

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E
ALCALOIDES DOS RESÍDUOS DO CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum)”**

Milena Campelo Freitas de Lima

MANAUS

2013

MILENA CAMPELO FREITAS DE LIMA

**“CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E
ALCALOIDES DOS RESÍDUOS DO CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre
em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS

2013

MILENA CAMPELO FREITAS DE LIMA

**“CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E
ALCALOIDES DOS RESÍDUOS DO CUPUAÇU (*Theobroma
grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum)”.**

Aprovada em 18 de dezembro de 2013.

Banca Examinadora

.....
Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior – Orientador
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

.....
Prof. Dr. Adley Antonini Neves de Lima – Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

.....
Prof. Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura – Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

*À minha querida e amada família.
À minha princesa Gabriela Lima,
ao meu amado pai José Lúcio
e ao meu querido esposo Max Lima,
pelo apoio, carinho e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder perseverança, forças e coragem ao longo do Mestrado, proporcionando-me oportunidades de crescer profissionalmente.

À minha tão amada filha Gabriela Lima pela compreensão e, principalmente por todas as vezes em que estava presente fisicamente, mas meus pensamentos e minha atenção estavam vinculados ao mestrado.

Ao meu querido esposo Max Lima pelo incentivo, companheirismo, dedicação, apoio e compreensão.

Ao meu pai José Lídio que ensinou-me a ser quem hoje sou, pelo amor, carinho e apoio.

Aos meus irmãos Daniel Campelo e Jonas de Oliveira que sempre estiveram do meu lado apoiando-me e colaborando para que tudo ocorresse corretamente.

Ao meu orientador prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior pelo carinho, confiança, apoio e pelas oportunidades de crescimento profissional que tem me proporcionado no decorrer desses seis anos de caminhada científica.

Ao prof. Dr. Emerson Lima pela imensa colaboração nos ensaios químicos e análises cromatográficas realizadas em seu laboratório e principalmente pelo carinho, atenção e disponibilidade.

Ao prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pelas oportunidades de aprendizado no Laboratório de Espectrometria de Massas.

Ao prof. Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura pela atenção e disponibilidade nas colaborações com reagentes e equipamentos como o moinho e o liofilizador.

Ao Dr. Max Lima pela atenção, paciência e dedicação nas orientações das análises estatísticas.

À Dr^a. Cecília Verônica Nunez, Dr^a. Maria da Paz Lima, Dr^a. Rita de Cássia Saraiva Nunomura, Dr^a. Maria Lúcia Belém, Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura, Dr. Afonso Leão Duarte, Dr. Marcos Machado e ao Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior pela atenção e dedicação vivenciada a cada momento em cada disciplina no decorrer do mestrado.

À Dr^a. Maria Lúcia Belém e a Dr^a. Cecília Verônica pelas contribuições no exame de qualificação e ao Dr. Adley Antonini e Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura pela atenção, disponibilidade e contribuição na minha Defesa de Dissertação.

Ao Doutorando Felipe Moura pela atenção, apoio e principalmente por sua dedicação nas inúmeras vezes em que precisei de suas orientações e esclarecimentos no Laboratório de espectrometria de massas da UFAM.

Às minhas amigas Klenicy Kazumi de Lima Yamaguchi e Lidiam Maia Leandro pela amizade, sinceridade, apoio e pelas incansáveis vezes em que as procurei para curar minhas crises e dores do mestrado.

Aos meus amigos de disciplinas, de bancada e da minha vida Igor de Assis Medeiros e Caroline de Souza Mathias pela amizade construída e fortalecida nesse período de aprendizado.

Ao Orlando Amazonas, Yasmin Cunha e Isadora Moita pelo companheirismo e disponibilidade em todas as vezes que precisei de uma mão extra no laboratório.

Aos companheiros Iuri Barros, Dayana Lacerda e Fabiano Vargas que passaram pelo grupo de pesquisa e deixaram suas contribuições em minha vida.

Ao grupo de pesquisa Q-BIOMA pelo espaço oferecido e pela oportunidade de aprendizado.

A CAPES, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa de mestrado.

Resumo

Theobroma grandiflorum é uma espécie nativa da Amazônia com elevado potencial econômico, que pertence ao mesmo gênero que o cacau (*Theobroma cacao*). Seu fruto, conhecido como cupuaçu, é o maior no gênero *Theobroma*, chegando a atingir até 4 kg em massa. A base econômica dessa espécie concentra-se no mesocarpo (polpa), bastante conhecido e comercializado para a produção de sucos, néctares, sorvetes entre outros. No processo de obtenção da polpa do cupuaçu são gerados subprodutos que correspondem a 65% em peso de cada fruto, que apesar de serem fontes de substâncias fenólicas e antioxidantes não são aproveitados. Este estudo teve como objetivo descrever a composição química dos extratos fenólicos e alcaloídicos do epicarpo e endocarpo do cupuaçu utilizando técnicas espectrométricas e cromatográficas. Foram utilizados diferentes métodos combinados com etanol e etanol/água (7:3) para a extração das substâncias fenólicas e para a extração dos alcaloides purínicos quatro metodologias específicas para metilxantinas foram usadas, afim de obter as melhores condições para as extrações. O teor de fenólicos totais variou entre 8,62% (113,30 mgGAEs/g) e 12,96% (157,8 mgGAEs/g) para os extratos do epicarpo e entre 3,17% (64,5 mgGAEs/g) e 12,86% (182,6 mgGAEs/g) para o endocarpo do cupuaçu. As condições ótimas que proporcionaram maiores teores de fenólicos e flavonoides foram a extração por maceração do epicarpo à quente em etanol e a extração do endocarpo por soxhlet em etanol/água (7:3). O perfil das extrações obtido por Espectrometria de Massas indica os íons de m/z 339, 325 e 311 característicos de ácidos fenólicos, como componente majoritário tanto no epicarpo quanto no endocarpo do cupuaçu. Os extratos do epicarpo apresentaram melhores capacidades de sequestro de radicais livres (CI₅₀=69,5 µg/mL) em relação ao endocarpo (CI₅₀=223,6 µg/mL). A presença das metilxantinas cafeína e teacrina foram confirmadas por espectrometria de massas (EM) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) por comparação do tempo de retenção de seus respectivos padrões. A confirmação da molécula da teacrina foi realizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono (RMN¹³C). O estudo do aproveitamento desses resíduos indica o endocarpo do cupuaçu como excelente matéria-prima fonte da metilxantina teacrina, além da inédita presença da cafeína valorizando tanto o epicarpo quanto o endocarpo uma vez que são considerados subprodutos das indústrias de polpas da Amazônia.

Palavras Chave: *Theobroma*, epicarpo, endocarpo, Amazônia, subprodutos, fenólicos, metilxantinas, CLAE.

Abstract

Theobroma grandiflorum is a species native of the Amazon with high economic potential, which belongs to the same genus as cocoa (*Theobroma cacao*). Its fruit, known as cupuaçu, is the largest in the genus *Theobroma*, reaching up to 4 kg in weight. The economic base of this species is concentrated in the mesocarp (pulp), widely known and commercialized for the production of juices, nectars, ice cream and others. In the process of obtaining the the cupuaçu pulp byproducts are generated which correspond to 65% by weight of each fruit, that although they are sources of phenolic substances and antioxidants are not used. This study aimed to describe the chemical composition of phenolic extracts and alcaloídicos of the epicarp and endocarp cupuaçu using chromatographic and spectrometric techniques. Different methods combined with ethanol and ethanol / water (7:3) was used for the extraction of phenolic substances and for extraction of purine alkaloids four specific methodologies for methylxanthines were used, in order to obtain the best conditions for extractions.

The total phenolic content ranged between 8.62% (113.30 mgGAEs/g) and 12.96% (157.8 mgGAEs/g) for the epicarp extracts and between 3.17% (64.5 mgGAEs/g) and 12.86% (182.6 mgGAEs/g) for cupuaçu endocarp. The optimum conditions that provided the highest levels of phenolics and flavonoids were the extraction by maceration of the epicarp hot ethanol and the extraction of the endocarp by soxhlet ethanol / water (7:3). The profile of extractions obtained by mass spectrometry indicates the íons of the m/z 339, 325 e 311 characteristic of phenolic acids, as a major component both epicarp as the endocarp cupuaçu. The epicarp extracts showed better capacity scavenging free radicals ($CI_{50}=69,5 \mu\text{g/mL}$) in relation to the endocarp ($CI_{50}=223,6 \mu\text{g/mL}$). The presence of methylxanthines caffeine and teacrina were confirmed by mass spectrometry (MS) and high performance liquid chromatography (HPLC-UV) by comparison of the retention time of their respective standards. The confirmation of the teacrina molecule was performed by nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$) and carbon ($^{13}\text{C NMR}$). The study of the utilization of these residues indicates the endocarp cupuaçu as excellent raw material source teacrina methylxanthine, addition to the unprecedented presence of caffeine and valuing both epicarp and the endocarp since they are considered byproducts of industrial pulps Amazon.

Keywords: *Theobroma*, epicarp, endocarp, Amazon byproducts phenolic, methylxanthine, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos biomas brasileiros.....	1
Figura 2. Metabólitos especiais com atividades biológicas.	6
Figura 3. Fenólicos de distribuição restrita.	8
Figura 4. Antioxidantes adquiridos pela dieta alimentar.....	10
Figura 5. Núcleo fundamental dos flavonoides.....	10
Figura 6. Representação geral da biossíntese dos flavonoides.....	12
Figura 7. Alcaloides purínicos.	14
Figura 8. Representação geral da biossíntese dos alcaloides purínicos	15
Figura 9. Frutos de <i>Theobroma grandiflorum</i> (cupuaçu).....	18
Figura 10. Compostos fenólicos encontrados nas sementes de <i>Theobroma grandiflorum</i>	20
Figura 11. Procedimentos realizados para a obtenção dos extratos brutos para posterior caracterização das substâncias fenólicas.....	22
Figura 12. Procedimentos realizados para a extração e caracterização das metilxantinas nos extratos do epicarpo e endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	25
Figura 13. Extração das metilxantinas de acordo com REGINATTO <i>et al.</i> , 1999.	26
Figura 14. Extração dos alcaloides pelo método descrito por GIORDANI <i>et al.</i> , 2008 com modificações.	29
Figura 15. Representação do ensaio qualitativo de Fenóis totais.....	30
Figura 16. Representação do ensaio qualitativo de DPPH.....	32
Figura 17. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos rendimentos dos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	42
Figura 18. Intervalo de confiança a 95% para o percentual médio dos rendimentos para a composição do solvente dos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	43

Figura 19. Comparação de médias para os efeitos dos fatores no percentual dos rendimentos nos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	44
Figura 20. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos fenólicos nos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	46
Figura 21. Comparação de médias para os efeitos dos fatores no percentual dos fenólicos nos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	48
Figura 22. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos flavonoides dos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	50
Figura 23. Comparação de médias para os efeitos dos fatores no percentual dos flavonoides nos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	50
Figura 24. Intervalo de confiança a 95% para o percentual médio dos flavonoides para os solventes (esquerda) e para os métodos (direita).	51
Figura 25. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos rendimentos dos extratos do endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	54
Figura 26. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos fenólicos nos extratos do endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	56
Figura 27. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos flavonoides nos extratos do endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	57
Figura 28. Intervalo de confiança a 95% para o percentual médio dos flavonoides para os solventes (esquerda) e para os métodos (direita).	58
Figura 29. Resultados do ensaio qualitativo para varredura de radicais livres em solução de DPPH. 60	
Figura 30. Curva correspondente a varredura de radicais livres pelo método do DPPH' para extração em soxhlet do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	64
Figura 31. Perfil das extrações do epicarpo do cupuaçu por espectrometria de massas conforme as metodologias e solventes utilizados.	67
Figura 32. Perfil das extrações do endocarpo do cupuaçu por espectrometria de massas conforme as metodologias e solventes utilizados.	70

Figura 33. Sugestão das estruturas dos principais íons detectados por Espectrometria de Massas nas extrações do EPC e EDC do cupuaçu.	71
Figura 34. Esquema de protonação e desprotonação durante o processo de extração das metilxantinas na metodologia descrita por REGINATTO <i>et al.</i> (1999).	73
Figura 35. Principais metilxantinas.	74
Figura 36. Espectro de massas das extrações das metilxantinas do epicarpo e endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	77
Figura 37. Espectro de massas das extrações das metilxantinas do epicarpo e endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	78
Figura 38. Fragmentos do íon m/z 195 nas extrações das metilxantinas em fonte APCI.	79
Figura 39. Fragmentos dos padrões de teobromina (b) e teofilina (a) em fonte APCI.	80
Figura 40. Fragmentos do íon m/z 225 nas extrações das metilxantinas em fonte APCI.	81
Figura 41. Cromatograma dos padrões das metilxantinas teobromina (A), teofilina (B) e cafeína (C).	82
Figura 42. Cromatogramas das extrações do endocarpo do cupuaçu por diferentes metodologias de extração.	84
Figura 43. Espectros de Ultravioleta do pico C (cafeína) nas diferentes metodologias utilizadas.	85
Figura 44. Espectros de Ultravioleta do pico T (teacrina) nas diferentes metodologias utilizadas.	86
Figura 45. Espectros de Ultravioleta do pico X (pico não identificado) nas diferentes metodologias utilizadas.	87
Figura 46. Espectro de massas do pico X obtido em fonte APCI no modo positivo de ionização $[M+H]^+$ e seu espectro de U.V.	88
Figura 47. Cromatogramas das extrações do epicarpo do cupuaçu por diferentes metodologias de extração.	89
Figura 48. Espectro de massas do pico Y obtido em fonte APCI no modo positivo de ionização $[M+H]^+$ e seu espectro de U.V.	90

Figura 49. Espectro de RMN ¹ H da extração das metilxantinas obtido pela metodologia 2.....	91
Figura 50. Espectro de RMN ¹³ C do extrato das metilxantinas obtido pela metodologia 2.....	92
Figura 51. Cromatograma da partição em diclorometano do extrato obtido pelo método soxhlet em etanol 70% do endocarpo do cupuaçu.....	107
Figura 52. Cromatograma da partição em acetato de etila do extrato obtido pelo método soxhlet em etanol 70% do endocarpo do cupuaçu.....	107
Figura 53. Cromatograma da partição em metanol do extrato obtido pelo método soxhlet em etanol 70% do endocarpo do cupuaçu.....	107
Figura 54. Cromatograma da partição em diclorometano do extrato obtido pelo método maceração a quente em etanol 100% do epicarpo do cupuaçu.	108
Figura 55. Cromatograma da partição em acetato de etila do extrato obtido pelo método maceração a quente em etanol 100% do epicarpo do cupuaçu.	108
Figura 56. Cromatograma da partição em metanol do extrato obtido pelo método maceração a quente em etanol 100% do epicarpo do cupuaçu.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esqueleto básico de alguns compostos fenólicos.	8
Tabela 2. Composição física dos frutos de <i>T. grandiflorum</i>	37
Tabela 3. Resultados obtidos para o rendimento dos extratos, quantificação de fenólicos e flavonoides totais do epicarpo do cupuaçu.	38
Tabela 4. Resultados obtidos para o rendimento dos extratos, quantificação de fenólicos e flavonoides totais do endocarpo do cupuaçu.	39
Tabela 5. Manova para efeito de interação entre o método de extração e a composição do solvente para os extratos do epicarpo e endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	40
Tabela 6. Correlação Parcial dos erros entre rendimento, fenólicos e flavonoides.	41
Tabela 7. Rendimento médio dos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	42
Tabela 8. ANOVA para os valores dos rendimentos, fenólicos e flavonoides dos extratos dos resíduos de <i>T. grandiflorum</i> nos fatores método de extração e solvente.	45
Tabela 9. Percentual médio dos fenólicos nos extratos do epicarpo de <i>Theobroma grandiflorum</i>	46
Tabela 10. Percentual médio dos flavonoides nos extratos do epicarpo de <i>T. grandiflorum</i>	49
Tabela 11. Rendimento médio dos extratos do endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	53
Tabela 12. Percentual médio dos fenólicos nos extratos do endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	54
Tabela 13. Percentual médio dos flavonoides nos extratos do endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	56
Tabela 14. Resultados do ensaio quantitativo para varredura de radicais livres dos extratos do epicarpo e endocarpo de <i>T. grandiflorum</i>	61
Tabela 15. Resultados obtidos para os ensaios de DPPH•, fenólicos e flavonoides totais dos extratos.	63
Tabela 16. Concentração Inibitória (CI50%) dos extratos dos resíduos do cupuaçu pelo método do DPPH•.	64
Tabela 17. Abundância relativa (%) dos íons das principais metilxantinas observadas nos espectros de massas dos extratos do epicarpo e endocarpo do cupuaçu.	75

