



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NAIARA RAICA LOPES DE OLIVEIRA

**Quantificação de compostos bioativos e avaliação da
diversidade molecular em espécies de *Anacardium
humile* e *Anacardium occidentale***

Goiânia
2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

NAIARA RAICA LOPES DE OLIVEIRA

3. Título do trabalho

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR EM ESPÉCIES DE ANACARDIUM HUMILE E ANACARDIUM OCCIDENTALE

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Naiara Raica Lopes De Oliveira, Técnico de Laboratório**, em 25/11/2025, às 10:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Boniek Gontijo Vaz, Professor do Magistério Superior**, em 08/12/2025, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5809827** e o código CRC **9880631C**.

NAIARA RAICA LOPES DE OLIVEIRA

**Quantificação de compostos bioativos e avaliação da
diversidade molecular em espécies de *Anacardium
humile* e *Anacardium occidentale***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador(a): Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz
Co-orientador: Dr. Gabriel Franco dos Santos

Goiânia

2026

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira, Naiara Raica Lopes de
QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA
DIVERSIDADE MOLECULAR EM ESPÉCIES DE ANACARDIUM HUMILE E
ANACARDIUM OCCIDENTALE [manuscrito] / Naiara Raica Lopes de Oliveira. -
2026.

139 f.: 2026

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz; co-orientador: Dr. Gabriel Franco dos Santos

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2026.

Apêndice.

Bibliografia.

Inclui: siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Cajuzinho do Cerrado. 2. Caju. 3. Lc-ms/ms. 4. Polifenóis. 5. Antioxidante.

I. Vaz, Boniek Gontijo, orient. II. Santos, Gabriel Franco dos , co-orient. III. Título.
CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **265** da sessão de Defesa de Tese de **NAIARA RAICA LOPES DE OLIVEIRA** que confere o título de Doutora em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **dezesete dias do mês de outubro de dois mil e vinte e cinco**, através de **videoconferência**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR EM ESPÉCIES DE ANACARDIUM HUMILE E ANACARDIUM OCCIDENTALE**”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Professor Doutor Boniek Gontijo Vaz (IQ/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professor Doutor José Realino de Paula (FF/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, membro titular interno; **Professora Doutora Silvana Maria Zucolotto Langassner (UFRN) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, membro titular externo; **Professora Doutora Joelma Abadia Marciano de Paula (UEG)**, membro titular externo; **Professor Doutor Alessandro de Carvalho Cruz (UNIFIMES)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professor Doutor Boniek Gontijo Vaz (IQ/UFG) - cuja participação ocorreu através de videoconferência**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **dezesete dias do mês de outubro de dois mil e vinte e cinco**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Boniek Gontijo Vaz, Professor do Magistério Superior**, em 08/12/2025, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandro De Carvalho Cruz, Usuário Externo**, em 08/12/2025, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Realino De Paula, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2025, às 12:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Kogawa, Vice-Coordenadora de Pós-Graduação**, em 10/12/2025, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joelma Abadia Marciano de Paula**, **Usuário Externo**, em 11/12/2025, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5838359** e o código CRC **91FC530F**.

Referência: Processo nº 23070.053859/2025-50

SEI nº 5838359

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. José Realino de Paula

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Ana Carolina Kogawa

Goiânia-GO

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BANCA EXAMINADORA

Aluna: Naiara Raica Lopes de Oliveira

Orientador: Boniek Gontijo Vaz

Boniek Gontijo Vaz

Professor Associado do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, IQ/UFG.

José Realino de Paula / Membro Titular

Professor Titular do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, IQ/UFG.

Joelma Abadia Marciano de Paula / Membro Titular

Professora Efetiva do Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Goiás, UEG.

Silvana Maria Zucolotto Langassner/ Membro Titular

Professora Associada do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN.

Alessandro de Carvalho Cruz / Membro Titular

Professor Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES) e Faculdade Estácio de Sá

Pierre Alexandre dos Santos / Membro Suplente

Professor Associado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Maria Teresa Freitas Bara / Membro Suplente

Professora Emérita da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Data: 17 de outubro de 2025

Dedico esta tese aos meus filhos, Bento, minha alegria presente, e Lara, que ainda está a caminho, mas já ilumina meus dias. Vocês são a razão da minha força, a inspiração da minha vida e o maior presente que poderia receber. Ao meu irmão, Bérqson (in memoriam), cuja lembrança permanece viva e sempre me inspira.

Agradeço à Deus por me capacitar, dar sabedoria e força para superar os desafios ao longo desta jornada.

Aos meus pais, Claudiomar e Ilda, não há palavras que possam expressar minha gratidão. Obrigada pelo amor incondicional, pelos sacrifícios silenciosos e por sempre acreditarem em mim, ensinando-me que a educação é a chave para transformar sonhos em realidade.

Ao meu marido, Jerônimo Neto, meu porto seguro e meu maior incentivador. Obrigada por toda a paciência, pelos abraços aconchegantes nos dias de cansaço, por cada palavra de apoio nos momentos difíceis e por ser o meu melhor amigo em cada etapa dessa jornada. Sem o seu apoio, nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador, Boniek Gontijo, por toda dedicação, paciência e valiosos ensinamentos.

Ao meu coorientador, Gabriel dos Santos, agradeço pelas valiosas contribuições, discussões enriquecedoras e pelo apoio constante em cada fase deste projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos, que foi essencial para a minha formação acadêmica e profissional.

Aos colegas do LaCEM/CEMEP, em especial ao Lucas, Hugo, João, Lanaia e Nerilson, pela convivência, pelas trocas de experiências e pelos momentos de aprendizado.

À querida Fernanda Belato, que vai muito além de ser a secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Sua amizade, conselhos e cuidado, sempre com a serenidade que lhe é tão característica, transformaram os momentos mais difíceis em experiências mais leves e suportáveis. Minha gratidão será eterna.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, pela estrutura, pelo ensino de qualidade e por proporcionarem um ambiente adequado para a pesquisa e o desenvolvimento científico.

À Universidade Federal de Goiás (UFG), instituição que me acolheu desde a graduação e que tenho orgulho de pertencer, pelo compromisso com a educação pública e de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo indispensável fomento a este projeto de pesquisa e à CAPES pelo apoio financeiro que foi crucial para a execução e conclusão desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho. Cada palavra de incentivo, gesto de apoio e demonstração de carinho tiveram papel essencial para que eu chegasse até aqui.

"A persistência é o caminho do êxito.."
— Charles Chaplin.

Quantificação de compostos bioativos e avaliação da diversidade molecular em espécies de *Anacardium humile* e *Anacardium occidentale***Naiara Raica L. de Oliveira, Gabriel F. dos Santos, Boniek Gontijo Vaz¹**¹Laboratório Multiusuário de Análises Químicas e Biológicas para Desenvolvimento e Inovação (LABFAR), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás - UFG.

O caju tem se destacado pelo potencial na prevenção de doenças degenerativas crônicas e do envelhecimento precoce, devido às propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citoprotetoras de compostos bioativos, como carotenoides, flavonoides, taninos e vitaminas presentes em seus frutos. Embora *Anacardium occidentale* seja a espécie mais cultivada e estudada, outras espécies nativas, como *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado), permanecem pouco exploradas. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar quantitativamente compostos bioativos e explorar o perfil químico comparativo entre as duas espécies. Foram analisadas 42 amostras de *A. humile* e 30 de *A. occidentale* provenientes de diferentes regiões do Estado de Goiás e Distrito Federal. Ensaio antioxidante foram realizados pelos métodos ABTS e DPPH. Dois métodos analíticos por LC-MS/MS foram desenvolvidos e validados para a quantificação de 12 compostos bioativos. Além disso, foi conduzida uma abordagem metabolômica não direcionada em modo positivo, com anotação preliminar pela plataforma GNPS. Os dados foram submetidos a análises estatísticas univariadas (ANOVA) e multivariadas (HCA, PCA, k-means e PLS-DA) para avaliação de diferenças químicas entre as espécies. Os ensaios de ABTS e DPPH revelaram elevada atividade antioxidante em ambas as espécies, sem diferenças significativas entre elas. O método de LC-MS/MS apresentou linearidade adequada com alta correlação ($r = 0,9942-0,9993$), boa precisão (RSD < 12,84%) e exatidão (87,70–110,78%). Foram quantificados ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina, ácido gálico, catequina, cianidina, isoquercetina, epicatequina e ácido ascórbico, enquanto o ácido clorogênico e o kaempferol não foram detectados. O ácido ascórbico foi o composto mais abundante em ambas as espécies, com maiores concentrações no *A. occidentale*. A análise univariada indicou diferenças significativas em cinco metabólitos: catequina e rutina foram mais abundantes em *A. humile*, enquanto quercetina, isoquercetina e ácido ascórbico predominaram em *A. occidentale*. A análise metabolômica revelou diferentes classes químicas e, nas análises multivariadas, observou-se clara distinção entre as espécies. Foram identificados íons discriminantes com elevado poder de separação. Esses resultados reforçam o potencial das abordagens metabolômicas associadas à quantificação dirigida para a compreensão da diversidade química do gênero *Anacardium* e de seus possíveis benefícios nutricionais e funcionais.

Palavras-chave: caju, cajuzinho do cerrado, LC-MS/MS, polifenóis; antioxidante.

Agradecimentos: CNPq, CAPES e FAPEG.

**Bioactive Compound Quantification and Molecular Diversity Analysis in
Anacardium humile and *Anacardium occidentale***

Naiara Raica L. de Oliveira, Gabriel F. dos Santos, Boniek Gontijo Vaz¹

¹Laboratório Multiusuário de Análises Químicas e Biológicas para Desenvolvimento e Inovação (LABFAR), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás - UFG.

Cashew has gained prominence for its potential in preventing chronic degenerative diseases and premature aging, due to the antioxidant, anti-inflammatory, and cytoprotective properties of bioactive compounds such as carotenoids, flavonoids, tannins, and vitamins present in its fruits. Although *Anacardium occidentale* is the most cultivated and studied species, other native species, such as *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado), remain poorly explored. This study aimed to quantitatively evaluate bioactive compounds and explore the comparative chemical profile between the two species. A total of 42 samples of *A. humile* and 30 of *A. occidentale* from different regions of the State of Goiás and the Federal District were analyzed. Antioxidant assays were performed using the ABTS and DPPH methods. Two LC-MS/MS analytical methods were developed and validated for the quantification of 12 bioactive compounds. In addition, a non-targeted metabolomic approach was conducted in positive ionization mode, with preliminary annotation performed through the GNPS platform. The data were subjected to univariate (ANOVA) and multivariate (HCA, PCA, k-means, and PLS-DA) statistical analyses to assess chemical differences between species. ABTS and DPPH assays revealed high antioxidant activity in both species, with no significant differences between them. The LC-MS/MS method showed appropriate linearity with high correlation ($r = 0.9942\text{--}0.9993$), good precision ($RSD < 12.84\%$), and accuracy (87.70–110.78%). Caffeic acid, ferulic acid, quercetin, gallic acid, catechin, cyanidin, isoquercitrin, epicatechin, and ascorbic acid were quantified, while chlorogenic acid and kaempferol were not detected. Ascorbic acid was the most abundant compound in both species, with higher concentrations in *A. occidentale*. The univariate analysis indicated significant differences in five metabolites: catechin and rutin were more abundant in *A. humile*, while quercetin, isoquercitrin, and ascorbic acid predominated in *A. occidentale*. The metabolomic analysis revealed different chemical classes, and the multivariate analyses showed clear discrimination between the species. Discriminant ions with high separation power were identified. These findings reinforce the potential of metabolomic approaches combined with targeted quantification to broaden the understanding of the chemical diversity of the *Anacardium* genus and support future investigations into its nutritional and functional benefits.

Keywords: cashew; “cajuzinho do cerrado”; LC-MS/MS; polyphenol; antioxidant.

Acknowledgements: CNPq, CAPES e FAPEG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto do Caju, destacando o fruto conhecido como castanha e o pedúnculo, dito pseudofruto.....	25
Figura 2. Comparação do tamanho do (a) Caju comum (<i>A. occidentale</i>), cerca de 10 cm e (b) cajuzinho do cerrado (<i>A. humile</i>), cerca de 3 cm.....	26
Figura 3. Classificação dos compostos fenólicos, com representação dos principais subgrupos e suas respectivas estruturas químicas e substituintes. Fonte: Autoria própria...	29
Figura 4. Reação de estabilização do radical DPPH por ação de um antioxidante. Adaptado de Becker et al. (2019) (132).....	40
Figura 5. Reação de formação e estabilização de radical ABTS por ação antioxidante.....	41
Figura 6. Mapa de localização dos pontos de coleta do caju e cajuzinho do cerrado.....	48
Figura 7. Cromatogramas obtidos (a) modo negativo método 1; (b) modo positivo método 1; (c) método 2.....	71
Figura 8. Resultado da quantificação dos compostos bioativos, por LC-MS/MS, em amostras de cajuzinho do cerrado.....	82
Figura 9. Resultado da quantificação dos compostos bioativos, por LC-MS/MS, em amostras de caju <i>A. occidentale</i>	83
Figura 10. Características dos conteúdos de compostos bioativos nas amostras de caju e cajuzinho de cerrado. (A) Mapa de calor dos conteúdos de compostos bioativos, quercetina, catequina, rutina, isoquercetina e ácido ascórbico, nas amostras de caju e cajuzinho do cerrado em diferentes localidades.(B) Boxplots exibindo a distribuição destes compostos nas duas espécies de caju.....	89
Figura 11. Distribuição das espécies <i>A. occidentale</i> e <i>A. Humile</i> com base na Análise de Componentes Principais (PCA) dos compostos bioativos.....	90
Figura 12. Análise Hierárquica de Cluster (HCA) de 72 amostras de LC-MS ESI(+). “A” = amostras de <i>A. humile</i> , “B” = amostras de <i>A. occidentale</i>	104
Figura 13. A) Análise de Componentes Principais destacando as amostras A1_01 e A12_03; B) PCA combinada com agrupamento K-means das 72 amostras analisadas.....	105
Figura 14. <i>Volcano plot</i> destacando íons com diferenças estatísticas ($p < 0,05$) e numéricas ($\log_2(\textit{fold-change}) > 1$) entre espécies.....	107
Figura 15. A) Scores plot da PLS-DA (dois primeiros componentes); B) Métricas de	

desempenho do modelo (acurácia, R^2 , Q^2) em função do número de componentes.....	108
Figura 16. Sobreposição entre variáveis VIP > 1 do PLS-DA e íons significativos da análise do gráfico de vulcão.....	110
Figura 17. Mapa de calor dos 10 principais íons com maiores pontuações VIP (PLS-DA) e significância estatística (Volcano), com base em dados ESI(+).	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Siglas, localidades e imagens das amostras de <i>A. humile</i> liofilizadas e do fruto in-natura.....	52
Tabela 2. Siglas, localidades e imagens das amostras de <i>A. occidentale</i> liofilizadas e do fruto in-natura.....	54
Tabela 3. Compostos bioativos: sigla, estrutura, classificação química e faixa linear de quantificação.....	60
Tabela 4. Capacidade antioxidante dos extratos de caju pelos métodos de DPPH e ABTS....	66
Tabela 5. Condições de ionização e parâmetros MRM para compostos bioativos analisados por LC-MS/MS, incluindo tempo de retenção, íons precursores/produtos e energias de colisão.....	71
Tabela 6. Parâmetros estatísticos das curvas de calibração: intervalos de concentração, coeficiente de correlação linear (<i>r</i>), resultados da ANOVA (<i>F</i>) e análise de efeito matriz.....	76
Tabela 7. Limite de quantificação (LIQ) e detecção (LD) para cada um dos analitos.....	77
Tabela 8. Avaliação da precisão do método: desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade e precisão intermediária, com respectivos valores de <i>p</i>	79
Tabela 9. Resultados de exatidão expressos como porcentagem de recuperação para todos os analitos de interesse nas concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA).....	80
Tabela 10. Resultados das análises das amostras de caju e cajuzinho (mg/100 g de caju liofilizado ± DP), através dos métodos LC-MS/MS desenvolvidos.....	83
Tabela 11. Anotação preliminar dos metabólitos detectados por LC-MS/MS em extratos de <i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>	96
Tabela A.1 – Classificação das amostras de <i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i> por PCA e agrupamento K-means.....	136
Tabela A.2 - <i>M/z</i> características compartilhadas entre PLS-DA (VIP > 1) e análises de <i>volcano plot</i>	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	amostra <i>A. humile</i> Goiânia
A10	amostra <i>A. humile</i> Santa Rita do Novo Destino matriz 4
A11	amostra <i>A. humile</i> Santa Rita do Novo Destino matriz 5
A12	amostra <i>A. humile</i> Artulândia
A13	amostra <i>A. humile</i> Brasília
A14	amostra <i>A. humile</i> Goianésia matriz 3
A2	amostra <i>A. humile</i> Uruana
A3	amostra <i>A. humile</i> Campinaçu
A4	amostra <i>A. humile</i> Goiás Velho
A5	amostra <i>A. humile</i> Goianésia matriz 1
A6	amostra <i>A. humile</i> Goianésia matriz 2
A7	amostra <i>A. humile</i> Santa Rita do Novo Destino matriz 1
A8	amostra <i>A. humile</i> Santa Rita do Novo Destino matriz 2
A9	amostra <i>A. humile</i> Santa Rita do Novo Destino matriz 3
ABTS	2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AOAC	<i>Association of Official Analytical Collaboration</i>
ASC	ácido ascórbico
B1	amostra <i>A. occidentale</i> Feira Goiânia 1
B10	amostra <i>A. occidentale</i> Goianésia cidade 2
B2	amostra <i>A. occidentale</i> Feira Goiânia 2
B3	amostra <i>A. occidentale</i> Feira Goiânia 3
B4	amostra <i>A. occidentale</i> Goianésia fazenda 1
B5	amostra <i>A. occidentale</i> Goianésia cidade 1
B6	amostra <i>A. occidentale</i> Goianésia caju amarelo 1
B7	amostra <i>A. occidentale</i> Jataí

B8	amostra <i>A. occidentale</i> Goianésia caju amarelo 2
B9	amostra <i>A. occidentale</i> Goianésia fazenda 2
CAF	ácido cafeico
CAT	catequina
CC	corrente contínua
CE	<i>collision energy</i>
CIA	cloreto de cianidina 3-glucosídeo
CID	dissociação induzida por colisão
CLO	ácido clorogênico
CQA	controle de qualidade alto
CQB	controle de qualidade baixo
CQM	controle de qualidade médio
CXP	<i>collision cell exit potential</i>
DAD	detector de arranjo de diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC ₅₀	concentração efetiva
EI	ionização por impacto de elétrons
EP	<i>entrance potential</i>
EPI	epicatequina
ESI	<i>electrospray</i>
FER	ácido ferúlico
GAL	ácido gálico
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HCA	Análise de Cluster Hierárquico (<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC	inclinação da curva
ISO	isoquercetina
K ₂ S ₂ O ₈	persulfato de potássio
KAM	kaempferol
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LD	limite de detecção
LIQ	limite de quantificação
LOOCV	validação cruzada <i>leave-one-out</i>
MALDI	ionização por laser assistida por matriz
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
MMQP	mínimos quadrados ponderados
MRM	monitoramento de reações múltiplas
ng	nanogramas
nm	nanômetros
°C	graus Celsius
PC1	primeira componente principal
PC2	segunda componente principal
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PI	padrão interno
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
Q1	primeiro quadrupolo
q2	segundo quadrupolo
Q3	terceiro quadrupolo

QqQ	triplo quadrupolo
QUER	quercetina
r	correlação de Pearson
R ²	coeficiente de determinação
RF	radiofrequência
RPM	rotação por minuto
RUT	rutina
trolox	6-Hidroxi-2,5,7,8- tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
v:v	volume:volume
VIP	importância da variável na Projeção
σ	desvio padrão

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 BIOMA CERRADO.....	22
2.2 FAMÍLIA ANACARDIACEAE.....	23
2.3 GÊNERO <i>ANACARDIUM</i>	24
2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	28
2.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	39
2.5.1 Método de DPPH.....	40
2.5.2 Método ABTS.....	41
2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	42
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 MATERIAIS.....	47
4.1.1 Substâncias e reagentes.....	47
4.2 MÉTODOS.....	47
4.2.1 Coleta e preparo das amostras.....	47
4.2.2 Extração dos compostos bioativos para análises de atividade antioxidante in vitro... 52	
4.2.2.1 Capacidade antioxidante por ABTS.....	53
4.2.2.2 Capacidade antioxidante por DPPH.....	53
4.2.3 Determinação dos compostos bioativos pelo sistema LC-MS/MS.....	54
4.2.4 Validação do método LC-MS/MS.....	55
4.2.4.1 Linearidade.....	56
4.2.4.2 Efeito matriz.....	58
4.2.4.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LIQ).....	59
4.2.4.4 Precisão.....	59
4.2.4.5 Exatidão.....	59
4.2.5 Análise metabolômica por LC-MS/MS.....	60
4.2.6 Análise estatística.....	61

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	63
5.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS LC-MS/MS.....	66
5.3 VALIDAÇÃO.....	71
5.3.1 Linearidade.....	71
5.3.2 Efeito matriz.....	73
5.3.3 Limites de detecção e quantificação.....	74
5.3.4 Precisão.....	76
5.3.5 Exatidão.....	77
5.8 APLICAÇÃO DE LC-MS/MS EM AMOSTRAS DE CAJU.....	78
5.9 AVALIAÇÃO METABOLÔMICA NÃO DIRECIONADA.....	91
6 CONCLUSÃO.....	114
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	116
APÊNDICE A – Tabelas suplementares.....	133

O *Anacardium occidentale* L. (caju) e o *Anacardium humile* A.St.-Hil. (cajuzinho do cerrado) são duas espécies frutíferas que pertencem à família Anacardiaceae e possuem aplicações importantes, tanto pelas castanhas quanto pelos seus pseudofrutos, que são amplamente utilizados na alimentação e na indústria alimentícia.

O *A. occidentale* é nativo da América tropical, entretanto é amplamente cultivado na Ásia, África e América do Sul. O caju consiste em fruto (castanha) e pseudofruto (1). Eles variam em forma e cor, sendo que a casca do pseudofruto pode variar entre as cores vermelho, laranja e amarelo. O pseudofruto é utilizado na produção de bebidas, sucos, geleias e alimentos *in natura*. O *A. humile*, nativo do Cerrado brasileiro, oferece pseudofrutos semelhantes ao caju, com potencial para fabricação de produtos como sorvetes, cachaça e licores, além de castanhas consumidas após a torrefação (2).

O *A. occidentale* é amplamente utilizado na medicina tropical devido à sua heterogeneidade química decorrente dos metabólitos secundários, como fenóis, flavonoides e taninos presentes na espécie. São utilizados para tratamento de inflamações, cicatrização de feridas, reumatismo, diabetes, hemorragia, diarreia, antisséptico e antioxidante (3). *A. humile* é popularmente conhecida por suas propriedades antidiarreicas, expectorantes, anti diabéticas e anti inflamatórias (4).

As propriedades benéficas mencionadas anteriormente resultam da presença de metabólitos secundários, como flavonóides, ácidos fenólicos e antocianinas presentes nessas frutas. Além de contribuírem para o sabor e qualidade nutricional, os compostos fenólicos são moléculas bioativas com reconhecidos benefícios à saúde, principalmente devido às suas propriedades antioxidantes. Eles podem atuar como doadores de hidrogênio e/ou elétron para radicais livres, interrompendo as reações em cadeia de oxidação. Dessa forma, esses compostos desempenham um papel essencial na proteção do organismo contra o estresse oxidativo (5). Evidências científicas apontam que compostos fenólicos apresentam propriedades farmacológicas relevantes, com potencial de uso em associação a terapias convencionais (6).

Embora o *A. humile* apresenta potencial agroeconômico promissor e seja popular regionalmente, informações essenciais sobre sua produção, métodos de colheita, técnicas de armazenamento e composição química ainda são insuficientemente documentadas. Para incentivar o consumo, a produção sustentável e a melhor utilização do cajuzinho do cerrado, é fundamental intensificar as pesquisas sobre as características químicas, nutricionais e terapêuticas. No entanto, a literatura ainda apresenta lacunas significativas em dados abrangentes sobre as propriedades biológicas, farmacológicas e atividades antioxidantes dessas espécies, bem como sobre as aplicações tecnológicas no desenvolvimento de novos produtos (7) .

A tese a ser defendida neste estudo é que os pseudofrutos de caju (*A. occidentale*) e do cajuzinho do cerrado (*A. humile*) apresentam perfis químicos distintos e potencial antioxidante significativo, com uma diversidade molecular rica em compostos bioativos que podem ser explorados para aplicações alimentares e farmacológicas. Neste contexto, este estudo tem como objetivo investigar o potencial antioxidante e a composição química dessas espécies utilizando abordagens metabolômicas direcionadas e não direcionadas. A abordagem metabolômica não direcionada , empregando espectrometria de massas de alta resolução combinada com ferramentas de fragmentação *in silico*, permite uma análise abrangente, potencialmente revelando compostos ainda não identificados. Complementarmente, o desenvolvimento e validação de um método LC-MS/MS robusto para quantificação simultânea dos compostos bioativos viabiliza a comparação precisa entre as duas espécies, destacando semelhanças e diferenças em suas propriedades bioativas. Os resultados deste estudo não apenas contribuirão para o entendimento de como essas espécies podem ser utilizadas de forma eficiente em aplicações alimentares e farmacológicas, mas também fornecerão *insights* sobre sua adaptação a diferentes ambientes. Isso implicará o conhecimento sobre a biodiversidade do cerrado, reforçando a importância de sua conservação e uso sustentável.

2.1 BIOMA CERRADO

O Brasil é um país com grande proporção continental, ocupando quase metade da América do Sul, integrando várias zonas climáticas. Essa diversidade de zonas climáticas reflete em grandes variações ecológicas, formando seis biomas distintos: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, além de uma extensa costa marinha que abriga inúmeros ecossistemas (8). Essa diversidade de biomas proporciona uma notável riqueza da flora e fauna do país, abrigo a maior biodiversidade do planeta (9).

O bioma Cerrado ocupa cerca de 23% do território brasileiro, equivalente a 1.983.017 Km², se consolidando como o segundo maior bioma em extensão do país. Sua maior expressão está no Centro Oeste, onde ocupa 56,1% da superfície. Além disso, sua posição geográfica, atravessada pelas três maiores bacias hidrográficas da América do Sul, abriga cerca de 11 mil espécies de plantas nativas já catalogadas (10,11). Sua vegetação inclui florestas e áreas campestres, destacando-se a savana como a forma mais proeminente (8,12). Entre as savanas distribuídas pelo mundo, o bioma Cerrado é reconhecido como aquele que apresenta a maior diversidade vegetal, caracterizando-se pela ampla variedade de sistemas ecológicos, tipos de solos, clima, relevo e altitude (13,14).

O Cerrado destaca-se pela ampla diversidade de espécies frutíferas comestíveis que desempenham um papel fundamental na sustentabilidade da fauna e da flora, bem como na subsistência da população local. As quais possuem um notável potencial de exploração econômica, atribuído às suas características singulares, que incluem sabores agradáveis e incomuns, formas e cores variadas, além dos valores nutricionais (10,11). O desafio para a comunidade científica é explorar este patrimônio de maneira sustentável, assegurando simultaneamente o desenvolvimento econômico das pequenas e médias empresas, bem como das cooperativas (15).

As frutas nativas do Cerrado são ricas em vitaminas, minerais e diversos metabólitos secundários que podem contribuir com a proteção do corpo humano

contra o estresse oxidativo e auxiliar na prevenção de doenças crônico-degenerativas (16). Os frutos apresentam síntese de compostos bioativos devido aos estímulos ambientais, característicos desse bioma, como o longo período de seca, alta precipitação, acidez e deficiência nutricional do solo e uma alta incidência de radiação solar, que fazem com que as plantas desenvolvam mecanismo de defesa contra os agentes físicos, químicos e biológicos associando a produção desses compostos (17).

Dentre as principais espécies frutíferas emblemáticas do Cerrado, que contribuem significativamente para a biodiversidade e a sustentabilidade do bioma, podemos citar o pequi (*Caryocar brasiliense* A.St.-Hil.), a mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), o buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), baru (*Dipteryx alata* Vogel), jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), jenipapo (*Genipa americana* L.), araticum-do-cerrado (*Annona crassiflora* Mart.), araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), goiabeira (*Psidium guajava* L.) e o cajuzinho de cerrado (*A. humile*) (18).

2.2 FAMÍLIA ANACARDIACEAE

A família Anacardiaceae é composta por cerca de 80 gêneros e 800 espécies, representada no Brasil por 55 espécies distribuídas em 14 gêneros. Cerca de 13 dessas espécies são restritas no país. Ocorre em ambientes secos à úmidos, principalmente nas regiões tropicais, subtropicais e até temperadas (19–21). As espécies pertencentes à família Anacardiaceae são reconhecidas pela sua significativa relevância econômica devido à provisão de frutos comestíveis, madeiras de valor, espécies ornamentais e uso medicinal. Destacam-se várias espécies frutíferas, tais como o cajueiro (*A. occidentale*), conhecido pela produção da castanha-de-caju, a manga (*Mangifera indica* L.), pistache (*Pistacia vera* L.), grupo dos cajás (*Spondias* spp.), exemplificado pelo umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) e a seriguela (*Spondias purpurea* L.). Algumas plantas dermatologicamente tóxicas, como a hera venenosa (*Toxicodendron radicans*) também pertencem às famílias

Anacardiaceae (22). Fitoquimicamente, anacardiáceos têm demonstrado um elevado potencial na investigação de substâncias bioativas (23).

2.3 GÊNERO ANACARDIUM

Entre os gêneros da família Anacardiaceae, destaca-se o *Anacardium* que engloba 11 espécies conhecidas, sendo elas: *A. corymbosum*, *A. excelsum*, *A. giganteum*, *A. humile*, *A. microsepalum*, *A. nanum*, *A. parvifolium*, *A. occidentale*, *A. fruticosum*, *A. othonianum* e *A. spruceanum*, distribuídas em praticamente todos os biomas brasileiros (23,24). Vale ressaltar a espécie *A. occidentale*, comumente encontrada no Nordeste brasileiro, cujo fruto é o caju, bastante utilizado para o consumo da castanha. Com base em informações publicadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção estimada de castanha de caju no Brasil em 2023 foi de 146,6 mil toneladas (25). Mas não é só a castanha que tem potencial para consumo, o caju também pode ser consumido *in natura* e é utilizado na produção de sucos, doces e cajuína (bebida típica do nordeste brasileiro).

O caju é composto pelo fruto, que é a castanha, e o pedúnculo ou pseudofruto, responsável por 90% do peso total (**Figura 1**) (26,27). O pseudofruto possui cor que varia do amarelo ao vermelho, e sabor ácido e suculento. A presença do cajueiro é notável em todo o território nacional, embora a predominância dessa cultura seja mais relevante na região Nordeste, particularmente nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, sendo sua exploração predominantemente agrícola, com cultivo planejado e manejo controlado (28).

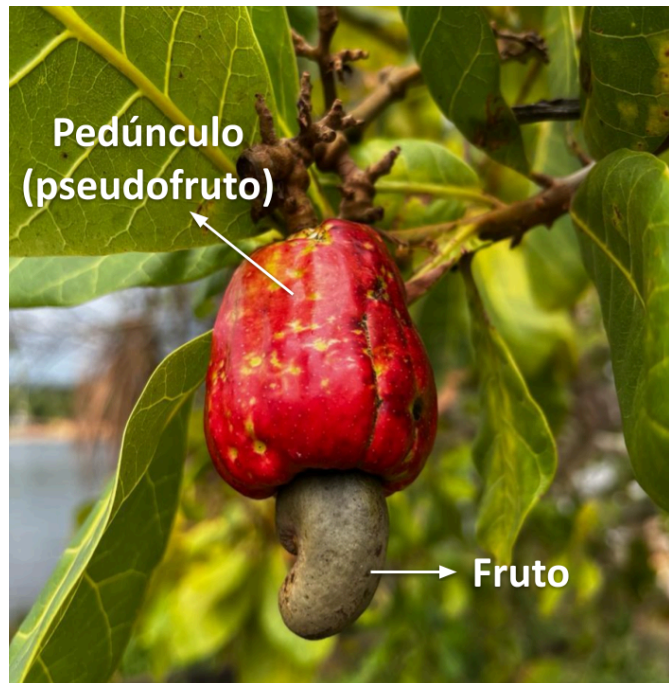


Figura 1. Foto do Caju, destacando o fruto conhecido como castanha e o pedúnculo, dito pseudofruto.

Fonte: Autoria própria.

A espécie *A. occidentale* é uma planta nativa da região Nordeste do Brasil. Sua espécie foi disseminada em muitos países e regiões tropicais, incluindo Moçambique, Índia e Sudeste Asiático, por exploradores europeus durante o século XVI, demonstrando uma notável capacidade de adaptação em determinados genótipos às condições de solos com escassez hídrica e baixa fertilidade (29,30). Atualmente, essas regiões testemunham a ascensão econômica significativa da espécie.

