CA</b>	Catequina	3,01	289,0669
	Procianidina tipo B - Dímero	2,74	577,1382
<b>C4_SA vs C4_CA</b>	Monogalato de dímero de procianidina	3,71	729,1516
	Catequina	3,01	289,0669
	Procianidina tipo B- dímero	2,74	577,1382

Fonte: Elaborada pelo autor

Um total de quatro compostos foram relacionados a discriminação da planta doente do clone 4 dos demais clones analisados. Dentre esses compostos destacaram-se a catequina e o dímero de procianidina do tipo B, estando presentes em todos os gráficos de dispersão (*S-plot*). Portanto, pode-se dizer que essas substâncias estão sendo produzidas a fim de defender a planta contra o ataque do patógeno da antracnose, ou seja, esses dois compostos estão dando uma resposta ao estresse biótico ao qual a planta foi submetida.

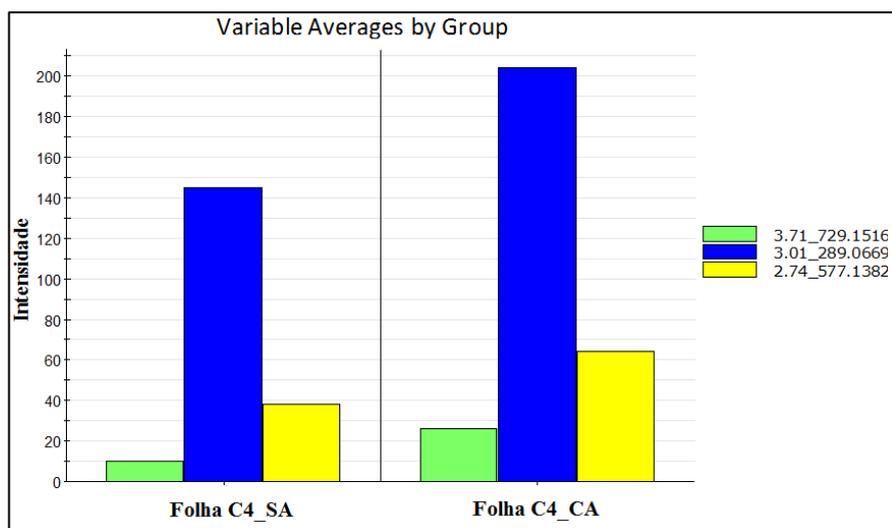
A Figura 20 mostra o gráfico da variação de intensidade dos componentes da planta doente com relação aos da planta saudável do extrato etanólico das folhas do clone 4. Analisando o gráfico, é possível verificar que as plantas saudáveis também apresentam os compostos catequina, monogalato de procianidina tipo B e dímero de procianidina do tipo B em sua composição, porém em quantidades inferiores a planta doente. Portanto, subentende-se que as folhas deste clone apresentam a produção desses metabólitos secundários em ambas as plantas saudáveis e doentes, porém quando o cajueiro é infectado, os mesmos agem na sua defesa a fim de evitar a disseminação do fungo para outras partes da planta.

Apesar de essas substâncias serem expressas em função da infecção no que se refere ao clone 4, como uma tentativa de defesa da planta, fica latente que as mesmas não possuem uma efetividade quando comparadas aos demais clones estudados (C1 a C3). Muito provavelmente por questões genéticas o clone 4 não produz em sua rota Biosintética os mesmos biomarcadores que conferem resistência a antracnose, como foi verificado nas análises quimiométricas.

Portanto os biomarcadores encontrados para o clone 4 fornecem uma informação interessante do ponto de vista da suscetibilidade, pois esse grupo de substâncias identificadas podem ser um indicativo de que não somente o clone 4, mas também quaisquer outros genótipos de caju que possuem tais substâncias como majoritárias em sua composição química, em comparação aos biomarcadores de resistência identificados nesse trabalho, podem indicar que tais genótipos não seriam adequados para serem utilizados nos programas de melhoramento genético do caju.

Na prática, tais resultados podem acelerar a seleção de genótipos viáveis levando a economia de recursos e a um ganho de tempo considerável. Essa perspectiva é aplicável tanto do ponto de vista das informações geradas através dos biomarcadores de suscetibilidade quanto dos biomarcadores de resistência. Ou seja, o perfil metabólico pode ser usado como uma opção de escolha de genótipos candidatos a futuros acessos resistentes a antracnose.

**Figura 20** - Variação média dos discriminantes do extrato etanólico do clone 4 (saudável) em relação ao clone 4 (doente).



\* Monogalato de dímero de procianidina ( $m/z$  729,1516 Da); Catequina ( $m/z$  289,0669 Da); Procianidina tipo B-dímero ( $m/z$  577,1382 Da).

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 6 CONCLUSÃO

O método de extração utilizado demonstrou ser de fácil e rápida execução, além de bastante eficiente na extração de compostos fenólicos, principalmente flavonóides. A análise dos extratos por UPLC-ESI-QTOF-MS(MS) permitiu a identificação tentativa de um total de 40 compostos nos quatro clones estudados, sendo alguns descritos pela primeira vez na espécie *Anacardium Occidentale L.* Portanto, a presente pesquisa apresenta-se como uma ótima fonte de informações para o desenvolvimento de futuros trabalhos.