LISTA DE ESTRUCTURAS

Ia – vincristina.....	06
Ib – vimblastina.....	06
II – artemisinina.....	06
III – quinina.....	06
IV – fenol.....	08
V – pirocatecol.....	08
VI – resorcinol.....	08
VII – hidroquinona.....	08
VIII – ácido elágico.....	09
IX – α -tocoferol.....	10
X – β -caroteno.....	10
XI – cafeína.....	14
XII – teobromina.....	14
XIII – teofilina.....	14
XIV – (+)-catequina.....	20
XV – (-)-epicatequina.....	20
XVI – quercetina.....	20
XVII – caempferol.....	20
XVIII – quercetina 3-O- β -D-glucuronideo 6''-metil éster.....	20
XIX – isoscutelarina 8-O- β -D-glucuronideo 6''-metil éster.....	20
XX – isoscutelarina 8-O- β -D-glucuronideo.....	20
XXI – hipolaetina 8-O- β -glucoronídeo.....	20
XXII – quercetina 3-O- β -D-glucuronideo.....	20
XXIII – teograndina I.....	20
XXIV – teograndina II.....	20

XXV – ácido cis-caftárico.....	71
XXVI – ácido ρ -coumaroilhexose.....	71
XXVII – ácido caféico.....	71
XXVIII – ácido clorogênico.....	71
XXVIX – acetina.....	71
XXX – teograndina II.....	71
XXXI – cafeína.....	74
XXXII – teobromina	74
XXXIII – teofilina	74
XXXIII – teacrina	74

LISTA DE UNIDADES, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

cm – centímetro

mL – mililitro

μL – microlitro

mg – miligrama

g – grama

kg – quilograma

nm – nanômetro

mM - milimolar

ppm – parte por milhão

MHz – mega Hertz

δ – deslocamento

J – constante de acoplamento

CE50 – concentração eficiente

DPPH• – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

ABTS•+ – 2, 2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato

TROLLOX – 2-carbóxi-6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano

DMSO – dimetilsufóxido

NBT – Nitrobluetetrazolium

PMS – fenazina metilsulfato

NADH - Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo

TMS – tetrametilsilano

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

NaOH – hidróxido de sódio

NH₄OH – hidróxido de amônio

NaHCO₃ – carbonato ácido de sódio

FeCl₃ – cloreto férrico

CH₂Cl₂ – diclorometano

CHCl₃ – clorofórmio

aq – aquoso

IMP – inosina monofosfato

XMP – xantosina monofosfato

EPC – epicarpo

EDC - endocarpo

EEPC – Extratos do epicarpo

EEDC – Extratos do endocarpo

MF – maceração a frio

MQ – maceração a quente

SON – sonicação

SOX – soxhlet

MANOVA – Análise de Variância Multivariada

ANOVA – Análise de Variância Univariada

CCD – cromatografia em camada delgada

EM – Espectrometria de Massas

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono

CG –DIC – Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas

CG –EM – Cromatografia gasosa com detector de Massas

BIOPHAR I – Laboratório de Atividades Biológicas e Farmacêuticas I

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	4
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
3. Revisão bibliográfica.....	5
3.1. <i>Biodiversidade</i>	5
3.2. <i>Metabolismo Especial das plantas</i>	7
3.3. <i>Substâncias fenólicas e atividade antioxidante</i>	7
3.3.1. <i>Flavonoides</i>	10
3.4. <i>Alcaloides</i>	13
3.5. <i>O gênero Theobroma</i>	16
3.6. <i>Theobroma grandiflorum</i>	17
4. Metodologia.....	21
4.1. <i>Coleta do material vegetal</i>	22
4.2. <i>Métodos utilizados para obtenção dos extratos</i>	22
4.2.1. <i>Extração por sonicação (SON)</i>	23
4.2.2. <i>Extração por soxhlet (SOX)</i>	23
4.2.3. <i>Extração por maceração</i>	24
4.3. <i>Extração dos flavonoides</i>	25

4.4. Extração das metilxantinas	25
4.4.1. Metodologia 1 (REGINATTO <i>et al.</i> , 1999)	26
4.4.2. Metodologia 2 (LI <i>et al.</i> , 1990).....	27
4.4.3. Metodologia 3.....	28
4.4.4. Metodologia 4 (GIORDANI <i>et al.</i> , 2008 com modificações).....	28
4.5. Testes químicos / biológicos.....	30
4.5.1. Fenóis Totais.....	30
4.5.1.1. Ensaio qualitativo.....	30
4.5.1.2. Ensaio quantitativo	30
4.5.2. Flavonoides Totais.....	31
4.5.2.1. Ensaio quantitativo	31
4.5.3. Varredura de radicais livres.....	32
4.5.3.1. Ensaio qualitativo do radical livre DPPH'	32
4.5.3.2. Ensaio quantitativo do radical livre DPPH'	32
4.5.3.3. Ensaio quantitativo do cátion radical ABTS*+	33
4.5.3.4. Ensaio quantitativo do ânion radical superóxido	33
4.6. Métodos Espectroscópicos	34
4.6.1. Espectrometria de massas	34
4.6.2. Ressonância Magnética Nuclear	34
4.7. Métodos Cromatográficos	35
4.7.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV).....	35
4.8. Métodos Estatísticos	35
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	37
5.1. Composição física dos frutos de <i>Theobroma grandiflorum</i>	37
5.2. Seleção do Método de Extração.....	37

5.2.1. Seleção do Método de Extração do Epicarpo de <i>Theobroma grandiflorum</i>	41
5.2.1.1. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de rendimentos	41
5.2.1.2. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de substâncias fenólicas	46
5.2.1.3. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de flavonoides	49
5.2.2. Seleção do Método de Extração do endocarpo de <i>Theobroma grandiflorum</i>	52
5.2.2.1. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de rendimento.....	52
5.2.2.2. Efeito do Método de Extração e da composição do solvente na variação do percentual de substâncias fenólicas	54
5.2.2.3. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de flavonoides	56
5.3. Varredura de Radicais Livres	59
5.3.1. Ensaio Qualitativo (DPPH [·])	59
5.3.2. Ensaio Quantitativo (DPPH [·] , ABTS ^{•+} e superóxido)	60
5.3.3. Concentração Eficiente (CE ₅₀) ou Concentração Inibitória (CI ₅₀) dos extratos brutos.....	63
5.4. Análise dos extratos brutos por Espectrometria de Massas	66
5.5. Avaliação dos Extratos brutos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta (CLAE-UV).....	72
5.6. Extração dos Alcaloides Purínicos ou Metilxantinas	72
5.6.1. Análise das Extrações das Metilxantinas por Espectrometria de Massas	74
5.6.2. Fragmentação dos Íons <i>m/z</i> 195, <i>m/z</i> 181 e <i>m/z</i> 225.....	79
5.6.3. Avaliação dos Extratos das Metilxantinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta (CLAE-UV).....	82
5.6.4. Identificação da molécula da teacrina por Ressonância Magnética Nuclear	90

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
8. ANEXO.....	107

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que apresenta elevada biodiversidade vegetal, devido principalmente à sua localização geográfica que permite uma variedade de biomas, (Fig. 1) como a floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, a Caatinga, o Pampa e o Pantanal (<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>).



Figura 1. Distribuição dos biomas brasileiros.

Fonte: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169

A existência de uma ampla diversidade vegetal proporciona ao Brasil a forte presença da fruticultura, que nas últimas décadas têm se tornado a base econômica de muitos estados brasileiros. O consumo de frutas tem adquirido uma posição de destaque na alimentação diária do brasileiro, sejam elas processadas ou para o consumo “*in natura*”. Assim, com uma grande variedade de frutas tropicais e a necessidade de uma alimentação saudável, tem crescido principalmente a produção de laranja, banana, abacaxi, melancia e coco-da-baía, contribuindo significativamente

para o desenvolvimento econômico do país, tanto a nível nacional quanto internacional (IBRAF, 2006).

A Amazônia, o maior bioma brasileiro, é caracterizada pela presença de inúmeras espécies frutíferas como o açaí (*Euterpe precatoria*), o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), o bacuri (*Platonia insignis*), o taperebá (*Spondias lutea*) e o camucamu (*Myrciaria dubia*), que são os principais responsáveis pelo desenvolvimento e expansão da fruticultura na região, sendo considerada a quarta principal atividade econômica (GEDER, 2008).

Muitas dessas espécies vegetais destacam-se por sua composição química, na maioria das vezes diferenciada e diversificada. O açaí (*Euterpe precatoria*), por exemplo, é rico em polifenóis e em compostos antioxidantes (KANG *et al.*, 2012). O taperebá (*Spondias lutea*) tem como principais compostos voláteis (*E*)-cariofileno, (*Z*)-cariofileno, limoneno e alguns ésteres como hexanoato de etila e butirato de etila, que são os responsáveis pelo aroma agradável desse fruto (CEVA-ANTUNES *et al.*, 2003). Outros frutos característico da região que não foram citados, como o buriti (*Mauritia vinifera*), possuem elevado teor de carotenoides e vitamina A (ROSSO & MERCADANTE, 2007).

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), um dos frutos nativos da região amazônica, tem se destacado nas últimas décadas nos mercados nacional e internacional de frutos exóticos tropicais (VENTURIERI *et al.*, 1985). O fruto é o maior no gênero *Theobroma*, chegando a pesar 4 quilogramas. É composto por aproximadamente 20% de sementes, 45% de cascas e 35% correspondem à polpa, que é a principal responsável pela movimentação econômica dessa espécie, através da produção de sucos, néctares, licores e sorvetes, entre outros (NAZARÉ *et al.*, 1990).

Das sementes, é extraída a manteiga do cupuaçu, utilizada para obtenção do “cupulate”, chocolate em pó e em tabletes, com características nutritivas e organolépticas similares às do chocolate produzido a partir das sementes de cacau (*Theobroma cacao*) (VENTURIERI & AGUIAR, 1988; NAZARÉ *et al.*, 1990).

Com a crescente demanda de frutos tropicais, processados ou não, ocorre paralelamente o aumento da quantidade de resíduos agroindustriais formados. Assim, o acúmulo de resíduos agroindustriais tem despertado a atenção de muitos pesquisadores e principalmente dos microempresários, com o propósito de aproveitar integralmente os frutos produzidos, sendo, desta maneira, economicamente viável às empresas e extremamente favorável ao meio ambiente.

Apesar da produção do cupulate ter aproveitamento de aproximadamente 80% da massa das sementes (NAZARÉ *et al.*, 1990), os resíduos agroindustriais provenientes das sementes somados às cascas dos frutos, apresentam um elevado volume de lixo orgânico que, quando disposto inadequadamente, pode gerar graves problemas ambientais.

As substâncias fenólicas já descritas nas sementes do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (YANG *et al.*, 2003), além de alcaloides descritos neste gênero e a ausência de estudos de identificação e caracterização química dos constituintes das cascas dos frutos motivaram a realização de estudos de aproveitamento destes resíduos, tanto no epicarpo quanto no endocarpo. Assim, com a utilização de técnicas analíticas associadas ao conhecimento fitoquímico, esse trabalho teve como foco principal a “caracterização química” dos constituintes do epicarpo e endocarpo de *Theobroma grandiflorum* e a realização de bioensaios de atividades antioxidante com o objetivo de agregar valores aos extratos originados desses resíduos da indústria extrativista de cupuaçu.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Descrever a composição química e atividades antioxidantes dos extratos (fenólicos e alcaloídicos) do epicarpo e endocarpo de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu).

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Investigar diferentes metodologias para extração das substâncias fenólicas e alcaloídicas.

2.2.2. Avaliar o sequestro do radical livre DPPH[•], do cátion radical ABTS^{•+} e do anion radical superóxido dos extratos brutos.

2.2.3. Identificar os alcaloides e flavonoides presentes nos extratos e nas frações obtidas utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodiversidade

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo e tal exuberância corresponde aproximadamente a 20% das espécies existentes no planeta. Devido ao elevado potencial da biodiversidade brasileira, principalmente ao que diz respeito à diversidade vegetal, o interesse em investigar as propriedades medicinais de muitas espécies vem crescendo acentuadamente (CALIXTO & SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

A produção de medicamentos a partir de recursos genéticos vegetais tem aumentado nas últimas décadas. Estima-se que 30% dos medicamentos disponíveis na medicina terapêutica são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais (KOEHN & CARTER, 2005). Dessa forma, a produção de fitoterápicos e fitofármacos têm despertado inequivocadamente o interesse de inúmeros pesquisadores, não somente ao químico de produtos naturais, mas também profissionais de diferentes áreas, uma vez que a geração de tais produtos requer um conhecimento multidisciplinar (PINTO *et al.*, 2002).

Alho (2012) enfatiza a relevância da biodiversidade brasileira na fabricação de medicamentos e na produtividade agropecuária; destaca a importância da etnomedicina, que é a principal base para os estudos de plantas medicinais, da biopirataria e o grande impacto causado pela população humana sobre a natureza. A biopirataria é um tema bastante polêmico, à medida que envolve o comércio e a utilização ilegais de plantas e animais, como é o caso do jaborandí (*Pilocarpus pennatifolius*), do açaí (*Euterpe oleracea*), do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e da copaíba (*Copaifera* sp.), que são espécies amazônicas que foram patenteadas por outros países.

BRAZ FILHO (2010) descreve a importância do químico de produtos naturais diante da enorme biodiversidade vegetal brasileira. A riqueza de florestas tropicais no Brasil favorece a descoberta de uma grande variedade de substâncias químicas, que muitas vezes são caracterizadas por apresentarem atividades biológicas, contribuindo significativamente para o surgimento de novos fitofármacos.

Dos componentes da biodiversidade, sejam eles, microorganismos, animais ou vegetais, é possível gerar inúmeros produtos de importância econômica (GUERRA & NODARI, 2007). Braz-Filho (2010) destaca a existência de uma série de metabólitos especiais que são utilizados como princípios ativos de muitos fitofármacos, como a quinina (III) e a artemisinina (II), que são dois antimaláricos naturais; e vincristina (Ia) e vimblastina (Ib), isoladas de *Catharantus roseus*, dois importantes agentes terapêuticos de uso clínico corrente contra o câncer (Fig. 2).