Existem dois tipos de cajueiro oriundos do *A. occidentale*, com base na variabilidade genética: o cajueiro comum e o anão. Os cajueiros comuns são amplamente cultivados, com altura das copas variando de 5 a 8 metros e diâmetro de chegando a 20 metros (31–33). Desenvolvem-se mais tardiamente, levando geralmente três anos para frutificar e exibem uma ampla variação na morfologia da copa, bem como nas características da castanha e do pedúnculo. O caule geralmente é tortuoso e baixo, apresentando ramos torcidos. Por outro lado, o genótipo anão é reconhecido por sua precocidade, normalmente inicia a floração aos

seis meses, apresentando árvores de menor porte, com menos de 4 metros de altura e uma maior uniformidade na forma da copa, do fruto e do pedúnculo (34–36)

O *A. occidentale* é a espécie mais estudada entre os gêneros *Anacardium*. As pesquisas destacam suas atividades biológicas e a diversidade dos constituintes químicos. Todas as partes da planta são utilizadas na medicina popular, as folhas são empregadas para problemas de garganta, hipertensão, úlceras de boca e cicatrização de lesões cutâneas. O chá da casca é usado para tratamento de asma e resfriado. O óleo da casca da castanha é usado como conservantes de alimentos, tintas, cimentos e estabilizantes em gasolina (37). O bagaço do caju, resíduo proveniente das indústrias de produção de suco, é utilizado como complemento nutricional na fabricação de rações para animais, como bovinos e caprinos. (38,39).

Integrado ao mesmo gênero do caju (*A. occidentale*), o cajuzinho-do-cerrado (*A. humile*) se distingue por sua morfologia, caracterizada por frutos bem menores, como pode ser observado na **Figura 2**.

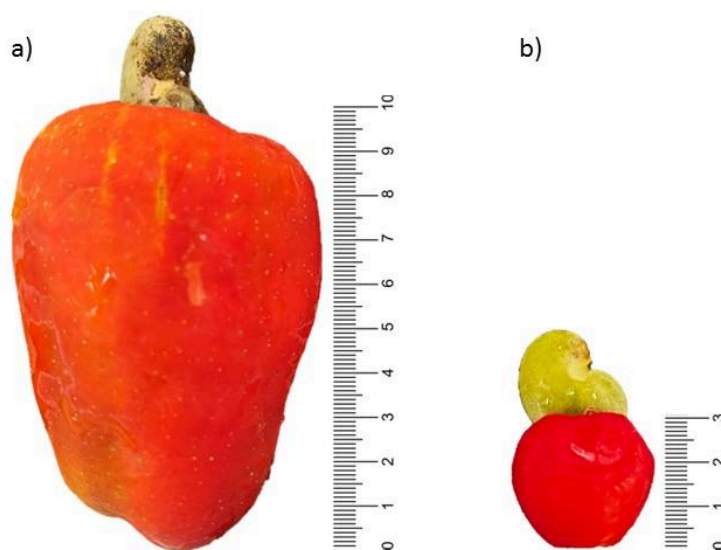


Figura 2. Comparação do tamanho do (a) Caju comum (*Anacardium occidentale*), cerca de 10 cm e (b) cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*), cerca de 3 cm.

O *A. humile* é uma espécie frutífera nativa do Cerrado brasileiro, com período de floração entre setembro e outubro, e frutificação de outubro a novembro. Os frutos, conhecidos como cajuzinhos, são caracterizados por sua suculência. Apresentam casca que varia entre os tons de vermelho e amarelo, e possui uma

polpa amarelada. As aplicações do *A. humile* assemelham-se às do *A. occidentale*, sendo valorizado tanto por suas castanhas quanto por seus pseudofrutos. O pseudofruto é utilizado para produção de sorvetes, geleias, cachaça, cervejas, sucos e licores, além de ser consumido *in natura*. A castanha é torrada após a remoção do epicarpo e mesocarpo esponjoso na qual está envolvida, podendo assim ser consumida ou mesmo ser utilizada como ingrediente na culinária (17,40).

A árvore do cajuzinho do cerrado apresenta de 3 a 6 metros de altura e tronco com 20 cm a 40 cm de diâmetro. A castanha tem 1,5 cm a 2,0 cm de comprimento por 1,2 cm a 1,5 cm de largura, profundamente escavado na parte central. O pedúnculo (pseudofruto) varia de 2 cm a 4 cm. Cada árvore fornece de 200 a 600 frutos, podendo pesar entre 5 e 10 gramas, podendo ser colhidos do segundo ou terceiro ano de produção. Suas flores são polinizadas por abelhas e vespas e suas sementes germinam com facilidade, porém é uma espécie bastante atacada por fungos (41).

Esta espécie ainda é pouco estudada, particularmente seu conteúdo e perfil de compostos fenólicos (17). Embora o *A. humile* tenha um grande potencial agroeconômico e popularidade local, ainda existem lacunas significativas no conhecimento sobre propagação, colheita e armazenamento de maneira eficiente. A falta de informações impede que ele seja cultivado em larga escala. Além disso, há preocupações de que essa carência de conhecimento possa levar à exploração insustentável da espécie, ou até mesmo ao risco de sua extinção (2,42).

Existe também uma escassez de informações na literatura quanto ao conteúdo de macronutrientes, micronutrientes e compostos antioxidantes do cajuzinho do cerrado. Esses dados são importantes para a aplicação tecnológica dessa fruta no desenvolvimento de novos produtos. O conhecimento detalhado desses componentes é essencial para orientar tanto o consumo da fruta quanto seu uso mais amplo na indústria alimentícia, possibilitando a criação de produtos inovadores e saudáveis (7,17).

2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS

Pesquisas científicas têm revelado o potencial dos frutos nativos do Cerrado na prevenção de doenças crônico-degenerativas, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer, além da prevenção ao envelhecimento precoce. Esses benefícios estão associados às propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e citoprotetoras dos compostos bioativos encontrados nesses alimentos (43).

O caju, um dos frutos típicos do Cerrado, apresenta uma composição rica e diversificada, contendo uma grande variedade de compostos fenólicos, como flavonóides e taninos. Além disso, o caju é fonte de carotenóides, vitaminas (em especial o ácido ascórbico), minerais como ferro e zinco, açúcares e fibras alimentares. Esses nutrientes são essenciais para a nutrição humana, promovendo a saúde metabólica, imunológica e digestiva, e reforçando o papel da fruta como um alimento funcional com potencial terapêutico e preventivo contra distúrbios oxidativos, inflamatórios e metabólicos (44–46).

Os compostos fenólicos constituem o maior grupo de compostos bioativos encontrados em frutas, desempenhando um papel crucial em suas propriedades funcionais e nutricionais. Dentre esses compostos, destacam-se as antocianinas, que fornecem as cores vermelha, roxa e azul observadas em muitas frutas (43,47) e os flavonoides, que também contribuem para suas características sensoriais e benefícios à saúde (48). Esses compostos são classificados em dois grandes grupos: flavonóides e não flavonóides, também chamados de fenóis simples.

Conforme ilustrado na **Figura 3**, os flavonoides são subdivididos em seis subclasses principais: antocianinas, que são pigmentos naturais que conferem cores vibrantes às frutas; flavanóis, presentes em alimentos como chá, vinho e cacau (49,50); flavanonas, comumente encontradas em frutas cítricas (51); flavonóis, amplamente distribuído em vegetais e frutas; flavonas, presentes em ervas e especiarias, e isoflavonas, encontrada principalmente em leguminosas, como a soja (52). Os não flavonóides são subdivididos em quatro subclasses: ácidos fenólicos, que são sub categorizados em ácidos hidroxibenzóicos (como o ácido gálico) e

ácidos hidroxicinâmicos (como o ácido cafeico); estilbenos, cumarinas e taninos (53).

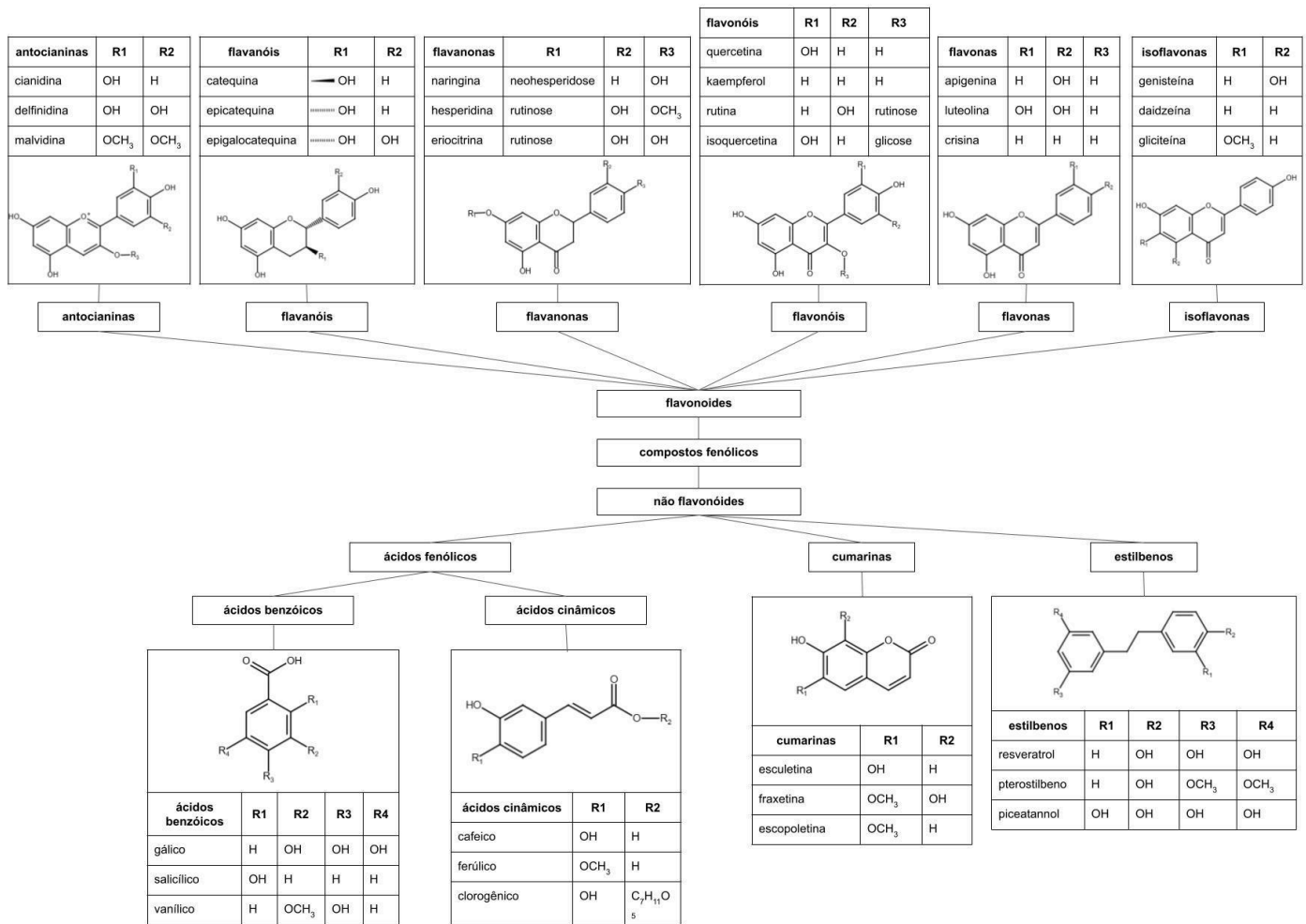


Figura 3. Classificação dos compostos fenólicos, com representação dos principais subgrupos e suas respectivas estruturas químicas e substituintes. Fonte: Autoria própria.

As antocianinas, pertencem à classe dos flavonoides, representam o maior grupo de metabólitos secundários de plantas e estão entre os compostos polifenólicos mais importantes do reino vegetal (54). Esses pigmentos naturais, solúveis em água, são responsáveis pelas cores vibrantes que variam do laranja ao vermelho, roxo e azul em flores, frutas e vegetais (55). Estruturalmente, possuem um esqueleto básico de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6), composto por dois anéis fenólicos e um anel pirano. No entanto, diferem da maioria dos flavonoides por apresentarem o oxigênio do anel pirano carregando positivamente em pH ácido (forma estável), o que confere propriedades únicas de cor e reatividade (56).

Além de sua função como pigmentos naturais, as antocianinas atuam como indicadores de pH, alterando sua coloração conforme o acidez do meio (vermelho em pH ácido, azul em pH alcalino). Sua formação ocorre por meio de acoplamento de açúcares à molécula de antocianidina, processo que influencia a estabilidade e solubilidade (57).

Devido ao crescente interesse por alternativas naturais aos corantes sintéticos, associados a efeitos nocivos à saúde, as antocianinas ganharam destaque nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (58). Além de seu apelo sustentável, esses pigmentos exibem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, com estudos comprovando seu potencial na redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e outras doenças crônicas (59).

Os flavanóis representam uma classe significativa de compostos fenólicos amplamente encontrados na natureza. Assim como as antocianinas, eles apresentam a estrutura básica C6-C3-C6, formada por dois anéis fenólicos e um anel pirano, mas com algumas características específicas que determinam sua identidade química e propriedades biológicas distintas. O anel pirano possui cadeia de carbono saturada entre C2 e C3, presença de grupo hidroxila na posição C3 e ausência de grupo carbonila (C=O) na posição C4. Esta característica estrutural confere à molécula quiralidade nos átomos C2 e C3, permitindo a existência de quatro configurações estereoquímicas (60).

Entre os diversos flavanóis encontrados na natureza, dois se destacam por sua abundância e relevância biológica: a catequina, com configuração *trans* entre C2 e C3, e a epicatequina, que apresenta arranjo *cis* nestes mesmos carbonos. Ambos

existem naturalmente em duas formas enantioméricas, sendo a (+)-catequina e a (-)-epicatequina as mais comuns (61). Esses compostos são particularmente abundantes nas sementes de uva (62), mas também estão presentes em outros alimentos como chá (especialmente chá verde), produtos derivados do cacau, vinho, diversas frutas (incluindo maçã, pera e frutas vermelhas) e nozes, contribuindo não apenas para suas características sensoriais, mas também para seus benefícios à saúde humana (63,64).

Evidências científicas indicam que a ingestão diária de 400-600 mg/dia de flavanóis pode contribuir para a redução do risco de doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2, além de auxiliar no controle da pressão arterial e na diminuição dos níveis de colesterol e glicose no sangue (65,66).

Uma subclasse dominante dos flavonóides em *Citrus spp* é a das flavanonas. Essas moléculas são caracterizadas pela ausência de uma ligação dupla entre os carbonos C2 e C3 no anel pirano e presença da carbonila em C4. Essa configuração estrutural as distingue de outras subclasses de flavonóides, como as flavonas e os flavonóis (67).

As flavanonas podem ser encontradas em alimentos como tomates e em plantas aromáticas como o hortelã-pimenta, mas suas principais fontes são frutas cítricas. Nesses frutos, destacam-se a hesperetina em laranjas e tangerinas, a naringenina em toranjas, e o eriodictiol em limões (68,69). As flavanonas ocorrem naturalmente tanto na forma de agliconas quanto na forma glicosídica, sendo a naringenina e a hesperidina as agliconas mais conhecidas. Apesar do suco das frutas cítricas apresentarem um alto teor de flavanonas, o consumo da parte sólida das frutas, como a parte branca e esponjosa da fruta e a membrana que separa os gomos, pode fornecer até cinco vezes mais glicosídeos de flavanona (67).

Nos últimos anos, a busca por fontes alternativas e mais concentradas desses compostos tem direcionado a atenção por subprodutos cítricos, especialmente as cascas, cujo aproveitamento apresenta potencial funcional e econômico. Entre elas, destacam-se as cascas de tangerina e laranja. Na medicina tradicional chinesa, por exemplo, a casca da tangerina é amplamente utilizada no tratamento de asma brônquica, indigestão e doenças cardiovasculares, efeito atribuído ao seu elevado teor de glicosídeos de flavanona e às atividades

antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias (70). Estudo um estudo recente, Garzón-Alonso et al. (2023) demonstra que a casca da laranja, assim como a da tangerina, contém elevadas concentrações de compostos bioativos, como naringina, hesperidina, neohesperidina e rutina. Por meio de ensaios de viabilidade celular, os autores identificaram que o extrato da casca possui efeitos promissores na prevenção do câncer de cólon, destacando seu potencial terapêutico (71).

As flavanonas diferenciam-se estruturalmente das flavonas pela saturação do anel pirano, decorrente da redução da ligação dupla entre os carbonos C2 e C3 no heterociclo. Essa diferença estrutural altera as propriedades físico-químicas e biológicas, influenciando aspectos como estabilidade, solubilidade e interação com alvos moleculares. Nas flavonas, a dupla ligação entre C2 e C3, associada ao grupo carbonila em C4 e à ausência de hidroxila na posição C3 é determinante para sua identidade e potencial bioativo (72).

As flavonas estão presentes em diversas estruturas vegetais, como caules, folhas, brotos, cascas, espinhos, raízes, rizomas, flores, frutos e sementes. Quando em altas concentrações ou complexadas a íons metálicos, esses compostos contribuem significativamente para a pigmentação dos tecidos das plantas. Além do papel na coloração, certas flavonas (como nobiletina, sinensetina e tangeretina) influenciam diretamente as propriedades sensoriais, sendo as principais responsáveis pelo característico amargor das cascas cítricas. Alimentos como salsa, aipo e camomila destacam-se por possuírem elevadas concentrações desses compostos (73).

Nas plantas, as flavonas exercem múltiplas funções ecológicas e fisiológicas. Uma das funções primárias desses compostos é a proteção contra a radiação UV, atuando como um escudo que absorve a radiação prejudicial aos ácidos nucleicos. Além disso, as flavonas são cruciais nas interações aleloquímica da planta com o ambiente. Elas funcionam como moléculas sinalizadoras em interação simbióticas. Em leguminosas, por exemplo, flavonas liberadas pelas raízes sinalizam para as bactérias fixadoras de nitrogênio, induzindo a formação de nódulos radiculares essenciais para a simbiose. No contexto das interações planta-inseto, esses compostos podem atuar como co-pigmentos em flores, contribuindo para a atração de polinizadores. Além disso, podem exercer efeitos defensivos, como inibir a

alimentação de herbívoros, reduzir o desenvolvimento de larvas e atuar como compostos de defesa contra patógenos, fungos, bactérias e outros organismos (72,74).

As flavonas ocorrem na natureza principalmente como agliconas ou, mais comumente, como glicosídeos, destacando-se os derivados de luteolina e apigenina. Essa subclasse de flavonoides exibe uma vasta gama de atividades farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, antidiabéticas, relaxantes do músculo liso, antiasmáticas e anti-inflamatórias. Tais ações sugerem um considerável potencial terapêutico no manejo de distúrbios associados ao estresse oxidativo, síndromes metabólicas e condições inflamatórias. Estudos recentes indicam que algumas flavonas, como o 6-hidroxiavona, são capazes de modular vias moleculares essenciais ligadas à inflamação, ao estresse oxidativo e à diferenciação celular (75).

Outra subclasse dos flavonoides que vem recebendo crescente atenção em virtude de evidências recentes que apontam seu papel singular no controle da sinalização e do desenvolvimento das plantas, são os flavonóis. Estruturalmente, os flavonóis distinguem-se das flavonas, pela presença de um grupo hidroxila na posição C3 do anel pirano, sendo ainda caracterizados por padrões distintos de hidroxilação dos anéis fenólicos (76). Dentre os flavonóis amplamente distribuídos nas plantas, destacam-se o kaempferol, a quercetina e a miricetina. Além da hidroxilação, esses compostos frequentemente passam por modificações adicionais, como a glicosilação, em que açúcares se ligam aos grupos hidroxila, ampliando ainda mais a diversidade química observada nesta subclasse. Outra modificação de relevância biológica é a metilação, processo que converte a quercetina em isoramnetina, um derivado de interesse por suas propriedades funcionais (77).

Os flavonóis desempenham um papel estratégico na defesa vegetal, atuando contra insetos que se alimentam de plantas e outros herbívoros ao modular tanto seu comportamento alimentar quanto seu crescimento e desenvolvimento. Esses compostos podem exercer efeitos citotóxicos diretos sobre as células dos organismos invasores ou, ainda, interagir com enzimas envolvidas em processos biológicos essenciais, comprometendo seu funcionamento. Dessa forma, contribuem para aumentar a resistência das plantas, funcionando como importantes mediadores nas interações ecológicas que asseguram sua sobrevivência (78).

Os flavonóis são reconhecidos não apenas por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, mas também por seus efeitos funcionais no sistema nervoso central, incluindo atividades antidepressiva e ansiolítica (79). Estudos experimentais em modelos animais indicam que a quercetina, um dos flavonóis mais estudados, exerce efeitos neuroprotetores, contribuindo para a redução do estresse oxidativo e da inflamação cerebral, além de modular comportamentos associados a estados depressivos. Esses achados reforçam o potencial terapêutico dos flavonóis no manejo de distúrbios neuropsiquiátricos, ampliando o interesse por esses compostos tanto na farmacologia quanto na nutrição funcional (80).

Diferente das subclasses anteriores, as isoflavonas apresentam o anel B ligado à posição C3 do anel pirano. Essa configuração lhes confere uma analogia estrutural com 17β -estradiol, o que as classifica como fitoestrógenos (67). Devido a essa semelhança, as isoflavonas conseguem se ligar a receptores estrogênicos, mimetizando ou, em alguns casos, exibindo propriedades antiestrogênicas. Essa capacidade de modulação hormonal tem gerado grande interesse, em pesquisas sugerindo que elas podem ajudar a restaurar o equilíbrio hormonal, como em caso de síndrome do ovário policístico (81).

Esses compostos ocorrem como metabólitos secundários em diversas leguminosas, sendo as principais fontes a soja e o trevo vermelho, onde se destacam as isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína. Outras fontes incluem o amendoim, o grão de bico e o feijão verde (82,83).

A inclusão de dietas ricas em isoflavonas têm recebido atenção significativa na saúde humana, devido aos seus potenciais benefícios. Estudos indicam que elas podem contribuir para a redução de condições como osteoporose, doenças cardiovasculares e câncer relacionado a hormônios (84). Além disso, o consumo de isoflavonas vem sendo associado à redução de sintomas pós menopausa e à manutenção da função cognitiva (81).

Embora as isoflavonas apresentem um promissor potencial terapêutico, sua aplicação é limitada pela baixa biodisponibilidade de compostos como daidzeína, biochanina A, formononetina e genisteína. Visando superar essa limitação e potencializar seus efeitos na prevenção e tratamento de condições patológicas,

estudos recentes têm explorado o uso de nanomateriais. Entre as abordagens investigadas, o encapsulamento por nanotecnologia se destaca, pois melhora os parâmetros farmacocinéticos dessas moléculas, proporciona liberação controlada e protege os compostos contra a degradação metabólica (85).

Considerando a diversidade estrutural e funcional das principais subclasses de flavonoides, é evidente o papel crucial que esses compostos desempenham tanto na biologia vegetal quanto na saúde humana. Suas propriedades, que vão da proteção contra radiação UV e defesa contra patógenos à sinalização simbiótica e atividades farmacológicas, demonstram a importância de sua presença na dieta e no ecossistema. No entanto, o universo de compostos bioativos não se restringe aos flavonoides. Uma vasta gama de compostos não flavonóides, como os ácidos fenólicos (ácido benzóico e ácido cinâmico), cumarinas e estilbenos, também exibem notável atividade biológica.

Os ácidos fenólicos representam uma importante classe de polifenóis não flavonóides, caracterizados por uma estrutura mais simples. Eles são classificados em duas subclasses principais, de acordo com o esqueleto de carbono que possuem. A primeira, dos ácidos hidroxibenzoicos, é baseada em um esqueleto C6-C1, e inclui compostos como o ácido gálico, vanílico e sirínico. Já a segunda subclasse, dos ácidos hidroxicinâmicos, é derivada de um esqueleto C6-C3 e engloba ácidos comumente encontrados em alimentos e bebidas, como os ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e clorogênico (86).

Pesquisas recentes têm demonstrado que diversos ácidos fenólicos possuem um notável potencial antineoplásico, com a capacidade de induzir a morte de células tumorais. O ácido cafeico, por exemplo, demonstrou ser capaz de impedir que as células de melanoma se espalhem, forçando-as a entrar em um processo de morte celular programada (87,88).

Outro composto importante é o ácido gálico. Pesquisas indicam que ele pode causar a morte de células de câncer de mama, e pode potencializar o efeito de quimioterápicos como o paclitaxel e a carboplatina por meio da modulação de proteínas (89). Além disso, sua ação antitumoral foi explorada em adenocarcinomas, onde induziu a morte celular programada, parada do ciclo celular e a inibição da

formação de tumores. A ação anticâncer do ácido gálico também foi elucidado no câncer de pulmão, câncer de pâncreas e câncer de próstata (90).

Adicionalmente, o ácido ferúlico também tem sua capacidade anticancerígena bem documentada. Pesquisas indicam que ele pode inibir células de câncer de cólon (91) e diminuir a proliferação de células de câncer de tireoide (92). Seu potencial antitumoral se estende ao carcinoma hepatocelular, no qual induz a morte celular, e ao câncer de mama, onde pode impedir a metástase (93,94). Uma vez que o ácido ferúlico tem demonstrado um potencial antitumoral significativo, o uso de nanocápsulas tem sido investigado como uma estratégia promissora para o tratamento do câncer colorretal, com resultados promissores tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (95).

As cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários de natureza fenólica, derivados de ácidos cinâmicos e estruturalmente caracterizadas pela presença de um anel benzopirano. Em virtude de seu odor adocicado, elas são amplamente utilizadas em cosméticos, perfumes, aditivos industriais e intensificadores de aroma (96). Podem ser encontradas diferentes organismos, incluindo bactérias e fungos, mas ocorrem predominantemente em plantas, sendo detectados em raízes, frutos, flores e sementes, com maior abundância em famílias como Apiaceae, Rutaceae e Asteraceae. Além disso, podem ser encontrados em alimentos de consumo frequente, como frutas cítricas, cenouras, damascos, cerejas, morangos, canela, pastinaca e funcho (97).

Nos últimos anos, as cumarinas têm despertado crescente interesse científico em virtude de suas propriedades farmacológicas relevantes, incluindo atividades antioxidante e anti-inflamatória. Esses compostos apresentam boa absorção pelo organismo, menor risco de causar resistência a medicamentos e podem atuar de forma protetora em diferentes doenças, incluindo a nefropatia diabética e câncer (98).

No grupo dos compostos não fenólicos, destacam-se ainda os estilbenos, cuja estrutura se baseia em dois anéis aromáticos ligados por uma fração de etileno e existem em duas formas estereoisoméricas, *cis* e *trans*, sendo a forma *trans* mais comum em plantas (99). Essas substâncias atuam como um mecanismo de defesa natural, ajudando as plantas a se protegerem contra o ataque de pragas e doenças

e a se adaptarem melhor a condições ambientais adversas, como seca ou calor excessivo (100).

Entre os estilbenos mais estudados, destaca-se o resveratrol, pterostilbeno e piceatanol, amplamente relatados na literatura por suas atividades no tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de mama. Esses compostos apresentam ainda efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antivirais e propriedades associadas à prevenção do envelhecimento, além de desempenharem papel significativo na proteção contra doenças crônicas, como diabetes e enfermidades cardiovasculares (101).

Como relatado, os compostos fenólicos, flavonóides e não flavonóides, são responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias (102), antimicrobianas (103–105), antidiabéticas (106) e antioxidantes (107,108). Presentes em concentrações significativas nos frutos do Cerrado, esses compostos reforçam o potencial desses recursos naturais para estudos fitoquímicos e aplicações na promoção da saúde (109).

Estudos mostram a presença de compostos fenólicos, vitamina C e minerais em diferentes espécies de caju (45,102). Oliveira e colaboradores (2019) identificaram no pseudofruto do cajuzinho do cerrado a presença de 14 compostos fenólicos, entre eles o ácido clorogênico, rutina, epicatequina e miricetina (26). Já Schweiggert e colaboradores (2016) fizeram um estudo em *A. occidentale*, investigando perfis pigmentares variados, com casca amarela, laranja e vermelha, onde foi possível observar a presença de 15 carotenóides, sendo o β -caroteno o mais abundante, nos cajus de casca laranja e amarela, e antocianinas naqueles de casca vermelha (110). Por meio de uma análise metabolômica direcionada, Huang e colaboradores, caracterizaram o perfil de antocianinas no pedúnculo de caju, identificando um total de 26 antocianinas em frutos de três cultivares de caju, e uma quantificação subsequente mostrou que a quantidade de antocianinas está diretamente relacionada com a coloração avermelhada da casca do fruto (111).

A avaliação do potencial terapêutico dessas espécies tem sido alvo de incessantes estudos onde já foram comprovadas ações farmacológicas através de ensaios pré-clínicos em animais (53). Um estudo conduzido por Sousa e colaboradores (2020), realizado em ratos, evidenciou o aumento dos antioxidantes

endógenos em lesões gástricas induzidas por anti-inflamatórios não esteroides, validando os efeitos gastroprotetores do bagaço de caju. Esse resultado destaca o potencial promissor desse extrato para a formulação e desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos (112).

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel, intimamente ligada à saúde humana, desempenhando funções importantes no fortalecimento do sistema imunológico, na saúde da pele e no auxílio na absorção, transporte e armazenamento de ferro, necessário para o bom funcionamento do sistema imunológico (113).

Os seres humanos não produzem o ácido ascórbico de forma endógena, sendo necessário a sua inclusão na alimentação, por meio de ingestão principalmente de frutas frescas. Tendo como dose recomendada de ingestão cerca de 75 mg/dia para mulheres e 90 mg/dia para homens. No entanto, doses mais elevadas são necessárias em caso de infecções, gravidez e amamentação, idosos, pessoas com deficiência e pessoas que fazem alto consumo de álcool e/ou drogas (114). Já a ausência prolongada desta vitamina no organismo pode gerar algumas síndromes clínicas específicas, uma delas é o escorbuto, que pode causar sangramento na gengiva, enfraquecimento ósseo e dores articulares e musculares (115).

O ácido ascórbico desempenha uma função significativa na neutralização de radicais livres altamente reativos, além de proteger os componentes celulares contra danos causados por essas espécies. É capaz de inibir a formação de inflamação, carcinógenos e outros fatores que agravam o fotoenvelhecimento da pele, sendo considerado um poderoso antioxidante. É também importante para a biossíntese de colágeno, carnitina e atua sobre os neurotransmissores dopamina e noradrenalina (116). Sua presença é de extrema importância para a manutenção do equilíbrio no sistema nervoso central e no sistema imunológico (117). Estudos mostram seu relevante papel contra várias patologias, como doenças cardiovasculares, Alzheimer, catarata e certos tipos de câncer (118–120).

Conforme citado anteriormente, a principal fonte de ácido ascórbico são as frutas, em especial as cítricas, das quais podemos destacar a laranja, o morango, o kiwi, a acerola e o caju. A variabilidade na quantidade de ácido ascórbico é grande,

não apenas dentro das espécies frutíferas, mas também devido ao estágio de maturação das frutas (121).

Dentre as principais fontes, o caju tem demonstrado ser uma fruta com alto nível de ácido ascórbico, e como consequência tem atraído a atenção da comunidade científica nos últimos anos. Silva e colaboradores fizeram um estudo com caju do cerrado, onde o suco apresentou um teor de ácido ascórbico de 30 mg/100mL, adicionalmente, o consumo diário do suco melhorou a pressão arterial e o perfil lipídico e glicêmico dos pacientes (45). O teor de ácido ascórbico observado por Cruz Reina e colaboradores no suco de caju de duas espécies da Colômbia variou de $51,8 \pm 1,82$ a $70,5 \pm 3,03$ mg/mL, já no bagaço o teor variou de $188 \pm 3,81$ a $204 \pm 4,26$ mg/100g (108). Em outro estudo, realizado com o *A. occidentale*, o teor de vitamina C variou de 21,43 a 148,41 mg/100 g de peso fresco (122). A composição do caju, notavelmente rica em ácido ascórbico, mostra sua viabilidade como um produto para combater a deficiência de vitamina C e tratar de síndromes associadas (123–125).

2.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante refere-se à habilidade de substâncias em neutralizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, protegendo sistemas biológicos contra danos oxidativos. Essa propriedade está diretamente associada à presença de compostos bioativos, como fenóis, flavonoides, vitaminas e outros agentes redutores, que atuam na prevenção do estresse oxidativo, processo relacionado ao envelhecimento das células e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares.