Os métodos quimiométricos (PCA, OPLS-DA e *S-plot*) serviram de base para identificar as diferenças nos perfis metabólicos das folhas de cajueiro e auxiliaram na identificação de dez biomarcadores ligados a resistência das plantas à antracnose. Esses compostos ativos são potenciais candidatos a produção de defensivos agrícolas naturais, que poderão apresentar vantagens como um impacto ambiental reduzido.

As análises OPLS-DA e *S-plot* também mostraram que a discriminação da planta doente do clone 4 dos demais clones estudados deu-se, principalmente, pela presença de dois biomarcadores de suscetibilidade, sendo eles: procianidina do tipo B e catequina. Essa análise revelou que ao sofrer um estresse biótico, causado pela presença do fungo *Colletotrichum Gloesporioides*, a planta produz determinados flavonóides essenciais para a proteção da planta.

Os resultados desse trabalho podem acelerar a seleção de genótipos viáveis levando a economia de recursos e a um ganho de tempo considerável. Essa perspectiva é aplicável tanto do ponto de vista das informações geradas através dos biomarcadores de suscetibilidade quanto dos biomarcadores de resistência. Ou seja, o perfil metabólico pode ser usado como uma opção de escolha de genótipos candidatos a futuros acessos resistentes a antracnose.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179–191, 2015.
- ARIF, T. et al. Antifungal agents derived from plants. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. **Natural products**, v.81, p. 283 – 311, 2011.
- AVULA, B. et al. Determination of shikimic acid in fruits of *Illicium* species and various other plant samples by LC-UV and LC-ESI-MS. **Chromatographia**, v. 69, n. 3/4, p. 307–314, 2008.
- BARRETO, L. C. DE O. B. et al. *Anacardium Occidentale* L.: prospecção tecnológica aplicada à tecnologia de compostos bioativos em produtos alimentícios. **GEINTEC**, v. 4, p. 1356–1366, 2014.
- BARROS, L. DE M. et al. **Recomendações Técnicas para a Cultura do Cajueiro-anão-precoce**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, 1993.
- CARDOSO, J. E. et al. Doenças do cajueiro. **Pragas e Doenças do cajueiro**, v. 22, p. 11–13.
- CASTRO, H. G. DE et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2<sup>a</sup> ed. Visconde do Rio Branco, 2004.
- CAVALCANTI, J. J. V.; NETO, F. DAS C. V.; BARROS, L. DE M. Avanços , desafios e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil. In: **Avanços, desafios e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil**. p. 151–174.
- CHAGAS-PAULA, D. A. et al. A Metabolomic Approach to Target Compounds from the Asteraceae Family for Dual COX and LOX Inhibition. **Metabolites**, v. 5, n. 3, p. 404–430, 2015.
- CHAVES, M. H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 106–112, 2010.
- CORREIA, S. DE J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos Secundários de Espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287–1300, 2006.
- CRISÓSTOMO, L. A. et al. **Cultivo do cajueiro anão precoce: aspectos fitotécnicos com ênfase na adubação e na irrigação**. 2001.
- DORTA, E. et al. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. **Food Research International**, v. 57, p. 51–60, 2014.
- DOU, J. et al. Identification and Comparison of Phenolic Compounds in the Preparation of Oolong Tea Manufactured by Semifermentation and Drying Processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7462–7468, 2007.

- ERNST, M. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **The Royal Society of Chemistry**. São Paulo, SP. p. 784–806, 2013.
- 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)-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 26, p. 5334–5344, 2016.
- FADEYI, O. E.; OLATUNJI, G. A.; OGUNDELE, V. A. Isolation and Characterization of the Chemical Constituents of *Anacardium occidentale* Cracked Bark. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 3, n. 5, p. 1–5, 2015.
- FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.
- FRAIGE, K. **TESE - Estudo comparativo do perfil metabolômico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bioanalíticas**. Universidade de São Carlos. São Carlos, p. 210. 2012.
- FREEMAN, S. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Eds.) *Colletotrichum: Host specificity, Pathology and Host-pathogen interaction*. APS Press, St. Paul, p.131-143, 2000.
- FREIRE, F. DAS C.O.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A.; VIANA, F. M. P. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. v. 21, p. 489–494, 2002.
- FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.
- GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna. 356 p., 2011.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GOMES, L. A. L. **DISSERTAÇÃO - Investigação metabolômica da toxicidade da cocaína em ratos submetidos à privação de sono, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 148. 2013.
- GRACE, M. H. et al. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts. **Food Chemistry**, v. 210, p. 85–95, 2016.
- HARRIS C., D. **Análise Química Quantitativa**. 8th. ed. [s.l.] LTC, 2012.
- HOKKANEN, J. et al. Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) Leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9437–9447, 2009.
- IGLESIAS, H. A. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida - Espectrometria de