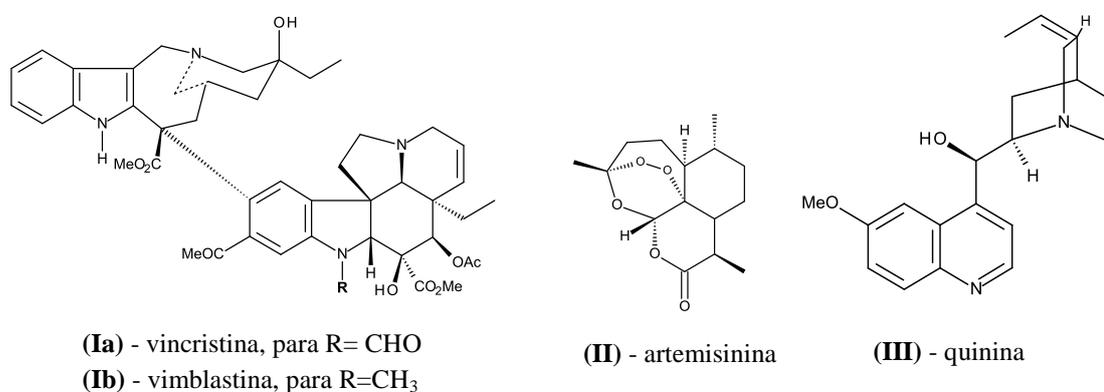


Figura 2. Metabólitos especiais com atividades biológicas.

Portanto, diante da elevada diversidade vegetal brasileira e da necessidade da descoberta de novos fitofármacos, o químico de produtos naturais desempenha um papel fundamental nos processos de extração, isolamento e elucidação estrutural de inúmeras substâncias com potenciais biológicos (BRAZ-FILHO, 2010).

3.2. Metabolismo Especial das plantas

O metabolismo compreende um conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente em uma célula. Nas células vegetais essas reações podem estar relacionadas com o aproveitamento de nutrientes visando às necessidades básicas da célula como a produção de energia e a biossíntese de substâncias essenciais à sobrevivência celular como os carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos caracterizando o metabolismo primário dos vegetais (SANTOS, 2007).

No entanto, os vegetais mais desenvolvidos são capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias que não estão relacionadas com as necessidades básicas da célula, das quais muitas apresentam produção e acúmulo restrito a um número limitado de organismos com bioquímica e metabolismo específico e único caracterizando o metabolismo especializado dos vegetais (SANTOS, 2007).

Embora muitos metabólitos primários sejam de interesse comercial, o elevado número e a grande diversidade de substâncias farmacologicamente ativas provenientes do metabolismo especializado das plantas têm despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores de diferentes áreas da ciência, como fontes promissoras de novas moléculas potencialmente úteis à sociedade (BARREIROS *et al.*, 2006).

3.3. Substâncias fenólicas e atividade antioxidante

As substâncias fenólicas representam uma classe numerosa e diversificada de compostos orgânicos amplamente distribuídas no reino vegetal e nos micro-organismos, caracterizadas pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado ao anel aromático. Os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático característico dos compostos fenólicos e, portanto, as pequenas quantidades de substâncias fenólicas

necessárias ao organismo dos animais são provenientes da dieta alimentar (CARVALHO *et al.*, 2007).

CARVALHO *et al.* (2007) classificam os compostos fenólicos de acordo com seu esqueleto principal (Tabela 1) ou segundo sua ocorrência no reino vegetal.

Esqueleto básico	Classe de substâncias fenólicas
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6 - C1	ácidos fenólicos
C6 - C3 - C6	flavonoides e isoflavonóides
(C6 - C3) 2	lignanas
(C6 - C3 - C6) 2	biflavonóides
(C6 - C3 - C6) n	taninos condensados

Tabela 1. Esqueleto básico de alguns compostos fenólicos.

Fonte: CARVALHO *et al.*, 2007.

De acordo com sua ocorrência no reino vegetal, os fenóis podem classificar-se em compostos fenólicos com distribuição restrita e aqueles que são amplamente distribuídos. Dentre os fenólicos de distribuição restrita (Fig. 3) podemos citar o fenol simples (IV), o pirocatecol (V), o resorcinol (VI) e a hidroquinona (VII) (SOARES, 2002).

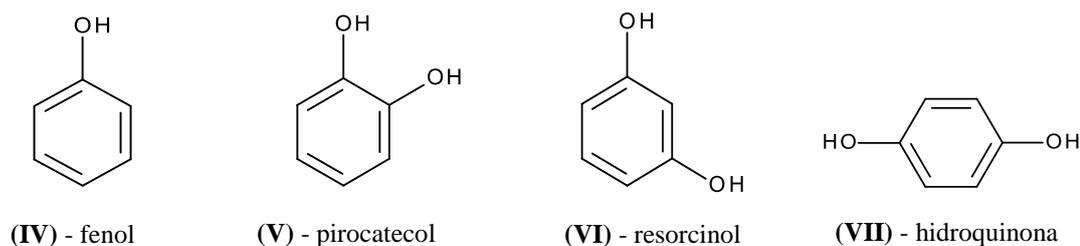
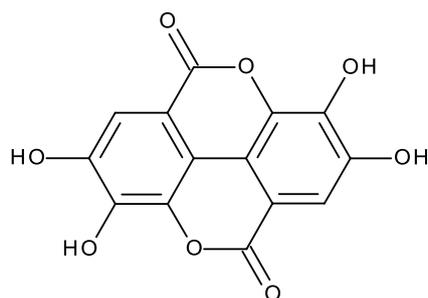


Figura 3. Fenólicos de distribuição restrita.

Entre os compostos amplamente distribuídos na natureza pode-se encontrar os derivados de ácidos benzoico como o ácido elágico (Estrutura VIII) e do ácido cinâmico, cumarinas, flavonoides e derivados de polimerização (SOARES, 2002).



(VIII) - ácido elágico

Muitas classes de compostos fenólicos têm atraído a atenção devido aos seus efeitos benéficos à saúde, relacionados ao potencial antioxidante que apresentam sobre os radicais livres (SOTO-VACA *et al.*, 2012). Os radicais livres são espécies químicas altamente reativas, que possuem elétrons desemparelhados localizados no átomo de oxigênio ou de nitrogênio. São formados no próprio organismo por processos naturais relacionados ao metabolismo, ou podem ser formados por alguma disfunção biológica ou ainda por fatores exógenos. Desenvolvem funções importantes relacionadas com a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS *et al.*, 2006).

Dos diversos radicais livres formados no organismo, o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é o que mais causa danos, uma vez que sua meia vida é muito curta, dificultando seu sequestro *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturação. O excesso de radicais livres é combatido por substâncias antioxidantes produzidas naturalmente no organismo. Entretanto, muitas vezes ocorre um desequilíbrio entre a produção de moléculas oxidantes e antioxidantes, havendo necessidade da ingestão de substâncias antioxidantes através da dieta alimentar. O α -tocoferol (IX) e β -caroteno (X) são alguns dos antioxidantes adquiridos por meio da dieta alimentar (Fig. 4) (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

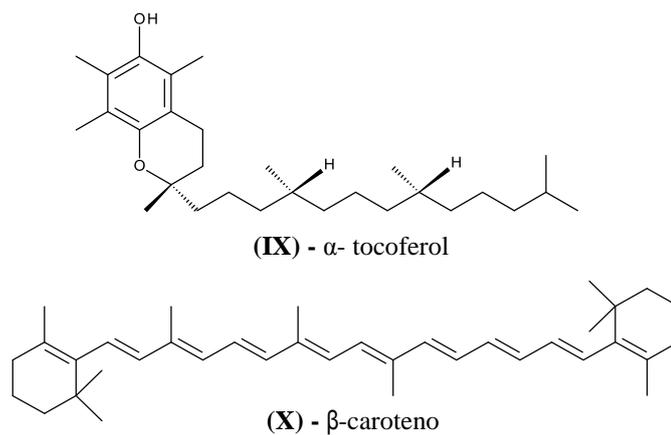


Figura 4. Antioxidantes adquiridos pela dieta alimentar.

3.3.1. Flavonoides

Os flavonoides representam uma classe numerosa e diversificada de compostos fenólicos no reino vegetal. São caracterizados pela presença de um esqueleto básico com quinze átomos de carbono, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos (Fig. 5). Apresentam diversas funções nas plantas, tais como a proteção dos vegetais contra a incidência das radiações ultravioleta e visível; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; antioxidantes, entre outras funções (ZUANAZZI & MONTANA, 2007).

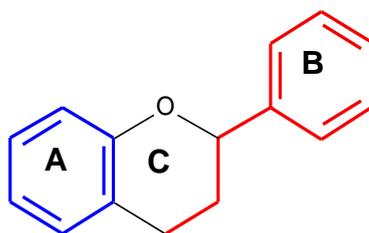


Figura 5. Núcleo fundamental dos flavonoides.

Os flavonoides são de elevado interesse econômico, por apresentarem diferentes propriedades. Devido à coloração intensa são utilizados como pigmentos;

são importantes no processo de tanagem de couro, na fermentação do chá da Índia, na manufatura do cacau e por conferirem cor e valor nutricional para muitos alimentos, além de muitos flavonoides apresentarem grande importância farmacológica (PIETTA, 2000; ZUANAZZI & MONTANA, 2007).

Nas últimas décadas, os flavonoides têm atraído bastante atenção, principalmente devido às suas atividades antioxidantes e seus potenciais terapêuticos (PIETTA, 2000). Pesquisas indicam que flavonoides como quercetina, rutina e apigenina contribuem para prevenção e redução de doenças cerebrovasculares, doenças arteriais coronárias, diabetes, e do câncer (DORNAS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010), além da elevada atividade antiinflamatória atribuída à quercetina e ao caempferol (COUTINHO *et al.*, 2009).

Os flavonoides são metabólitos especiais biossintetizados por uma rota mista. Parte da estrutura dessas moléculas é biossintetizada pela rota do ácido chiquímico, sendo o responsável pela formação do anel B dos flavonoides (C₆C₃) e a outra parte da molécula é derivada da via do acetato, sendo a responsável pela formação do anel A. A rota do ácido chiquímico dá origem ao ácido cinâmico e seus derivados (ácidos caféico, ferúlico e etc.) e a rota do acetato dar origem aos policetídeos, que por reação de condensação com o ácido cinâmico ou com qualquer um de seus derivados dão origem a chalconas precursoras das diferentes classes de flavonoides. Na figura 6 é apresentado um esquema geral da biossíntese dos flavonoides.

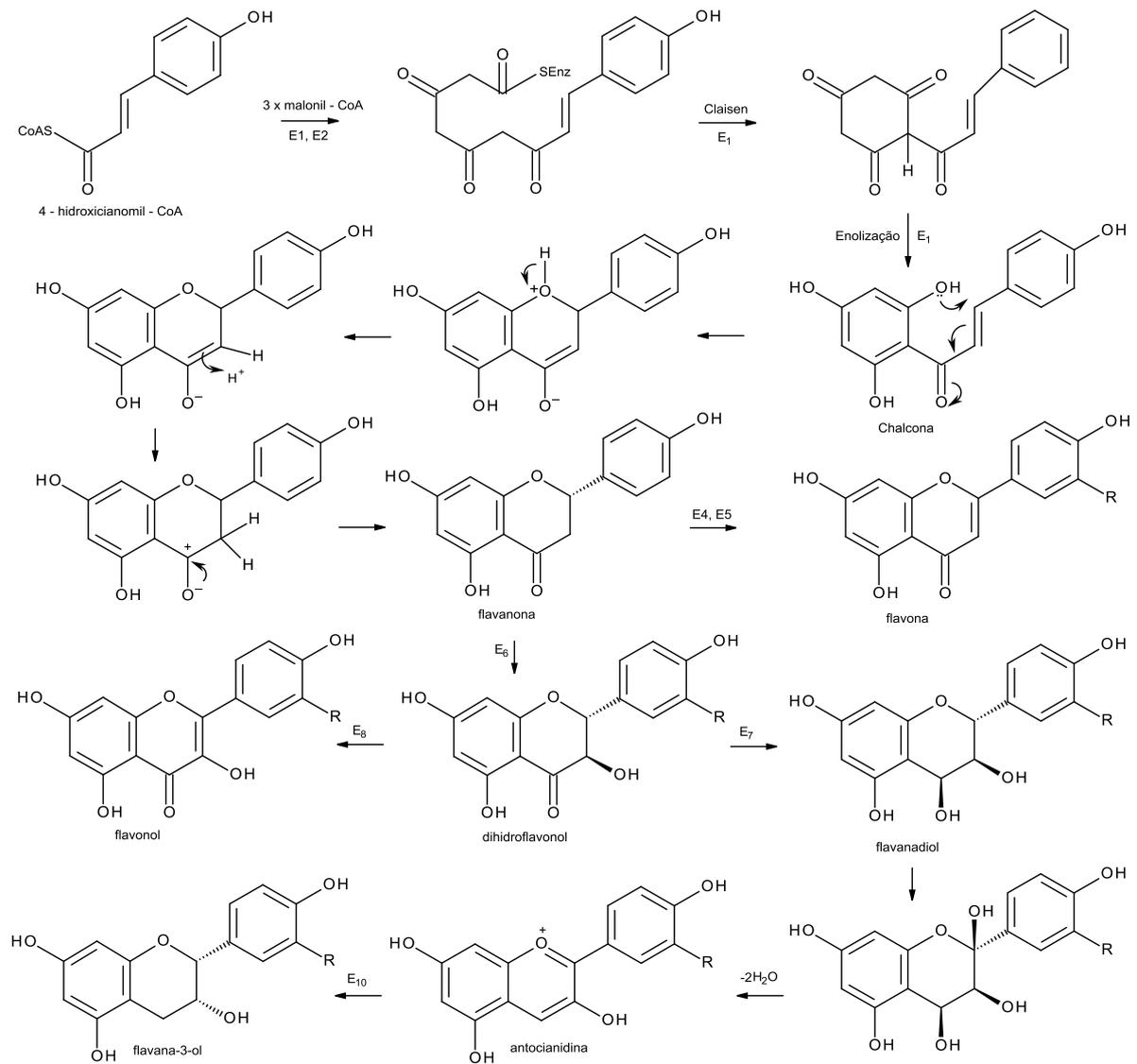


Figura 6. Representação geral da biossíntese dos flavonoides.

Fonte: Dewick, 2009.

3.4. Alcaloides

Os alcaloides constituem uma classe de metabólitos especiais representada por um número muito grande de substâncias estruturalmente diversas e, portanto difícil de ser definida quimicamente (SANTOS, 2007). São compostos orgânicos de baixo peso molecular, caracterizados pela presença de um ou mais átomos de nitrogênio ao qual lhes conferem o caráter básico. O átomo de nitrogênio presente nos alcaloides é originado dos aminoácidos e o anel heterocíclico formado fornece base para sua classificação química (HENRIQUES *et al.*, 2007).

A fonte mais reconhecida de alcaloides são os vegetais superiores, microorganismos e animais marinhos, podendo ser encontrados em todas as partes do vegetal em diferentes concentrações. São sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se nos vacúolos, portanto, não aparecem em células jovens antes de ocorrer à formação dessas estruturas (HENRIQUES *et al.*, 2007).

Como os demais metabólitos especiais, os alcaloides apresentam funções de defesa nas plantas e são de grande interesse farmacológico. Muitos alcaloides de origem vegetal têm sido utilizados como modelo para modernas drogas sintéticas, como a atropina, que é modelo para a tropicamida, fármaco utilizado para dilatação das pupilas durante exames oftalmológicos; a quinina, que é um alcaloide com propriedades antitérmicas, antimalárica e analgésica, utilizada como modelo para a cloroquinina (CROTEAU *et al.*, 2000).