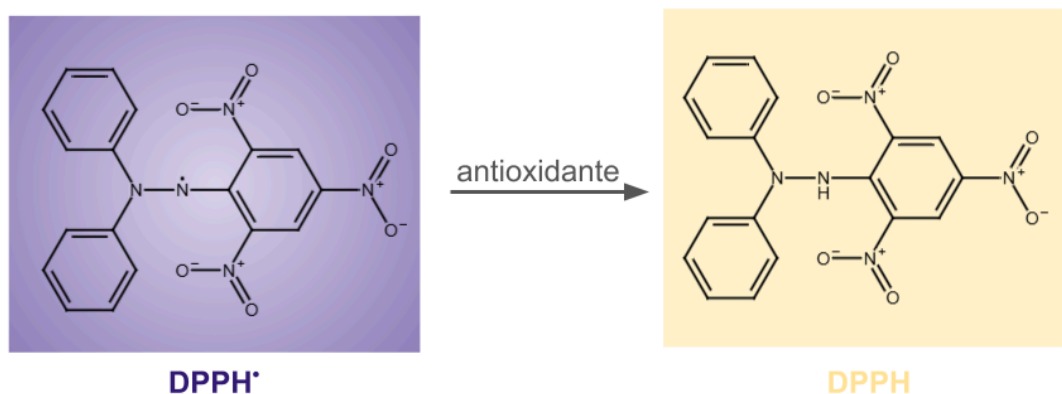
A avaliação da capacidade antioxidante de extratos e compostos isolados pode ser determinada por diversas metodologias analíticas, sendo os métodos espectrofotométricos tradicionais amplamente empregados. Dentre esses, destacam-se os ensaios baseados nos radicais livres 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e no radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), os quais avaliam a capacidade das amostras em neutralizar espécies reativas.

Adicionalmente, técnicas eletroquímicas têm se consolidado como ferramentas analíticas promissoras para a avaliação da capacidade antioxidantes em amostras complexas (126,127).

2.5.1 Método de DPPH

Desenvolvido em 1958 por Blois, o método de DPPH é a técnica espectrofotométrica mais utilizada para avaliar a capacidade antioxidante de compostos presentes em frutas (128). Ao longo dos anos, o método passou por adaptações, e o protocolo estabelecido por Brand-Willians et al. (1995) consolidou-se referência, sendo amplamente usado por vários grupos de pesquisadores. O DPPH é um radical livre estável devido ao seu elétron desemparelhado, o que confere a ele uma característica coloração roxa intensa em solução. Quando um antioxidante doa um átomo de hidrogênio ao DPPH, neutralizando o radical, ele é convertido em sua forma não radical (DPPH-H). Como ilustrado na **Figura 4**, essa reação promove uma mudança de cor visível, passando de roxo intenso para amarelo, devido à redução na absorbância do radical DPPH. A variação na intensidade da cor pode ser monitorada por espectrofotometria no comprimentos e onde de 515 a 520 nm, permitindo a determinação da atividade antioxidante da amostra (129–131).

Figura 4. Reação de estabilização do radical DPPH por ação de um antioxidante. Adaptado de Becker et al. (2019) (132)

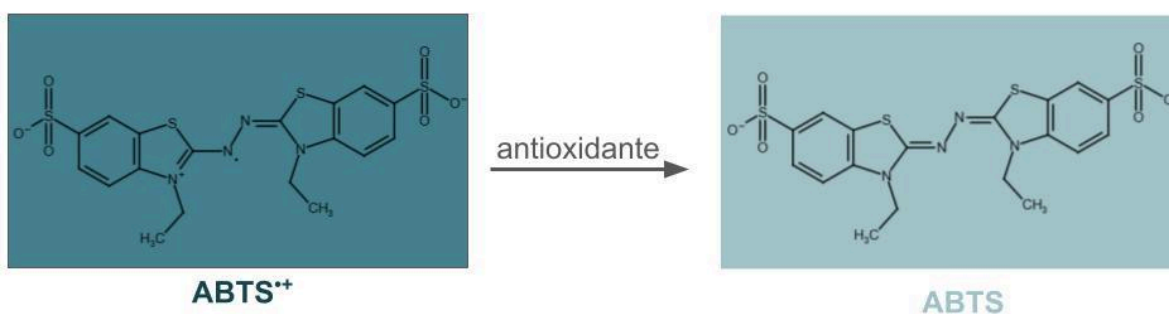


2.5.2 Método ABTS

O método ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)) é um teste colorimétrico amplamente empregado que se baseia na capacidade de substâncias antioxidantes de neutralizar o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Este radical é formado quando o composto ABTS, originalmente incolor ou levemente amarelado, sofre oxidação, adquirindo coloração intensa verde-azulada. A formação do radical ocorre através da oxidação química com o persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), que demanda um período de 12 a 16 horas no escuro para completa formação do radical, ou alternativamente por enzimas (133).

Esta técnica foi originalmente desenvolvida por Miller et al. em 1993 para análises de amostras biológicas, utilizando inicialmente um sistema complexo envolvendo metamioglobina e peróxido de hidrogênio para gerar o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Ao longo dos anos, o método foi simplificado, permitindo a produção direta do radical através da reação com persulfato de potássio (**Figura 5**). O radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ apresenta três picos característicos de absorção - a 654 nm, 734 nm (o mais utilizado) e 815 nm - e a redução na intensidade da cor, medida pela diminuição da absorção, reflete diretamente o poder antioxidante da amostra testada (134,135).

Figura 5. Reação de formação e estabilização de radical ABTS por ação antioxidante.



O método se destaca por se adaptar a diferentes condições experimentais. O radical mantém sua estabilidade em uma ampla faixa de pH, o que permite análises em diferentes meios reacionais. Além disso, tem capacidade de se dissolver em meio orgânico e aquoso e uma boa reatividade com compostos puros, lipofílicos e hidrofílicos (133).

2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), é uma técnica analítica amplamente utilizada para separação de compostos, sendo possível assim identificar e/ou quantificar estes compostos em amostras complexas. Sua aplicação é muito ampla, abrangendo áreas como química, bioquímica, farmacologia, alimentos e ambiental. Mikhail S. Tswett foi um dos pioneiros nas contribuições desta técnica, usando tubos de vidro contendo partículas sólidas e um líquido apolar, para separação de pigmentos extraídos de plantas (136,137).

A separação se baseia nas diferenças de interações dos compostos com a fase móvel e a fase estacionária. As colunas inicialmente eram preenchidas com partículas irregulares de 100-200 μm , resultando em uma baixa eficiência. Com o passar dos anos, surgiram as partículas esféricas porosas menores de 1,7 a 5 μm , obtendo assim colunas mais robustas, com maior seletividade e com mais eficiência permitindo assim análises mais rápidas. Os avanços significativos alcançados ao longo dos anos, como diminuição do tamanho das partículas, tamanho da coluna e surgimento da fase estacionária reversa, foram de grande importância para tornar o uso do HPLC essencial na indústria e em aplicações científicas (138,139).

O sistema de cromatografia líquida é formado por um cromatógrafo onde a amostra em solução é injetada e arrastada pela fase móvel até a coluna cromatográfica (fase estacionária). Na coluna, a amostra é eluída pelo solvente, e a separação ocorre devido às diferenças de polaridade das moléculas, que em seguida são encaminhadas para um detector, como de UV-VIS e DAD (arranjo de

diodos). Assim, aliados a softwares, permite a análise quantitativa dos componentes presentes na mistura (137).

Apesar das vantagens que o HPLC apresenta, a presença de um detector eficiente para identificação e quantificação é de grande importância. O acoplamento do HPLC com a espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*) vem sendo bastante utilizado, para uma identificação exata dos compostos. O acoplamento das duas técnicas combinam a eficiência de separação da cromatografia, com as vantagens da espectrometria de massas, como sensibilidade e identificação precisa.

A espectrometria de massas (MS, *mass spectrometry*) é uma poderosa técnica utilizada para identificar e quantificar compostos através da relação massa/carga (m/z) de íons, permitindo a determinação da composição molecular. Desde o surgimento em 1897, com os trabalhos de J. J. Thomson, esta técnica tem encontrado uma ampla gama de campos, consolidando-se como uma ferramenta analítica versátil e altamente benéfica (140).

Existem uma grande variedade de espectrômetros de massas, entretanto todos apresentam uma configuração básica, composto pelo sistema de introdução de amostra, fonte de íons, analisador de massas, detector e por fim o sistema de tratamento de sinais. A amostra pode ser injetada por infusão direta ou de forma indireta utilizando alguma técnica, como por exemplo, a cromatografia líquida e cromatografia gasosa. Após a injeção, a amostra é direcionada para a fonte de ionização, onde as moléculas são ionizadas adquirindo cargas positivas ou negativas. Em seguida, os íons viajam pelo analisador de massas, onde ocorre a separação dos íons, os quais chegam ao detector de acordo com a sua relação m/z . No detector sinais são gerados, através da conversão de corrente de íons em sinais elétricos, que são processados resultando em um espectro de massas (141).

O processo de ionização das moléculas é viabilizado através de diferentes fontes, como a ionização por eletrospray (ESI), ionização por laser assistida por matriz (MALDI), ionização por impacto de elétrons (EI), dentre outras. A ESI é convencionalmente acoplada em HPLC, sendo empregada para análise de uma gama diversificada de compostos, desde metabólitos altamente polares com baixo peso molecular até grandes moléculas como peptídeos e proteínas (142,143).

Desenvolvida por John Fenn na década de 1980, a ESI permitiu uma ionização suave que mantém a identidade molecular dos analitos, o que era um grande desafio para a época. Em 2002, John Fenn recebeu o Prêmio Nobel de Química, devido às suas contribuições ao desenvolvimento da ionização por electrospray (144,145).

No sistema ESI, uma solução com os analitos de interesse é injetada no eletrodo, onde é aplicado um grande potencial elétrico, entre o eletrodo e contra eletrodo, formando gotículas carregadas que são direcionadas à entrada do espectrômetro de massas. Devido à carga elétrica essas gotículas tendem a se repelir uma das outras, o que as mantém dispersas. Simultaneamente, um fluxo de gás, geralmente N_2 , é usado para facilitar o processo de nebulização e contribuir no direcionamento da pulverização. O solvente é evaporado, devido a temperatura elevada da fonte e a presença de uma corrente gás secante, N_2 , levando a redução do tamanho das gotículas carregadas e o aumento da densidade de carga superficial. Em seguida, as moléculas se ionizam sob a influência do campo elétrico intenso, formando íons positivos ou negativos, que são ejetados para a fase gasosa e direcionados para o analisador (140,141,146).

O analisador de massas, é onde os íons são selecionados e analisados em função da relação m/z . Os analisadores do tipo quadrupolo são os mais prevalentes, devido ao seu design compacto, simplicidade, linearidade nas análises e custo inferior em comparação com outros modelos de analisadores (147). É composto por quatro barras, dispostas em dois pares, um par com potencial elétrico positivo e o outro com potencial negativo. A combinação de uma corrente contínua (CC) com uma tensão de rádio frequência (RF) é aplicada nos conjuntos de barras. As barras positivas atuam como um filtro para as massas maiores, enquanto as barras negativas filtram as massas pequenas. Os íons adquirem uma oscilação no campo eletrostático dependendo da razão entre RF e CC. Os íons com uma razão m/z específica adquirem uma trajetória estável e são conduzidos de uma extremidade a outra do quadrupolo. Já os íons desestabilizados atingem as hastes e são expelidas pelo sistema de vácuo (148).

Uma configuração importante de quadrupolos é o triplo quadrupolo (QqQ), no qual existem dois quadrupolos analíticos (Q1 e Q3) e um quadrupolo de colisão (q2),

comumente utilizados para quantificação. Chamada de espectrometria de massas sequencial, ou tandem, a configuração triplo quadrupolo é utilizada para gerar espectros de massas com fragmentações de íons selecionadas (149). Os íons gerados na fonte são direcionados para para primeiro quadrupolo (Q1) onde os íons precursores são selecionados e enviados para a célula de colisão (segundo quadrupolo, q2), onde ocorre a dissociação induzida por colisão (CID) através de um gás neutro, e conseqüentemente os íons são fragmentados, gerando íons produtos. No terceiro quadrupolo (Q3), esses fragmentos são selecionados e enviados para o detector, fornecendo assim um espectro do tipo MS/MS (150).

O espectrômetro de massa triplo-quadrupolo tem a capacidade de ser operado em diferentes modos de aquisição. Entre estes, destaca-se o monitoramento de reações múltiplas (MRM), amplamente empregado para análises quantitativas. Neste modo, um ou mais íons precursores específicos são previamente selecionados no modo Q1 com base em suas características de massa e carga. Em seguida, estes íons são fragmentados no q2 e direcionados para o Q3, onde os íons produtos de interesse são selecionados e detectados pelo detector de íons. Múltiplos analitos de uma amostra podem ser analisados em uma única execução, pois este modo permite a busca e detecção de várias transições de massas simultaneamente (150,151).

3.1 OBJETIVOS

Avaliar a diversidade molecular e as potencialidades nutricionais dos pseudofrutos de *Anacardium humile* e *Anacardium occidentale* por meio da quantificação de compostos bioativos e da aplicação de abordagens metabolômicas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar, avaliar e comparar a capacidade antioxidante dos pseudofrutos de *A. humile* e *A. occidentale* por meio de métodos espectrofotométricos clássicos, incluindo DPPH e ABTS.
- ✓ Desenvolver e validar método analítico para a quantificação de compostos bioativos em pseudofrutos de *A. humile* e *A. occidentale* utilizando LC-MS/MS.
- ✓ Quantificar um grupo de 12 compostos bioativos previamente selecionados nos pseudofrutos de *A. humile* e *A. occidentale* por meio de LC-MS/MS.
- ✓ Aplicar abordagem metabolômica não direcionada para anotar os metabólitos presentes nos pseudofrutos de *A. humile* e *A. occidentale*.
- ✓ Comparar os perfis metabólitos de *A. humile* e *A. occidentale* para avaliar diferenças metabólicas entre as espécies.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias e reagentes

Acetonitrila e metanol de grau HPLC foram adquiridos da Tedia Company (Fairfield, EUA). O ácido fórmico, quercetina (QUER), rutina (RUT), catequina (CAT), ácido ferúlico (FER), kaempferol (KAM), ácido cafeico (CAF), ácido clorogênico (CLO), epicatequina (EPI) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O cloreto de cianidina 3-glucosídeo (CIA) foi obtido da PhytoLab GmbH & Co (Vestenbergsgreuth, Alemanha). A isoquercetina (ISO) foi adquirida da HWI analítica (Frankfurt, Alemanha). O ácido gálico (GAL) e o ácido ascórbico (ASC) foram adquiridos da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil). O padrão interno (PI) 6-acetilmorfina- d_3 foi obtido da Cerilliant® (Round Rock, Texas). A água ultra-pura foi produzida utilizando um sistema de purificação de água (Gehaka Master A&D TOC, São Paulo, SP, Brasil) com resistividade de 18,2 M Ω cm.

4.2 MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no LABFAR (Laboratório Multiusuário de Análises Químicas e Biológicas para Desenvolvimento e Inovação) e no NEPET (Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas) vinculados à Faculdade de Farmácia, bem como no LaCEM (Laboratório de Espectrometria de Massas) do Instituto de Química, todos situados na Universidade Federal de Goiás.

4.2.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras de *A. humile* foram coletadas de quatorze árvores diferentes em oito cidades no estado de Goiás e Distrito Federal, conforme mostrado na **Figura 6**. Os frutos de *A. occidentale* foram coletados em sete árvores distintas distribuídas pelas cidades de Jataí e Goianésia no estado de Goiás. Também foram adquiridos frutos de *A. occidentale* em feiras de Goiânia em três semanas diferentes, buscando uma maior variedade de amostras comerciais de caju. As coletas foram realizadas nos meses de setembro e outubro, período correspondente à frutificação das

espécies na região. Cada árvore amostrada teve três frutos selecionados, sempre buscando manter o mesmo estágio de maturação, de forma a minimizar variações associadas ao desenvolvimento do fruto. Todas as frutas foram lavadas, os pedúnculos foram fatiados manualmente com faca estéril, moído em moinho analítico IKA A11 (IKA, Staufen, Alemanha) e liofilizadas por 48 horas. Após a liofilização, as amostras foram armazenadas em ultra-freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração e análise.

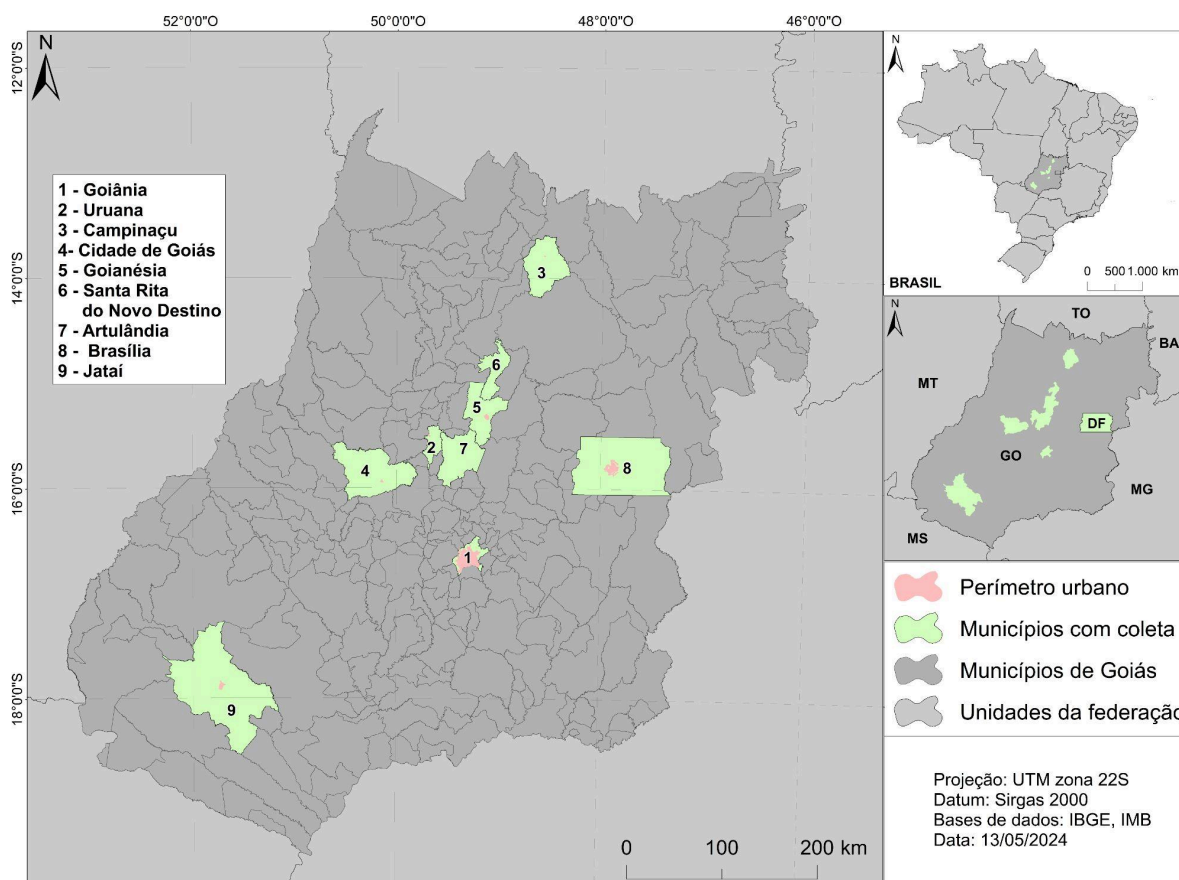


Figura 6. Mapa de localização dos pontos de coleta do caju e cajuzinho do cerrado.








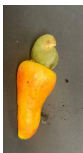
Fonte: Laboratório de Processamento de Imagens e Geoprocessamento (LAPIG), elaborado por Me. João Vitor Silva Costa.

Para a organização e rastreabilidade das amostras, foi adotado um sistema padronizado de nomenclatura, conforme apresentado na **Tabela 1** e na **Tabela 2**. As amostras identificadas com a letra “A” correspondem à espécie *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado), enquanto aquelas indicadas com a letra “B” pertencem à

espécie *Anacardium occidentale* (caju). O código completo segue o formato A1-01, em que a letra inicial representa a espécie; o primeiro número indica a localidade ou árvore específica dentro daquela espécie; e o número após o hífen identifica o fruto individual dentro do conjunto de três frutos coletados por árvore. Essa padronização permitiu manter um controle rigoroso da origem de cada amostra e assegurou a consistência ao longo de todas as etapas analíticas. As tabelas também incluem as imagens das amostras após o processo de liofilização.

Para quantificação e análise metabolômica, 20 mg do pedúnculo liofilizados foram extraídos com 1 mL de metanol contendo 500 ng/mL do PI, agitados em vórtex por 1 min, levado em ultrassom por 10 min e por fim centrifugados a 14.000 rpm por 30 min a 4 °C. A fase orgânica foi separada e mantida até a análise por LC-MS/MS. Os extratos das amostras foram diluídos em fase móvel em proporção 1:15 (v:v), e transferidos para frascos injetáveis para análise por LC-MS/MS.

Tabela 1. Siglas, localidades e imagens das amostras de *A. humile* liofilizadas e do fruto *in natura*.

Sigla	Cidade	Amostra liofilizada	Fruto
A1	Goiânia		
A2	Uruana		
A3	Campinaçu		
A4	Cidade de Goiás		

A5	Goianésia matriz 1		
A6	Goianésia matriz 2		
A7	Santa Rita do Novo Destino matriz 1		
A8	Santa Rita do Novo Destino matriz 2		
A9	Santa Rita do Novo Destino matriz 3		
A10	Santa Rita do Novo Destino matriz 4		
A11	Santa Rita do Novo Destino matriz 5		
A12	Artulândia		

A13

Brasília















A14

Goianésia matriz 3



Tabela 2. Siglas, localidades e imagens das amostras de *Anacardium occidentale* liofilizadas e do fruto *in-natura*.

Sigla	Cidade	Amostra liofilizada	Fruto
B1	Feira Goiânia 1		
B2	Feira Goiânia 2		
B3	Feira Goiânia 3		
B4	Goianésia fazenda		
B5	Goianésia cidade		
B6	Goianésia caju amarelo 1		

B7	Jataí		
B8	Goianésia caju amarelo 2		
B9	Goianésia fazenda		
B10	Goianésia cidade		

4.2.2 Extração dos compostos bioativos para análises de atividade antioxidante *in vitro*

Os compostos bioativos foram extraídos em metanol. A amostra de caju liofilizado (50 mg) foi pesada e então adicionado 1 mL de metanol, em seguida foi deixada sob agitação por 1 minuto e em sonicação por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, 14.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a - 80 °C para posteriores análises.

Os testes *in vitro* foram conduzidos por meio de ensaios espectrofotométricos realizados em placas de 96 poços, utilizando o leitor de placa Enspire® (PerkinElmer) em absorbâncias específicas determinadas para cada tipo de ensaio.

4.2.2.1 Capacidade antioxidante por ABTS

Para avaliar o poder antioxidante das amostras, adotou-se o método baseado na captura do radical ABTS^{•+}, seguindo a metodologia de Rufino et al. com pequenas adaptações (152,153). O radical ABTS^{•+} foi gerado através da reação de sal de diamônio ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) com persulfato de potássio (K₂S₂O₈), adicionando 176 µL de K₂S₂O₈ (140 mM) em 10 mL de ABTS (7 mM). Essa mistura foi mantida em repouso no escuro, à temperatura ambiente, por um período de 16 horas para completa formação do radical estável. Após esse período, a solução foi diluída com etanol até obter uma absorbância de 0,70 ± 0,05 a 734 nm.

Em um ambiente escuro, foram adicionados em cada poço da placa, 250 µL da solução de ABTS^{•+} e 50 µL da amostra na concentração de 1,0 mg/mL. A absorbância foi medida após 6 minutos de reação em comprimento de onda de 734 nm. Paralelamente, preparou-se uma curva de calibração utilizando soluções etanólicas de trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8- tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) em concentrações variando de 1 a 75 µM. Os resultados obtidos foram expressos equivalente de trolox por grama de amostra (µM trolox/g de caju), permitindo assim a comparação quantitativa da capacidade antioxidante entre as diferentes amostras analisadas.

4.2.2.2 Capacidade antioxidante por DPPH

A capacidade antioxidante também foi determinada pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), com base em metodologia descrita na literatura com ajustes (130,153). Preparou-se uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,06 mM. Desta solução, foi transferido 250 µL para os poços de

um microplaca, adicionando-se em seguida 50 µL dos extratos das amostras em diferentes concentrações. A mistura foi mantida protegida da luz por 30 minutos para permitir a reação completa entre os antioxidantes presentes nas amostras e o radical DPPH.

Após este período, mediu-se a absorbância a 515 nm. Para quantificação foi preparada uma curva de calibração com soluções de DPPH em concentrações entre 10 e 60 µM. A atividade antioxidante foi expressa como concentração efetiva (EC_{50}), que corresponde à quantidade de extrato necessária para reduzir pela metade a concentração inicial do radical DPPH. Os resultados foram apresentados em grama de fruta por grama de DPPH (g de fruta/g de DPPH), permitindo a comparação do potencial antioxidante entre as amostras.

4.2.3 Determinação dos compostos bioativos pelo sistema LC-MS/MS

Para caracterização completa dos compostos bioativos das amostras, foram estabelecidos e validados dois métodos analíticos distintos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. O primeiro método foi desenvolvido para detecção e quantificação simultânea de onze compostos fenólicos principais, incluindo queratina, rutina, catequina, ácido ferúlico, kaempferol, ácido cafeico, ácido clorogênico, cianidina, epicatequina, isoquercetina e ácido gálico. Paralelamente, um segundo método foi desenvolvido para a determinação específica de ácido ascórbico, considerando suas particularidades químicas e de estabilidade que demandam condições analíticas diferenciadas.

As análises foram realizadas em sistema HPLC Exion LC™ acoplado a um espectrofotômetro de massas triplo quadrupolo 4500 QTRAP™ (SCIEX, Toronto, CA) equipado com fonte de ionização Turbo V™, atuando operando no modo de ionização *Turbo Ion Spray*® (“*electrospray*” – ESI). As análises do método 1 foram realizadas utilizando a fonte ESI em modo positivo e negativo simultaneamente, enquanto o método 2 foi conduzido apenas em modo positivo.

O processo de desenvolvimento dos métodos iniciou-se com a avaliação das condições ideais para detecção por espectrometria de massas. Para isso,

realizou-se infusões diretas individuais de cada solução padrão dos analitos e do padrão interno, empregando concentrações de 500 ng/mL. Os íons precursores foram monitorados no modo “precursor ion” variando os seguintes parâmetros: potencial de desagrupamento (DP - *declustering potential*), potencial de entrada (EP- *entrance potential*), energia de colisão (CE - *collision energy*) e potencial de saída da cela de colisão (CXP - *collision cell exit potential*).

Os valores otimizados dos parâmetros da fonte de íons para os métodos foram: gás de cortina (CUR) foi mantido a 20 psi, enquanto as pressões dos gases da fonte de íons nebulizadores (GS1 e GS2) foram configuradas em 60 e 40 psi, respectivamente, garantindo uma nebulização eficiente da amostra. A temperatura da fonte de *electrospray* foi fixada em 600 °C para otimizar a dessolvatação dos íons, utilizando gás de colisão médio (CAD). As voltagens da fonte de íons ESI utilizadas foram de +4500 V e -5500 V nos modos positivo e negativo, respectivamente. O software utilizado para controlar as funções do sistema foi o Analyst® 1.7.2 (Sciex, Singapore).

Para a análise cromatográfica, utilizou-se como fase estacionária uma coluna ACE generix C18 (150 x 4,6 mm, com 5 µm de tamanho de partícula) com cartucho de proteção phenomenex (4 x 3 mm) a 40 °C para os dois métodos. A temperatura do amostrador foi ajustada em 15 °C. O Método 1 utilizou ácido fórmico 0,1% (v/v) em água como fase móvel A e metanol como fase móvel B. A eluição do gradiente começou em 15% (B), foi mantida por 2 min e aumentou linearmente para 85% (B) até 10,5 min, e foi mantida constante até 11 min a 85% (B). O eluente foi então restaurado às condições iniciais e mantido até 16 min a 15% (B). A vazão foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção foi de 10 µL. No método 2 a fase móvel foi constituída por uma fração aquosa com ácido fórmico 0,1% (v/v) + formiato de amônio 10 mM (A) e metanol como fração orgânica (B). A separação cromatográfica foi realizada em modo isocrático utilizando a proporção de 70:30 (A:B v/v) a uma vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e tempo de corrida foi de 4 minutos.

4.2.4 Validação do método LC-MS/MS

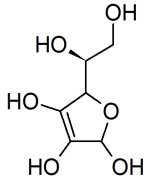
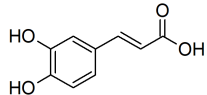
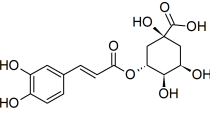
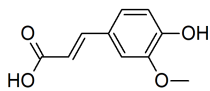
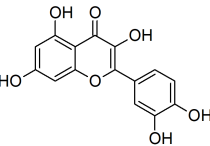
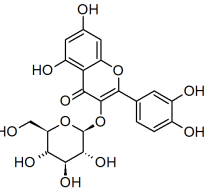
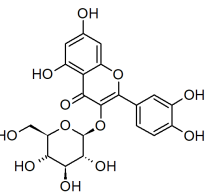
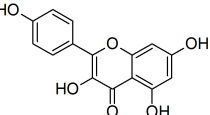
A validação de um método analítico é um processo importante para fornecer evidências de que um método é adequado ao propósito pretendido, garantindo que os resultados obtidos sejam confiáveis, reprodutíveis e precisos dentro do intervalo de concentrações específicas em que as substâncias de interesse devem ser encontradas. A validação precisa ser realizada para todos os analitos de interesse dentro do escopo do método (154).

Na competência de órgãos nacionais foram utilizados dois compêndios que regulamentam a validação de método analítico, a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 - Anvisa (155) e a Instrução normativa nº 4, de 18 de junho de 2014 (156). Dentre os documentos internacionais foi utilizado o SANTE 11312/2021 da União Europeia (154). Conforme instruções dos guias, foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão.

4.2.4.1 Linearidade

A linearidade do método é a capacidade, dentro de um determinado intervalo, de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito. Para verificação da linearidade foi construída uma curva analítica com os valores da razão das áreas do analito e do PI ($\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{PI}}$) *versus* a concentração do analito. Devido a diferença de ionização de cada analito utilizado neste estudo, foi necessário separar os analitos em grupos, utilizando diferentes faixas de concentrações, como pode ser observado na **Tabela 3**. As curvas foram feitas em 7 níveis de concentrações diferentes e em triplicata. Para o método do ASC a linearidade foi determinada de 100 a 1000 ng/mL. Para avaliar a linearidade, os coeficientes de correlação e análise de variância (ANOVA) foram calculados.

Tabela 3. Compostos bioativos: sigla, estrutura, classificação química e faixa linear de quantificação

Composto	Sigla	Estrutura	Classificação química	Faixa linear (ng/mL)
Ácido ascórbico	ASC		ácido orgânico	100 - 1000
Ácido cafeico	CAF		ácido cinâmico	0,5 - 500
Ácido clorogênico	CLOR		ácido cinâmico	0,5 - 500
Ácido ferúlico	FER		ácido cinâmico	0,5 - 500
Quercetina	QUER		flavonol	0,5 - 500
Epicatequina	EPI		flavanol	5 - 640
Isoquercetina	ISO		flavonol	5 - 640
Kaempferol	KAM		flavonol	5 - 640

Ácido gálico	GAL		ácido benzóico	10 - 640
Catequina	CAT		flavanol	10 - 640
Cianidina 3-glucosídeo	CIA		antocianina	10 - 640
Rutina	RUT		flavonol	10 - 640

4.2.4.2 Efeito matriz

O efeito matriz é a influência de compostos co-extraídos de uma amostra na detecção ou quantificação precisa dos analitos de interesse, podendo haver supressão ou aumento de sinal dos analitos na matriz em comparação com aquela produzida pelas soluções em solventes. A presença ou ausência do efeito matriz foi demonstrado por meio da diferença entre a inclinação das curvas construídas com solução dos analitos em solvente e em amostra fortificada (amostra + padrão), seguindo a equação 2.

$$Efeito\ matriz\ (\%) = \left(\frac{S_{matriz}}{S_{solvente}} - 1 \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde

S_{matriz} = inclinação da curva em matriz fortificada

$S_{solvente}$ = inclinação da curva em solvente

4.2.4.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LIQ)

Os LD e LIQ estão relacionados ao desempenho instrumental do método. O LD é o menor nível de concentração da espécie de interesse na qual a área do pico pode ser detectada pelo equipamento. E o LIQ o menor nível de concentração que o analito pode ser quantificado pelo método, com precisão e exatidão aceitáveis. Esses limites foram obtidos a partir das curvas analíticas de calibração, utilizando o cálculo da média da inclinação da curva (IC) e do desvio padrão do intercepto (σ), conforme equações 3 e 4:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC} \text{ Equação 3}$$

$$LIQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC} \text{ Equação 4}$$

4.2.4.4 Precisão

A precisão no método avalia a proximidade entre os resultados obtidos através de uma série de medições obtidas de múltiplas amostragens, em uma mesma concentração. Dois tipos de estudos de precisão foram avaliados durante a validação do método de quantificação: repetibilidade e precisão intermediária.