- massas. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1–13, 2013.
- JUNG, H. J. et al. ANTIFUNGAL EFFECT OF AMENTOFLAVONE DERIVED FROM SELAGINELLA TAMARISCINA. **Arch Pharm**, v. 29, n. 9, p. 746–751, 2006.
- JÚNIOR, A. T. C.; CHAVES, J. C. M. **Produção de mudas de cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 42 p., 2001.
- KHAKIMOV, B. B.; GURDENIZ, G.; ENGELSEN, S. B. Trends in the Application of Chemometrics to Foodomics Studies. **Acta Alimentaria**, v. 44, n. 1, p. 4–31, 2015.
- KIM, J. et al. Correlation between antioxidative activities and metabolite changes during Cheonggukjang fermentation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 4, p. 732–739, 2011.
- KRASTANOV A. Metabolomics – The State of Art. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Plovdiv, Bulgária, v. 24, n. 1, p. 1537-1543, Abril 2010. ISSN DOI: 10.2478/V10133-010-0001-Y.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? v. 5, n. 1, p. 27–46, 2013.
- LEITE, A. D. S. et al. Pharmacological properties of cashew ( *Anacardium occidentale* ). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 35, p. 1855–1863, 2016.
- LI, J. et al. Identification of chemical composition of leaves and flowers from paeonia rockii by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 947, 2016.
- LIMA, G. A. DE S. Panorama sobre a Cajucultura no Ceará. **Companhia Nacional de Abastecimento**, 4 p., 2013.
- LIU, Z. et al. The modulatory effect of infusions of green tea, oolong tea, and black tea on gut microbiota in high-fat-induced obese mice. **Food Funct.**, 2016.
- LOPEZ, A. M. Q.; LUCAS, J. A. Colletotrichum isolates related to anthracnose of cashew trees in Brazil: Morphological and molecular description using LSU rDNA sequences. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 741–752, 2010.
- LUIZ, J.; DANTAS, L.; SAMPAIO, C. V. Fruticultura Tropical espécies regionais e exóticas. **Embrapa Informação Tecnológica**, 2009.
- MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Oleo da castanha de caju: Oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 732–741, 2009.
- MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Cadernos de Ciência & Tecnologia. 2001.
- MUZAFFAR, S. et al. Anacardic acid induces apoptosis-like cell death in the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 323, 2016.
- NEHME, C. J. et al. Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from

leaves of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 8, p. 602–611, ago. 2008.

NG, L. K.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of cigarette tobacco by direct electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (ESI-ITMS) analysis of the aqueous extract - A novel and simple approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7251–7257, 2004.

PAIVA, J. R. DE; CRISÓSTOMOS, J. R.; BARROS, L. DE M. Recursos genéticos do cajueiro: coleta, conservação e utilização. **Documentos EMBRAPA 65 - Agroindústria Tropical**, p. 43, 2003.

PAIVA, F. F. DE A. et al. **Processamento de Castanha de Caju**. 2006.

RABANY, C.; RULLIER, N.; RICAU, P. The african cashew sector in 2015. October, 2015.

REDDY, T. S. K.; BALAMMAL, G.; KUMAR, A. S. Ultra Performance Liquid Chromatography: an Introduction and Review. **International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis**, v. 2, n. 1, p. 24–31, 2012.

ROCKENBACH, I. I. et al. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 848–855, 2012.

ROUSSEL, S. et al. Multivariate Data Analysis (Chemometrics). In: **Process Analytical Technology for the Food Industry**. Nova York. v. 3, p. 7–16.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, 2013.

SANTOS-SEREJO, J. A. DOS et al. **Fruticultura Tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica. 2009.

SANTOS, F. O. Atividades Biológicas de *ANACARDIUM OCCIDENTALE* (Linn). 2011.

SANTOS, F. O. et al. Antibacterial evaluation of *Anacardium occidentale* (Linn) (*Anacardiaceae*) in semiarid Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 30, p. 4836–4840, 2013.

SCHIEBER, A.; BERARDINI, N.; CARLE, R. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. “Tommy Atkins”) peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 5006–5011, 2003.

SHUKRI, M. A. M.; ALAN, C. Analysis of phenolics in *Anacardium occidentale* shoot extracts using a reversed-phase high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS). **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 38, n. 2, p. 221–230, 2010.

SILVA, J. G DA. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de**

**Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572–577, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed.rev.a. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TEÓFILO, R. F. **Métodos Quimiométricos : Uma Visão Geral - Conceitos básicos de quimiometria**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **Journal of Chemometrics**, v. 16, n. 3, p. 119–128, 2002.

VILAR, M. et al. Assessment of Phenolic Compounds and Anti-Inflammatory Activity of Ethyl Acetate Phase of *Anacardium occidentale* L. Bark. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 17, 2016.  
WEHRENS, R. **Chemometrics with R Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences**. Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 2011.

WIKLUND, S. et al. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 115–122, 2008.

YAN, T. et al. Characterisation of proanthocyanidins from *Schisandra chinensis* seed coats by UPLC-QTOF/MS. **Natural product research**, v. 28, n. 21, p. 1834–1842, 2014.