Os alcaloides purínicos ou metilxantinas são usualmente representados pela cafeína (XI), teobromina (XII) e pela teofilina (XIII) (Fig. 7). Possuem distribuição limitada, suas origens estão relacionadas com as bases purínicas: adenina e guanina, possuem caráter anfótero e são considerados pseudoalcaloides (DEWICK, 2009). Entretanto, devido à sua marcante atividade biológica, distribuição restrita e à presença

do nitrogênio no heterociclo, muitos autores os consideram como alcaloides verdadeiros (RATES, 2007).

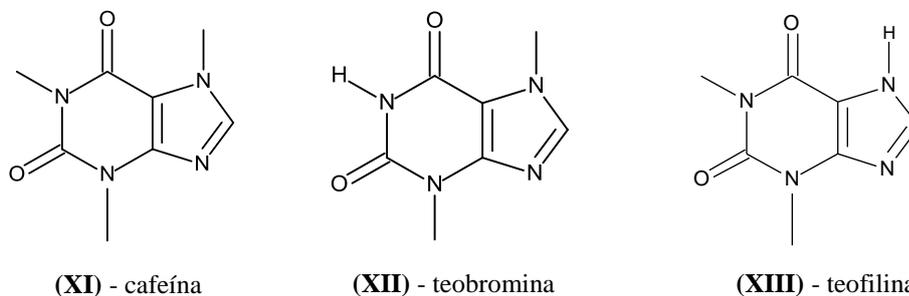


Figura 7. Alcaloides purínicos.

As metilxantinas são de importância comercial e apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas, atuando sobre os sistemas nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo. A cafeína é o alcaloide purínico mais consumido mundialmente, sob diferentes formas; é utilizada na forma de bebidas, chás, refrigerantes, atuando como estimulante natural; participam na composição de diversos fármacos com atividades analgésicas e antigripais, associada com o ácido acetilsalicílico e o paracetamol (RATES, 2007). A teofilina também é muito utilizada, sob a forma de fármaco, devido às suas propriedades relaxante muscular, utilizada no alívio de asma brônquica. Já a teobromina é um importante componente do cacau (DEWICK, 2009).

Os alcaloides purínicos são formados pela via da inosina monofosfato (IMP) e da xantosina monofosfato (XMP) (Fig. 8). Metilação seguida da perda do grupo fosfato produz o nucleotídeo 7-metilxantosina, liberando a molécula de açúcar. Sucessivas metilações levam a formação da cafeína por intermédio da teobromina, enquanto uma sequencia de metilações pela via da XMP levam a formação da teofilina (DEWICK, 2009).

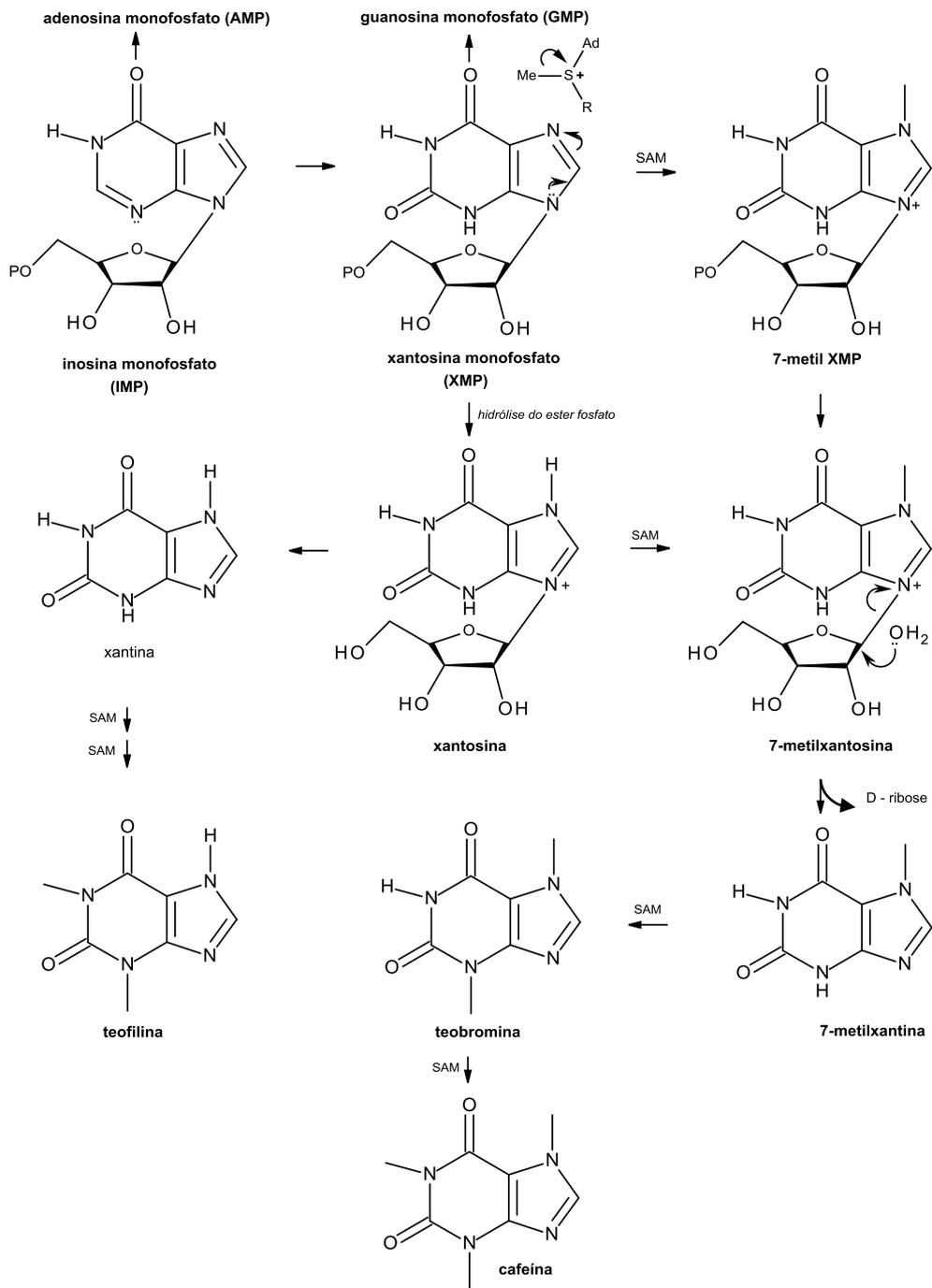


Figura 8. Representação geral da biossíntese dos alcaloides purínicos
Fonte: Dewick, 2009.

3.5. O gênero *Theobroma*

Sterculiaceae é uma família difundida nas regiões tropicais principalmente na América e na África, sendo constituída por 68 gêneros e 430 espécies. É uma família economicamente importante devido à existência de três espécies cultivadas em países tropicais como a *Cola acuminata* cujas sementes são utilizadas para a produção de uma bebida homonina utilizada como base para refrigerantes; o cacau que é uma cultura cultivada no Brasil, onde é o quinto maior produtor mundial, cujas sementes são utilizadas para a produção de chocolate e o cupuaçu que é um fruto consumido mundialmente. O gênero é composto por 22 espécies, todas apresentam frutos de valor comercial, porém somente algumas espécies são cultivadas para estes fins, das quais destacam-se *T. cacao* (cacau) e *T. grandiflorum* (cupuaçu) (SOUZA & LORENZI, 2005).

O cacau é a espécie vegetal de maior interesse comercial no gênero (WOLLGAST & ANKLAN, 2000). Sua polpa é utilizada para fabricação de geleias, vinhos, licores, vinagres, entre outros. Suas sementes são a principal fonte econômica, pois a partir delas são obtidos a torta, o pó e a manteiga de cacau. A torta e o pó são utilizados para a produção de chocolates e seus derivados e a manteiga do cacau é utilizada pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

As sementes do cacau apresentam elevados teores de gordura (SOTELO & ALVAREZ, 1991). A fração lipídica das sementes é predominantemente composta pelos ácidos palmítico, esteárico, e oleico, (BRUNI *et al.*, 2000). Suas sementes são fontes de polifenóis com potenciais antioxidantes (FORSYTH, 1955; SANBONGI *et al.*, 1998; SÁNCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2003; OTHMAN *et al.*, 2007).

Além dos compostos fenólicos, *Theobroma cacao* é caracterizado pela presença de alcaloides purínicos, principalmente a teobromina, seguida da cafeína e teofilina. Esses compostos encontram-se distribuídos em toda a planta, tanto nas folhas, quanto nas flores, com predominância nas sementes (SOTELO & ALVAREZ, 1991).

Nas últimas décadas, diversas pesquisas têm sido realizadas em outras espécies de *Theobroma*, a fim de encontrar aplicações econômicas similares às do *Theobroma cacao* (SOTELO & ALVAREZ, 1991). Depois do cacau, o cupuaçu é a espécie vegetal de maior interesse econômico no gênero.

3.6. *Theobroma grandiflorum*

Theobroma grandiflorum, popularmente conhecido como cupuaçu é uma espécie frutífera nativa da Amazônia. A árvore do cupuaçu é de médio porte, em suas condições naturais atinge até 20 metros de altura; suas folhas são longas e largas com 25 a 30 cm de comprimento e 10 a 15 cm de largura; as folhas quando jovens são de cor rósea e quando maduras são de coloração verde-escura e suas flores são grandes e vermelhas (GONDIN *et al.*, 2001).

O fruto de *Theobroma grandiflorum* (Fig. 9) é o maior do gênero, possui casca dura, de coloração marrom escuro, podendo apresentar-se em diferentes formatos: redondo, elíptico, obovado, oblongo e ovado (MATOS, 2007). Dependendo de seu formato, o comprimento e diâmetro do fruto podem variar respectivamente de 12 a 25 cm e de 10 a 12 cm, assim como seu peso, variando de 500 a 4.500 g, bem como o rendimento de sua polpa e de suas sementes (GONDIN *et al.*, 2001).



Figura 9. Frutos de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu).

Segundo MATOS (2007), não há diferenças em relação às características físico-químicas do fruto de diferentes formatos. Entretanto destaca-se o cupuaçu obovado, com maior rendimento de polpa (39,81%), e o cupuaçu elíptico, com maior rendimento de sementes (26,46%).

O cupuaçu é uma das frutas mais populares do Amazonas. Assim como o cacau, o mesocarpo (polpa) é utilizado na culinária brasileira no preparo de sucos, sorvetes, licores, bolos, balas, bombons entre outros, contribuindo para o desenvolvimento econômico da região (RIZZINI & MORS, 1995). O epicarpo do cupuaçu tem sido utilizado para elaboração de pães, uma vez que, são fontes potenciais de fibra alimentar (79,8%), não gerando alterações nas características químicas, físicas ou reológicas dos pães (SALGADO *et al.*, 2011).

Das sementes do cupuaçu é produzido o cupulate, produto com características similares ao chocolate, não havendo diferenças significativas em suas características físico-químicas (cor, odor, sabor, textura e consistência) com uma boa relação custo benefício (NAZARÉ *et al.*, 1990). Ademais, de suas sementes é extraída a matéria prima para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos, umas principais fontes que contribuem para o desenvolvimento do cupuaçu como uma matéria-prima emergente.

A polpa do cupuaçu apresenta-se com caráter ácido (pH 3,4). O teor de proteínas, lipídios, cinzas, fibras e matéria seca são, respectivamente 8,8%, 12,7%,

5,3%, 14,3% e 12,1%. Possui composição rica em aminoácidos e ácidos graxos, destacando-se os ácidos palmítico, oleico e α -linoléico, além da presença de elementos importantes à saúde como potássio (34,3 mg/g), fósforo (15,7 mg/g), magnésio (13,1 mg/g), cálcio (5,5 mg/g), sódio (2,5 mg/g), e outros elementos em concentrações inferiores à 0,1 mg/g, como ferro, zinco, cobre e manganês (ROGEZ *et al.*, 2004).

Segundo FRANCO & SHIBAMOTO (2000), o aroma peculiar, agradável e exótico da polpa do cupuaçu é atribuído à presença de diversos compostos voláteis, principalmente por ésteres, com predominância de 42% de butanoato de etila e 22% de hexanoato de etila, confirmando os trabalhos realizados por ALVES & JENNINGS (1979), cujos componentes majoritários na polpa do cupuaçu foram os dois compostos citados acima. Além desses compostos, FRANCO & SHIBAMOTO (2000) observaram a presença de outros ésteres em proporções menores, e 12% correspondente à presença de ácido hexadecanóico.

QUIJANO & PINO (2007) descreveram uma quantidade maior de compostos voláteis utilizando extração líquido-líquido. Éteres, terpenos, alcoóis, ácidos e lactonas, com predominância de hexanoato de etila, linalol e butanoato de etila foram detectados utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa com detector de massas (CG-EM).

A polpa do fruto do cupuaçu apresenta pequeno potencial antioxidante (GONÇALVES *et al.*, 2010). O maior potencial é atribuído à suas sementes (CONTRERAS-CALDERON *et al.*, 2011) que são fontes de compostos fenólicos (Fig. 10), tais como a (+) – catequina (XIV), (-) – epicatequina (XV), quercetina (XVI), caempferol (XVII), quercetina 3-O- β -D-glucuronideo 6''-metil éster (XVIII), isoescutelarina 8-O- β -D-glucuronideo 6''-metil-éster (XIX), isoescutelarina 8-O- β -D-glucoronídeo (XX), hipolaetina 8-O- β -glucoronídeo (XXI), quercetina 3-O- β -D-

glucoronídeo (XXII), e dois novos flavonoides sulfactados glicosilados: teograndina I (XXIII) e teograndina II (XXIV) (YANG *et al.*, 2003).