A repetibilidade foi avaliada sob as mesmas condições de operação em um curto período de tempo, mesmo analista e mesma instrumentação utilizando 6 replicatas de uma mesma concentração de soluções preparadas individualmente. A precisão intermediária foi determinada pelos resultados obtidos em dias e analistas diferentes utilizando a mesma concentração e mesmo número de replicações da repetibilidade. A concentração escolhida corresponde ao ponto médio das curvas de calibração. Os resultados foram expressos por desvio padrão relativo e também por testes estatísticos de comparação, teste F e teste T.

4.2.4.5 Exatidão

A exatidão do método é definida pela concordância entre resultados obtidos com aqueles ditos como verdadeiro. Considerando o caju uma matriz complexa e não existindo placebo (fruto sem os compostos de interesse), a exatidão foi avaliada pela adição de padrão de referência com concentrações conhecidas à amostra (fruto liofilizado). Foram adicionadas concentrações teóricas de baixa, média e alta, com três replicatas, seguindo intervalo determinado na linearidade, abrangendo assim todo o intervalo de aplicação do método. A exatidão foi expressa por meio de estudo de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz, estabelecida pela relação entre a área da matriz fortificada e a área do padrão em solução, seguindo a equação 5.

$$EXATIDÃO(\%) = \frac{(A_{matriz+padr\tilde{a}o} - A_{matriz})}{A_{padr\tilde{a}o}} \cdot 100 \text{ Equação 5}$$

4.2.5 Análise metabolômica por LC-MS/MS

Para estudos de metabolômica, as análises por LC-MS/MS foram realizadas utilizando um sistema HPLC-UV Agilent 1220 Infinity II acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Thermo Scientific Q-Exactive híbrido Quadrupole-Orbitrap, equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), utilizando uma metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa e já aplicada em trabalhos anteriores (157). A coluna utilizada neste estudo foi uma coluna Luna Omega Phenomenex C18 (4,6 × 150 mm × 5 µm).

Todas as amostras foram analisadas utilizando eluição em gradiente no modo ESI-positivo. A fase móvel binária consistia em (A) solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e (B) metanol. A eluição em gradiente iniciou-se a 20% (B), aumentando linearmente até 95% (B) ao longo de 13 min, seguida por uma manutenção de 19,5 min a 95% (B). O eluente foi então restaurado às condições iniciais em 1 min e

mantido constante por 2 min. A vazão foi fixada em 0,5 mL min⁻¹, com um volume de injeção de 30 µL e uma temperatura da coluna mantida a 35 °C.

Os parâmetros da fonte ESI foram os seguintes: tensão de pulverização de 3,5 kV; temperatura capilar de 250 °C; nível de RF da lente S de 60 V; vazão do gás de revestimento de 47 L min⁻¹; e vazão do gás auxiliar de 11 L min⁻¹. Espectros de massas de alta resolução foram obtidos no modo Full MS/dd-MS². A faixa de massas nos experimentos de varredura de MS completo foi de m/z 100-1200. Os 5 precursores mais abundantes (TopN, 5, contagem de loops 5) foram transferidos sequencialmente para aquisição de fragmentação induzida por colisão. A energia de colisão para os analitos alvo foi de 20, 30 e 35 eV. O poder de resolução foi de 140.000 e 70.000 para aquisições de Full MS/dd-MS², respectivamente.

4.2.6 Análise estatística

Todas as análises estatísticas e visualização de dados foram realizadas em Python3, utilizando scripts personalizados e desenvolvidos internamente. As bibliotecas NumPy, pandas, matplotlib, SciPy e scikit-learn foram aplicadas para tratamento dos dados, geração de figuras e análises de significância. Para os dados de quantificação de compostos bioativos (n = 12), foi conduzida uma ANOVA unidirecional ao nível do fruto (n = 72), a fim de testar diferenças significativas (p < 0,05) entre *A. humile* e *A. occidentale*.

Em seguida, realizou-se uma Análise de Componentes Principais (ACP) para explorar padrões nos perfis de concentração. Previamente, os dados foram centrados na média e escalonados para variância unitária, reduzindo a influência de metabólitos com alta variabilidade. Dois modelos foram avaliados: (i) considerando todos os metabólitos quantificados e (ii) apenas aqueles com diferenças significativas identificadas pela ANOVA.

Para os dados metabolômicos não direcionados, os espectros foram extraídos diretamente dos arquivos brutos (.RAW) por meio da biblioteca Raw File Reader, em scripts Python3 personalizados. O pré-processamento envolveu a remoção de sinais

com intensidade inferior a 1% da máxima em cada varredura, seguido por soma espectral e normalização pelo pico base, resultando em intensidades relativas de 0 a 100%. O alinhamento de massa foi realizado arredondando valores de m/z até a terceira casa decimal, obtendo-se uma matriz final composta por 539 variáveis. Esse tipo de alinhamento não direcionado tem se mostrado eficaz para análises metabolômicas em sistemas vegetais complexos (158).

Na etapa exploratória, empregaram-se métodos de aprendizado não supervisionado, como o Análise de Cluster Hierárquico (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA) (159), seguidas pelo algoritmo *K-means*, como o objetivo de identificar padrões naturais de agrupamento entre as amostras de *A. occidentale* e *A. humile* coletadas em diferentes localidades. Além disso, realizou-se uma análise estatística univariada utilizando *volcano plots*, os quais permitiram a visualização integrada de metabólitos com diferenças significativas entre as espécies. Para uma discriminação mais robusta, adotou-se uma abordagem supervisionada por meio da Análise Discriminante por Mínimos Quadros Parciais (PLS-DA), que permitiu visualizar os metabólitos mais discriminantes entre *A. occidentale* e *A. humile* (179–182).

5.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliação da capacidade antioxidante das amostras, foram utilizados os métodos de ABTS e DPPH, ambos amplamente reconhecidos para este tipo de avaliação e aplicáveis em diferentes extratos vegetais e produtos naturais. A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos para a capacidade antioxidante dos extratos de caju, conforme determinado pelos métodos de ABTS e DPPH. Os valores obtidos pelo método ABTS foram expressos em μmol de trolox/g de caju, enquanto os valores para o método DPPH são expressos em concentração eficiente EC_{50} (g de caju/g de DPPH $^{\cdot}$). O EC_{50} indica a concentração necessária para o antioxidante reduzir em 50% a quantidade inicial de DPPH $^{\cdot}$ da reação.

Tabela 4. Capacidade antioxidante dos extratos de caju pelos métodos de DPPH e ABTS.

Amostras	Espécie	DPPH (EC ₅₀)	ABTS (μ mol de trolox/g de caju)
A1	Cajuzinho do cerrado (<i>A. humile</i>)	89,75	372,52
A2		227,62	108,72
A3		107,58	249,17
A4		138,07	316,79
A5		133,63	150,99
A6		170,73	164,45
A7		152,39	325,34
A8		159,4	244,85
A9		145,48	234,82
A10		97,47	187,74
A11		125,16	240,52
A12		118,11	206,12
A13		85,37	245,44
A14		95,6	313,35
B1	Caju (<i>A. occidentale</i>)	75,77	336,54
B2		92,77	281,21
B3		103,54	224,01
B4		65,67	454,58
B5		110,43	162,98
B6		121,7	178,01
B7		82,39	348,04
B8		381,94	73,64
B9		82,56	313,15
B10		133,34	177,62

Ao analisar a atividade antioxidante pelo método de DPPH[•], observou-se uma variabilidade significativa entre as amostras de *A. occidentale* e cajuzinho do cerrado. A amostra B4 (*A. occidentale*) apresentou maior eficiência antioxidante (EC₅₀ de 65,67 g de caju/g de DPPH[•]), seguida pelas amostras B1 (75,77) , B7 (82,39) e B9 (82,56), que apresentaram desempenho semelhante. Em contraste, a amostra B8 (EC₅₀ = 381,94) demonstrou menor atividade antioxidante, exigindo quase seis vezes mais extrato para neutralizar o radical DPPH[•] em comparação com B4. Essa diferença pode estar associada a diferenças na composição de compostos fenólicos presentes em cada uma.

Entre as amostras de cajuzinho do cerrado, a amostra A13 apresentou maior atividade antioxidante, com EC₅₀ 85,37 g de caju/g de DPPH[•]. As amostras A1, A5, A10 e A3 exibiram valores de EC₅₀ próximos ao da amostra de A13, variando entre 89,75 a 103,54 g de caju/g de DPPH[•], sugerindo um perfil antioxidante homogêneo neste grupo. Por outro lado, a amostra A2 (227,62) demandou uma quantidade significativamente maior de extrato para a neutralização do radical, indicando menor eficiência antioxidante.

Em um estudo anterior conduzido por Alves *et al.* (2014) com amostras de cajuzinho do cerrado coletada em diferentes municípios de Goiás, foram observados valores de DPPH significativamente inferiores aos encontrados no presente estudo. As amostras analisadas, provenientes de Goianésia, Faina e Santa Terezinha, apresentaram valores de EC₅₀ de 8,2 ± 1,6; 28,0 ± 2,3 e 31,8 ± 3,4 g fruto. g⁻¹ DPPH, respectivamente. Esses resultados contrastam com os valores médios obtidos em nossa pesquisa para a mesma espécie (131,88 g fruto. g⁻¹ DPPH), sugerindo diferenças importantes na composição química dos frutos ou nos métodos analíticos empregados. Por outro lado, em um estudo com frutas tropicais que inclui o caju (*A. occidentale*), o valor reportado de EC50 foi de 906 ± 78,2 g fruto. g⁻¹ DPPH, notavelmente mais elevado do que o valor da nossa amostra com menor atividade antioxidante (B8=381,94 g fruto. g⁻¹ DPPH) e cerca de sete vezes maior que a média para *A.occidentale* (125,01 g fruto. g⁻¹ DPPH) (153,164). As diferenças observadas nos resultados podem ser atribuídas a variações nos métodos de preparo das amostras, nos procedimentos de extração dos compostos antioxidantes, bem como

às condições de coleta, fatores edafoclimáticos, e ao armazenamento das amostras até análise.

A avaliação da atividade antioxidante utilizando pelo método ABTS revelou uma ampla variação nos resultados, com valores variando entre 73,64 a 454,58 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ de caju. Entre as amostras de *A. occidentale*, a amostra B4 demonstrou a maior capacidade antioxidante, enquanto a amostra B8 exibiu menor. No grupo do cajuzinho do cerrado, a amostra A1 apresentou a maior capacidade antioxidante, com 372,52 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ de caju, e a amostra A2 apresentou a menor, com 95,72 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ de caju.

Contreras-Calderón *et al.* (2011), ao estudar a capacidade antioxidante de diversas frutas exóticas da Colômbia, observaram que o maracujá banana (*P. tarminiana*), maracujá banana (*P. mollissima*) e caju (*A. occidentale*) apresentaram os maiores valores, com 144, 131 e 115 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, respectivamente. Em contraste, Rufino *et al.* (2010), avaliaram a capacidade antioxidante de frutas tropicais do Brasil, e identificaram que o caju apresentou uma atividade antioxidante relativamente baixa, com $79,4 \pm 15,7 \mu\text{mol trolox.g}^{-1}$. Comparativamente, o caju superou carnaúba, bacuri, cajá, açaí, mangaba e umbu, enquanto frutas como jabuticaba, acerola e camu-camu mostraram atividade antioxidante superior. Clones de *A. occidentale* em diferentes estágios de maturação revelaram uma atividade antioxidante total, medida pelo método de ABTS, variando de 35,61 a 109,07 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ de caju (165).

Os valores de atividade antioxidante obtidos no presente foram significativamente mais altos do que os relatados na literatura para a maioria das amostras, com média de 240,06 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ para cajuzinho do cerrado e 254,98 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$ para o caju (108,166).

5.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS LC-MS/MS

A otimização dos parâmetros do sistema de detecção por espectrometria de massas com fonte de ionização por *electrospray* foi conduzida individualmente para cada um dos analitos de interesse neste estudo. Para isso, infusões diretas foram feitas com soluções padrões de cada composto na concentração de 500 ng/mL. No

modo Q1 *multiple ions*, foram definidos os valores ótimos de DP tanto para os íons precursores protonados $[M + H]^+$ quanto para os desprotonados $[M - H]^-$. O DP, potencial de desagrupamento, é um potencial aplicado ainda na fonte de ionização, que tem por finalidade desfazer possíveis ligações entre os analitos e as moléculas do solvente, garantindo assim a liberação eficiente dos íons individuais para análise. Contudo, valores elevados de DP podem induzir fragmentações prematuras dos íons ainda na fonte, afetando comprometendo a eficiência do processo e sensibilidade de resposta (167). Nestes experimentos, foram aplicadas rampas de potencial variando de 0 a 150 volts (V), e os valores ideais de DP foram selecionados a partir das curvas de intensidade iônica obtidas, correspondente ao potencial que proporcionou maior intensidade do íon precursor.

Para definir a fragmentação e melhor sensibilidade dos íons produtos, fragmentações MS/MS foram realizadas no modo *product ion*, sob diferentes energias de colisão (CE, do inglês *collision energy*), variando de 0 a 50 V. Foram selecionados os dois íons produtos de maior intensidade para cada analito, o primeiro para quantificação e o segundo para confirmação. Para otimizar a CE de cada íon produto foi utilizado o modo MRM, monitorando através da rampa de energia de colisão o valor de maior intensidade para cada fragmentação.

Parâmetros como potencial de entrada (EP, do inglês *entrance potential*) e potencial de saída da célula de colisão (CXP, do inglês *collision cell exit potential*) também foram otimizados. O EP é aplicado para guiar e focar os íons que são injetados no Q1, tendo um menor efeito na otimização do sistema. O CXP concentra e acelera os íons fragmentados que saem da célula de colisão e entram no Q3. Sua otimização é importante para garantir uma fragmentação eficiente e uma detecção sensível dos íons fragmentados, contribuindo para obtenção de melhores resultados.

Os valores otimizados de DP, CE, EP e CXP, para cada transição dos 12 analitos e do padrão interno, foram registrados na **Tabela 5**. A avaliação dos parâmetros de ionização e fragmentação foi realizada a fim de se obter uma maior especificidade e valores de detecção e quantificação mais baixos.

Tabela 5. Condições de ionização e parâmetros MRM para compostos bioativos analisados por LC-MS/MS, incluindo tempo de retenção, íons precursores/produtos e energias de colisão.

Compostos	Modo de ionização	t _R (min)	Íon precursor (m/z)	1ª transição*			2ª transição			DP (V)
				Íon produto (m/z)	CE (V)	CXP (V)	Íon produto (m/z)	CE (V)	CXP (V)	
Ácido gálico	-	2,63	169	125	-10	-11	79	-32	-14	-95
Catequina	-	5,52	289	245	-20	-9	203	-24	-15	-90
Ácido clorogênico	-	6,06	353	191	-26	-13	135	-48	-9	-65
Epicatequina	-	6,61	289	109	-28	-9	245	-20	-9	-90
Ácido cafeico	-	6,77	179	134	-32	-9	107	-30	-7	-60
Ácido ferúlico	-	8,05	193	178	-17	-15	134	-24	-9	-60
Isoquercetina	-	8,41	463	300	-36	-11	301	-30	-11	-100
Quercetina	-	9,80	301	151	-28	-11	179	-24	-9	-100
Cianidina	+	6,43	449	287	24	19	213	61	19	90
Rutina	+	8,34	611	303	29	10	465	19	14	56
Kaempferol	+	10,55	287	153	43	10	185	37	12	86
Ácido ascórbico	+	1,58	177	95	16	10	85	19	10	55
PI	+	5,57 ^a 2,51 ^b	331	165	49	12	211	35	14	30

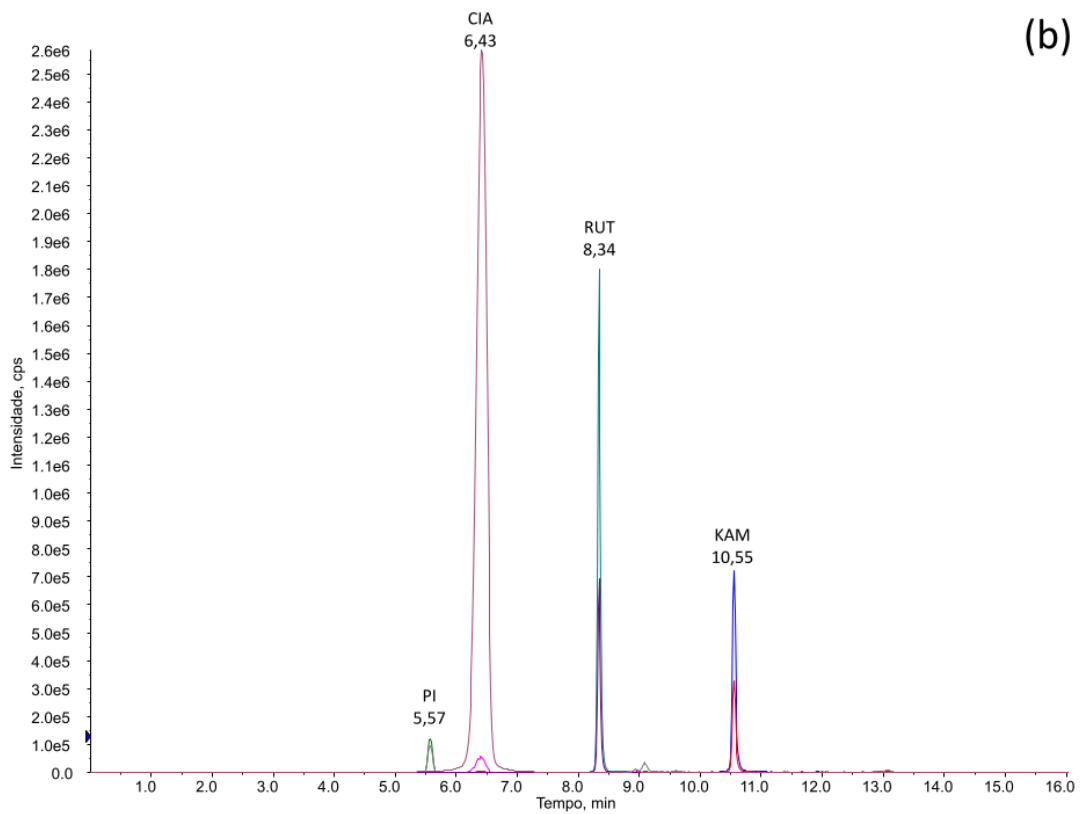
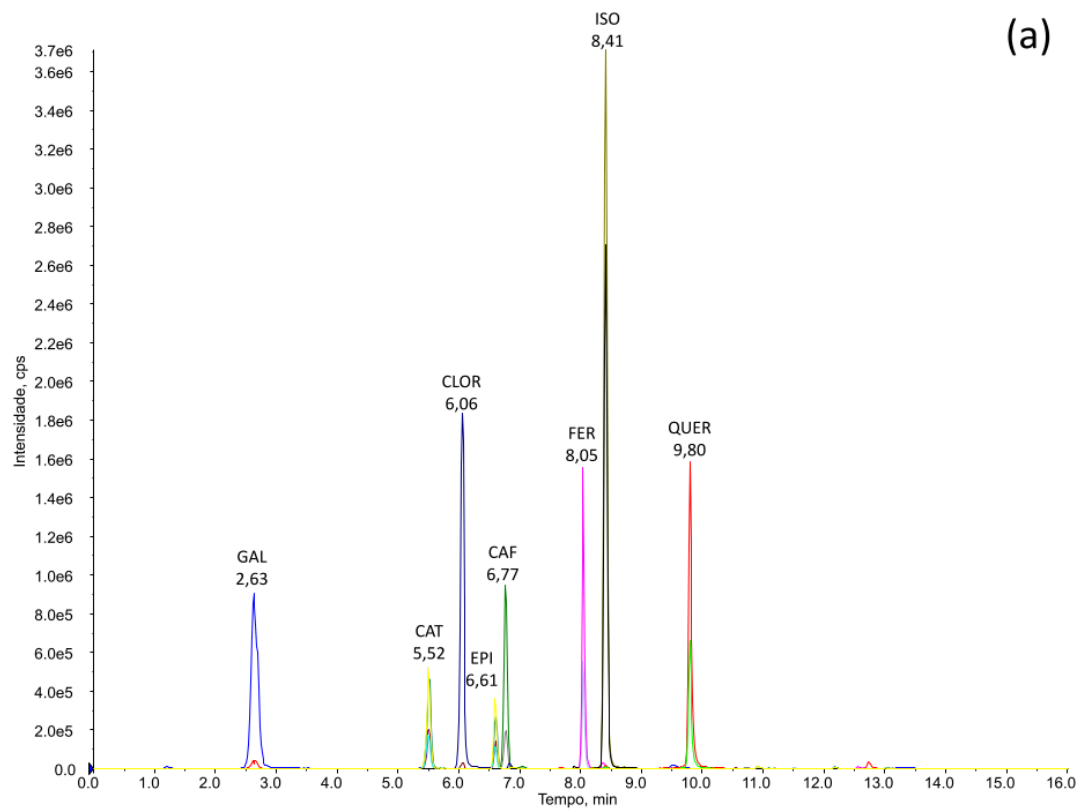
Legenda: t_R tempo de retenção; *transição de quantificação; ^a t_R método 1 ; ^b t_R método 2; DP - potencial de desagrupamento (declustering potential); CE - energia de colisão (collision energy) e CXP - potencial de saída (collision cell exit potential). (+) modo positivo (-) modo negativo.

Para estabelecer as melhores condições de separação, foram realizadas inicialmente a análise da mistura de padrões em modo isocrático, monitorando os tempos de retenção e a resolução entre os picos. Diferentes proporções de solventes na fase móvel foram testadas, porém não foi possível alcançar a separação completa dos 12 compostos nesse modo de eluição.

Em seguida, foram avaliadas colunas C18 com diferentes configurações (variações em comprimento e tamanho de partícula), mantendo-se a eluição isocrática. No entanto, mesmo com essas modificações, a resolução obtida permaneceu insuficiente para a separação eficiente de todos os analitos.

Diante desses resultados, optou-se pela eluição em gradiente, utilizando como fase móvel água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (B) até a obtenção de picos com boa resolução e separação. Para otimizar a intensidade dos picos, foram avaliados diferentes aditivos na fase móvel, incluindo o aumento de ácido fórmico e a adição de formiato de amônio (5 mM e 10 mM). No método 1, a condição sem adição de formiato de amônio resultou nas maiores intensidades de sinal. Já no método 2, a presença simultânea de 0,1% de ácido fórmico e 10 mM de formiato de amônio proporcionou desempenho superior em termos de intensidade e qualidade do sinal.

A substituição do solvente orgânico por acetonitrila foi avaliada, porém não foram observadas diferenças significativas no desempenho cromatográfico. Diante disso, optou-se pela utilização de metanol devido à sua menor toxicidade e custo reduzido. Após a definição dos solventes da fase móvel buscou-se uma redução do tempo de análise por meio da modificação das condições de eluição gradiente. Essa otimização permitiu reduzir o tempo total de corrida cromatográfica de 30 para 16 minutos, mantendo a resolução adequada dos picos e a eficiência de separação. A diminuição do tempo de corrida proporcionou não somente a redução do tempo necessário para realizar cada ensaio, mas também economia substancial no consumo de reagentes da fase móvel, sem comprometer a separação dos analitos de interesse e a resolução dos picos cromatográficos. Na **Figura 7**, pode ser observado os cromatogramas do método 1 e do método 2.



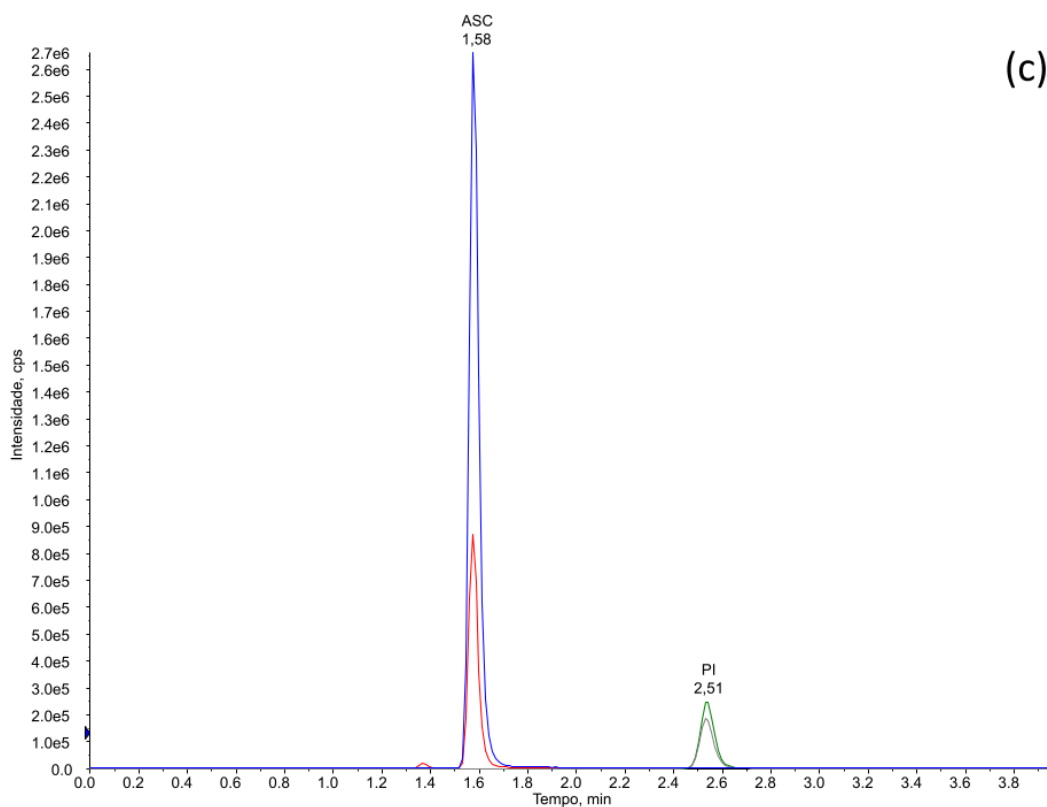


Figura 7. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS a partir das soluções de padrões (250 ng/mL): (a) método 1 em modo de ionização negativo (ESI^-); (b) método 1 em modo de ionização positivo (ESI^+); e (c) método 2 modo de ionização positivo (ESI^+).

5.3 VALIDAÇÃO

De acordo com as recomendações dos guias de validação analítica, foram avaliadas as principais figuras de mérito para ambos os métodos desenvolvidos. As etapas de validação incluíram a verificação da linearidade, efeito matriz, limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), além da determinação da precisão e exatidão dos métodos. Essas avaliações permitiram assegurar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos nas análises quantitativas.

5.3.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade dos métodos, os compostos foram analisados em diferentes faixas de concentração adequadas a cada analito. Os compostos CAF, CLOR, FER e QUER foram avaliados da faixa de 0,25 a 500 ng/mL, enquanto KAM, EPI e ISO foram analisados entre 5 a 640 ng/mL, e GAL, CAT, RUT e CIA entre 10 e 640 ng/mL. As curvas analíticas foram construídas com oito níveis de concentração, preparadas tanto em solventes (mistura 50:50 de água acidificada com 0,1 % ácido fórmico e MeOH) quanto em extrato da matriz, permitindo avaliar o comportamento dos analitos em diferentes meios. A avaliação da linearidade foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação e da análise de variância das curvas analíticas, garantindo uma avaliação estatística robusta.

Para a construção das curvas de calibração, foram plantados gráficos de dispersão relacionando a razão entre a área do analito e a área do padrão interno (eixo y) com a concentração dos padrões em ng/mL (eixo x). A partir destes gráficos foram obtidas as equações de regressão linear, contendo os coeficientes angular e linear além dos coeficientes de determinação (R^2) e de correlação de Pearson (r) para cada um dos analitos. Os resultados demonstraram excelente linearidade para todos os compostos estudados, com os valores de r variando entre 0,9942 e 0,9993, conforme apresentado na Tabela 6. Estes valores confirmam a adequação dos métodos para determinações analíticas quantitativas, atestando sua confiabilidade e precisão nas faixas de concentrações avaliadas. A consistência dos resultados obtidos tanto em solvente quanto em matriz reforça a robustez dos métodos desenvolvidos.

Para avaliar a homocedasticidade dos métodos, foi empregado o teste estatístico de Cochran, que comparou o valor de $C_{\text{calculado}}$ e de $C_{\text{crítico}}$. O $C_{\text{calculado}}$ foi determinado a partir dos valores experimentais, calculando-se a razão entre o maior valor de variância observada para os conjuntos de dados de y e a soma das variâncias de y em todos os níveis de concentração. Os resultados demonstraram que, para todos os analitos, os valores de $C_{\text{calculado}}$ foram maiores que o $C_{\text{crítico}}$, rejeitando-se a hipótese nula e indicando comportamento heterocedástico dos dados (168). Diante desses resultados, optou-se pela aplicação do método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) para correção da heterocedasticidade. Foram testados diferentes fatores de ponderação, visando minimizar o erro padrão relativo

e otimizar os valores de r . O fator de ponderação de $1/x^2$ mostrou-se o mais adequado, apresentando o melhor ajuste aos dados experimentais.

A comprovação da significância do coeficiente angular é fundamental para que seja demonstrada a linearidade dos métodos, assim o teste de análise de variância (Anova) foi aplicado a fim de comprovar a relação entre a concentração e o sinal obtido. O modelo se mostrou adequadamente ajustado aos dados experimentais, pois os valores de F calculados, apresentados na **Tabela 6**, foram maiores que o $F_{\text{crítico}}$, 4,30. Os valores de p de significância, também obtido pela Anova, foram inferiores a 0,05, evidenciando assim que a hipótese nula é rejeitada, assumindo que Y efetivamente varia em função de x e que o modelo de regressão linear é significativo.

Tabela 6. Parâmetros estatísticos das curvas de calibração: intervalos de concentração, coeficiente de correlação linear (r), resultados da ANOVA (F) e análise de efeito matriz

Compostos	r	F (Anova)	Efeito matriz (%)
Método 1_faixa 1: 0,25 - 500 ng/mL			
CAF	0,9993	15461,43	-0,41
CLOR	0,9981	5722,99	0,15
FER	0,9990	11071,57	18,10
QUER	0,9970	3678,92	-15,83
Método 1_faixa 2: 5 – 640 ng/mL			
KAM	0,9976	4548,49	-5,29
EPI	0,9980	5506,10	-5,95
ISO	0,9975	4431,49	-8,58
Método 1_faixa 3: 10 – 640 ng/mL			
GAL	0,9962	2846,03	-19,94
CAT	0,9942	1883,11	-1,10
RUT	0,9951	2226,25	-1,32
CIA	0,9959	2675,43	-0,82

Método 2: 100 – 1000 ng/mL

ASC	0,9964	2203,13	-16,91
-----	--------	---------	--------

Legenda: CAF (ácido cafeico), CLOR (ácido clorogênico), FER (ácido ferúlico), QUER (quercetina), KAM (kaempferol), EPI (epicatequina), ISO (isoquercetina), GAL (ácido gálico), CAT (catequina), RUT (rutina), CIA (cianidina), ASC (ácido ascórbico).

5.3.2 Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada mediante a comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas em solvente e em matriz fortificada. Os efeitos que os componentes da matriz exercem são classificados de acordo com o aumento ou supressão de sinal. Valores abaixo de $\pm 20\%$ são considerados baixo efeito matriz para a faixa de supressão ou aumento de sinal, entre $\pm 20\%$ e $\pm 50\%$ médio efeito e acima de $\pm 50\%$ alto efeito. Os cálculos de porcentagem de supressão ou enriquecimento de ionização foram efetuados conforme Equação 2 (item 4.6.2), cujos resultados estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados demonstraram um padrão predominante de supressão de sinal para a maioria dos analitos investigados, com exceção do ácido clorogênico e ácido ferúlico, que apresentam enriquecimento de ionização. Em todos os casos, as variações no sinal analítico mantiveram-se dentro da faixa de $\pm 20\%$, indicando que o efeito matriz pode ser considerado insignificante para a análise dos compostos em estudo. A ausência do efeito matriz permite inferir que os métodos desenvolvidos apresentam adequada eficiência para a matriz, possibilitando a utilização de curvas de calibração preparadas em solvente para análise quantitativas das amostras.

5.3.3 Limites de detecção e quantificação

Os LDs e LIQs foram calculados com base na inclinação das curvas de calibração e no desvio padrão dos resíduos, conforme equação 3 e 4 descritas no item 4.6.3. Os valores resultados obtidos encontram-se detalhados na **Tabela 7**, demonstrando a elevada sensibilidade dos métodos LC-MS/MS desenvolvido.

Para o método 1, os limites de quantificação foram estabelecidos entre 0,25 a 10 ng/mL, faixa que reflete a diferente capacidade de ionização dos diversos analitos investigados. No caso do método de quantificação do ácido ascórbico, o limite de

quantificação foi definido em 100 ng/mL, que representa a menor concentração que pode ser quantificada com precisão, levando em consideração a sensibilidade específica e a performance do método para este analito.

Tabela 7. Limite de quantificação (LIQ) e detecção (LD) para cada um dos analitos.

Compostos	LIQ (ng/mL)	LD (ng/mL)
faixa 1: 0,25 - 500 ng/mL		
CAF	0,2	0,09
CLOR	0,1	0,04
FER	0,6	0,2
QUER	0,2	0,1
faixa 2: 5 – 640 ng/mL		
KAM	2,3	0,8
EPI	4,9	1,6
ISO	2,4	0,8
faixa 3: 10 – 640 ng/mL		
GAL	8,6	2,8
CAT	2,8	0,9
RUT	3,3	1,1
CIA	4,1	1,4
faixa 4: 100 – 1000 ng/mL		
ASC	94,5	31,2

Legenda: CAF (ácido cafeico), CLOR (ácido clorogênico), FER (ácido ferúlico), QUER (quercetina), KAM (kaempferol), EPI (epicatequina), ISO (isoquercetina), GAL (ácido gálico), CAT (catequina), RUT (rutina), CIA (cianidina), ASC (ácido ascórbico).

Os valores obtidos para LIQ e LD mostraram-se consistentes com os dados reportados na literatura. Estudo realizado por Freitas *et al.* (2022) com compostos fenólicos em cajuzinho do cerrado apresentou limite de quantificação de 10 ng/mL, enquanto Mustafa e colaboradores (2022), ao analisarem 36 compostos fenólicos

em frutas vermelhas reportaram limites de detecção entre 0,4 e 3,3 mg/mL e limites de quantificação variando de 1,2 a 10 ng/mL.

Os valores obtidos para LD e LIQ foram relativamente baixos, evidenciando a alta sensibilidade da técnica analítica empregada, possibilitando a detecção e quantificação precisa dos compostos de interesse em baixas concentrações. Esses resultados atestam a adequabilidade do método para aplicação em diferentes matrizes vegetais, com potencial para análise de extratos de diversas frutas, mesmo quando os compostos se encontram em concentrações reduzidas.

5.3.4 Precisão

A precisão dos métodos analíticos foi conduzida através da repetibilidade e precisão intermediária. Para avaliação da repetibilidade, foram preparadas de forma independente seis réplicas de soluções na mesma concentração. Os resultados demonstram uma boa reprodutibilidade do método, com valores de desvio padrão relativo (DPR) variando entre 3,57% e 12,84% para os diferentes analitos. Esses valores estão dentro do limite aceitável estabelecido pelo documento da SANTE (2021), que recomenda DPR inferiores a 20%, confirmando a adequada precisão dos métodos desenvolvidos (154).

A precisão intermediária foi avaliada em diferentes dias e por diferentes analistas, utilizando a mesma concentração e o mesmo número de replicações empregado na avaliação da repetibilidade. Os valores de DPR encontrados foram inferiores a 20%, em conformidade com os limites estabelecidos para métodos analíticos (154). Os resultados foram expressos em termos de desvio padrão relativo e submetidos a análises estatísticas de comparação, incluindo o teste F e o teste T, os quais podem ser encontrados na **Tabela 8**. Os valores de p obtidos nas análises foram utilizados para determinar a significância estatística das variações observadas. Para ambos os testes, considerou-se o nível de significância de 5%. Os valores de p maiores a 0,05 indicaram que as variações observadas entre os dias e os analistas não foram estatisticamente significativas, sugerindo que a precisão intermediária é robusta e consistente sob as diferentes condições de teste. Reforçando assim a confiabilidade do método analítico utilizado.

Tabela 8. Avaliação da precisão do método: desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade e precisão intermediária, com respectivos valores de p

Analito	Repetibilidade	Precisão intermediária	valor de p
	DPR (%)	DPR (%)	
CAF	7,08	5,67	0,21
CLOR	9,29	8,07	0,18
FER	10,13	8,60	0,98
QUER	7,70	6,60	0,14
KAM	7,31	3,72	0,20
EPI	9,19	7,50	0,33
ISO	9,02	3,49	0,22
GAL	12,84	8,78	0,28
CAT	11,69	8,85	0,42
RUT	9,53	7,27	0,48
CIA	7,47	5,64	0,89
ASC	3,57	4,12	0,17

Legenda: CAF (ácido cafeico), CLOR (ácido clorogênico), FER (ácido ferúlico), QUER (quercetina), KAM (kaempferol), EPI (epicatequina), ISO (isoquercetina), GAL (ácido gálico), CAT (catequina), RUT (rutina), CIA (cianidina), ASC (ácido ascórbico).

5.3.5 Exatidão

A fim de avaliar a exatidão dos métodos desenvolvidos, as amostras de caju foram fortificadas em três diferentes níveis de concentração: baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), com três repetições por nível. Os resultados foram avaliados em termos de recuperação dos analitos, calculados conforme equação 5 descrita na seção 4.6.5. Os resultados estão apresentados na **Tabela 9** e mostram que as recuperações dos analitos variaram entre 88,42% e 110,78%. As recuperações médias para cada nível de concentração e para cada analito ficaram dentro do

intervalo de aceitabilidade recomendado por órgãos regulamentadores, que é de 80% a 120% para estes níveis de concentração (154,155).

Tabela 9. Resultados de exatidão expressos como porcentagem de recuperação para todos os analitos de interesse nas concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA)

Analito	Exatidão (%)		
	CQB	CQM	CQA
CAF	97,17	101,37	97,56
CLOR	92,72	97,20	102,20
FER	99,98	96,15	96,30
QUER	110,78	110,34	106,74
KAM	100,66	100,56	95,55
EPI	94,93	102,48	101,90
ISO	105,68	106,09	104,91
GAL	89,86	105,74	110,16
CAT	88,42	103,39	106,43
RUT	89,01	97,37	99,24
CIA	87,70	103,69	104,87
ASC	96,90	93,42	88,53

Legenda: CAF (ácido cafeico), CLOR (ácido clorogênico), FER (ácido ferúlico), QUER (quercetina), KAM (kaempferol), EPI (epicatequina), ISO (isoquercetina), GAL (ácido gálico), CAT (catequina), RUT (rutina), CIA (cianidina), ASC (ácido ascórbico).

5.8 APLICAÇÃO DE LC-MS/MS EM AMOSTRAS DE CAJU

Após otimização e validação, os métodos propostos foram aplicados em 72 amostras de caju e cajuzinho do cerrado. As amostras de cajuzinho foram coletadas de quatorze árvores diferentes distribuídas em oito cidades no estado de Goiás. Em seis desses municípios - Goiânia, Uruana, Campinaçu, Cidade de Goiás, Artulandia e Brasília - foram realizadas coletas de frutos de uma única árvore de cada Já em

Goianésia, os frutos foram obtidos de três árvores distintas, e em Santa Rita do Nova Destino, de cinco árvores diferentes.

Os frutos de caju (*A. occidentale*) foram coletados em sete árvores individuais localizadas em duas regiões geográficas distintas do estado de Goiás: na região sudoeste (Jataí) e na região central (Goianésia). Adicionalmente, frutos de caju *occidentale* foram adquiridos em feiras de Goiânia em semanas diferentes, incorporando ao estudo amostras comerciais para ampliar a diversidade da matriz analisada.

Utilizando o método validado para a análise das amostras, foi possível detectar e quantificar a maioria dos compostos bioativos investigados. No entanto, ácido clorogênico e kaempferol não foram detectados em concentrações adequadas para sua quantificação precisa, sendo portanto, considerados como ausentes. As concentrações dos demais compostos bioativos variaram entre 0,02 a 76,49 mg/100 g de caju liofilizado, conforme detalhado na **Tabela 10**.

Tabela 10. Resultados das análises das amostras de caju e cajuzinho (mg/100 g de caju liofilizado \pm DP), através dos métodos LC-MS/MS desenvolvidos

Amostras	CAF	QUER	CLOR	FER	GAL	CAT	CIA	RUT	ISO	EPI	KAMP	ASC
A1	<LIQ	0,06 \pm 0,02	<LIQ	<LIQ	1,99 \pm 0,09	4,93 \pm 0,36	<LIQ	4,85 \pm 0,49	1,31 \pm 0,13	<LIQ	<LIQ	25,57 \pm 1,65
A2	0,14 \pm 0,00	0,29 \pm 0,03	<LIQ	<LIQ	9,14 \pm 0,87	3,16 \pm 0,05	<LIQ	2,40 \pm 0,12	0,52 \pm 0,02	0,61 \pm 0,04	<LIQ	8,18 \pm 0,32
A3	0,12 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01	<LIQ	<LIQ	18,40 \pm 2,34	5,53 \pm 0,30	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ
A4	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	<LIQ	<LIQ	2,62 \pm 0,19	3,60 \pm 0,35	<LIQ	1,31 \pm 0,05	1,49 \pm 0,14	<LIQ	<LIQ	16,06 \pm 0,50
A5	0,03 \pm 0,01	0,10 \pm 0,03	<LIQ	<LIQ	1,37 \pm 0,46	6,55 \pm 2,09	<LIQ	2,93 \pm 0,98	1,56 \pm 0,39	0,57 \pm 0,08	<LIQ	13,79 \pm 1,49
A6	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	1,13 \pm 0,06	5,31 \pm 0,75	<LIQ	1,03 \pm 0,21	0,65 \pm 0,17	0,58 \pm 0,04	<LIQ	14,50 \pm 0,72
A7	<LIQ	0,02 \pm 0,03	<LIQ	<LIQ	0,63 \pm 0,55	2,83 \pm 0,93	2,15 \pm 0,65	4,03 \pm 1,75	1,64 \pm 0,65	0,36 \pm 0,32	<LIQ	23,19 \pm 0,93
A8	0,05 \pm 0,01	0,27 \pm 0,19	<LIQ	0,04 \pm 0,01	6,48 \pm 3,07	11,98 \pm 4,04	0,53 \pm 0,92	5,54 \pm 4,02	2,64 \pm 2,21	1,03 \pm 0,37	<LIQ	14,75 \pm 0,05
A9	0,03 \pm 0,00	0,12 \pm 0,01	<LIQ	0,02 \pm 0,02	10,08 \pm 1,71	18,15 \pm 0,89	<LIQ	0,97 \pm 0,12	1,90 \pm 0,13	1,55 \pm 0,28	<LIQ	<LIQ
A10	<LIQ	0,03 \pm 0,02	<LIQ	<LIQ	1,98 \pm 1,45	5,35 \pm 0,55	4,21 \pm 0,68	1,33 \pm 0,13	1,39 \pm 0,09	1,07 \pm 0,02	<LIQ	7,79 \pm 0,53
A11	<LIQ	<LIQ	<LIQ	<LIQ	1,05 \pm 0,10	4,91 \pm 0,44	<LIQ	0,98 \pm 0,22	<LIQ	<LIQ	<LIQ	14,23 \pm 0,58
A12	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	<LIQ	<LIQ	1,13 \pm 0,05	4,70 \pm 0,79	0,82 \pm 0,73	2,27 \pm 0,77	1,35 \pm 0,57	1,35 \pm 0,18	<LIQ	13,22 \pm 2,60

A13	0,03±0,00	0,12±0,01	0,04±21,9 2	0,03±0,03	5,31±0,96	10,49±2,53	43,82±5,35	2,94±0,52	3,03±0,45	1,83±0,11	<LIQ	18,69±2,97
A14	0,04±0,00	<LIQ	<LIQ	<LIQ	1,56±0,04	4,84±0,35	2,87±0,53	<LIQ	0,69±0,14	3,78±0,48	<LIQ	25,23±0,40
B1	0,02±0,02	0,11±0,08	<LIQ	<LIQ	4,20±1,74	<LIQ	<LIQ	<LIQ	6,39±4,97	0,56±0,16	<LIQ	46,46±8,33
B2	0,02±0,02	0,14±0,10	<LIQ	<LIQ	7,19±5,72	0,69±0,62	<LIQ	<LIQ	8,76±5,49	0,59±0,07	<LIQ	40,97±6,11
B3	0,07±0,01	0,47±0,11	<LIQ	<LIQ	14,74±0,71	2,02±0,07	<LIQ	<LIQ	9,85±3,16	0,93±0,19	<LIQ	26,86±0,79
B4	0,02±0,02	0,45±0,04	<LIQ	<LIQ	1,77±0,31	2,41±1,15	<LIQ	<LIQ	16,66±8,31	0,51±0,45	<LIQ	72,98±3,12
B5	0,06±0,00	0,05±0,00	<LIQ	0,05±0,04	1,92±0,18	1,96±0,14	<LIQ	<LIQ	2,96±0,18	0,47±0,06	<LIQ	20,94±1,75
B6	0,04±0,01	0,13±0,01	<LIQ	0,03±0,02	4,78±0,42	4,59±0,82	<LIQ	<LIQ	5,97±0,68	<LIQ	<LIQ	19,05±0,21
B7	0,04±0,01	0,24±0,03	<LIQ	0,00±0,00	4,45±0,16	6,17±0,36	<LIQ	<LIQ	16,10±1,53	4,04±0,18	<LIQ	51,31±1,37
B8	0,08±0,01	0,18±0,00	<LIQ	0,04±0,04	3,22±0,19	4,01±0,09	<LIQ	<LIQ	5,04±0,14	1,18±0,03	<LIQ	<LIQ
B9	0,05±0,00	0,06±0,00	<LIQ	0,05±0,04	1,75±0,17	3,25±0,10	<LIQ	<LIQ	3,01±0,72	1,36±0,07	<LIQ	49,51±0,64
B10	0,06±0,01	0,18±0,04	<LIQ	0,01±0,02	4,63±1,02	5,91±0,57	<LIQ	<LIQ	3,75±0,32	0,62±0,06	<LIQ	<LIQ

Legenda: CAF (ácido cafeico), CLOR (ácido clorogênico), FER (ácido ferúlico), QUER (quercetina), KAM (kaempferol), EPI (epicatequina), ISO (isoquercetina), GAL (ácido gálico), CAT (catequina), RUT (rutina), CIA (cianidina), ASC (ácido ascórbico); A: cajuzinho do cerrado (*A. humile*) B: Caju (*A. occidentale*); A1: Goiânia, A2: Uruana, A3: Campinaçu, A4: Cidade de Goiás, A5: Goianésia 1, A6: Goianésia 2, A7: Santa Rita do Novo Destino 1, A8: Santa Rita do Novo Destino 2, A9: Santa Rita do Novo Destino 3, A10: Santa Rita do Novo Destino 4, A11: Santa Rita do Novo Destino 5, A12: Artulândia, A13: Brasília, A14: Goianésia 3.

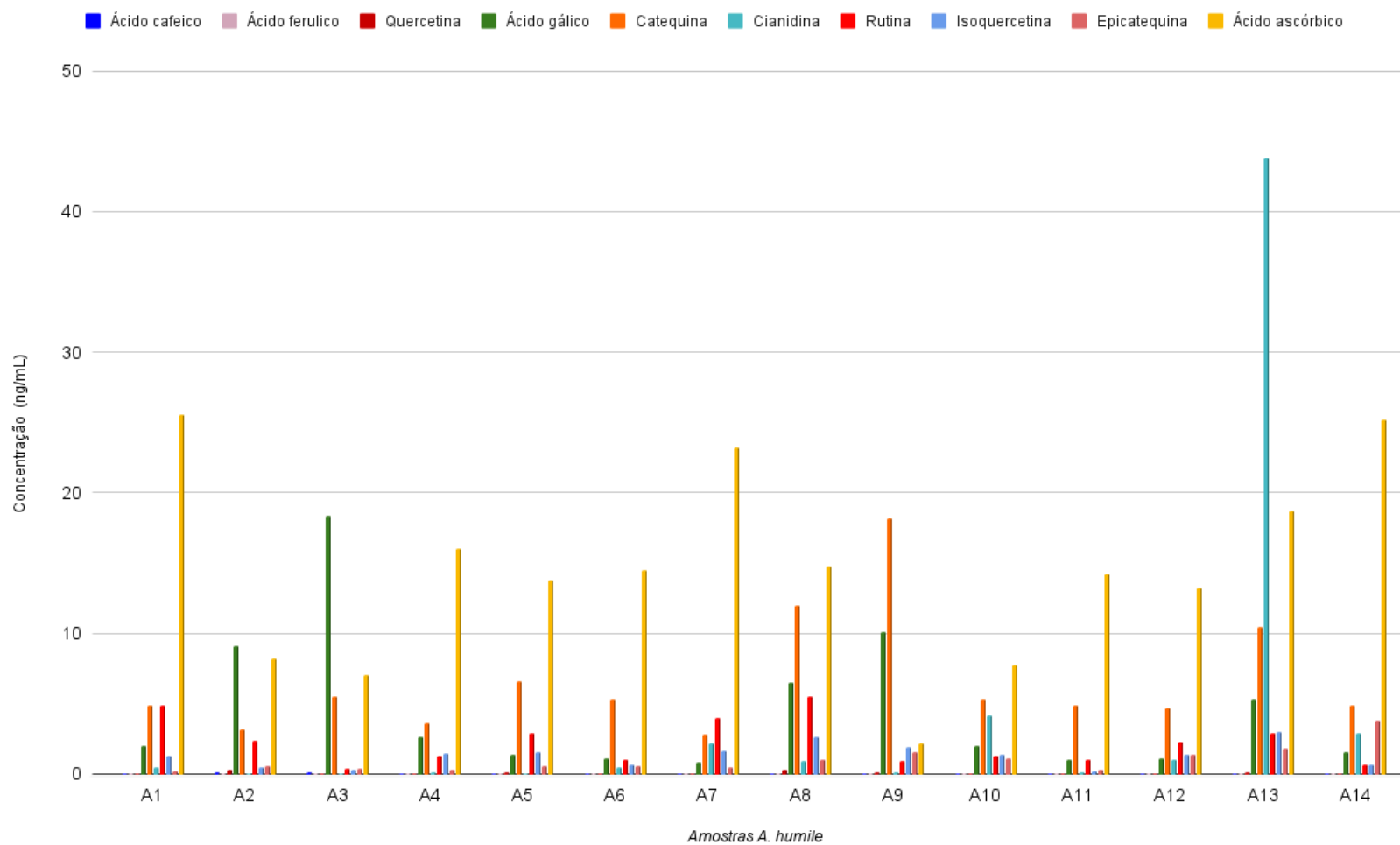


Figura 8. Resultado da quantificação dos compostos bioativos, por LC-MS/MS, em amostras de *Anacardium humile*.

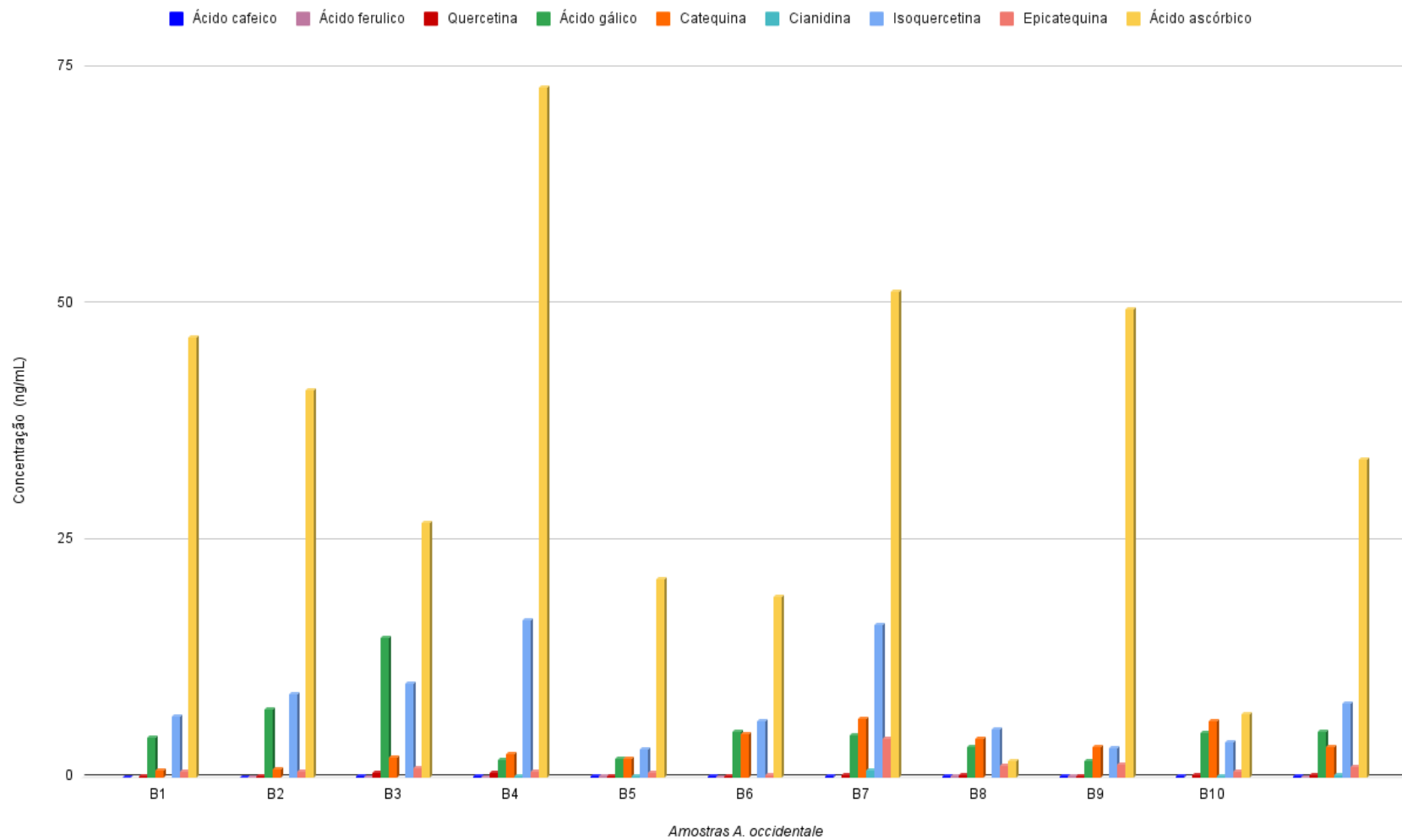


Figura 9. Resultado da quantificação dos compostos bioativos, por LC-MS/MS, em amostras de caju *Anacardium occidentale*.

Ao comparar os perfis de compostos bioativos, apresentados nas **Figura 8** (cajuzinho do cerrado) e **Figura 9** (caju comum), podemos observar padrões interessantes na distribuição desses metabólitos. No cajuzinho do cerrado, o ácido ascórbico destacou como o composto majoritário na maioria das amostras, embora podem ser observadas exceções significativas: as amostras A2 e A3 apresentaram maior concentração de ácido gálico, a amostra A9 mostrou predominância de catequina, enquanto a A13 exibiu elevados teores de cianidina. Os demais compostos - rutina, ácido ferúlico e epicatequina - mantiveram distribuição relativamente homogênea entre as várias amostras, mas em concentrações menores.

De maneira similar às amostras de cajuzinho do cerrado, o ácido ascórbico é o composto predominante na maioria das amostras de caju comum, destacando-se especialmente nas amostras B1, B2, B4, B7 e B9, onde suas concentrações são superiores às das demais substâncias. A isoquercetina também apresenta concentrações significativas nas amostras B4 e B7. As amostras B1, B2, B3 e B6, por sua vez, demonstraram uma presença notável de ácido gálico.

O caju comum apresentou teores significativamente mais elevado de ácido ascórbico (19,05 a 72,98 mg/100 g) em comparação como cajuzinho do cerrado (19,05 a 72,98 mg/100 g), evidenciando diferenças marcantes no acúmulo deste composto entre as duas espécies. Esses resultados evidenciam a importância do ASC como principal composto bioativo em ambas as espécies. No entanto, existe uma lacuna na literatura quanto à aplicação de técnicas analíticas avançadas, como o LC-MS/MS, para quantificação específica destes compostos em matrizes de caju. Esta deficiência de metodologias limita comparações mais robustas entre estudos e destaca a necessidade de desenvolvimento de abordagens técnicas mais sensíveis e específicas para melhor caracterizar o potencial bioativo das espécies.

Diversos métodos têm sido empregados para a determinação de ácido ascórbico em alimentos, incluindo espectrofotometria, titulação, eletroforese e cromatografia líquida de alta eficiência. Dentre esses, os métodos titulométricos, que se baseiam na forte capacidade redutora do ácido ascórbico, são amplamente utilizados devido à sua simplicidade. O método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Collaboration*) para determinação de vitamina C baseia-se na

redução do corante 2,6-diclorofenolindofenol, que atua como indicador. Neste método, o corante é reduzido pelo ácido ascórbico, resultando na descoloração da solução (169). Trata-se de um método consolidado, de baixo custo e amplamente utilizado para análises rotineiras. No entanto, em caso de matrizes complexas, como extratos de frutas com alta concentração de compostos redutores e coloração intensa, interferências podem ocorrer, demandando cuidados adicionais para garantir precisão dos resultados (170).

Para superar essas limitações, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas emerge como alternativa analítica superior. Este método apresenta diversas vantagens analíticas: (i) requer uma quantidade significativamente menor de amostra (na ordem de μL); (ii) é menos suscetível a interferências de matriz devido à seletividade do detector de massas; (iii) permite a detecção e quantificação simultânea de múltiplos compostos em uma única análise, otimizando o tempo de análise e reduzindo o consumo de solventes; (iv) apresenta maior precisão e reprodutibilidade, com baixos limites de detecção (faixa de ng/mL); e (v) fornece identificação molecular confiável através do monitoramento das transições específicas entre os íons precursores e produtos (171). A combinação dessas vantagens torna a LC-MS/MS particularmente valiosa para estudos que demandam maior confiabilidade e discriminação de compostos estruturalmente similares.

Estudos anteriores que utilizaram métodos de titulação demonstraram teores elevados de ASC no caju. Akinwale (2000), por exemplo, comparou o conteúdo de vitamina C no caju com outras frutas tropicais, como abacaxi, laranja, uva, manga e limão, utilizando titulação como método de análise. O caju se destacou com uma concentração significativamente maior (203,5 $\text{mg}/100 \text{ mL}$), enquanto as outras frutas apresentaram entre 30,9 e 54,7 $\text{mg}/100 \text{ mL}$. Esses resultados ressaltam a riqueza do caju como fonte de vitamina C (172).

Assunção e Mercadante (2003) analisaram o teor de ASC em variedades de caju vermelho e amarelo nas regiões de São Paulo e Piauí, também empregando titulação. Os resultados mostraram que o teor de ASC foi ligeiramente maior na variedade amarela, com $121 \pm 18,2$ e $109 \pm 21,2 \text{ mg}/100 \text{ g}$, em comparação à vermelha, que apresentou $118 \pm 28,7$ e $106 \pm 20,0 \text{ mg}/100 \text{ g}$. No entanto, essas

diferenças não foram estatisticamente significativas, sugerindo que a cor da casca não é um fator determinante para o teor de ASC (173). Este comportamento difere do encontrado no presente estudo, onde as amostras de caju com casca amarela (B3, B6 e B8) apresentaram menor concentração de ASC, com exceção da amostra B9, que, apesar da coloração amarela, está entre as de maior concentração de ASC.

Estudos realizados em cajuzinho de cerrado, como o de Silva *et al.* (2004), que analisaram amostras coletadas em diferentes regiões de Goiás sob diversas condições de armazenamento, também usaram titulação para quantificar ácido ascórbico. Nesse caso, os teores variaram de 2,87 a 80,57 mg/100 g, também utilizando titulação como método de análise (174). Assim como no caju, os teores de ASC encontrados nas amostras de cajuzinho do cerrado na literatura, utilizando titulação, foram mais altos do que os observados no presente estudo, corroborando com a ideia de que o método titulométrico pode superestimar os níveis de ácido ascórbico, uma vez que compostos redutores presentes nas amostras podem interferir nos resultados, aumentando a imprecisão das análises.

A quantificação precisa do ASC é essencial para entender e maximizar os benefícios nutricionais e funcionais de frutas como o caju e o cajuzinho do cerrado. Ao comparar os resultados do presente estudo, com aqueles gerados por outros métodos analíticos igualmente precisos, como HPLC-UV, observa-se uma convergência nos teores de ácido ascórbico. Um exemplo relevante é o estudo de Borges *et al.* (2022), que quantificou o ASC em frutas nativas brasileiras e encontrou uma concentração de 7,5 mg/100 g em amostras de cajuzinho do cerrado utilizando HPLC. Esse valor é comparável aos resultados obtidos no presente trabalho, sugerindo que, quando aplicadas tendências mais seletivas, os teores de ASC tendem a ser mais similares, destacando a confiabilidade desses métodos em comparação aos métodos titulométricos (43).

Essa precisão na quantificação é fundamental para avaliar corretamente o papel do ASC na capacidade antioxidante das frutas. No caju, por exemplo, a elevada concentração de ASC contribui diretamente para sua atividade antioxidante e potencial nutracêutico, o que é fundamental para a promoção da saúde e a prevenção de doenças crônicas. Métodos analíticos mais seletivos, portanto, não apenas permitem uma melhor avaliação do conteúdo de ASC, mas também

fortalecem o entendimento de como esse nutriente pode influenciar os efeitos terapêuticos e preventivos do consumo do caju e cajuzinho (175,176).

O conteúdo de compostos bioativos nas frutas é influenciado por diversos fatores, incluindo o estágio de desenvolvimento, as condições de cultivo, o estado de maturação no momento da colheita, as práticas de manejo, condições de armazenamento pós colheita e os métodos de processamento (177,178). Além dos fatores mencionados, a espécie botânica pode também influenciar significativamente o perfil de compostos bioativos (179). Assim, quantificar todos os compostos presentes em uma fruta é de extrema importância.

No presente estudo, observou-se que o teor dos compostos bioativos avaliados apresentou uma grande variabilidade entre as amostras analisadas, o que reforça a relevância da quantificação precisa mencionada anteriormente. A catequina destacou-se como o segundo composto em termos de concentração nas amostras de cajuzinho, sendo seguida, pelo ácido gálico, rutina, isoquercetina e epicatequina. Já nas amostras de caju o composto que se destacou após o ASC, em termo de concentração, foi a isoquercetina seguida pelo ácido gálico, catequina, epicatequina e quercetina. Esse perfil de compostos bioativos é notável, especialmente em comparação com estudos anteriores.

Freitas *et al.* realizaram a identificação e quantificação de compostos fenólicos no cajuzinho do cerrado amarelo, vermelho e laranja, onde a catequina foi encontrada nas concentrações de $0,54 \pm 0,54$, $0,67 \pm 0,56$ e $0,58 \pm 0,18$ mg/kg, respectivamente. Esses valores são inferiores aos encontrados no presente trabalho, onde a concentração da catequina variou entre 3,16 e 18,15 mg/100 g no cajuzinho do cerrado e entre 1,03 e 6,17 mg/100 g no caju. Isso sugere que as amostras do presente estudo possuem concentrações superiores de catequina, especialmente no cajuzinho do cerrado (180).

Em contraste, no estudo realizado por Bataglioni *et al.* (2015), que analisou os compostos fenólicos em abacaxi, açaí, e caju, não foi detectado catequina em nenhuma dessas frutas. Isso é um contraste marcante com os resultados atuais, onde a catequina foi um dos principais compostos identificados. Por outro lado, a concentração de quercetina no caju, relatada por Bataglioni, foi significativamente maior ($2,31 \pm 0,99$ mg/100 g) em comparação com o presente estudo, onde variou

entre 0,03 a 0,47 mg/100g nas amostras de caju e cajuzinho. Além disso, também foram quantificados os teores de epicatequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico. Assim como no presente trabalho, o teor de ácido clorogênico e ácido ferúlico ficaram abaixo do limite de quantificação, não sendo possível detectá-los. O teor de ácido gálico ($14,85 \pm 0,99$ mg/100 g) foi concordante com as amostras do presente estudo, onde a concentração variou de 0,86 a 18,40 para o cajuzinho do cerrado e 1,71 a 14,74 mg/100 g para a caju (181).

Oliveira (2018), utilizando HPLC-DAD-UV, identificou a presença de epicatequina, rutina e ácido clorogênico em amostras de cajuzinho do cerrado. Das 30 matrizes analisadas apenas em 2 amostras foram detectadas concentrações de ácido clorogênico. As concentrações de epicatequina foram semelhantes às observadas no presente estudo (26).