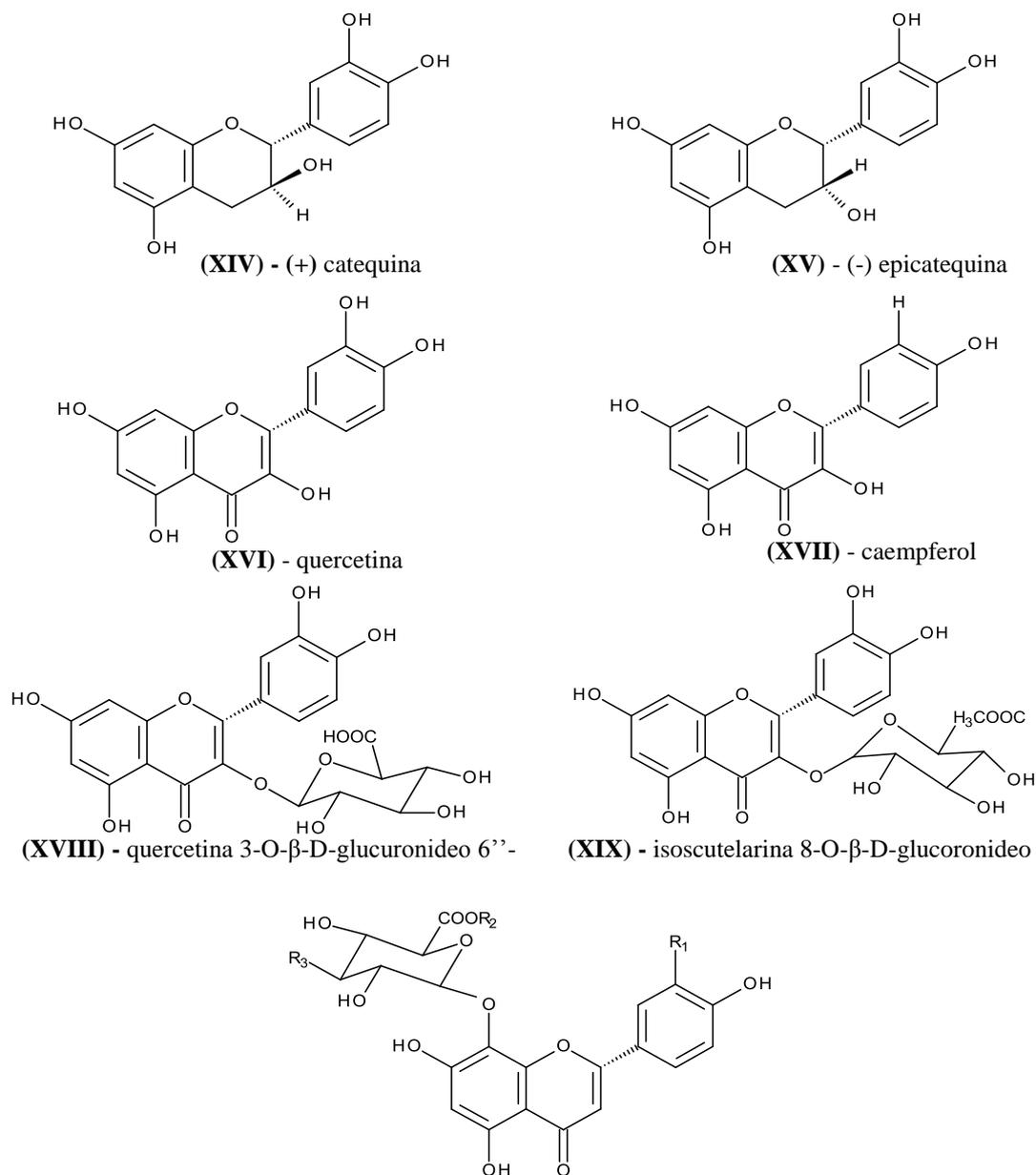


Figura 10. Compostos fenólicos encontrados nas sementes de *Theobroma grandiflorum*.

Assim, *Theobroma grandiflorum* evidencia-se como uma importante espécie na região amazônica devido aos seus diversos usos e aplicações, nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos. Ao longo do processo de domesticação do cupuaçu, algumas aplicações têm sido atribuídas aos resíduos provenientes do processo de industrialização, entretanto, muitos são os resíduos industriais gerados, sem aplicação útil à sociedade.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material vegetal

Os frutos do cupuaçu foram adquiridos comercialmente em abril de 2012, no entanto, todos os frutos foram originados da mesma propriedade, localizada em Manaus, no Estado do Amazonas (Brasil). Após a aquisição, os frutos foram devidamente higienizados em água corrente e separados os resíduos de suas respectivas polpas. Posteriormente, os resíduos foram reservados, limpos, secos em estufa com circulação de ar a 45 °C, e triturados em moinho de quatro facas.

4.2. Métodos utilizados para obtenção dos extratos.

Todos os métodos de extração foram realizados para o epicarpo (EPC) e para o endocarpo (EDC) de *Theobroma grandiflorum* utilizando aproximadamente 50 g do material vegetal. Tanto os extratos do epicarpo (EEPC) quanto os extratos do endocarpo do cupuaçu (EEDC) foram obtidos utilizando três métodos de extração: sonicação (SON), soxhlet (SOX) e maceração (quente (MQ) e a frio (MF)). Para cada método houve variação na composição dos solventes em etanol e etanol/água (7:3). Todos os extratos foram preparados em triplicata pra garantir a reprodutibilidade do experimento e seleção do melhor método de obtenção. Na figura 11 são apresentados os procedimentos realizados para a obtenção dos extratos brutos do EPC e EDC do cupuaçu. Nas sessões seguintes são descritos os procedimentos realizados com mais detalhes para melhor compreensão do trabalho.

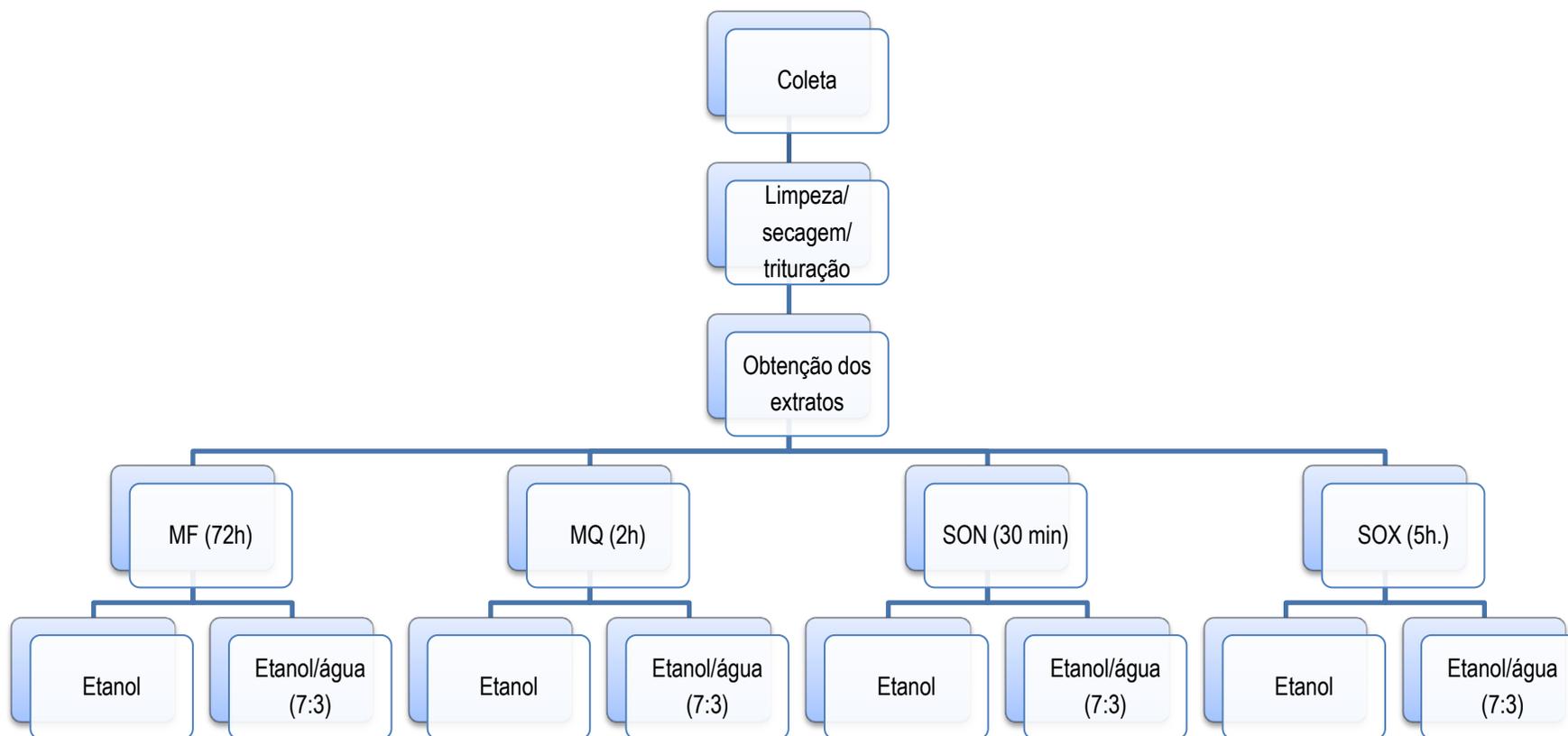


Figura 11. Procedimentos realizados para a obtenção dos extratos brutos para posterior caracterização das substâncias fenólicas

4.2.1. Extração por sonicação (SON)

Em um erlenmeyer de 1 litro adicionou-se o material vegetal, seguido da adição de 500 mL de etanol e extraiu-se em ultrassom por 30 minutos. Após a extração do material vegetal, prosseguiu-se o experimento com uma filtração simples e posterior eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após a eliminação do solvente o extrato permaneceu na capela para eliminar qualquer possibilidade de resquícios do solvente, após isto foi armazenado em dessecador por alguns dias para remover a água proveniente do etanol durante o processo de extração e posteriormente pesado para o cálculo do rendimento. Para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos por sonicação, os procedimentos realizados foram os mesmos descritos acima, apenas com variação na composição do solvente de extração, onde se utilizou uma mistura de etanol/água (7:3). Todos os extratos hidroalcoólicos de todos os métodos utilizados, após a eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida foram liofilizados para a eliminação total da água presente.

4.2.2. Extração por soxhlet (SOX).

Em um balão com capacidade para 500 mL adicionou-se o material vegetal, seguido da adição de 350 mL de etanol. O processo de extração teve a duração de aproximadamente 5 horas ou, o equivalente a cinco ciclos de extrações. Após a extração, o material vegetal foi submetido a uma filtração simples com posterior eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após a eliminação do solvente o extrato permaneceu na capela para eliminar qualquer possibilidade de resquícios do solvente, após isto foi armazenado em dessecador por alguns dias para remover a água proveniente do etanol durante o processo de extração e posteriormente pesado para o cálculo do rendimento. Para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos por soxhlet, os procedimentos realizados foram os mesmos descritos

acima, apenas com variação na composição do solvente de extração, onde se utilizou uma mistura de etanol/água (7:3).

4.2.3. Extração por maceração

A extração por maceração foi realizada utilizando duas temperaturas distintas: fez-se maceração a quente (MQ) e maceração a frio (MF). A maceração a frio foi realizada a temperatura ambiente, (aproximadamente 25 °C), por um período de 72 horas. Após o tempo de extração o material vegetal foi submetido à filtração simples com posterior eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Depois da eliminação do solvente, o extrato permaneceu na capela para eliminar qualquer possibilidade de resquícios do solvente, após isto foi armazenado em dessecador por alguns dias para remover a água proveniente do etanol durante o processo de extração e posteriormente pesado para o cálculo do rendimento. Para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos por maceração a frio, o procedimento utilizado foi o mesmo descrito acima, apenas com variação na composição do solvente de extração, onde se utilizou uma mistura de etanol/água (7:3).

Para a extração por maceração a quente adicionou-se o material vegetal em um erlenmeyer de 1 litro, seguido da adição de 500 mL de etanol. A maceração a quente foi realizada em banho-maria a uma temperatura de 50 ° C, por um período de 2 horas sob agitação com bastão de vidro. Após o tempo de extração e ao atingir a temperatura ambiente o material vegetal foi submetido à filtração simples e posterior eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após a eliminação do solvente o extrato permaneceu na capela para eliminar qualquer possibilidade de resquícios do solvente, após isto foi armazenado em dessecador por alguns dias para remover a água proveniente do etanol durante o processo de extração e posteriormente pesado para o cálculo do rendimento. Para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos por maceração a

quente, o procedimento realizado foi o mesmo descrito anteriormente, apenas com variação na composição do solvente de extração, onde se utilizou uma mistura de etanol/água (7:3).

4.3. Extração dos flavonoides

Em um béquer, solubilizou-se um grama de extrato bruto (EPC e EDC) obtido pelo método soxhlet (sessão 4.3.2) em 10,0 mL de uma mistura composta por etanol/água (8:2). Após a solubilização total, o extrato aquoso foi submetido a partição com hexano para a remoção de substâncias apolares tais como gorduras, esteróis e pigmentos; em seguida o extrato foi particionado com diclorometano e acetato de etila para a extração dos flavonoides agliconas pouco polares, tais como flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis e outras agliconas com elevado grau de metilação; e, finalmente, o extrato foi particionado com metanol para a extração das agliconas poli-hidroxiladas. Em seguida, todas as fases orgânicas tiveram seus solventes eliminados em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

4.4. Extração das metilxantinas

Todas as metodologias utilizadas para a extração das metilxantinas são compostas por duas etapas: a primeira etapa compreende a extração desta classe de substâncias a partir do material vegetal e a segunda etapa compreende a remoção das metilxantinas presentes no extrato obtido por partição líquido-líquido.

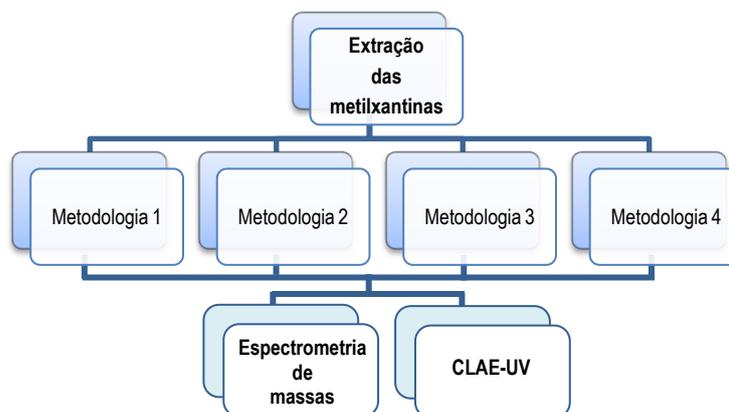


Figura 12. Procedimentos realizados para a extração e caracterização das metilxantinas nos extratos do epicarpo e endocarpo de *T. grandiflorum*.

4.4.1. Metodologia 1 (REGINATTO *et al.*, 1999)

Para a obtenção do extrato das metilxantinas adicionou-se 10 g do material vegetal (EPC e EDC), em um erlenmeyer com capacidade para 500 mL contendo 300 mL de uma solução aquosa de H_2SO_4 (aq) 20% e ferveu-se a mistura em chapa aquecedora por 10 minutos (Fig. 13). Durante o processo de ebulição a solução aquosa do extrato ácido permaneceu a uma temperatura de 94 °C. Após atingir a temperatura ambiente o extrato obtido foi submetido a uma filtração simples e neutralizado pela adição de $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}$ 30%. O processo de neutralização foi realizado com cautela, uma vez que a reação é extremamente exotérmica. Após a neutralização, o extrato aquoso foi particionado com uma mistura de clorofórmio/isopropanol (3:1). Em seguida, a fase orgânica teve seu solvente eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se um extrato rico em metilxantinas.



Figura 13. Extração das metilxantinas de acordo com REGINATTO *et al.*, 1999.

4.4.2. Metodologia 2 (LI *et al.*, 1990)

Para a obtenção do extrato das metilxantinas adicionou-se 1 g do material vegetal (EPC e EDC) em um erlenmeyer acrescido de 96 mL de água destilada e 4 mL de acetato de chumbo. Aqueceu-se essa mistura em chapa aquecedora, sob agitação constante, por um período de 5 minutos a uma temperatura de 80 °C. Após atingir a temperatura ambiente, completou-se o volume correspondente a 100 mL com água destilada e o extrato foi submetido a uma filtração simples. Ao filtrado, adicionou-se carbonato ácido de sódio na proporção de 0,1g de NaHCO₃ para cada 10 mL de solução filtrada e, após a solubilização total do carbonato ácido de sódio, foram realizadas sucessivas filtrações.