Uma análise de Variância (ANOVA) foi realizada para comparar a distribuição de cada metabólito entre as amostras das duas espécies de caju, *A. occidentale* e *A. humile*. A análise revelou que cinco metabólitos, quercetina, catequina, rutina, isoquercetina e ácido ascórbico, apresentaram diferenças estaticamente significativas com valor de $p < 0,05$, o que corresponde a um nível de confiança de 95%.

A identificação de diferenças significativas na concentração desses cinco metabólitos sugere que eles podem ter papéis diferentes ou significativos entre as duas espécies de caju estudadas. Esses metabólitos estão associados a diversas funções biológicas e propriedades antioxidantes, o que implica em diferenças no perfil bioativo e nos benefícios para a saúde.

Para ilustrar as variações relativas entre os metabólitos quantificados, foi construído um mapa de calor agrupado e o boxplots dos principais metabólitos (**Figura 10**). No mapa de calor (**Figura 10A**), as cores roxo e amarelo indicam, respectivamente, a presença de metabólitos em menores e maiores concentrações. Pelos boxplots foi possível observar que nas amostras de caju (*A. occidentale*), a concentração de quercetina, ácido ascórbico e isoquercetina foi significativamente mais alta. Em contraste, nas amostras de cajuzinho do cerrado, os compostos predominantes foram catequina e rutina. Observou-se ainda que a distribuição de rutina restrita exclusivamente à espécie de *A. humile* (**Figura 10B**).

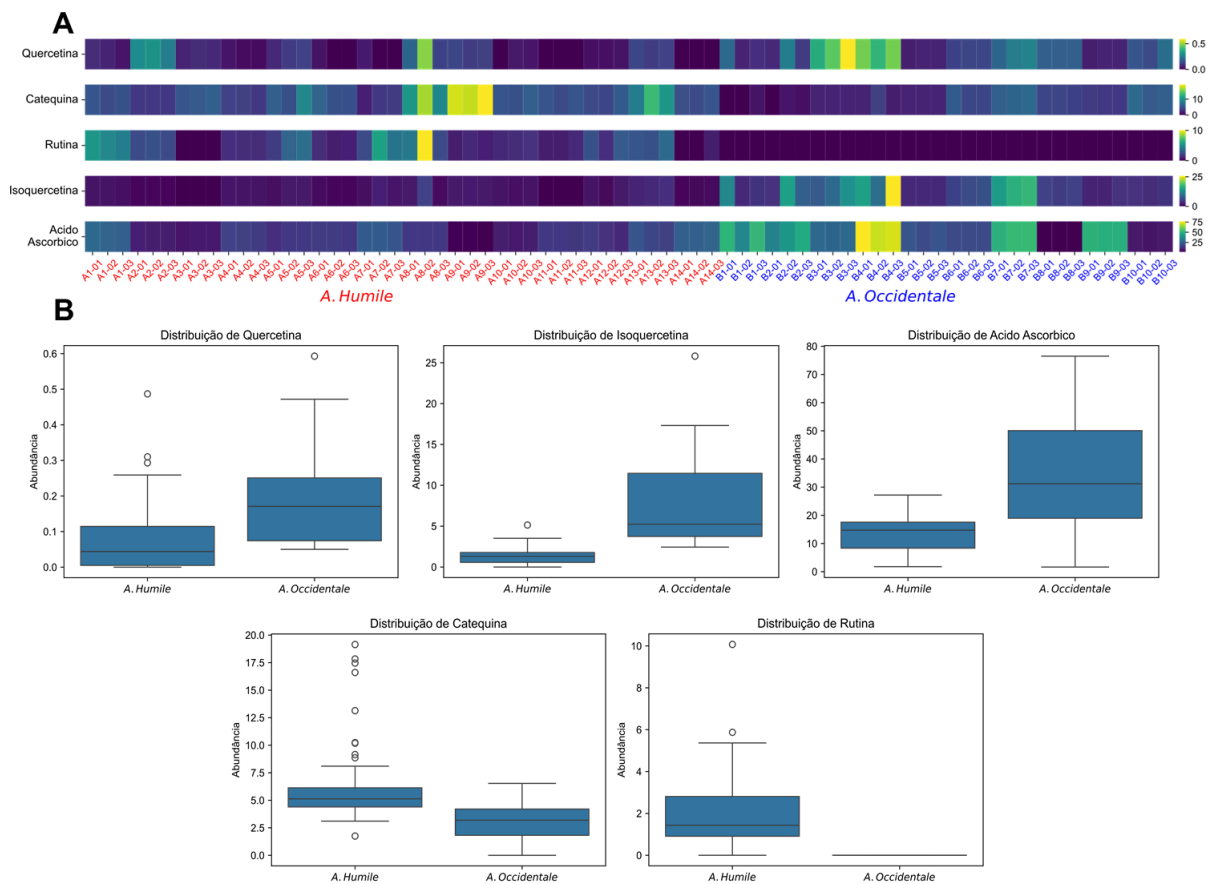


Figura 10. Características dos conteúdos de compostos bioativos nas amostras de caju e cajuzinho de cerrado. (A) Mapa de calor dos conteúdos de compostos bioativos, quercetina, catequina, rutina, isoquercetina e ácido ascórbico, nas amostras de caju e cajuzinho do cerrado em diferentes localidades. (B) Boxplots exibindo a distribuição destes compostos nas duas espécies de caju.

A análise de componentes principais (PCA), apresentada na **Figura 11**, ilustra a distribuição das duas espécies estudadas, *A. occidentale* e *A. humile*, de acordo com os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), que juntos explicam aproximadamente 73,88% da variância total dos dados. O primeiro componente principal (PC1) foi capaz de explicar 48,32% da variação total, enquanto o segundo componente principal (PC2) contribuiu com 25,56% da variação total.

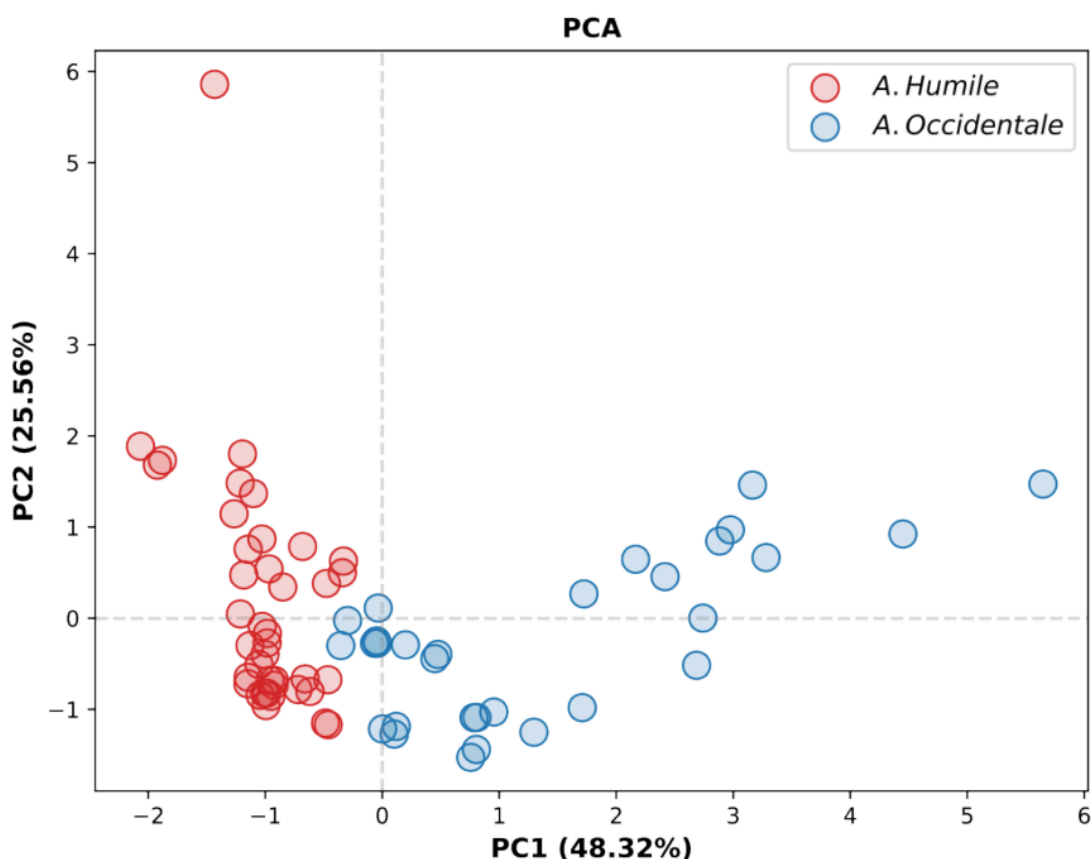


Figura 11. Distribuição das espécies *Anacardium occidentale* e *Anacardium humile* com base na Análise de Componentes Principais (PCA) dos compostos bioativos.

Os resultados da PCA demonstram uma separação distinta entre as duas espécies analisadas, com *A. humile* (representada pelos círculos vermelhos) localizada predominantemente no quadrante esquerdo e *A. occidentale* (círculos azuis) no quadrante direito. Essa distinção não apenas enfatiza a eficácia das variáveis selecionadas para o modelo de PCA, mas também destaca as variações significativas entre as espécies, refletindo suas diferenças intrínsecas em relação à composição dos compostos bioativos analisados. O gráfico de dispersão das pontuações para PC1 e PC2 mostra que as duas espécies de caju tendem a formar aglomerados distintos, conforme suas respectivas características. A formação dos aglomerados no gráfico reforça a ideia de que os compostos bioativos desempenham um papel fundamental na identificação e caracterização dessas espécies.

Apesar da separação clara entre os grupos, é relevante notar que existe uma leve sobreposição de pontos na região central do gráfico, sugerindo que, em algumas amostras, pode haver características compartilhadas entre *A. occidentale* e *A. humile*, ou que as variáveis utilizadas no modelo possuem certa correlação que impede uma separação completa entre as espécies.

Além disso, os dados sugerem que a localização dos frutos coletados não configura como um fator determinante nas características de composição das espécies, indicando que as variações observadas são mais influenciadas pelas características intrínsecas de cada espécie do que por fatores ambientais específicos do local de coleta.

5.9 AVALIAÇÃO METABOLÔMICA NÃO DIRECIONADA

A análise metabolômica não direcionada oferece uma abordagem poderosa para identificar características bioquímicas distintas e potenciais biomarcadores entre as espécies intimamente relacionadas submetidas às mesmas condições ambientais.

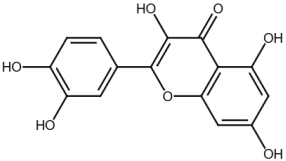
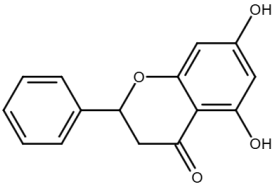
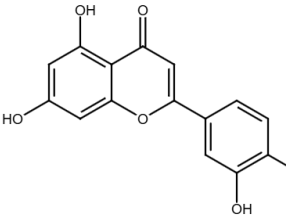
A diversidade molecular dos frutos, a avaliação da abundância dos íons e o conteúdo metabólico foram determinadas usando espectrometria de massas de alta resolução. O equipamento foi operado com faixa de aquisição de m/z 100–1000, possibilitando a detecção de uma ampla diversidade de metabólitos presentes nas amostras. Os arquivos adquiridos para os extratos metanólicos foram inicialmente convertidos do formato bruto (.raw) para o formato aberto (.mzML) utilizando o software *MSConvert*, garantindo maior compatibilidade e padronização para as etapas subsequentes de processamento.

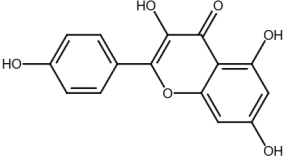
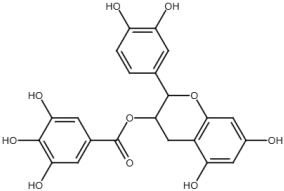
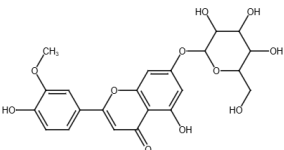
Em seguida, os dados foram submetidos à plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), que dispõe de uma ampla biblioteca espectral de compostos naturais e derivados. A partir dessa ferramenta, foi realizada uma anotação preliminar dos metabólitos presentes, com base na similaridade dos espectros de fragmentação com os disponíveis no banco de dados. Os resultados dessa etapa foram organizados na Tabela 11, contendo os compostos putativamente

identificados, constituindo um passo inicial para a caracterização química das espécies analisadas.

A anotação preliminar dos metabólitos permitiu identificar diferentes classes químicas presentes nos extratos metanólicos de *A. occidentale* e *A. humile*, incluindo compostos fenólicos, como flavonóides, flavonas, ácidos fenólicos e orgânicos. A distribuição dos metabólitos entre as espécies revelou tanto compostos compartilhados, que provavelmente refletem rotas metabólicas centrais conservadas, quanto moléculas exclusivas, que podem representar potenciais marcadores químicos de cada espécie. Ressalta-se que tais identificações foram realizadas com base em similaridade espectral no GNPS e devem ser consideradas putativas, uma vez que não houve confirmação com padrões analíticos. Em relação aos locais de coleta, não foram observadas variações substanciais no conteúdo de metabólitos. Ainda assim, essa etapa fornece um panorama inicial do perfil químico das espécies e contribui para a compreensão de sua diversidade metabólica. A caracterização preliminar dos metabólitos serve, portanto, como base para as análises estatísticas subsequentes, que permitem explorar de forma mais robusta a variabilidade metabólica entre as espécies.

Tabela 11. Anotação preliminar dos metabólitos detectados por LC-HRMS/MS em extratos de *Anacardium occidentale* e *Anacardium humile*.

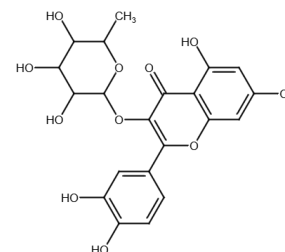
Íon precursor	Aduto	Fórmula molecular	Nome do metabólito	Estrutura química	Classe química	Espécie
303.05	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina		Flavonol	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
257.081	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Pinocembrina		Flavanona	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
287.055	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Luteolina		Flavona	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>

287.055	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol		Flavonol	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
443.097	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	Galato de epicatequina		Flavanol	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
463.124	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Criseeriol-7-O-glucósido		Flavona	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>

449.108

[M+H]⁺C₂₁H₂₀O₁₁

Quercetrina



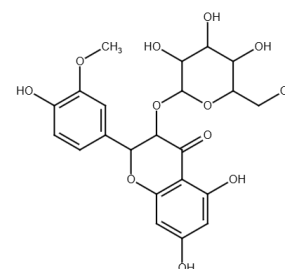
Flavonol

A.occidentale
and A. humile

479.118

[M+H]⁺C₂₂H₂₂O₁₂

Cacticina



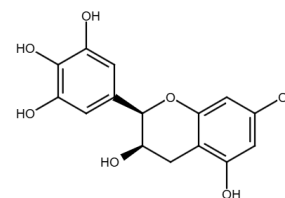
Flavonol

A.occidentale
and A. humile

307.081

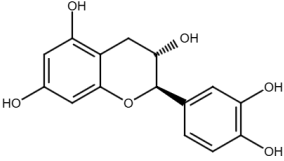
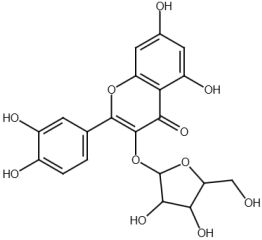
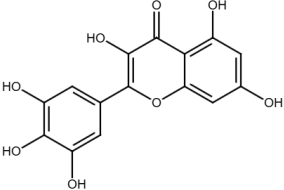
[M+H]⁺C₁₅H₁₄O₇

(-)-Epigallocatequina



Flavanol

A.occidentale
and A. humile

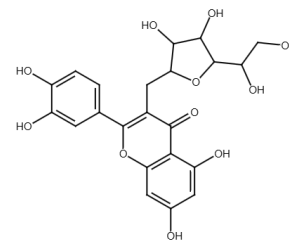
291.086	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catequina		Flavanol	A.occidentale and A. humile
435.09	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	Avicularina		Flavonol	<i>A.occidentale e A. humile</i>
319.045	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	Miricetina		Flavonol	<i>A.occidentale e A. humile</i>

487.085

M+Na

$C_{21}H_{20}O_{12}$

Isoquercetina



Flavonol

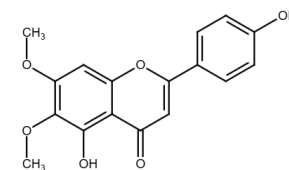
A. occidentale e
A. humile

315.086

[M+H]⁺

$C_{17}H_{14}O_6$

Cirsimaritina



Flavona

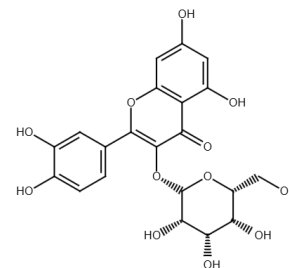
A. occidentale e
A. humile

465.103

[M+H]⁺

$C_{21}H_{20}O_{12}$

Hiperosídeo



Flavonol

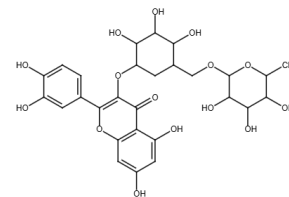
A. occidentale e
A. humile

633.143

M+Na

 $C_{27}H_{30}O_{16}$

Quercetina-3-O-rutinosídeo



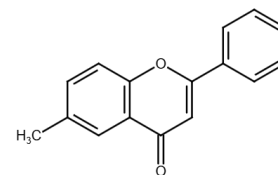
Flavonol

A. humile

237.091

[M+H]⁺ $C_{16}H_{12}O_2$

6-Metilflavona



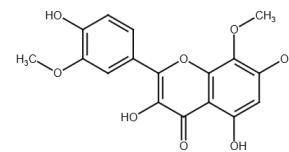
Flavona

A. occidentale e
A. humile

347.076

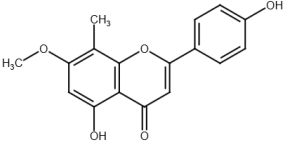
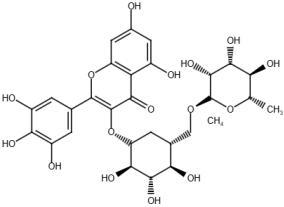
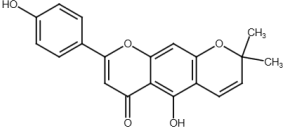
[M+H]⁺ $C_{17}H_{14}O_8$

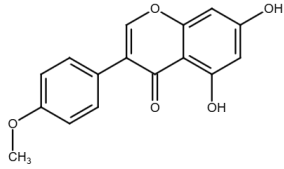
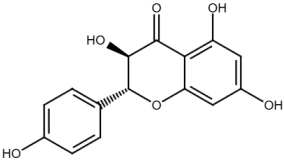
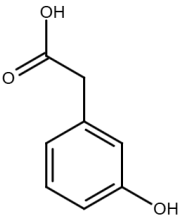
Limocitrina

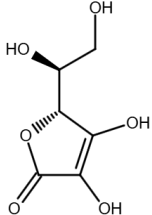
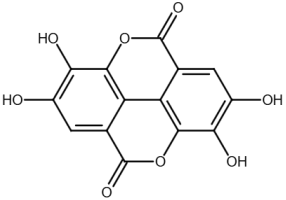
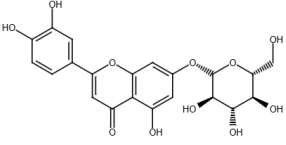
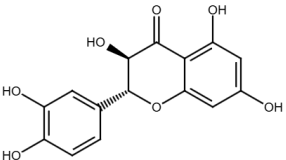


Flavonol

A. occidentale

299.091	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	8-Desmetil sideroxilina		Flavona	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
627.159	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Miricetina 3-O-rutinosídeo		Flavonol	<i>A. humile</i>
337.107	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	Carpacromeno		Flavona	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>

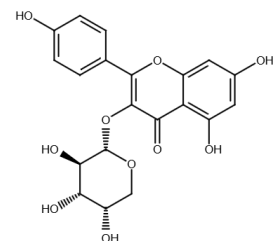
285.076	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Biochanina A		Isoflavona	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
289.07	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	Aromadendrina		Flavonol	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
170.081	M+NH ₄	C ₈ H ₈ O ₃	Ácido 3-hidroxifenilacético		Ácido fenólico	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>

177.039	[M+H] ⁺	C ₆ H ₈ O ₆	Ácido ascórbico		Ácido orgânico	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
303.014	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₆ O ₈	Ácido elágico		Ácido fenólico	<i>A. humile</i>
449.11	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Cinarosídeo		Flavona	<i>A. occidentale</i> e <i>A. humile</i>
305.07	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	Taxifolina		Isoflavona	<i>A. humile</i>

419.097

[M+H]⁺C₂₀H₁₈O₁₀

Juglalina



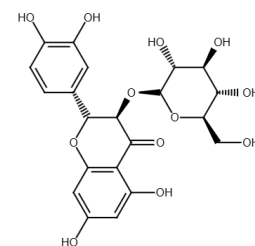
Flavonol

A. humile

467.12

[M+H]⁺C₂₁H₂₂O₁₂

Taxifolina-3-glicosídeo



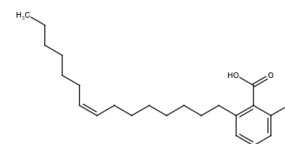
Dihidroflavonóis

A. humile

347.258

[M+H]⁺C₂₂H₃₄O₃

Ácido gíngico



Ácido fenólico

A. occidentale e
A. humile

A análise metabolômica não direcionada das amostras de *A. humile* e *A. occidentale* gerou uma matriz composta por 539 variáveis de m/z, obtidas após o pré-processamento e alinhamento dos espectros de LC-MS. Esse conjunto de dados possibilitou uma avaliação abrangente do perfil químico das espécies, permitindo explorar padrões globais de variação. Inicialmente, foram aplicadas abordagens exploratórias não supervisionadas, como Análise de Cluster Hierárquico (*Hierarchical Cluster Analysis*, HCA), Análise de Componentes Principais (*Principal component analysis*, PCA) e *K-means*, que revelaram tendências de agrupamento consistentes entre as amostras de acordo com a espécie e a origem.

A HCA (**Figura 12**) revelou três grupos principais: um composto por amostras de *A. humile* e dois grupos de *A. occidentale*. Porém, duas amostras de *A. humile* (A1_01 e A12_03) agrupam-se junto ao grupo *A. occidentale*, sugerindo uma variação metabólica atípica. Para verificar a consistência desses agrupamentos e explorar a variabilidade entre as amostras de forma complementar, foi realizada uma PCA.

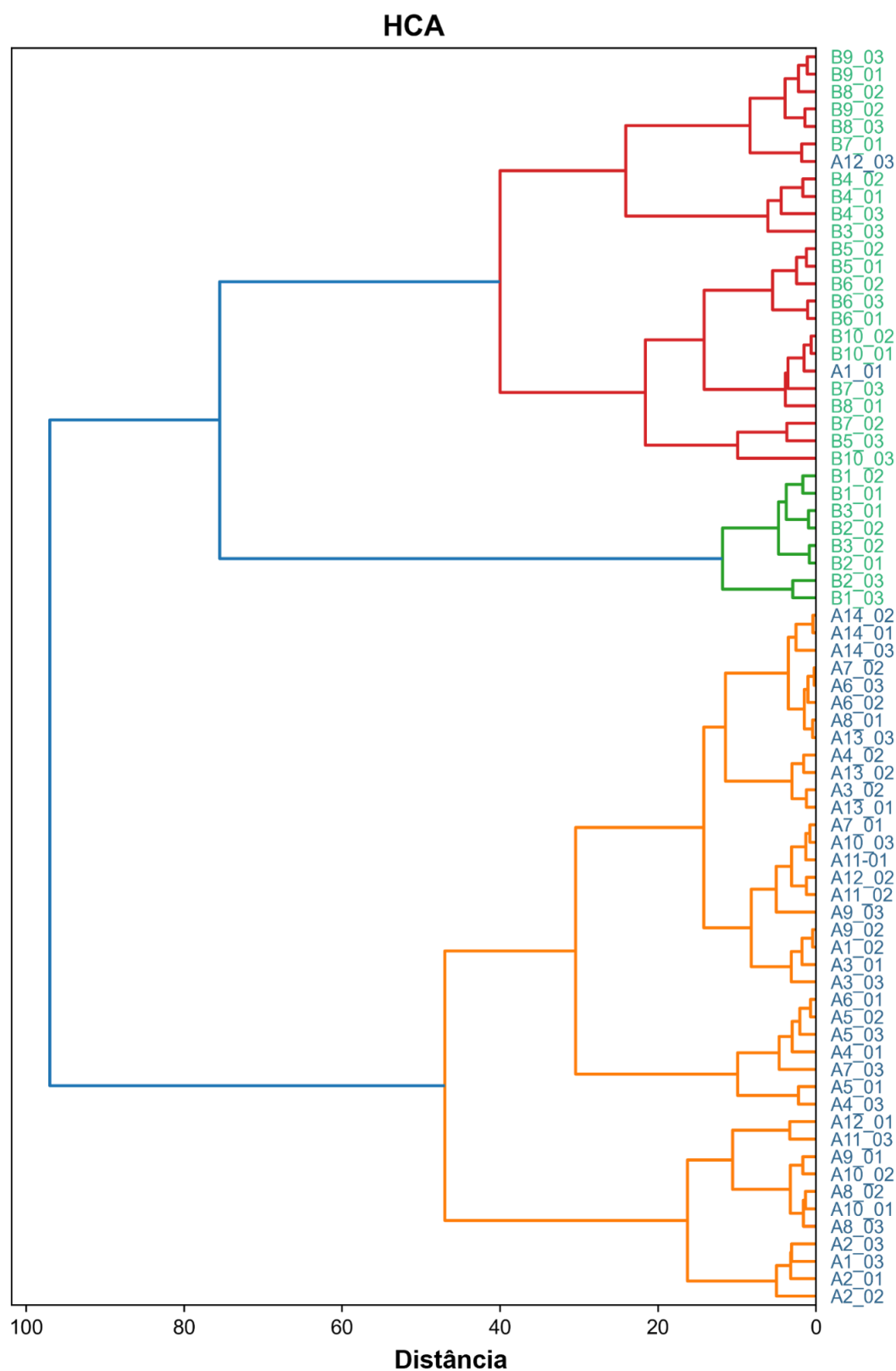


Figura 12. Análise Hierárquica de Cluster (HCA) de 72 amostras de LC-MS ESI(+). “A” = amostras de *Anacardium humile*, “B” = amostras de *Anacardium occidentale*.

A PCA confirmou a existência de padrões de agrupamento consistentes entre as amostras, conforme ilustrado na **Figura 13A**. Nessa análise, as espécies *A. humile* e *A. occidentale* formaram agrupamentos bem definidos e separados, indicando diferenças significativas em seu perfil. No entanto, duas réplicas de *A. humile*, especificamente A1_01 e A12_03, apresentaram um comportamento atípico, posicionando-se mais próximas das amostras de *A. occidentale*, o que sugere possíveis variações biológicas ou influências ambientais compartilhadas.

Em complemento, a aplicação do método de agrupamento *K-means* revelou uma estrutura interna ainda mais detalhada dentro do grupo *A. occidentale*, identificando a presença de dois subgrupos distintos (**Figura 13B**). Essa subdivisão indica que, além da separação entre espécies, existe variabilidade significativa dentro da própria espécie *A. occidentale*.

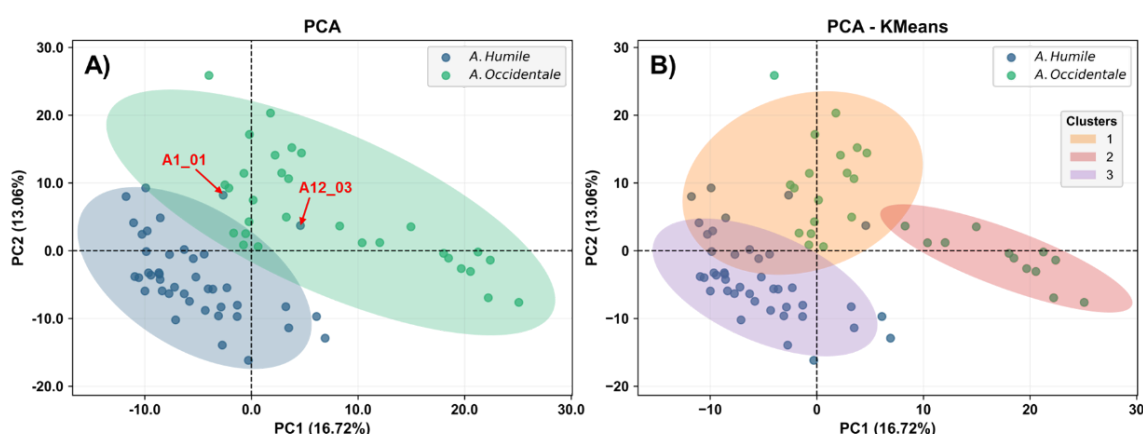


Figura 13. A) Análise de Componentes Principais destacando as amostras A1_01 e A12_03; B) PCA combinada com agrupamento K-means das 72 amostras analisadas

Para reduzir a variabilidade dentro das espécies e direcionar a análise para a diferenciação entre *A. humile* e *A. occidentale*, o conjunto de dados foi ajustado para incluir todas as 14 amostras biológicas de *A. humile* e as 10 de *A. occidentale*. Duas réplicas técnicas de *A. humile* (A1_01 e A12_03) foram removidas por apresentarem padrões de agrupamento atípicos nas análises exploratórias anteriores. Assim, a análise supervisionada foi conduzida com um total de 70 execuções de LC-MS/MS.

A inspeção dos metadados também indicou que as amostras de *A. occidentale* se distribuíram em dois subgrupos distintos, relacionados à origem:

indivíduos coletados em ambiente natural (Cluster 1) e indivíduos de origem comercial (Cluster 2), conforme detalhado na Tabela A.1 do Apêndice A. Apesar dessa subdivisão, ambos os grupos foram considerados em conjunto nas análises subsequentes, já que o objetivo principal foi a discriminação em nível de espécie. Ressalta-se, contudo, que a separação observada entre as amostras de *A. occidentale* pode estar associada a fatores como épocas distintas de aquisição, condições de armazenamento, manejo pós-colheita e outros fatores inerentes ao processo de comercialização. Em contrapartida, as amostras provenientes de ambiente natural foram coletadas e em seguida congeladas, minimizando assim variações adicionais e garantindo maior preservação do perfil metabólico.

Após a caracterização dos perfis metabólicos por meio de análises multivariadas, buscou-se aprofundar a investigação com uma abordagem univariada, de modo a identificar os íons mais relevantes para a diferenciação entre as espécies. A análise por *volcano plot* permitiu identificar íons discriminantes entre *A. humile* e *A. occidentale* utilizando os dados obtidos em modo ESI(+). Foram detectados 83 sinais de *m/z* com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), sendo que os dez mais relevantes, destacados na **Figura 14**, apresentaram simultaneamente altos valores de *fold-change* e forte significância estatística. No gráfico, os pontos em vermelho correspondem a íons mais abundantes em *A. humile*, enquanto os pontos em azul indicam íons predominantes em *A. occidentale*. Os pontos em cinza representam aqueles que não diferiram significativamente entre as espécies. Esses achados reforçam as evidências obtidas pelas análises multivariadas, confirmando a existência de metabólitos diferenciais capazes de sustentar a discriminação química entre *A. humile* e *A. occidentale*.

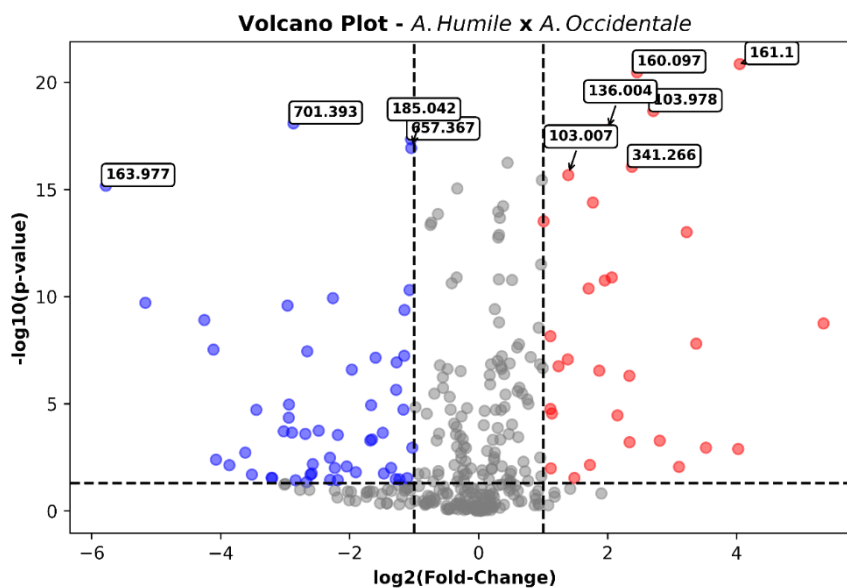


Figura 14. *Volcano plot* destacando íons com diferenças estatísticas ($p < 0,05$) e numéricas ($\log_2(\text{fold-change}) > 1$) entre espécies.

Com o objetivo de confirmar e aprofundar a discriminação química entre as espécies, foi aplicada a modelagem supervisionada por Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*, PLS-DA) ao conjunto de dados curado, composto por 70 execuções de LC-MS em modo ESI(+) (**Figura 15**). Diferentemente das abordagens exploratórias, o PLS-DA permite uma separação direcionada dos grupos, ao construir variáveis lattes capazes de maximizar a variância entre as espécies (intergrupo) enquanto minimiza a variabilidade interna (intragrupa) (160). O modelo final utilizou cinco componentes principais, refletindo a complexidade do sistema metabólico analisado e garantindo a captura de padrões robustos de variação.

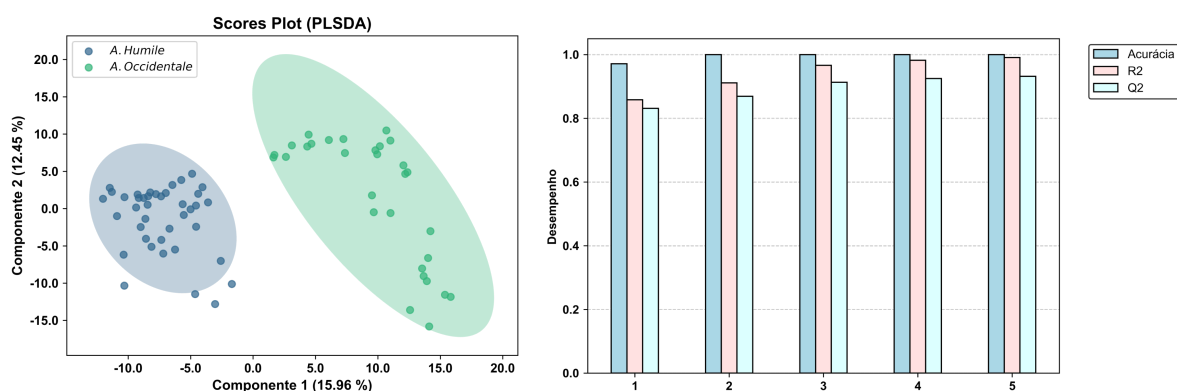


Figura 15. A) *Scores plot* da PLS-DA (dois primeiros componentes); B) Métricas de desempenho do modelo (acurácia, R^2 , Q^2) em função do número de componentes.

A confiabilidade do modelo foi avaliada por meio da validação cruzada *leave-one-out* (LOOCV), considerando uma das estratégias mais rigorosas e apropriadas para conjuntos de dados de pequeno porte, como os frequentemente encontrados em estudos metabolômicos. Nessa abordagem, cada amostra é deixada de fora sucessivamente e usada como teste, enquanto as demais alimentam o treinamento do modelo. Esse processo garante que todas as amostras sejam avaliadas individualmente, evitando vieses relacionados à divisão do conjunto de dados. Entre as principais vantagens da LOOCV destacam-se: (i) o aproveitamento quase integral das informações disponíveis para treinamento, (ii) a maior confiabilidade na avaliação da capacidade preditiva do modelo e (iii) a redução do risco de sobreajuste (*overfitting*), um dos maiores desafios em análises multivariadas com número limitado de observações.

Assim, a combinação do PLS-DA com a validação LOOCV não apenas reforçou os padrões de agrupamento previamente observados nas análises exploratórias (HCA e PCA) e univariadas (*volcano plot*), como também forneceu uma discriminação mais clara entre *A. humile* e *A. occidentale*, destacando os metabólitos mais relevantes para a diferenciação entre as espécies.

O *Scores plot* obtido a partir da PLS-DA (Figura 14A) evidencia uma separação clara entre *A. humile* e *A. occidentale*, já observável no primeiro componente, o que indica que a variabilidade metabólica mais significativa entre as

espécies é capturada de forma eficiente. O modelo utilizando apenas dois componentes alcançou 100% de acurácia na classificação das amostras, evidenciando que uma pequena fração das variáveis latentes é suficiente para diferenciar as espécies de maneira confiável. O modelo otimizado, construído com cinco componentes, apresentou $R^2 = 0,99$ e $Q^2 = 0,93$ (Figura 14B), valores que refletem tanto a excelente capacidade de explicação da variância observada quanto ao alto poder preditivo do modelo. Esses resultados confirmam a robustez do PLS-DA e indicam que o modelo não apresenta sobreajuste (*overfitting*), reforçando a confiança na identificação de metabólitos responsáveis pela discriminação entre as espécies.

A análise das m/z dos componentes permitiu identificar os metabólitos mais influentes na separação dos grupos, muitos dos quais coincidem com os sinais destacados na análise univariada por *volcano plot*. Essa convergência evidencia que determinados íons de m/z funcionam como marcadores químicos robustos para diferenciar *A. humile* e *A. occidentale*. Biologicamente, os metabólitos discriminantes podem refletir estratégias adaptativas distintas: compostos antioxidantes e fenólicos em *A. humile* podem estar associados à resistência ao estresse ambiental típico do Cerrado, enquanto o perfil de *A. occidentale*, especialmente nas amostras comerciais, pode ser influenciado por fatores de manejo, armazenamento e cultivo.

Dessa forma, a combinação do PLS-DA com a validação rigorosa LOOCV não apenas confirma a separação clara entre as espécies, como também fornece insights sobre os metabólitos-chave responsáveis por essas diferenças, permitindo compreender tanto a variabilidade interespecie quanto os potenciais efeitos de fatores ambientais e de manejo sobre o perfil metabólico.

Para aprofundar a interpretação do modelo supervisionado e identificar quais variáveis individuais contribuíram de forma mais significativa para a discriminação entre as espécies, foram calculados os escores de Importância da Variável na Projeção (VIP). Nesse contexto, características com $VIP > 1$ são consideradas mais influentes que a média no modelo clássico, enquanto valores maiores refletem um impacto ainda mais expressivo na separação das espécies. No total, 160 variáveis atingiram o critério $VIP > 1$, sendo que 23 delas apresentaram $VIP > 2$, indicando um

poder discriminatório particularmente forte e destacando metabólitos potencialmente relevantes como marcadores químicos.

Para avaliar a convergência entre as abordagens supervisionada e univariada, foi construído um diagrama de *Venn* comparando as variáveis com $VIP > 1$ e aquelas identificadas como estatisticamente significativas nos *volcano plots*. Essa análise revelou uma sobreposição de 62 variáveis entre as duas metodologias (**Figura 16**), reforçando a robustez dos resultados e indicando que esses metabólitos desempenham um papel consistente na distinção química das espécies. A convergência entre as abordagens sugere que essas variáveis não apenas contribuem fortemente para o modelo de classificação, mas também apresentam relevância biológica, podendo refletir diferenças funcionais e adaptativas nos perfis metabólicos de *A. humile* e *A. occidentale*.



Figura 16. Sobreposição entre variáveis $VIP > 1$ do PLS-DA e íons significativos da análise do gráfico de vulcão

Após a identificação das variáveis mais relevantes pelas análises univariada (*volcano plot*) e supervisionada (*VIP scores*), buscou-se integrar essas informações em uma abordagem visual comparativa. Para explorar mais a fundo os padrões de abundância dos metabólitos discriminantes, foi gerado um mapa de calor utilizando os 10 íons com maiores valores de *VIP*, que também se mostraram estatisticamente significativos no *volcano plot* (**Figura 17**). Esse mapa revelou perfis de intensidade relativa altamente consistentes e contrastantes entre *A. humile* e *A. occidentale*, evidenciando a robustez desses íons como potenciais marcadores metabólicos. A convergência entre diferentes métodos estatísticos reforça a confiabilidade dos

resultados, reduzindo a probabilidade de que esses sinais sejam fruto de variação aleatória ou ruído experimental. Além disso, a consistência observada sugere que tais íons podem refletir diferenças biológicas intrínsecas entre as espécies, relacionadas tanto a fatores genéticos quanto às condições ecológicas em que se desenvolvem. A lista completa das 62 características interseccionais, que representam um conjunto ampliado de potenciais biomarcadores, está apresentada na Tabela A.2 do Apêndice A.

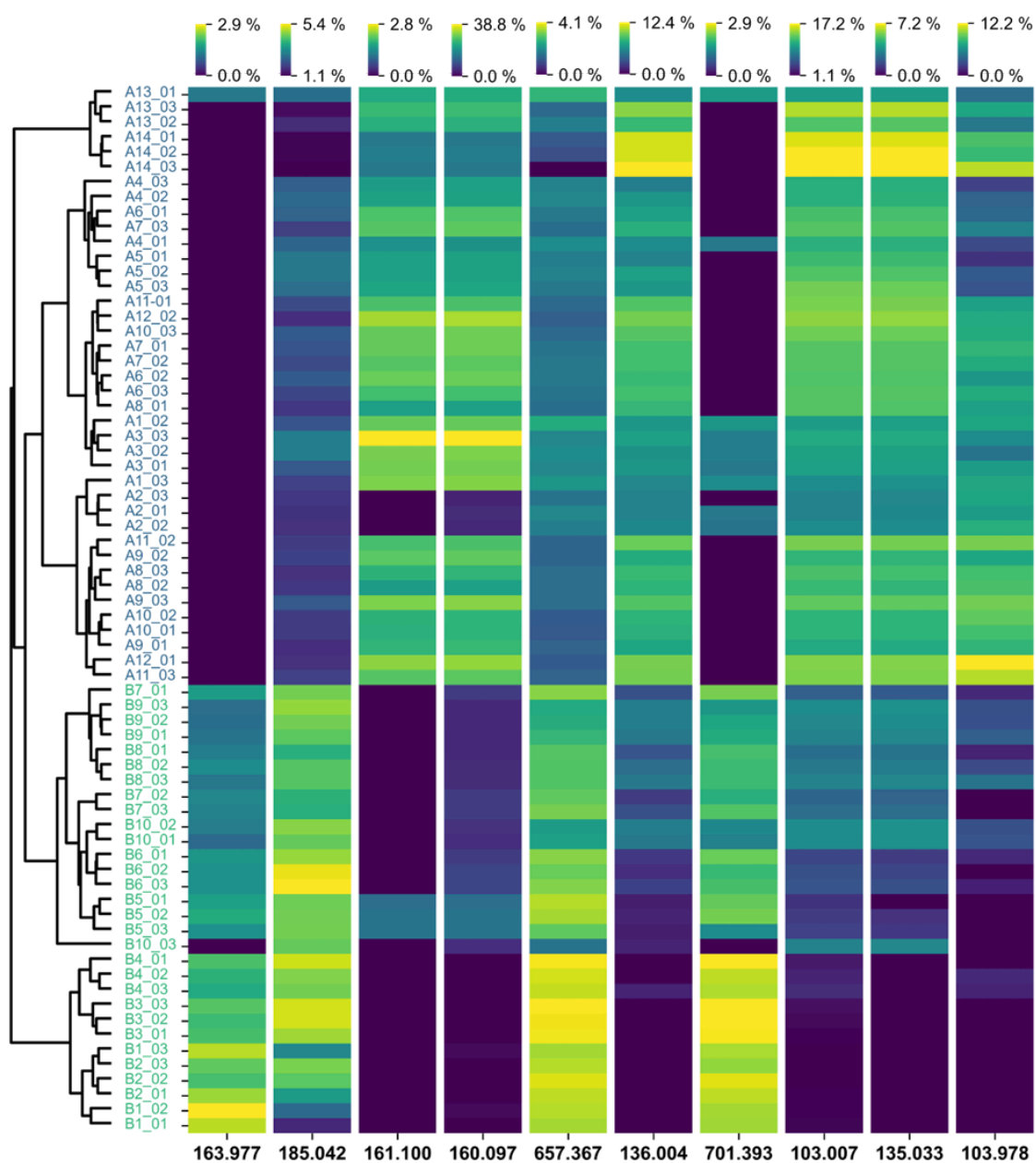


Figura 17. Mapa de calor dos 10 principais íons com maiores pontuações VIP (PLS-DA) e significância estatística (*Volcano*), com base em dados ESI(+).

Embora os metabólitos responsáveis pela discriminação entre *A. humile* e *A. occidentale* não tenham sido plenamente identificados, os resultados obtidos fornecem informações valiosas sobre a variabilidade metabólica entre as espécies. A tentativa de identificação utilizando a plataforma GNPS não foi bem-sucedida, possivelmente devido à complexidade química dos extratos vegetais e à possível presença de metabólitos ainda não descritos em bases de dados públicas. Apesar disso, a combinação de análises multivariadas (HCA, PCA e PLS-DA), univariadas (*Volcano plot*) e a avaliação de importância das variáveis (VIP) permitiu identificar padrões claros de diferenciação e metabólitos discriminantes consistentes, que podem ser considerados potenciais marcadores químicos. Esses achados abrem caminho para estudos futuros de isolamento e caracterização química, além de fornecer uma base sólida para compreender a diversidade metabólica intra e interespecífica e suas possíveis implicações ecológicas, adaptativas e tecnológicas no gênero *Anacardium*.

Os resultados deste estudo indicam que o *Anacardium occidentale* e o *Anacardium humile* possuem um potencial significativo como frutas funcionais, devido ao seu conteúdo fitoquímico favorável e suas elevadas propriedades antioxidantes. Ao determinar a atividade antioxidante pelos métodos de ABTS e DPPH não foram observadas diferenças significativas entre as espécies.

Os métodos de LC-MS/MS, que foram desenvolvidos e validados para a quantificação de 12 compostos bioativos, foram aplicados em 72 amostras, sendo 42 de *A. humile* e 30 de *A. occidentale*, coletadas em diferentes localizações. Foi possível quantificar ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina, ácido gálico, catequina, cianidina, isoquercetina, epicatequina e ácido ascórbico, apenas ácido clorogênico e kaempferol, não foram encontrados. O composto de maior concentração encontrado em ambas as espécies foi o ácido ascórbico, apresentando níveis mais elevados no *A. occidentale*.

Análises estatísticas realizadas neste estudo demonstraram diferenças significativas nas concentrações de cinco metabólitos secundários - quercetina, catequina, rutina, isoquercetina e ácido ascórbico - entre as amostras de *A. occidentale* e *A. humile*. Esses resultados sugerem funções metabólicas distintas em cada espécie, refletindo variações em seus perfis bioquímicos que podem estar associadas a características nutricionais, funcionais ou farmacológicas específicas.

Essa variabilidade reforça a importância de investigações contínuas sobre o potencial nutricional e funcional dessas frutas, contribuindo para a valorização do caju e do cajuzinho-do-cerrado como recursos promissores para a alimentação e a saúde.

De forma complementar, a análise metabolômica não direcionada permitiu uma visão mais abrangente da diversidade química das espécies. A anotação preliminar dos metabólitos por meio da plataforma GNPS revelou a presença de diferentes classes químicas. Embora essa identificação seja putativa, por se basear em similaridade espectral sem confirmação por padrões analíticos, ela forneceu um panorama inicial relevante do perfil químico, servindo de base para as análises estatísticas subsequentes.

Por fim, a aplicação de análises estatísticas multivariadas aos dados metabolômicos não direcionados acrescentou de forma robusta a caracterização química das espécies. A combinação de abordagens univariadas e supervisionadas permitiu identificar íons discriminantes com forte poder de separação entre *A. humile* e *A. occidentale*, mesmo sem a identificação estrutural completa dos metabólitos. Esse achado evidencia a complexidade metabólica das espécies e ressalta o potencial da metabolômica como ferramenta para revelar marcadores químicos e direcionar futuras investigações, que poderão avançar no isolamento e elucidação estrutural desses compostos ainda não caracterizados.

De maneira geral, os resultados obtidos neste estudo evidenciam o notável potencial fitoquímico das espécies *A. humile* e *A. occidentale*, que se destacam pela riqueza e diversidade de compostos bioativos. A integração entre abordagens analíticas direcionadas e não direcionadas permitiu uma compreensão ampla e detalhada do perfil químico dessas espécies, revelando tanto compostos majoritários de reconhecida atividade biológica quanto metabólitos ainda pouco explorados. Essa caracterização reforça o valor científico e biotecnológico do caju e do cajuzinho-do-cerrado, não apenas como alimentos funcionais, mas também como fontes promissoras de moléculas bioativas com potencial aplicação nas áreas farmacêutica, nutracêutica e cosmética. Assim, este trabalho contribui significativamente para o conhecimento químico e funcional do gênero *Anacardium*, abrindo perspectivas para futuras pesquisas voltadas ao aproveitamento sustentável e à valorização dessas espécies nativas do Cerrado brasileiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Sruthi P, Naidu MM. Cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) testa as a potential source of bioactive compounds: A review on its functional properties and valorization. *Food Chem Adv.* 1º de dezembro de 2023;3:100390.
2. de Oliveira CB, Queiroz BBT, Delalibera P, Navarro JP, Gómez-Alonso S, Pertuzatti PB. Application of response surface methodology in the characterization and sensorial analysis of *Anacardium humile* liqueur. *Food Chem Adv.* 1º de dezembro de 2023;3:100533.
3. Costa AR, José Weverton Almeida-Bezerra, Gonçalves da Silva T, Pereira PS, Fernanda de Oliveira Borba E, Braga AL, et al. Phytochemical profile and anti-*Candida* and cytotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree). *Biocatal Agric Biotechnol.* 1º de outubro de 2021;37:102192.
4. Urzêda MA, Marcussi S, Silva Pereira LL, França SC, Pereira AMS, Pereira PS, et al. Evaluation of the Hypoglycemic Properties of *Anacardium humile* Aqueous Extract. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013(1):191080.
5. Vieira J de S, de Oliveira VS, Carneiro MJ, da Silva TL, Augusta IM, de Carvalho MG, et al. Phenolic composition and insights into the use of pink pepper (*Schinus terebentifolius* Raddi) fruit against lipid oxidation in food systems. *Food Biosci.* 1º de junho de 2023;53:102556.
6. R. Albuquerque B, A. Heleno S, P. Oliveira MBP, Barros L, R. Ferreira ICF. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food Funct.* 2021;12(1):14–29.
7. Lima Júnior JP de, Franco RR, Saraiva AL, Moraes IB, Espindola FS. *Anacardium humile* St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and α -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. *J Ethnopharmacol.* 25 de março de 2021;268:113667.
8. IBGE. IBGE. 2023 [citado 11 de abril de 2024]. Biomas e sistema costeiro-marinho do Brasil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/biomas/#/home>
9. Carvalho PER, Gaiad S. Anacardiaceae - Portal Embrapa [Internet]. 2021 [citado 5 de abril de 2024]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/especies-arboreas-brasileiras/anacardiaceae>
10. Noleto AR, Guimarães APN, Mendonça MC, Gonçalves MAB, Silveira MFA, Souza ARM de. Conhecimento da população sobre frutos nativos do Cerrado brasileiro. *Res Soc Dev.* 4 de novembro de 2022;11(14):e520111436585–e520111436585.

11. Soares CM da S, Aguiar AO de, Silva RR da, Ibiapina A, Santos AL dos, Martins GA de S. Typology of the Consumer of Cerrado Fruits. DESAFIOS - Rev Interdiscip Universidade Fed Tocantins. 2 de outubro de 2019;6(Especial):134–9.
12. Bonanomi J, Tortato FR, Gomes R de SR, Penha JM, Bueno AS, Peres CA. Protecting forests at the expense of native grasslands: Land-use policy encourages open-habitat loss in the Brazilian *cerrado* biome. *Perspect Ecol Conserv*. 1º de janeiro de 2019;17(1):26–31.
13. Colli GR, Vieira CR, Dianese JC. Biodiversity and conservation of the Cerrado: recent advances and old challenges. *Biodivers Conserv*. 1º de abril de 2020;29(5):1465–75.
14. Ribeiro JF, Walter BMT. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, SM; ALMEIDA, SP de (Ed.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.; 1998. 89–166 p.
15. Bortolotto IM, Hiane PA, Ishii IH, de Souza PR, Campos RP, Juraci Bastos Gomes R, et al. A knowledge network to promote the use and valorization of wild food plants in the Pantanal and Cerrado, Brazil. *Reg Environ Change*. 1º de junho de 2017;17(5):1329–41.
16. Santos DCD, Oliveira Filho JGD, Sousa TLD, Ribeiro CB, Egea MB. Ameliorating effects of metabolic syndrome with the consumption of rich-bioactive compounds fruits from Brazilian Cerrado: a narrative review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 26 de setembro de 2022;62(27):7632–49.
17. Guimarães ACG, de Souza Gomes M, Zacaroni Lima LM, Sales PF, da Cunha MC, Rodrigues LJ, et al. Application of Chemometric Techniques In The Evaluation of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Fruit From Brazilian Cerrado. *J Food Meas Charact*. 1º de junho de 2023;17(3):2095–106.
18. Bailão EFLC, Devilla IA, da Conceição EC, Borges LL. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *Int J Mol Sci*. 9 de outubro de 2015;16(10):23760–83.
19. Hall CF, Gil A dos SB. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Anacardiaceae. *Rodriguésia*. setembro de 2017;68:911–6.
20. Martinelli G, Moraes MA. Livro vermelho da flora do Brasil. 1ª ed. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: CNCFLORA-Centro Nacional de Conservação da Flora; 2013. 1102 p.
21. Oliveira YR, Sousa WGM de, Silva PH da, Pacheco ACL, Abreu MC de. Anacardiaceae na Medicina Tradicional de Comunidades Rurais do Piauí, Nordeste do Brasil. *Ens E Ciênc C Biológicas Agrár E Saúde*. 30 de março de 2022;26(1):32–42.

22. Herrera F, Mitchell JD, Pell SK, Collinson ME, Daly DC, Manchester SR. Fruit Morphology and Anatomy of the Spondioid Anacardiaceae. *Bot Rev Interpret Bot Prog*. 2018;84(4):315–93.
23. Correia SDJ, David JP, David JM. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Quím Nova*. dezembro de 2006;29(6):1287–300.
24. Vieira RF, Costa T da SA, Franco MM, Carneiro RMD, de Mello SCM, Carneiro VT de C. Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil [Internet]. 1ª edição. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2006 [citado 8 de abril de 2024]. Disponível em: http://www.agabrasil.org.br/_Dinamicos/livro_frutas_nativas_Embrapa.pdf
25. BRASIL. EMBRAPA. 2023 [citado 26 de abril de 2024]. Produção de castanha do caju cresce 33% em 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/78004497/producao-de-castanha-do-caju-cresce-33-em-2022>
26. Oliveira VF, Silva FG, Resende EC, Pereira PS, de L E Silva FH, Egea MB. Physicochemical characterization of “Cerrado” cashew (*Anacardium othonianum* Rizzini) fruits and pseudofruits. *J Sci Food Agric*. novembro de 2019;99(14):6199–208.
27. Tamiello-Rosa CS, Cantu-Jungles TM, Iacomini M, Cordeiro LMC. Pectins from cashew apple fruit (*Anacardium occidentale*): Extraction and chemical characterization. *Carbohydr Res*. 1º de setembro de 2019;483:107752.
28. Silva Junior JF da. A arca de Noé das frutas nativas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa; 2021.
29. Rege A, Lee JSH. The socio-environmental impacts of tropical crop expansion on a global scale: A case study in cashew. *Biol Conserv*. 1º de abril de 2023;280:109961.
30. Campos AS. MICROBIOMA DO SOLO ASSOCIADO AO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.): COMPOSIÇÃO, DIVERSIDADE E FUNÇÕES [Internet]. [FORTALEZA]: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ; 2023. Disponível em: file:///C:/Users/UFG/Downloads/2023_tese_ascampos.pdf
31. Araújo JMD de, Silva AP da, Cândido M de B, Silva TWM da, Júnior FP de A. Estudo etnofarmacológico de *Anacardium occidentale*: uma breve revisão. *Res Soc Dev*. 18 de julho de 2020;9(8):e487985802–e487985802.
32. Machado IP. ESTIMATIVAS DE REPETIBILIDADE E PREDIÇÕES DE GANHOS GENÉTICOS EM CLONES DE CAJUEIRO-ANÃO. 2018;
33. Silva RAD. Ação antimicrobiana de *Anacardium occidentale* L.: Potencial biotecnológico na geração de produtos anticárie. 2012;

34. Adu-Gyamfi PKK, Akpertey A, Barnnor M, Ofori A, Padi F. Genotypic characterization of cashew (*Anacardium occidentale* L.) clones using agro-morphological traits. *Plant-Environ Interact*. 2020;1(3):196–206.
35. Crisóstomo JR, Barros L de M, de Paiva JR, Cavalcanti JJV. Melhoramento genético do cajueiro. 2003;
36. Paiva JR de, Crisóstomo JR, Barros L de M. Recursos Genéticos do Cajueiro: Coleta, Conservação, Caracterização e Utilização. 2003;(1a edição).
37. Carvalho ALN, Annoni R, Silva PRP, Borelli P, Fock RA, Trevisan MTS, et al. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *J Ethnopharmacol*. 1º de junho de 2011;135(3):730–6.
38. Aslam N, Hassan SA, Mehak F, Zia S, Bhat ZF, Yıkmiş S, et al. Exploring the potential of cashew waste for food and health applications- A review. *Future Foods*. 1º de junho de 2024;9:100319.
39. Mota LC. IMPACTO DO FARELO DO BAGAÇO DO CAJU NA ALIMENTAÇÃO DE SUÍNOS DOS 60 AOS 90 KG: ESTUDO DA DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, DESEMPENHO E VIABILIDADE ECONÔMICA. Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2014.
40. Oliveira : Valeria Ferreira. DIVERSIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR ENTRE MATRIZES DE CAJU-DEÁRVORE-DO-CERRADO (*Anacardium othonianum* Rizzini). [Rio Verde]: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE; 2018.
41. GOMES JG. VARIABILIDADE FENOTÍPICA DE *Anacardium othonianum* Rizz. NO NORTE DE MINAS GERAIS. 2013.
42. Ressel K de A, Lima-Ribeiro M de S, Reis EF dos. Desempenho de progênies de diferentes matrizes de cajuzinho-do-cerrado mediante o armazenamento e o peso das núculas. *Ciênc Rural*. 2015;45:1782–7.
43. Borges PRS, Edelenbos M, Larsen E, Hernandez T, Nunes EE, de Barros Vilas Boas EV, et al. The bioactive constituents and antioxidant activities of ten selected Brazilian Cerrado fruits. *Food Chem X*. 30 de junho de 2022;14:100268.
44. Anoopkumar. AN, Gopinath C, Annadurai S, Abdullah S, Tarafdar A, Hazeena SH, et al. Biotechnological valorisation of cashew apple: Prospects and challenges in synthesising wide spectrum of products with market value. *Bioresour Technol Rep*. 1º de fevereiro de 2024;25:101742.
45. Silva ALL e, Santos DC dos, Sousa TL de, Silva FG, Egea MB. “Cerrado” cashew (*Anacardium othonianum* Rizz.) juice improves metabolic

parameters in women: A pilot study. *J Funct Foods*. 1º de junho de 2020;69:103950.

46. Zheng X, Gong M, Zhang Q, Tan H, Li L, Tang Y, et al. Metabolism and Regulation of Ascorbic Acid in Fruits. *Plants*. janeiro de 2022;11(12):1602.

47. Chandra Singh M, Kelso C, Price WE, Probst Y. Validated liquid chromatography separation methods for identification and quantification of anthocyanins in fruit and vegetables: A systematic review. *Food Res Int*. 1º de dezembro de 2020;138:109754.

48. Saini RK, Ranjit A, Sharma K, Prasad P, Shang X, Gowda KGM, et al. Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes. *Antioxidants*. fevereiro de 2022;11(2):239.

49. Tan J, Vincken JP, Sanders MG, Lin Z, de Bruijn WJC. The influence of pH on auto-oxidative browning of flavan-3-ols and gallic acid as a promising browning inhibitor. *Food Chem*. 1º de maio de 2025;473:143066.

50. Zhang Z, Ren Y, He X, Zhang X, Pei G, Zhao X. Exploring the impact of substitution and conformational variations on the copigmentation ability of monomeric flavan-3-ols in wine. *Food Res Int*. 1º de novembro de 2024;196:115032.

51. Cao W, Ye LH, Cao J, Xu JJ, Peng LQ, Zhu QY, et al. Quantitative analysis of flavanones from citrus fruits by using mesoporous molecular sieve-based miniaturized solid phase extraction coupled to ultrahigh-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 7 de agosto de 2015;1406:68–77.

52. Wahle KWJ, Brown I, Rotondo D, Heys SD. Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. Em: Giardi MT, Rea G, Berra B, organizadores. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2010 [citado 12 de abril de 2024]. p. 36–51. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_4

53. Lopez-Corona AV, Valencia-Espinosa I, González-Sánchez FA, Sánchez-López AL, Garcia-Amezquita LE, Garcia-Varela R. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries (*Rubus idaeus*): A General Review. *Antioxidants*. junho de 2022;11(6):1192.

54. Sunil L, Shetty NP. Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1º de março de 2022;106(5):1783–98.

55. Nassour R, Ayash A, Al-Tameemi K. Anthocyanin pigments: Structure and biological importance. 2020;13(4).

56. Husain A, Chanana H, Khan SA, Dhanalekshmi UM, Ali M, Alghamdi AA, et al. Chemistry and Pharmacological Actions of Delphinidin, a Dietary Purple Pigment in Anthocyanidin and Anthocyanin Forms. *Front Nutr* [Internet]. 17 de março de 2022 [citado 5 de agosto de 2025];9. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2022.746881/full>
57. He J, Giusti M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties.
58. Sharma P, Hamid. Ultrasonication-assisted extraction of anthocyanins from fruit and vegetable waste. *Food Humanity*. 1º de dezembro de 2025;5:100713.
59. Li N, Wang Q, Zhou J, Li S, Liu J, Chen H. Insight into the Progress on Natural Dyes: Sources, Structural Features, Health Effects, Challenges, and Potential. *Molecules*. janeiro de 2022;27(10):3291.
60. Seleem D, Pardi V, Murata RM. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Arch Oral Biol*. 1º de abril de 2017;76:76–83.
61. Garrido J, Borges F. Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Res Int*. 1º de dezembro de 2013;54(2):1844–58.
62. Górnas P, Mišina I, Waśkiewicz A, Perkons I, Pugajeva I, Segliņa D. Simultaneous extraction of tocochromanols and flavan-3-ols from the grape seeds: Analytical and industrial aspects. *Food Chem*. 1º de janeiro de 2025;462:140913.
63. Di Pede G, Mena P, Bresciani L, Achour M, Lamuela-Raventós RM, Estruch R, et al. Revisiting the bioavailability of flavan-3-ols in humans: A systematic review and comprehensive data analysis. *Mol Aspects Med*. 1º de fevereiro de 2023;89:101146.
64. Tosi N, Bresciani L, Favari C, Rosi A, Dodi R, Bertelé A, et al. How does the flavan-3-ol structure condition the quali-quantitative production of phenolic metabolites? Insights from a 3-arm intervention. *Food Chem*. 1º de novembro de 2025;491:145207.
65. Crowe-White KM, Evans LW, Kuhnle GGC, Milenkovic D, Stote K, Wallace T, et al. Flavan-3-ols and Cardiometabolic Health: First Ever Dietary Bioactive Guideline. *Adv Nutr*. 1º de novembro de 2022;13(6):2070–83.
66. Raman G, Avendano EE, Chen S, Wang J, Matson J, Gayer B, et al. Dietary intakes of flavan-3-ols and cardiometabolic health: systematic review and meta-analysis of randomized trials and prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 1º de novembro de 2019;110(5):1067–78.

67. Pietta P, Minoggio M, Bramati L. Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. Em: Rahman A ur, organizador. Studies in Natural Products Chemistry [Internet]. Elsevier; 2003 [citado 13 de agosto de 2025]. p. 257–312. (Bioactive Natural Products (Part I); v. 28). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572599503801436>
68. Peterson JJ, Dwyer JT, Beecher GR, Bhagwat SA, Gebhardt SE, Haytowitz DB, et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J Food Compos Anal*. 1º de agosto de 2006;19:S66–73.
69. Gilcher C, Jungen M, Schweiggert R, Steingass CB. Comparative HPLC-DAD-ESI-QTOF-HR-MS/MS analyses of phenolic compounds of authentic lemon, lime, orange, and grapefruit juices. *Food Chem*. 1º de setembro de 2025;485:144416.
70. Ho SC, Kuo CT. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae* pericarpium). *Food Chem Toxicol*. 1º de setembro de 2014;71:176–82.
71. Garzón-Alonso KE, Bohorquez-Peña MJ, Vargas-Suaza B, Rendón-Londoño JC, Mesa M, Franco-Tobón YN, et al. Hydrolysis of flavanones from orange peel and evaluation of anticancer potential using naringinase immobilized on corn cob powder. *Food Biosci*. 1º de julho de 2025;69:106752.
72. Hostetler GL, Ralston RA, Schwartz SJ. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Adv Nutr*. 1º de maio de 2017;8(3):423–35.
73. Drewnowski A, Gomez-Carneros C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J Clin Nutr*. 1º de dezembro de 2000;72(6):1424–35.
74. Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*. 1º de outubro de 2005;66(20):2399–407.
75. Patil H, Khule SP, Gagrani M, Pawar SD. Pharmacological exploration of natural 6-hydroxy flavone: A promising moiety. *Fitoterapia*. 1º de julho de 2025;184:106647.
76. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*. 28 de setembro de 2012;3:222.
77. Daryanavard H, Postiglione AE, Mühlemann JK, Muday GK. Flavonols modulate plant development, signaling, and stress responses. *Curr Opin Plant Biol*. 1º de abril de 2023;72:102350.