Após a obtenção do extrato, uma alíquota de 50,0 mL foi retirada e alcalinizada pela adição de uma solução de hidróxido de sódio 1M (NaOH) até atingir pH 12,5, em seguida o extrato foi particionado várias vezes com clorofórmio (10,0 mL). Após isto, todas as fases orgânicas (CHCl₃) foram reunidas e seu solvente eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida para a obtenção de um extrato rico em cafeína. E, a solução aquosa remanescente foi transferida para um balão volumétrico com capacidade para 100,0 mL completando seu volume com água destilada. Retirou-se uma alíquota de 10,0 mL e transferiu-se para um recipiente e completou-se o volume com água destilada para 50,0 mL. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de uma solução de HCl (aq) 2% e completou-se o volume com água destilada para 100,0 mL e, finalmente a fração aquosa foi liofilizada para a obtenção de um extrato rico em teobromina.

4.4.3. Metodologia 3

Para a obtenção do extrato das metilxantinas adicionou-se 10 g do material vegetal (EPC e EDC) em um erlenmeyer com capacidade para 500 mL, somados a 5 g de carbonato de cálcio e 100 mL de água destilada. Em seguida a mistura foi aquecida por um período de 30 minutos em chapa aquecedora para a obtenção do extrato. Após atingir a temperatura ambiente o extrato foi neutralizado pela adição de uma solução aquosa de HCl_(aq) 2% e, em seguida realizou-se uma filtração a vácuo. Posteriormente a filtração particionou-se o extrato com clorofórmio (10,0 mL) e todas as fases orgânicas (CHCl₃) foram reunidas e seu solvente eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida para a obtenção de um extrato rico em metilxantinas.

4.4.4. Metodologia 4 (GIORDANI *et al.*, 2008 com modificações)

Para a realização dessa extração algumas modificações foram realizadas em função da disponibilidade de alguns reagentes, como a substituição do HCl 10% por HCl 2%, do solvente éter utilizado para remover as substâncias de média e baixa polaridade pelo hexano e pelo DCM e a substituição do n-butanol pelo DCM. Para a extração dos alcaloides 1 g do EEPC obtido pelo método MQ e 1 g do EEDC obtido pelo método SOX foi ressuspense em água e acidificado com uma solução aquosa de HCl_(aq) 2% até atingir o pH~3,0. O extrato aquoso acidificado foi particionado com hexano e posteriormente com diclorometano diversas vezes até a máxima remoção das substâncias de baixa e média polaridades. Após a remoção das respectivas fases orgânicas, a fase aquosa remanescente foi alcalinizada com uma solução aquosa de NH₄OH_(aq) 30% até atingir o pH~10. Em seguida, o extrato foi particionado com diclorometano (10,0 mL) e a fase orgânica (CH₂Cl₂) teve seu solvente eliminado em

evaporador rotatório sob pressão reduzida para a obtenção de um extrato rico em alcaloides (Fig. 14).

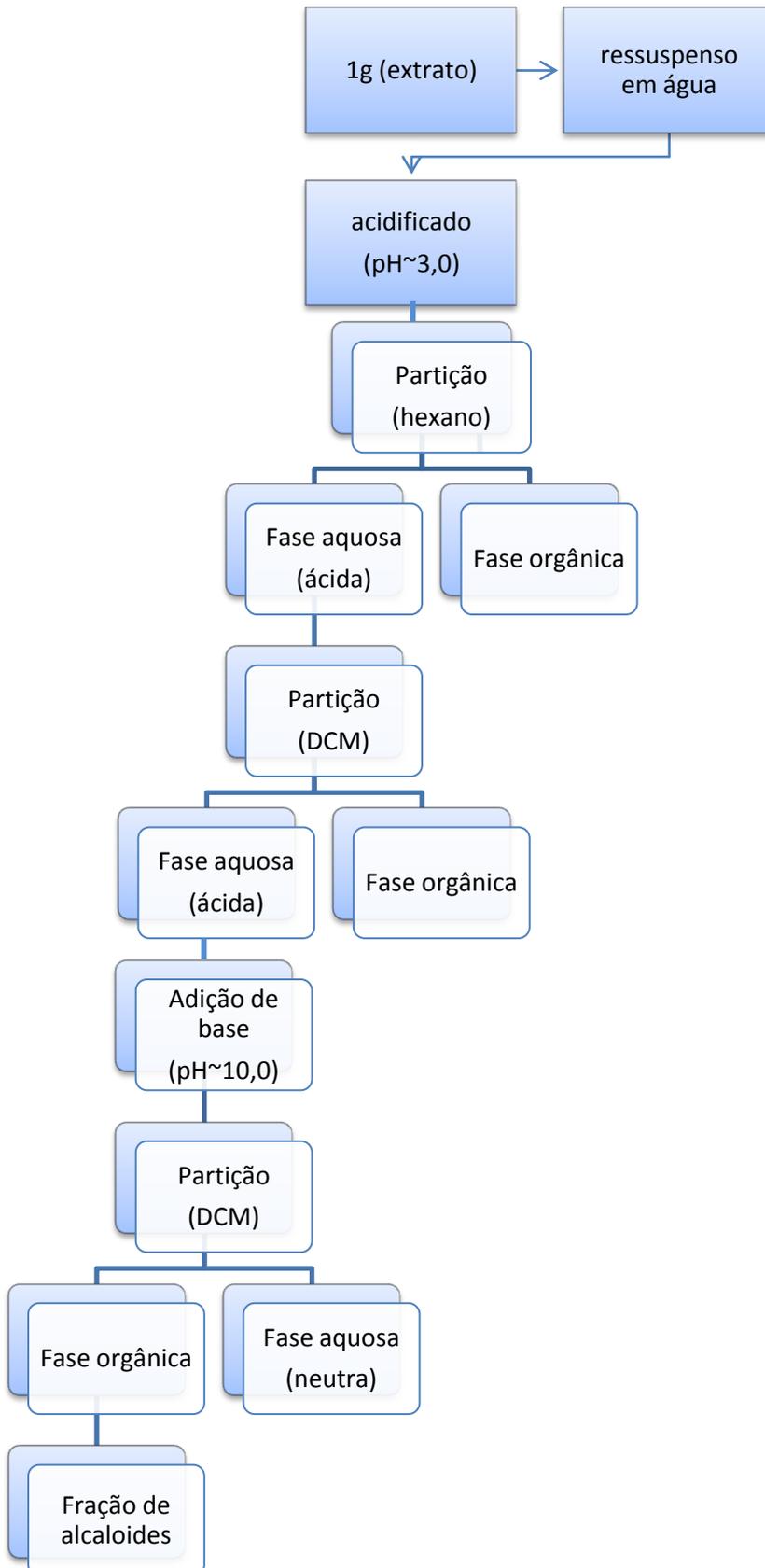


Figura 14. Extração dos alcaloides pelo método descrito por GIORDANI *et al.*, 2008 com modificações.

4.5. Testes químicos / biológicos

Os ensaios colorimétricos de fenóis totais, flavonoides totais e a varredura de radicais livres frente ao radical DPPH•, ao cátion radical ABTS•+ e ao ânion superóxido foram realizados no Laboratório de Atividades Biológicas I (BIOPHAR) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Todos os extratos obtidos foram submetidos aos ensaios colorimétricos descritos acima.

4.5.1. Fenóis Totais

4.5.1.1. Ensaio qualitativo

Aplicou-se um volume de 5 µL de cada extrato e do padrão ácido gálico em placa de cromatografia em camada delgada (CCD) na concentração de 1 mg/mL. Para a revelação das substâncias fenólicas utilizou-se uma solução de cloreto férrico (FeCl₃) em etanol 10%. A mudança de coloração do extrato para azul é um indicativo da presença de substâncias fenólicas (Fig. 15).

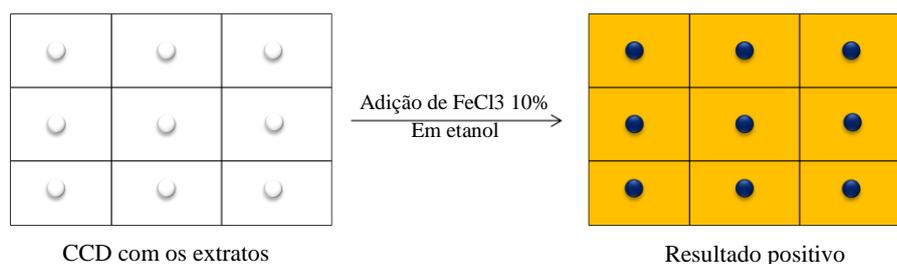


Figura 15. Representação do ensaio qualitativo de Fenóis totais.

4.5.1.2. Ensaio quantitativo

Para a quantificação de fenóis totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965). O ácido gálico foi utilizado como padrão de fenólicos e a atividade expressa em percentuais (%). O reagente de Folin-Ciocalteu

consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, onde o molibdênio encontra-se no estado de oxidação (VI) formando um complexo de coloração amarela; na presença de agentes redutores como substâncias fenólicas forma-se o complexo molibdênio-tungstênio de coloração azul.

Para a realização do ensaio, solubilizou-se 10 mg de cada extrato em 1000 µL de etanol P.A., em seguida retirou-se uma alíquota de 50 µL e diluiu-se em 450 µL de etanol P.A.. Em uma microplaca de 96 poços adicionou-se uma alíquota de 10 µL do extrato diluído na concentração de 1 mg/mL acrescido de 50 µL do reagente de reagente Folin-Ciocalteu 10%. Após 8 minutos sob ausência de luz, adicionou-se 240 µL de uma solução de carbonato de sódio 0,4%. Após 3 minutos em repouso e ao abrigo da luz mediu-se a absorbância em espectrofotômetro de UV/VIS Beckman Coulter DXT 800, em comprimento de onda correspondente a 620 nm.

4.5.2. Flavonoides Totais

4.5.2.1. Ensaio quantitativo

Para a quantificação de flavonoides totais utilizou-se o método colorimétrico do cloreto de alumínio (ZHISHEN *et al.*, 1999) e quercetina como padrão de flavonoide. Solubilizou-se 10 mg de cada extrato em 1000 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Retirou-se uma alíquota de 50 µL e diluiu-se em 450 µL de (DMSO). Em uma microplaca de 96 poços adicionou-se em cada poço uma alíquota de 30 µL do extrato na concentração de 1 mg/mL acrescido de 90 µL de etanol, 6µL de cloreto de alumínio 10%, 6µL de acetato de potássio 1M e 168 µL de água destilada. Após 30 minutos em repouso e ao abrigo da luz mediu-se a absorbância em espectrofotômetro de UV/VIS Beckman Coulter DXT 800 em um comprimento de onda correspondente a 510 nm.

4.5.3. Varredura de radicais livres

A varredura de radicais livres foi realizada utilizando os métodos colorimétricos do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato) e do ânion superóxido.

4.5.3.1. Ensaio qualitativo do radical livre DPPH•

Aplicou-se um volume de 5 µL de cada extrato e do padrão quercetina em placa de CCD na concentração de 1 mg/mL. Para a revelação da atividade antioxidante presente nos extratos utilizou-se uma solução metanólica de DPPH• na concentração de 0,8 mM/mL. O aparecimento de manchas amarelas é indicativo positivo da presença de substâncias com atividade antioxidante em comparação com o padrão quercetina (Fig. 16).

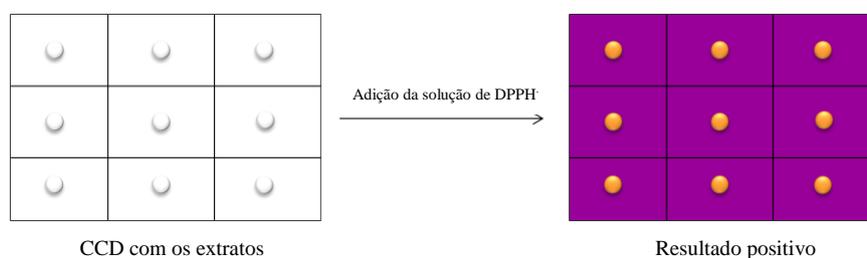


Figura 16. Representação do ensaio qualitativo de DPPH.

4.5.3.2. Ensaio quantitativo do radical livre DPPH•

A atividade antioxidante foi avaliada por meio da capacidade sequestrante do radical DPPH• (MOLYNEUX, 2004). Para a realização deste ensaio utilizou-se a quercetina como padrão antioxidante, e a atividade expressa com valores de concentração eficiente (CE₅₀). Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido

(DMSO) e preparados em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 µg/mL). Em uma microplaca de 96 poços, adicionou-se 30 µL dos extratos e do padrão (em triplicata) em diferentes concentrações e, em seguida, adicionou-se 270 µL da solução de DPPH (0,8 mmol/L) em cada poço. As leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas após 30 minutos da adição da solução de DPPH*, em espectrofotômetro de UV/VIS Beckman Coulter DXT 800 a 517 nm. Através dos valores obtidos das leituras das absorbâncias e por regressão linear foram obtidos os valores de CE₅₀.

4.6.3.3. Ensaio quantitativo do cátion radical ABTS^{•+}

O método foi baseado na capacidade redutora do cátion radical ABTS^{•+} (RE *et al.*, 1999). Para a realização deste ensaio utilizou-se TROLOX[®] como padrão antioxidante, e a atividade expressa em porcentagem. Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e na concentração de 100 µg/mL foram adicionados 30 µL de cada extrato (em triplicata) em uma microplaca de 96 poços. Em seguida adicionou-se 270 µL da solução de ABTS^{•+}. As leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas após 30 minutos da adição da solução padrão em espectrofotômetro de UV/VIS Beckman Coulter DXT 800 a 715 nm.

4.5.3.4. Ensaio quantitativo do ânion radical superóxido

O método foi baseado na capacidade varredora do ânion radical superóxido (OZTURK *et al.*, 2007). Para a realização deste ensaio utilizou-se o ácido gálico como padrão antioxidante, e a atividade expressa em porcentagem. Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e na concentração de 100 µg/mL foram adicionados 50 µL de cada extrato (em triplicata) em uma microplaca de 96 poços. Em

seguida adicionou-se 100 µL da solução de Nitrobluetetrazolium (NBT) a 250 µM somados a 100 µL de NADH (390 µM) e 100 µL de fenazina metilsulfato (PMS) a 10 µM. As leituras das absorvâncias das amostras foram realizadas após 5 minutos da adição todos os reagentes em espectrofotômetro de UV/VIS Beckman Coulter DXT 800 a 560 nm.

4.6. Métodos Espectroscópicos

4.6.1. Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas em espectrômetro de massas LCQ-*Fleet* da Thermo, com detector do tipo Ion-Trap. Os extratos foram devidamente solubilizados em metanol de grau CLAE e diluídos a uma concentração de 5 ppm. As amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas com uma taxa de fluxo de 20 µL/minuto. Para a avaliação do perfil dos compostos fenólicos utilizou-se o modo negativo de ionização $[M+H]^-$ e os espectros foram obtidos em uma faixa de m/z 100 a 800 com a voltagem do spray de 4,9 Kv, temperatura do capilar de 280 °C e voltagem do capilar de 26 V. Para a avaliação do perfil das metilxantinas foram realizados os mesmos procedimentos descritos acima, entretanto, as análises foram realizadas no modo positivo de ionização $[M+H]^+$ em uma faixa de m/z 150 a 230. Para a fragmentação dos íons, as condições utilizadas também foram as mesmas descritas acima, apenas com variação nas energias de colisões para cada íon.