78. Gautam H, Sharma A, Trivedi PK. The role of flavonols in insect resistance and stress response. *Curr Opin Plant Biol.* 1º de junho de 2023;73:102353.
79. Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. Role of Quercetin in Depressive-Like Behaviors: Findings from Animal Models. *Appl Sci.* janeiro de 2021;11(15):7116.
80. Mendonça CR, Manhães-de-Castro R, de Santana BJRC, Olegário da Silva L, Toscano AE, Guzmán-Quevedo O, et al. Effects of flavonols on emotional behavior and compounds of the serotonergic system: A preclinical systematic review. *Eur J Pharmacol.* 5 de fevereiro de 2022;916:174697.
81. Armarkar A, Sabale P, Prasad S, Sabale V, Potey L, Masram D. Therapeutic role of isoflavones from traditional medicine in the management of polycystic ovary syndrome. *Pharmacol Res - Mod Chin Med.* 1º de março de 2025;14:100580.
82. Anushya vardhini V, Sowmiya S, Abdul Sameer S, Sakthi R, Divya R, Monisha A. Role of isoflavones in multiple sclerosis. *IBRO Neurosci Rep.* 1º de dezembro de 2025;19:456–70.
83. Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño MM, Pérez-Martín L, Rodríguez-Gonzalo E, Domínguez-Álvarez J. Analysis of Isoflavones in Foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018;17(2):391–411.
84. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Molecules.* janeiro de 2019;24(6):1076.
85. Chauhan R, Poonia N, Subudhi RN, Arora V. Nanoformulations of Isoflavones: Mechanistic insights and translational research. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1º de junho de 2025;108:106948.
86. Chandrasekara A. Phenolic Acids. Em: Melton L, Shahidi F, Varelis P, organizadores. *Encyclopedia of Food Chemistry* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2019 [citado 19 de agosto de 2025]. p. 535–45. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965223950>
87. Pelinson LP, Assmann CE, Palma TV, da Cruz IBM, Pillat MM, Mânica A, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. *Mol Biol Rep.* 1º de abril de 2019;46(2):2085–92.
88. Oršolić N, Kunštić M, Kukulj M, Gračan R, Nemrava J. Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. *Chem Biol Interact.* 25 de agosto de 2016;256:111–24.
89. Aborehab NM, Elnagar MR, Waly NE. Gallic acid potentiates the apoptotic effect of paclitaxel and carboplatin via overexpression of Bax and P53

on the MCF-7 human breast cancer cell line. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021;35(2):e22638.

90. Silva GB da, Rocha KG, Bagatini MD, Kempka AP. Anticancer properties of phenolic acids and cell death signaling pathways: A 20-year bibliometric analysis (2003–2023). *Food Biosci.* 1º de janeiro de 2025;63:105741.

91. Chen S, Zhao D, Luan C, Zheng J, Liu W, Feng Z, et al. Ferulic Acid Induces Autophagy and Apoptosis in Colon Cancer CT26 Cells via the MAPK Pathway. *Molecules.* janeiro de 2023;28(16):6014.

92. Dodurga Y, Eroğlu C, Seçme M, Elmas L, Avcı ÇB, Şatiroğlu-Tufan NL. Anti-proliferative and anti-invasive effects of ferulic acid in TT medullary thyroid cancer cells interacting with URG4/URGCP. *Tumor Biol.* 1º de fevereiro de 2016;37(2):1933–40.

93. Wang J, Lai X, Yuan D, Liu Y, Wang J, Liang Y. Effects of ferulic acid, a major component of rice bran, on proliferation, apoptosis, and autophagy of HepG2 cells. *Food Res Int.* 1º de novembro de 2022;161:111816.

94. Zhang X, Lin D, Jiang R, Li H, Wan J, Li H. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. *Oncol Rep.* 1º de julho de 2016;36(1):271–8.

95. El-Gogary RI, Nasr M, Rahsed LA, Hamzawy MA. Ferulic acid nanocapsules as a promising treatment modality for colorectal cancer: Preparation and *in vitro/in vivo* appraisal. *Life Sci.* 1º de junho de 2022;298:120500.

96. Lončar M, Jakovljević M, Šubarić D, Pavlić M, Buzjak Služek V, Cindrić I, et al. Coumarins in Food and Methods of Their Determination. *Foods.* maio de 2020;9(5):645.

97. Hassanein EHM, Sayed AM, Hussein OE, Mahmoud AM. Coumarins as Modulators of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020(1):1675957.

98. Garg SS, Gupta J, Sharma S, Sahu D. An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action. *Eur J Pharm Sci.* 1º de setembro de 2020;152:105424.

99. Medicinal chemistry perspective on the structure–activity relationship of stilbene derivatives. *RSC Adv.* 18 de junho de 2024;14(28):19823–79.

100. Akinwumi BC, Bordun KAM, Anderson HD. Biological Activities of Stilbenoids. *Int J Mol Sci.* 9 de março de 2018;19(3):792.

101. Ahamad J, Ismail SA, Jalal AZ, Akhtar MS, Ahmad J. Stilbenes in breast cancer treatment: Nanostilbenes an approach to improve therapeutic efficacy. *Pharmacol Res - Nat Prod*. 1º de março de 2025;6:100173.
102. Vasconcelos M da S, Gomes-Rochette NF, de Oliveira MLM, Nunes-Pinheiro DCS, Tomé AR, Maia de Sousa FY, et al. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. *Exp Biol Med*. 1º de dezembro de 2015;240(12):1648–55.
103. Baptista A, Gonçalves RV, Bressan J, Pelúzio M do CG. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Extracts and Fractions of Cashew (*Anacardium occidentale* L.), Cajui (*Anacardium microcarpum*), and Pequi (*Caryocar brasiliense* C.): A Systematic Review. *Oxid Med Cell Longev*. 18 de abril de 2018;2018:e3753562.
104. de Albuquerque TL, Cavalcante VGC, da Silva Rocha W, de Macedo AC, Rocha MVP. Hydrogels based on lignin extracted from cashew apple bagasse and its application in antimicrobial wound dressings. *Int J Biol Macromol*. 1º de março de 2024;262:130169.
105. Sousa JMS, de Abreu FAP, Ruiz ALTG, da Silva GG, Machado SL, Garcia CPG, et al. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from a by-product of juice processing: assessment of its toxicity, antiproliferative and antimicrobial activities. *J Food Sci Technol*. 1º de fevereiro de 2021;58(2):764–76.
106. Dionísio AP, Carvalho-Silva LB de, Vieira NM, Goes T de S, Wurlitzer NJ, Borges M de F, et al. Cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) functional beverage improve the diabetic state in rats. *Food Res Int*. 1º de novembro de 2015;77:171–6.
107. Andrade RAM de S, da Silva DC, Souza MMB de, de Oliveira RL, Maciel MIS, Porto ALF, et al. Microencapsulation of phenolic compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-food waste: Physicochemical characterization, antioxidant activity, biodisponibility and stability. *Food Chem Adv*. 1º de dezembro de 2023;3:100364.
108. Cruz Reina LJ, Durán-Aranguren DD, Forero-Rojas LF, Tarapuez-Viveros LF, Durán-Sequeda D, Carazzone C, et al. Chemical composition and bioactive compounds of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and bagasse from Colombian varieties. *Heliyon*. 1º de maio de 2022;8(5):e09528.
109. Peixoto J de C, Neves BJ, Vasconcelos FG, Napolitano HB, Barbalho MG da S, Silva SD e, et al. Flavonoids from Brazilian Cerrado: Biosynthesis, Chemical and Biological Profile. *Molecules*. 9 de agosto de 2019;24(16):2891.
110. Schweiggert RM, Vargas E, Conrad J, Hempel J, Gras CC, Ziegler JU, et al. Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and

red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). Food Chem. 1º de junho de 2016;200:274–82.

111. Huang H, Zhao L, Zhang B, Huang W, Zhang Z, An B. Integrated analysis of the metabolome and transcriptome provides insights into anthocyanin biosynthesis of cashew apple. Food Res Int. 1º de janeiro de 2024;175:113711.

112. Goulart da Silva G, de Oliveira Braga LE, Souza de Oliveira EC, Valério Tinti S, de Carvalho JE, Goldoni Lazarini J, et al. Cashew apple byproduct: Gastroprotective effects of standardized extract. J Ethnopharmacol. 6 de abril de 2021;269:113744.

113. Ali A, Riaz S, Khalid W, Fatima M, Mubeen U, Babar Q, et al. Potential of ascorbic acid in human health against different diseases: an updated narrative review. Int J Food Prop. 31 de dezembro de 2024;27(1):493–515.

114. Sharma R, Naidoo SF, Bhatt B. Scurvy as a Mimicker of Arthritis: Isolated Hemarthrosis due to Vitamin C Deficiency, A case report. J Orthop Rep. 27 de abril de 2024;100346.

115. Srienč-Ściesiek MT, Richards N, Ladstätter S, Kirchengast S. Evidence of non-adult vitamin C deficiency in three early medieval sites in the Jaun/Podjuna Valley, Carinthia, Austria. Int J Paleopathol. 1º de junho de 2024;45:18–29.

116. Bird JK, Feskens EJ, Melse-Boonstra A. A Systematized Review of the Relationship Between Obesity and Vitamin C Requirements. Curr Dev Nutr. 1º de maio de 2024;8(5):102152.

117. Li XY, Meng L, Shen L, Ji HF. Regulation of gut microbiota by vitamin C, vitamin E and β -carotene. Food Res Int. 1º de julho de 2023;169:112749.

118. Chen L, Sun X, Wang Z, Lu Y, Chen M, He Y, et al. The impact of plasma vitamin C levels on the risk of cardiovascular diseases and Alzheimer's disease: A Mendelian randomization study. Clin Nutr. 1º de outubro de 2021;40(10):5327–34.

119. Shenoy N, Creagan E, Witzig T, Levine M. Ascorbic Acid in Cancer Treatment: Let the Phoenix Fly. Cancer Cell. 12 de novembro de 2018;34(5):700–6.

120. Yonova-Doing E, Forkin ZA, Hysi PG, Williams KM, Spector TD, Gilbert CE, et al. Genetic and Dietary Factors Influencing the Progression of Nuclear Cataract. Ophthalmology. 1º de junho de 2016;123(6):1237–44.

121. Arabia A, Munné-Bosch S, Muñoz P. Ascorbic acid as a master redox regulator of fruit ripening. Postharvest Biol Technol. 1º de janeiro de 2024;207:112614.

122. Moo-Huchin VM, Estrada-Mota I, Estrada-León R, Cuevas-Glory L, Ortiz-Vázquez E, Vargas M de LV y, et al. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem.* 1º de junho de 2014;152:508–15.
123. Aidoo R, Kwofie EM, Ngadi MO. Circularity of Cashew Apples: Examining the Product-Process Pathways, Techno-Functional, Nutritional/Phytomolecular Qualities for Food Applications. *ACS Food Sci Technol.* 15 de julho de 2022;2(7):1051–66.
124. Akyereko YG, Yeboah GB, Wireko-Manu FD, Alemawor F, Mills-Robertson FC, Odoom W. Nutritional value and health benefits of cashew apple. *JSFA Rep.* 2023;3(3):110–8.
125. Oliveira NN, Mothé CG, Mothé MG, de Oliveira LG. Cashew nut and cashew apple: a scientific and technological monitoring worldwide review. *J Food Sci Technol.* 1º de janeiro de 2020;57(1):12–21.
126. Alam MW, Najeeb J, Naeem S, Usman SM, Nahvi I, Alismail F, et al. Electrochemical Methodologies for Investigating the Antioxidant Potential of Plant and Fruit Extracts: A Review. *Antioxidants.* 20 de junho de 2022;11(6):1205.
127. Agregán R, Echegaray N, Bermúdez R. 2 - Electrochemical methods to evaluate antioxidant activity in food products. Em: Pateiro M, organizador. *Natural Antioxidants to Enhance the Shelf-Life of Food* [Internet]. Academic Press; 2024 [citado 6 de março de 2025]. p. 29–49. (Developments in Food Quality and Safety). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780443153860000023>
128. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. 2004;26(2).
129. Hidayat MA, Fitri A, Kuswandi B. Scanometry as microplate reader for high throughput method based on DPPH dry reagent for antioxidant assay. *Acta Pharm Sin B.* 1º de maio de 2017;7(3):395–400.
130. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1º de janeiro de 1995;28(1):25–30.
131. Polez VLP, Dantas KC de S, Duarte A de O, Magarelli G, Silva LP da. Método de avaliação antioxidante de material vegetal por DPPH em microplaca e controle de qualidade. 2023;(1ª Edição):1–18.
132. Becker MM, Nunes GS, Ribeiro DB, Silva FEPS, Catanante G, Marty JL. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized

Spectrophotometry Assays. *J Braz Chem Soc* [Internet]. 2019 [citado 19 de maio de 2025]; Disponível em: <https://hal.science/hal-03968401>

133. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Sci Technol*. dezembro de 2005;25:726–32.

134. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin Sci*. 1º de abril de 1993;84(4):407–12.

135. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1º de maio de 1999;26(9):1231–7.

136. Collins CH. I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. *Sci Chromatogr*. 2009;1(1).

137. Lanças FM. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Sci Chromatogr*. 2009;1(2).

138. Engelhardt H. One century of liquid chromatography: From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. *J Chromatogr B*. 5 de fevereiro de 2004;800(1):3–6.

139. Maldaner L, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quím Nova*. 2009;32(1):214–22.

140. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem*. 2012;2012:282574.

141. Ho C, Lam C, Chan M, Cheung R, Law L, Lit L, et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev*. fevereiro de 2003;24(1):3–12.

142. Liigand P, Liigand J, Kaupmees K, Kruve A. 30 Years of research on ESI/MS response: Trends, contradictions and applications. *Anal Chim Acta*. 1º de abril de 2021;1152:238117.

143. Oss M, Kruve A, Herodes K, Leito I. Electrospray Ionization Efficiency Scale of Organic Compounds. *Anal Chem*. 1º de abril de 2010;82(7):2865–72.

144. Vallejo DD, Corstvet JL, Fernández FM. Triboelectric nanogenerators: Low-cost power supplies for improved electrospray ionization. *Int J Mass Spectrom*. 1º de janeiro de 2024;495:117167.

145. Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem.* setembro de 1984;88(20):4451–9.
146. Wilm M. Principles of Electrospray Ionization. *Mol Cell Proteomics.* 1º de julho de 2011;10(7):M111.009407.
147. Lanças FM. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. *Sci Chromatogr.* 2013;5(1):27–46.
148. Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. Introdução à espectroscopia. Cengage Learning; 2010. 399–499 p.
149. Greaves J, Roboz J. Mass Spectrometry for the Novice [Internet]. 1st ed. Boca Raton: CRC Press.; 2014. 309 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/b15436>
150. van der Gugten JG. Tandem mass spectrometry in the clinical laboratory: A tutorial overview. *Clin Mass Spectrom.* 1º de janeiro de 2020;15:36–43.
151. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Bergquist J, Meikle AW. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin Biochem.* 1º de janeiro de 2011;44(1):77–88.
152. Fonteles TV, Leite AKF, da Silva ARA, Fernandes FAN, Rodrigues S. Sonication Effect on Bioactive Compounds of Cashew Apple Bagasse. *Food Bioprocess Technol.* 1º de outubro de 2017;10(10):1854–64.
153. Rufino M do SM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* agosto de 2010;121(4):996–1002.
154. SANTE. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE 11312/2021 v2. Seq. v2 2021.
155. BRASIL. RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 [Internet]. Brasília; 2017. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401
156. BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 18 DE JUNHO DE 2014. Brasília; 2014.
157. dos Santos GF, Lima NM, Lima GS, Roque JV, Preet G, Oppong-Danquah E, et al. Mass spectrometry-based untargeted metabolomics approaches for comprehensive structural annotation of bioactive metabolites

from bushy cashew (*Anacardium humile*) fruits. *South Afr J Bot.* 1º de dezembro de 2023;163:121–34.

158. Gowda GAN, Djukovic D. Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014;1198:3–12.

159. Bro R, Smilde AK. Principal component analysis. *Anal Methods.* 2014;6(9):2812–31.

160. Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J Chemom.* março de 2003;17(3):166–73.

161. Brereton RG, Lloyd GR. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J Chemom.* abril de 2014;28(4):213–25.

162. Lê Cao KA, Boitard S, Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics.* 22 de junho de 2011;12(1):253.

163. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom Intell Lab Syst.* 28 de outubro de 2001;58(2):109–30.

164. Alves MSO, Alves AM, Naves MMV. Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado. *Rev Inst Adolfo Lutz [Internet].* 2014 [citado 9 de agosto de 2024]; Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/32936>

165. Lopes MM de A, Miranda MRA de, Moura CFH, Enéas Filho J. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. *Ciênc E Agrotecnologia.* junho de 2012;36:325–32.

166. Sucupira NR, Sabino LB de S, Gondim Neto L, Gouveia ST, Figueiredo RW de, Maia GA, et al. Evaluation of cooking methods on the bioactive compounds of cashew apple fibre and its application in plant-based foods. *Heliyon.* 1º de novembro de 2020;6(11):e05346.

167. Gao F, McDaniel J, Chen EY, Rockwell H, Lynes MD, Tseng YH, et al. Monoacylglycerol Analysis Using MS/MSALL Quadruple Time of Flight Mass Spectrometry. *Metabolites.* setembro de 2016;6(3):25.

168. BRASIL. GUIA PARA TRATAMENTO ESTATÍSTICO DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA - GUIA Nº 10/2017 [Internet]. GUIA Nº 10/2017 Brasília; set 12, 2017. Disponível em: <https://www.farmacêuticas.com.br/wp-content/uploads/2017/09/Guia-10-v1-Tratamento-estatístico-validação-analítica.pdf>

169. AOAC A of OA. Vitamin C in Juices and Vitamin Preparations, Official Method 967.21. AOAC Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists Gaithersburg, MD, USA; 2005.
170. Ramli F, Azlan A. Comparison of vitamin C content in citrus fruits by titration and high performance liquid chromatography (HPLC) methods. Em 2017 [citado 9 de outubro de 2024]. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Comparison-of-vitamin-C-content-in-citrus-fruits-by-Ramli-Azlan/db18ee8cbe33b10e67070de53f5a37e8c9696ff7>
171. Spínola V, Mendes B, Câmara JS, Castilho PC. Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. LWT - Food Sci Technol. 1º de março de 2013;50(2):489–95.
172. Akinwale TO. Cashew apple juice: its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits. Eur Food Res Technol. 1º de agosto de 2000;211(3):205–7.
173. Assunção RB, Mercadante AZ. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. Food Chem. 1º de junho de 2003;81(4):495–502.
174. Silva MR, Silva MS, Oliveira JS, Oliveira J. ESTABILIDADE DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM PSEUDOFRUTOS DE CAJU-DO-CERRADO REFRIGERADOS E CONGELADOS. Pesqui Agropecuária Trop. 2004;9–14.
175. Kaprasob R, Sarkar D, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N, Khanongnuch C, Shetty K. Beneficial lactic acid bacteria based bioprocessing of cashew apple juice for targeting antioxidant nutraceutical inhibitors as relevant antidotes to type 2 diabetes. Process Biochem. 1º de julho de 2019;82:40–50.
176. Zié M, Alabi T, Karamoko G, Blecker C. Valorization of cashew apple bagasse in food application: Focus on the use and extraction of nutritional or bioactive compounds. Food Humanity. 1º de dezembro de 2023;1:848–63.
177. AlJuhaimi F, Mohamed Ahmed IA, Özcan MM, Uslu N, Karrar E. Effects of maturation on bioactive properties, phenolic compounds, fatty acid compositions and nutrients of unripe and ripe sumac (*Rhus coriaria* L.) fruits. Food Humanity. 1º de maio de 2024;2:100281.
178. Nakitto AMS, Byaruhanga YB, Wagner AE, Muyonga JH. Influence of ripeness stage on the bioactive compounds' contents and antioxidant activities of *Solanum anguivi* Lam. fruits accessions. Heliyon. 1º de novembro de 2023;9(11):e21614.
179. Paško P, Galanty A, Zagrodzki P, Ku YG, Luksirikul P, Weisz M, et al. Bioactivity and cytotoxicity of different species of pitaya fruits – A comparative

study with advanced chemometric analysis. *Food Biosci.* 1º de abril de 2021;40:100888.

180. Freitas BSM de, Haas IC da S, Pereira-Coelho M, Almeida AB de, Almeida J dos SO de, Egea MB, et al. Cerrado cashew (*Anacardium othonianum* Rizz) apple pomace: chemical characterization and optimization of enzyme-assisted extraction of phenolic compounds. *Food Sci Technol* [Internet]. 20 de julho de 2023 [citado 10 de abril de 2024];43. Disponível em: <https://fstjournal.com.br/revista/article/view/104>

181. Bataglioni GA, da Silva FMA, Eberlin MN, Koolen HHF. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. *Food Chem.* 1º de agosto de 2015;180:280–7.

APÊNDICE A – Tabelas suplementares

Tabela A.1 – Classificação das amostras de *A. occidentale* e *A. humile* por PCA e agrupamento *K-means*

Amostras	Espécie	PC1	PC2	Grupo <i>k-means</i>
A10_01	<i>A. humile</i>	-02,87006	-08,29521	2
A10_02	<i>A. humile</i>	-01,40365	-09,72120	2
A10_03	<i>A. humile</i>	-07,77331	-05,88008	2
A11-01	<i>A. humile</i>	-07,24461	-05,02121	2
A11_02	<i>A. humile</i>	-05,87611	-07,21055	2
A11_03	<i>A. humile</i>	-02,94719	-13,66330	2
A12_01	<i>A. humile</i>	-00,48270	-15,98746	2
A12_02	<i>A. humile</i>	-06,36412	-06,04206	2
A13_01	<i>A. humile</i>	-05,11769	-01,08715	2
A13_02	<i>A. humile</i>	-08,23576	-00,98521	2
A13_03	<i>A. humile</i>	-10,24455	-03,59010	2
A14_01	<i>A. humile</i>	-11,17970	-04,24732	2
A14_02	<i>A. humile</i>	-11,54684	-04,09661	2
A14_03	<i>A. humile</i>	-10,64360	-06,28187	2
A1_02	<i>A. humile</i>	-03,61933	-05,34021	2
A1_03	<i>A. humile</i>	03,50654	-11,15314	2
A2_01	<i>A. humile</i>	03,25143	-08,22745	2
A2_02	<i>A. humile</i>	06,81297	-12,93662	2
A2_03	<i>A. humile</i>	06,08461	-09,89315	2
A3_01	<i>A. humile</i>	-02,22891	-04,98524	2
A3_02	<i>A. humile</i>	-05,32525	-00,63675	2
A3_03	<i>A. humile</i>	-05,14698	-03,32357	2
A4_01	<i>A. humile</i>	-08,44927	05,28703	2

A4_02	<i>A. humile</i>	-06,16666	00,71730	2
A4_03	<i>A. humile</i>	-09,67716	09,78227	1
A5_01	<i>A. humile</i>	-11,57293	08,61238	1
A5_02	<i>A. humile</i>	-09,66710	03,50321	2
A5_03	<i>A. humile</i>	-10,93026	04,70293	2
A6_01	<i>A. humile</i>	-10,24223	02,86669	2
A6_02	<i>A. humile</i>	-08,59896	-03,77888	2
A6_03	<i>A. humile</i>	-08,65345	-03,02672	2
A7_01	<i>A. humile</i>	-08,42110	-05,40994	2
A7_02	<i>A. humile</i>	-08,67086	-02,83652	2
A7_03	<i>A. humile</i>	-09,80916	00,35285	2
A8_01	<i>A. humile</i>	-09,40906	-03,16818	2
A8_02	<i>A. humile</i>	-03,12082	-09,32207	2
A8_03	<i>A. humile</i>	-04,35909	-08,50584	2
A9_01	<i>A. humile</i>	-01,32070	-08,14202	2
A9_02	<i>A. humile</i>	-04,03989	-05,53742	2
A9_03	<i>A. humile</i>	-07,19465	-09,70727	2
A10_01	<i>A. humile</i>	-02,87006	-08,29521	2
A10_02	<i>A. humile</i>	-01,40365	-09,72120	2
A10_03	<i>A. humile</i>	-07,77331	-05,88008	2
A11-01	<i>A. humile</i>	-07,24461	-05,02121	2
A11_02	<i>A. humile</i>	-05,87611	-07,21055	2
A11_03	<i>A. humile</i>	-02,94719	-13,66330	2
A12_01	<i>A. humile</i>	-00,48270	-15,98746	2
A12_02	<i>A. humile</i>	-06,36412	-06,04206	2
A13_01	<i>A. humile</i>	-05,11769	-01,08715	2
A13_02	<i>A. humile</i>	-08,23576	-00,98521	2
A13_03	<i>A. humile</i>	-10,24455	-03,59010	2

A14_01	<i>A. humile</i>	-11,17970	-04,24732	2
A14_02	<i>A. humile</i>	-11,54684	-04,09661	2
A14_03	<i>A. humile</i>	-10,64360	-06,28187	2
<hr/>				
B1_01	<i>A. occidentale</i>	21,47360	-00,70793	3
B1_02	<i>A. occidentale</i>	22,51517	-01,73262	3
B1_03	<i>A. occidentale</i>	24,95871	-07,91463	3
B2_01	<i>A. occidentale</i>	18,55571	-01,34994	3
B2_02	<i>A. occidentale</i>	20,52206	-03,26453	3
B2_03	<i>A. occidentale</i>	22,11469	-07,15917	3
B3_01	<i>A. occidentale</i>	19,63745	-02,68517	3
B3_02	<i>A. occidentale</i>	18,00566	-00,31803	3
B3_03	<i>A. occidentale</i>	15,06434	03,69248	3
B4_01	<i>A. occidentale</i>	12,07855	01,34197	3
B4_02	<i>A. occidentale</i>	10,53000	01,26905	3
B4_03	<i>A. occidentale</i>	08,49136	03,71699	3
B5_01	<i>A. occidentale</i>	05,06215	14,52870	1
B5_02	<i>A. occidentale</i>	04,12340	15,38760	1
B5_03	<i>A. occidentale</i>	02,23496	20,48184	1
B6_01	<i>A. occidentale</i>	03,78115	10,75382	1
B6_02	<i>A. occidentale</i>	02,56963	14,30653	1
B6_03	<i>A. occidentale</i>	03,12941	11,69727	1
B7_01	<i>A. occidentale</i>	03,42558	05,30849	1
B7_02	<i>A. occidentale</i>	00,12514	17,43648	1
B7_03	<i>A. occidentale</i>	-00,46753	11,71484	1
B8_01	<i>A. occidentale</i>	00,38439	07,75940	1
B8_02	<i>A. occidentale</i>	-00,09126	04,68400	1
B8_03	<i>A. occidentale</i>	00,69561	01,04993	2

B9_01	<i>A. occidentale</i>	-00,38084	02,84024	2
B9_02	<i>A. occidentale</i>	-00,61524	01,21376	2
B9_03	<i>A. occidentale</i>	-01,52620	02,95813	2
B10_01	<i>A. occidentale</i>	-01,82087	09,45559	1
B10_02	<i>A. occidentale</i>	-02,23763	09,94091	1
B10_03	<i>A. occidentale</i>	-03,44102	25,80966	1

Tabela A.2 - M/z características compartilhadas entre PLS-DA (VIP > 1) e análises de *volcano plot*.

Massas	VIPS	p-value	Fold Change	log10	Espécie
163.977	2.29	6.71e-16	-5.78	15.17	A. Occidentale
185.042	2.27	1.15e-17	-1.05	16.94	A. Occidentale
161.1	2.23	1.39e-21	4.05	20.86	A. Humile
160.097	2.2	3.39e-21	2.45	20.47	A. Humile
657.367	2.19	4.53e-18	-1.05	17.34	A. Occidentale
136.004	2.17	1.69e-18	2	17.77	A. Humile
701.393	2.17	8.16e-19	-2.87	18.09	A. Occidentale
103.007	2.14	2.14e-16	1.39	15.67	A. Humile
135.033	2.13	4.09e-15	1.77	14.39	A. Humile
103.978	2.12	2.17e-19	2.71	18.66	A. Humile
341.266	2.1	8.65e-17	2.38	16.06	A. Humile
163.133	2.04	4.91e-11	-1.07	10.31	A. Occidentale
125.039	2.03	3.06e-14	1.01	13.51	A. Humile
149.978	2.01	4.16e-11	1.7	10.38	A. Humile
403.233	2.01	1.93e-10	-5.17	9.71	A. Occidentale
239.095	1.99	1.73e-11	1.95	10.76	A. Humile
340.209	1.89	1.27e-11	2.06	10.9	A. Humile
430.914	1.89	1.23e-09	-4.25	8.91	A. Occidentale
318.667	1.87	9.84e-14	3.22	13.01	A. Humile
467.298	1.84	2.59e-10	-2.97	9.59	A. Occidentale
365.209	1.83	2.93e-08	-4.11	7.53	A. Occidentale
231.108	1.77	1.74e-07	1.24	6.76	A. Humile
564.555	1.76	1.17e-10	-2.26	9.93	A. Occidentale
341.269	1.68	4.24e-10	-1.15	9.37	A. Occidentale
641.512	1.66	3.54e-08	-2.66	7.45	A. Occidentale
121.017	1.63	1.76e-09	5.35	8.75	A. Humile
618.515	1.62	2.50e-07	-1.97	6.6	A. Occidentale
226.952	1.61	5.68e-08	-1.15	7.25	A. Occidentale
644.531	1.57	1.16e-07	-1.27	6.94	A. Occidentale
318.3	1.56	7.01e-09	1.11	8.15	A. Humile
379.282	1.55	7.07e-08	-1.6	7.15	A. Occidentale
367.246	1.54	1.90e-05	-3.45	4.72	A. Occidentale

121.018	1.51	8.47e-08	1.38	7.07	A. Humile
239.162	1.51	1.55e-08	3.37	7.81	A. Humile
219.027	1.49	1.08e-05	-2.94	4.97	A. Occidentale
248.089	1.48	2.86e-07	1.87	6.54	A. Humile
617.512	1.45	1.87e-05	-1.17	4.73	A. Occidentale
368.425	1.43	4.96e-07	2.34	6.3	A. Humile
481.402	1.38	1.91e-04	-3.02	3.72	A. Occidentale
463.267	1.37	4.42e-05	-2.95	4.35	A. Occidentale
450.379	1.36	2.50e-04	-2.69	3.6	A. Occidentale
449.376	1.36	2.19e-04	-2.9	3.66	A. Occidentale
585.533	1.35	1.16e-05	-1.67	4.94	A. Occidentale
639.496	1.35	2.22e-06	-1.28	5.65	A. Occidentale
467.386	1.3	1.77e-04	-2.48	3.75	A. Occidentale
188.071	1.28	1.72e-05	1.11	4.76	A. Humile
362.222	1.26	2.84e-05	1.13	4.55	A. Humile
615.496	1.23	2.81e-04	-2.19	3.55	A. Occidentale
137.133	1.22	2.27e-04	-1.49	3.64	A. Occidentale
428.732	1.18	3.44e-05	2.15	4.46	A. Humile
182.081	1.18	4.62e-04	-1.66	3.34	A. Occidentale
665.497	1.18	5.14e-04	-1.68	3.29	A. Occidentale
643.527	1.17	1.10e-03	-1.03	2.96	A. Occidentale
483.381	1.12	1.90e-03	-3.62	2.72	A. Occidentale
909.78	1.09	1.76e-02	-2.59	1.76	A. Occidentale
465.371	1.08	3.98e-03	-4.07	2.4	A. Occidentale
334.098	1.05	9.86e-03	-2.23	2.01	A. Occidentale
215.125	1.02	5.21e-04	2.81	3.28	A. Humile
569.314	1.02	8.31e-03	-2.05	2.08	A. Occidentale
522.356	1.02	9.82e-03	-1.36	2.01	A. Occidentale
391.222	1.01	7.26e-03	-3.86	2.14	A. Occidentale
880.745	1.01	6.42e-03	-2.57	2.19	A. Occidentale