4.6.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN 1H) e carbono (RMN ^{13}C) foram realizados em espectrômetro da Varian modelo INOVA de

11,7 T, do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), operando a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em 600 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno TMS ($\delta = 0,00$) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

4.7. Métodos Cromatográficos

4.7.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV)

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Atividades Biológicas e Farmacêuticas I (BIOPHAR) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em cromatógrafo líquido com detector de Ultravioleta (UV) da SHIMADZU. Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna de fase reversa (C18) da marca VARIAN (250 x 4,6 mm) – modelo Microsorb – MV 100 – 5. As eluições realizadas para identificação das metilxantinas foram realizadas em um tempo de análise correspondente a 30 minutos usando um sistema em gradiente constituído por acetonitrila/ácido fórmico 0,05%, monitorados em um comprimento de onda de 274 nm. Os padrões de teobromina, teofilina e cafeína foram injetados nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Utilizou-se um volume de injeção de 10 μL com uma taxa de fluxo de 0,75 mL/minuto.

4.8. Métodos Estatísticos

Para a otimização do processo de extração utilizou-se como metodologia estatística a Análise de Variância Multivariada (MANOVA) baseada em um delineamento de experimento fatorial com resposta multivariada (JOHNSON & WICHERN, 2007), utilizando uma versão gratuita do software estatístico MINITAB[®]

16.0 (<http://www.minitab.com/pt-BR/products/minitab/free-trial.aspx>). Utilizou-se o fator método de extração nos níveis maceração a frio, maceração a quente, soxhlet e sonicação e o fator solvente nos níveis etanol e etanol/água (7:3). A resposta multivariada é a terna (% de rendimentos, % de fenólicos e % de flavonoides) representada estatisticamente por

$$\mathbf{Y}_{ijk} = (\mathbf{R}_{ijk}, \mathbf{Fe}_{ijk}, \mathbf{Fl}_{ijk})', i = 1, 2, 3 \quad j = 1, 2, 3, 4, \quad k = 1, 2.$$

onde, \mathbf{R}_{ijk} (\mathbf{Fe}_{ijk} , \mathbf{Fl}_{ijk}) é o percentual de rendimento (fenólicos, flavonoides) medido no i -ésimo extrato (do epicarpo ou do endocarpo) usando j -ésimo método de extração e k -ésimo tipo de solvente. A MANOVA é desbalanceada, pois para cada método foram obtidas três medidas do percentual de rendimentos, nove medidas de leituras do percentual de fenólicos e nove de flavonoides.

O modelo estrutural utilizado para o delineamento fatorial é representado por

$$\mathbf{Y}_{ijk} = \boldsymbol{\mu} + \boldsymbol{\tau}_j + \boldsymbol{\beta}_k + \boldsymbol{\gamma}_{jk} + \boldsymbol{\epsilon}_{ijk}$$

em que $\boldsymbol{\mu} = (\mu^R, \mu^{Fe}, \mu^{Fl})$ é o vetor de médias globais, $\boldsymbol{\tau}_j = (\tau_j^R, \tau_j^{Fe}, \tau_j^{Fl})$ mede o efeito do j -ésimo método de extração, $\boldsymbol{\beta}_k = (\beta_k^R, \beta_k^{Fe}, \beta_k^{Fl})$ representa o efeito do k -ésimo tipo de solvente, $\boldsymbol{\gamma}_{jk} = (\gamma_{jk}^R, \gamma_{jk}^{Fe}, \gamma_{jk}^{Fl})$ mede o efeito da interação método-solvente e $\boldsymbol{\epsilon}_{ijk}$ representa o erro aleatório. As comparações de médias entre os níveis dos fatores (método, solvente e método-solvente), quando necessárias foram realizadas através do teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição física dos frutos de *Theobroma grandiflorum*

Os frutos utilizados para caracterização química das substâncias fenólicas e das metilxantinas apresentaram pesos médios de 1,3952 kg. Como pode ser verificado na tabela 2, o maior percentual observado está relacionado com a composição das cascas dos frutos (epicarpo), com valor médio equivalente a 42,16% em relação ao peso integral do fruto, seguido da polpa (mesocarpo) com 39% e das sementes com 14,2%.

Peso dos frutos (Kg)	Epicarpo (%)	Sementes (%)	Mesocarpo (%)
1,3520	42,70	17,10	37,60
1,2700	43,10	13,10	39,40
1,2980	44,10	13,90	37,70
1,5400	39,90	13,40	43,40
Média	42,16	14,20	39,00

Tabela 2. Composição física dos frutos de *T. grandiflorum*.

Fonte: o autor

É possível notar que a quantidade de resíduos gerados em detrimento do processamento do fruto do cupuaçu é relativamente expressiva, visto que o percentual de epicarpo e sementes corresponde a mais que a metade do fruto em relação ao mesocarpo (39%), que é a principal movimentação econômica desta espécie em ascensão. Portanto, é evidente a importância do estudo de caracterização química desses resíduos, a fim de se obter o aproveitamento integral do fruto, beneficiando os produtores, as agroindústrias, os consumidores e, principalmente, o meio ambiente.

5.2. Seleção do Método de Extração

Nas tabelas 3 e 4 são apresentados respectivamente os resultados obtidos para os rendimentos dos extratos e a quantificação de fenólicos e flavonoides totais do EPC e

EDC do cupuaçu utilizados para a realização das análises estatísticas (MANOVA, ANOVA e Tuckey).

	Extratos do Epicarpo do cupuaçu									
	Etanol					Etanol / água (7:3)				
	R (%)	Fe (%)	Fe (% médio)	Fl (%)	Fl (% médio)	R (%)	Fe (%)	Fe (% médio)	Fl (%)	Fl (% médio)
MF	2,80	14,77	12,88	3,84	3,00	10,10	11,22	9,28	3,06	2,66
		9,46		2,21			6,49		2,19	
		14,42		2,96			10,13		2,72	
	2,70	15,69	13,02	3,90	3,13	8,60	13,03	9,83	3,12	2,67
		8,79		2,17			6,50		2,25	
		14,57		3,32			9,95		2,63	
2,60	15,65	12,98	3,31	2,96	9,00	11,79	9,50	3,02	2,70	
	8,54		2,32			6,67		2,29		
	14,74		3,24			10,05		2,80		
MQ	3,10	9,12	11,39	2,39	4,23	11,50	10,58	9,11	2,71	2,7
		14,17		5,04			10,11		2,74	
		10,88		5,27			6,66		2,65	
	3,40	9,53	11,48	2,18	4,07	9,50	10,58	9,32	1,66	1,64
		14,08		4,65			10,95		1,88	
		10,84		5,38			6,43		1,39	
3,20	9,75	11,48	2,30	4,19	9,10	8,79	8,41	2,77	2,73	
	13,63		4,68			10,03		2,94		
	11,06		5,58			6,41		2,48		
SON	4,40	9,83	10,72	2,74	3,52	10,20	5,27	8,87	2,17	1,93
		10,80		2,05			10,43		2,02	
		11,53		5,76			10,29		1,61	
	4,60	10,95	11,48	2,74	3,50	8,30	5,34	9,01	2,04	1,84
		10,76		2,24			11,33		1,91	
		12,72		5,53			10,37		1,56	
4,70	10,59	11,11	2,87	3,76	8,30	5,08	8,19	2,14	2,45	
	10,50		2,30			10,83		3,06		
	12,24		6,10			8,65		2,14		
SOX	4,50	8,36	9,13	3,13	3,06	11,50	8,97	9,02	1,66	1,64
		10,58		2,78			8,95		1,68	
		8,46		3,28			9,13		1,58	
	4,40	7,28	9,23	3,03	2,69	8,60	11,09	10,56	1,61	1,65
		11,98		2,36			10,66		1,71	
		8,43		2,68			9,92		1,62	
3,80	8,42	9,66	2,97	2,73	9,00	10,23	10,84	2,35	1,88	
	11,83		2,35			10,97		1,58		
	8,72		2,86			11,32		1,71		

Tabela 3. Resultados obtidos para o rendimento dos extratos, quantificação de fenólicos e flavonoides totais do epicarpo do cupuaçu.

(R=rendimento; Fe=fenólicos totais; Fl=flavonoides totais; MF=maceração a frio; MQ=maceração a quente; SON=sonicação; SOX=soxhlet).

Extratos do endocarpo do cupuaçu										
	R (%)	Fe (%)	Etanol			Etanol / água (7:3)				
			Fe (% médio)	Fl (%)	Fl (% médio)	R (%)	Fe (%)	Fe (% médio)	Fl (%)	Fl (% médio)
MF	22,70	3,87	3,15	0,11	0,04	22,20	9,52	9,44	0,92	0,92
		2,62		0,00			8,93		0,88	
		2,95		0,00			9,86		0,96	
	20,16	3,68	3,26	0,00	0,00	22,60	7,31	8,05	0,71	0,73
		2,80		0,00			7,95		0,74	
		3,30		0,00			8,89		0,75	
	20,40	3,36	3,08	0,05	0,02	19,60	7,12	8,46	0,60	0,66
		3,24		0,00			8,91		0,67	
		2,65		0,00			9,34		0,72	
MQ	19,00	5,23	5,18	0,00	0,00	24,00	9,46	10,61	0,73	0,60
		5,16		0,00			11,59		0,53	
		5,16		0,00			10,78		0,53	
	19,30	5,76	5,04	0,00	0,00	23,80	9,88	10,18	0,42	0,52
		4,86		0,00			10,39		0,58	
		4,50		0,00			10,26		0,57	
	19,40	5,34	4,84	0,00	0,00	23,80	10,05	10,16	0,43	0,59
		4,83		0,00			10,30		0,61	
		4,36		0,00			10,12		0,74	
SON	15,80	3,67	3,00	0,00	0,00	21,70	7,46	7,55	0,65	0,65
		2,89		0,00			7,61		0,60	
		2,45		0,00			7,57		0,69	
	12,20	3,55	3,32	0,00	0,00	19,90	7,65	7,52	0,68	0,58
		3,08		0,00			7,19		0,56	
		3,34		0,00			7,73		0,51	
	10,90	3,56	3,49	0,00	0,00	20,70	7,61	7,81	0,90	0,97
		2,92		0,00			8,07		1,07	
		3,98		0,00			7,75		0,95	
SOX	20,50	5,19	4,60	0,22	0,24	26,00	12,05	12,48	1,14	0,97
		4,75		0,24			13,08		0,83	
		3,88		0,26			12,30		0,93	
	21,00	5,15	4,70	0,23	0,16	26,50	13,03	12,86	1,02	0,96
		4,42		0,12			12,66		0,90	
		4,53		0,13			12,88		0,97	
	22,00	4,04	4,90	0,26	0,29	27,00	14,01	13,24	1,12	0,88
		5,09		0,30			12,23		0,63	
		5,56		0,30			13,47		0,90	

Tabela 4. Resultados obtidos para o rendimento dos extratos, quantificação de fenólicos e flavonoides totais do endocarpo do cupuaçu.

(R=rendimento; Fe=fenólicos totais; Fl=flavonoides totais; MF=maceração a frio; MQ=maceração a quente; SON=sonicação; SOX=soxhlet).

Para a seleção do método para a extração das substâncias fenólicas foram considerados os rendimentos dos extratos brutos, os percentuais das substâncias fenólicas, dos flavonoides, as atividades antioxidantes e o perfil dos extratos realizados por espectrometria de massas. Para avaliar o efeito do método de extração e da composição do solvente nos percentuais de rendimentos, fenólicos e flavonoides dos extratos brutos, utilizou-se a Análise de Variância Multivariada (MANOVA) baseada em um delineamento de experimento fatorial com resposta multivariada.

Na tabela 5 são apresentados os resultados da MANOVA em termos de valor-p. É considerado significativo (valor-p < 0,05) o efeito de interação entre o método de extração e a composição do solvente, tanto para os EEPC quanto para os EEDC. Como o valor-p observado é significativo sabe-se que as interações solvente-método de extração exercem influências em pelo menos uma das variáveis respostas, podendo ser tanto no percentual de rendimentos quanto no percentual de fenólicos ou flavonoides, sugerindo a continuidade da análise multivariada.

	Critério	Est. de Teste	F aproximado	valor-p
Epicarpo	Wilks	0,0501	9,2020	0,0000
	Lawley-Hotelling	8,7154	12,266	0,0000
	Pillai's	1,5279	5.5360	0,0000
Endocarpo	Wilks	0,1049	5,7990	0,0000
	Lawley-Hotelling	3,7969	5,3440	0,0000
	Pillai's	1,4839	5,2200	0,0000

Tabela 5. Manova para efeito de interação entre o método de extração e a composição do solvente para os extratos do epicarpo e endocarpo de *T. grandiflorum*.

A tabela 6 mostra a correlação entre as variáveis observadas. É considerada a existência de correlações o quanto mais próximo de 1 em módulo. Portanto, conforme, a matriz de correlação parcial dos erros (Tabela 6) obtida para o conjunto de variáveis respostas (rendimento, fenólicos e flavonoides) verifica-se a presença de correlações

fracas indicando que a vantagem da análise multivariada é pequena, e que análises individuais para o percentual de rendimentos, fenólicos e de flavonoides devem ser realizadas usando um simples delineamento de experimento fatorial.

		Rendimentos	Fenólicos	Flavonoides
EEPC	Rendimentos	1,0000	-0,282	0,0586
	Fenólicos	-0,282	1,0000	-0,216
	Flavonoides	0,0586	-0,216	1,0000
EEDC	Rendimentos	1,0000	0,3712	0,2525
	Fenólicos	0,3712	1,0000	1,1019
	Flavonoides	0,2525	0,1019	1,0000

Tabela 6. Correlação Parcial dos erros entre rendimento, fenólicos e flavonoides.

Conforme recomendado pela MANOVA, realizou-se uma análise fatorial individual para cada fator do experimento. Os resultados são apresentados na forma de tabelas e gráficos nas sessões seguintes.

5.2.1. Seleção do Método de Extração do Epicarpo de *Theobroma grandiflorum*

5.2.1.1. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de rendimentos

Para a obtenção dos EEPC foram utilizados quatro métodos de extração, cada método teve variação na composição do solvente (etanol e etanol/água (7:3) e todas as extrações foram realizadas em triplicata totalizando 24 extratos. Os rendimentos médios dos extratos variaram entre 2,70% e 10,03% (Tabela 7). O menor rendimento observado foi para o método maceração a frio com etanol e o maior rendimento médio foi para o método maceração a quente com etanol/água (7:3).

Métodos de extração	Etanol (%)	Etanol/água (7:3) (%)
Maceração a frio	2,70 ± 0,10	9,23 ± 0,78
Maceração a quente	3,23 ± 0,15	10,03 ± 1,29
Sonicação	4,57 ± 0,15	8,93 ± 1,10
Soxhlet	4,23 ± 0,38	9,21 ± 0,73

Tabela 7. Rendimento médio dos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*.

Valores médios ± o desvio padrão

O gráfico de interação (Fig. 17) avalia as interações (se houver) existentes entre os fatores, ou seja, entre o método e o solvente utilizado proporcionando as melhores condições para as extrações. É possível notar que todos os métodos utilizados apresentaram comportamentos similares e que os extratos hidroalcoólicos apresentaram rendimentos superiores em relação aos extratos etanólicos, sugerindo possíveis influências da composição do solvente no processo de extração e, portanto, no rendimento dos extratos.

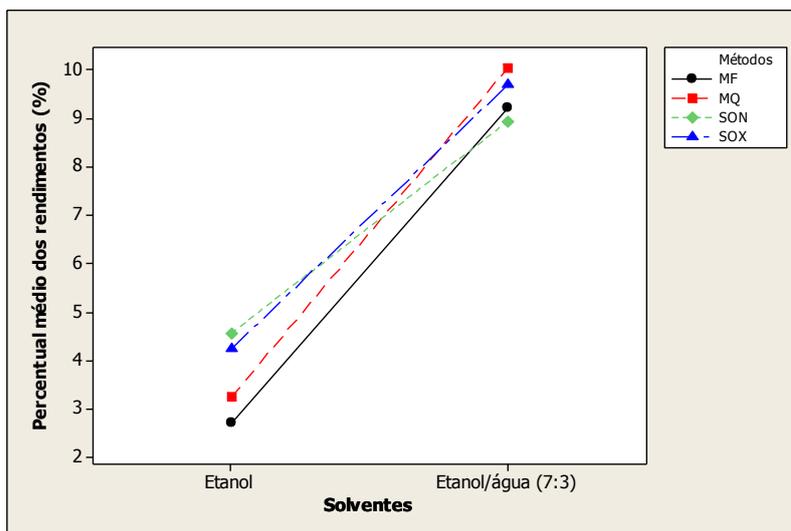


Figura 17. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos rendimentos dos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*.

Conforme ANOVA efeitos significativos foram observados apenas para o fator solvente no percentual médio de rendimentos (valor-p < 0,05; tabela 8) confirmando a análise descritiva do gráfico de interação (Fig. 17). Através do gráfico de intervalo de confiança a 95% para a composição do solvente (Fig. 18) é possível visualizar o efeito da composição do solvente, ao passo que os maiores rendimentos percentuais foram observados no solvente etanol/água (7:3). Os maiores rendimentos observados podem ser explicados em virtude do aumento da polaridade do solvente de extração, em consequência da adição de água ao etanol possibilitando a extração de uma ampla variedade de substâncias fenólicas como ácidos fenólicos, lignanas, flavonoides, polifenóis, substâncias glicosiladas e outras classes de metabólitos de polaridades elevadas, proporcionando maiores interações entre solvente-amostra aumentando a eficiência da extração contribuindo para o aumento dos rendimentos dos extratos hidroalcoólicos.

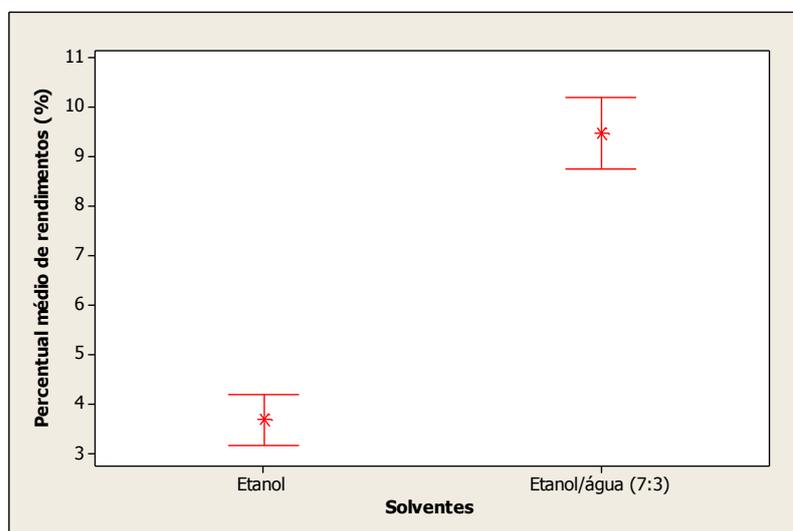


Figura 18. Intervalo de confiança a 95% para o percentual médio dos rendimentos para a composição do solvente dos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*.

O gráfico de comparação de médias (Fig. 19) apresenta as principais contribuições para os fatores (solvente e método de extração), assim como as interações observadas

entre ambos. É possível notar a ausência de interações solvente-método, bem como o efeito do método. No entanto, efeitos significativos são observados para a composição do solvente, ao passo que efeitos positivos são observados para o etanol/água (7:3), contribuindo para os maiores rendimentos percentuais, assim como também é visível o efeito negativo do etanol. Considerando apenas o efeito significativo do solvente sobre os percentuais médios de rendimentos, qualquer um dos métodos combinado com etanol/água (7:3) poderia ser utilizado para as extrações do EPC, ao passo que os métodos não diferem significativamente entre si. No entanto, conforme sugerido pelo gráfico de interação (Fig. 17) o método maceração a quente com etanol/água (7:3) seria o mais indicado ao passo que essa combinação proporciona os maiores rendimentos percentuais.

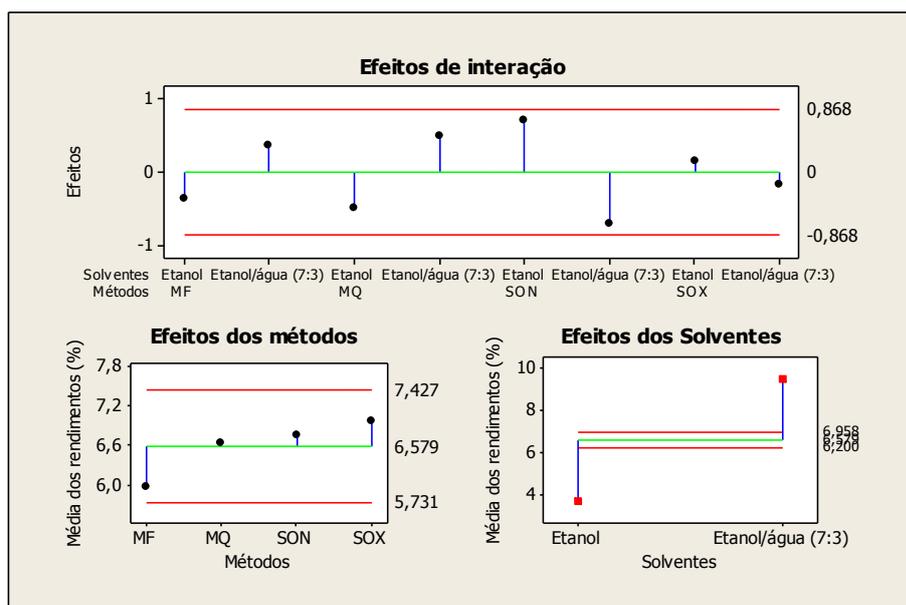


Figura 19. Comparação de médias para os efeitos dos fatores no percentual dos rendimentos nos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*.

Os resultados apresentados nas figuras 17, 18 e 19 corroboram os resultados obtidos pela análise de variância (ANOVA) descrita na tabela 8, onde apenas o solvente apresentou efeito significativo (valor- $p < 0,05$).

		Fonte	gl	SQ	QM	Valor F	Valor P
Epicarpo	Rendimentos	Métodos	3	3,345	1,115	1,45	0,264
		Solventes	1	201,3	210,3	262,7	0,000
		Met * Solv	3	5,555	1,852	2,420	0,104
		Error	16	12,26	0,766		
		Total	23	222,4			
	Fenólicos	Métodos	3	25,40	8,467	1,960	0,129
		Solventes	1	65,20	65,20	15,08	0,000
		Met * Solv	3	46,35	15,45	3,570	0,019
		Error	64	276,6	4,323		
		Total	71	413,6			
	Flavonoides	Métodos	3	8,867	2,956	3,850	0,013
		Solventes	1	25,70	25,70	33,50	0,000
		Met * Solv	3	5,324	1,775	2,310	0,084
		Error	16	49,10	0,766		
		Total	23	88,99			
Endocarpo	Rendimentos	Métodos	3	152,6	50,87	31,88	0,000
		Solventes	1	123,5	123,5	77,38	0,000
		Met * Solv	3	42,86	14,28	8,95	0,001
		Error	16	25,53	1,596		
		Total	23	344,5			
	Fenólicos	Métodos	3	130,7	43,58	129,8	0,000
		Solventes	1	608,1	608,1	1810	0,000
		Met * Solv	3	35,25	11,75	34,99	0,000
		Error	64	21,49	0,340		
		Total	71	795,6			
	Flavonoides	Métodos	3	0,823	0,274	21,43	0,000
		Solventes	1	8,562	8,562	668,5	0,000
		Met * Solv	3	0,092	0,030	2,390	0,077
		Error	64	0,819	0,013		
		Total	71	10,29			

Tabela 8. ANOVA para os valores dos rendimentos, fenólicos e flavonoides dos extratos dos resíduos de *T. grandiflorum* nos fatores método de extração e solvente. Efeitos com valor-p < 0,05 são considerados significativos; gl = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio.

5.2.1.2. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de substâncias fenólicas

O percentual médio de fenólicos totais nos EEPC do cupuaçu variou entre 8,62% (113,3 mgEAG/g de extrato) e 12,96% (157,8 mgEAG/g de extrato). O menor percentual foi observado para o método sonicação combinado com etanol/água (7:3) e o maior foi observado para o método maceração a frio com etanol (Tabela 9).

Métodos de extração	Etanol (%)	Etanol / água (7:3) (%)
Maceração a frio	12,96 ± 0,07 ^a	9,54 ± 0,28 ^c
Maceração a quente	11,45 ± 0,05 ^{ac}	8,95 ± 0,48 ^c
Sonicação	11,10 ± 0,38 ^{ac}	8,69 ± 0,44 ^c
Soxhlet	9,34 ± 0,28 ^{bc}	10,14 ± 0,98 ^{ac}

Tabela 9. Percentual médio dos fenólicos nos extratos do epicarpo de *Theobroma grandiflorum*. Valores médios ± o desvio padrão. Interações com letras iguais não diferem significativamente entre si.

Os maiores percentuais de fenólicos foram observados nos extratos em etanol. Todos os métodos apresentaram comportamentos similares, com exceção do soxhlet, sugerindo a existência de possíveis interações solvente-método de extração (Fig. 20).

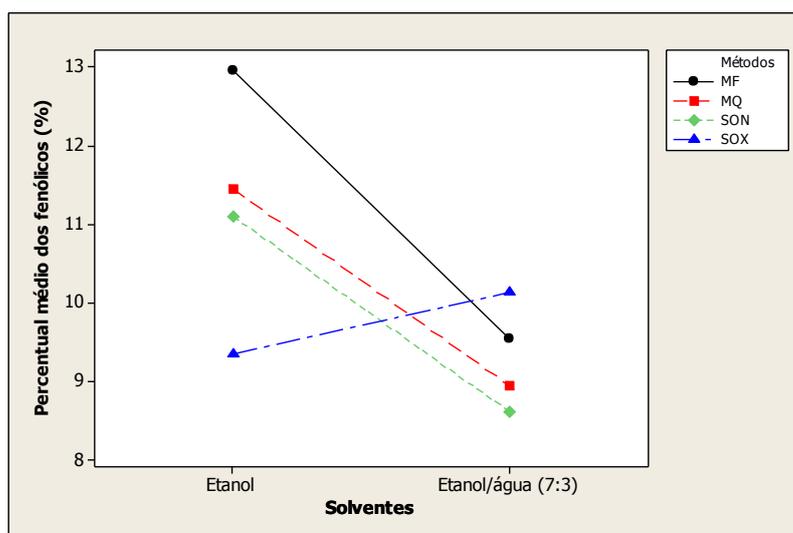


Figura 20. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos fenólicos nos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*.

Interações significativas foram observadas entre o método de extração e a composição do solvente (valor-p < 0,05; tabela 8) no percentual médio de fenólicos corroborando a análise descritiva do gráfico de interação (Fig. 20). Tanto o método de extração quanto a composição do solvente podem exercer efeitos sobre o percentual de fenólicos; no entanto, conjuntamente os efeitos observados são consideráveis. Os efeitos individuais dos fatores (métodos e solventes) são importantes para a compreensão dos resultados, porém, quando há interação significativa (valor-p < 0,05) entre esses fatores, ambos são avaliados conjuntamente, uma vez que o objetivo é otimizar o processo de extração com o melhor método e solvente.

Ao passo que interações significativas foram observadas pela ANOVA, utilizou-se o teste de Tukey para avaliar as diferenças significativas entre todas as possíveis combinações entre os métodos e solventes utilizados. Conforme o teste de Tukey a combinação de maceração a frio com etanol é a mais indicada para as extrações de fenólicos no EPC do cupuaçu, ao passo que proporciona maior percentual de substâncias fenólicas. Alternativamente, os métodos maceração a quente e sonicação, ambos em etanol poderiam ser utilizados, assim como o método soxhlet combinado com etanol/água (7:3), visto que essas combinações não diferem significativamente entre si, confirmando a análise descritiva do gráfico de interação (Fig.20).

No gráfico de comparação de médias (Fig. 21) verifica-se a existência da interação solvente-método de extração para o método soxhlet, justificando seu comportamento diferenciado em relação às combinações dos demais métodos e solventes utilizados. Efeitos positivos são observados para a combinação do soxhlet com etanol/água (7:3) assim como são observados efeitos negativos para o etanol. Os efeitos observados para o método soxhlet pelo gráfico de comparação de médias estão

de acordo com a análise descritiva do gráfico de interação (Fig. 20) e com os resultados obtidos pela ANOVA (Tabela 8) onde interações significativas foram observadas, justificando o comportamento diferenciado do soxhlet em relação aos demais métodos.

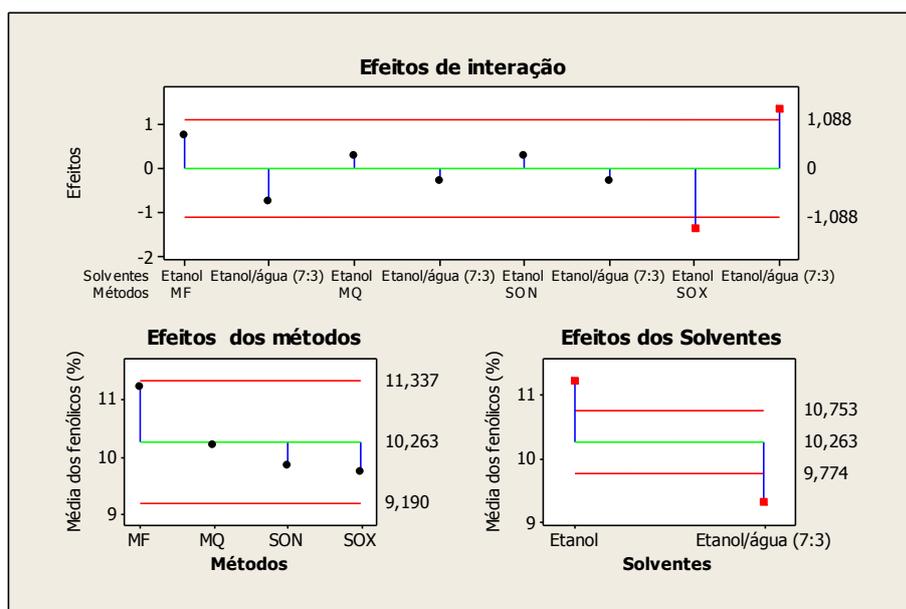


Figura 21. Comparação de médias para os efeitos dos fatores no percentual dos fenólicos nos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*.

A maioria das substâncias fenólicas não é encontrada na forma livre na natureza, e sim na forma de ésteres ou ligados a moléculas de açúcares (CARVALHO *et al.*, 2007), e principalmente por essa razão, grande parte dos trabalhos descritos utilizam solventes hidroalcoólicos para extração de fenólicos, uma vez que tais substâncias apresentam maiores afinidades com solventes polares tendo a água como co-solvente de extração (YARIWAKE *et al.*, 2005; OTHMAN *et al.*, 2007; ROCKENBACH *et al.*, 2008; POMPEU *et al.*, 2009).

Entretanto, os resultados obtidos para a quantificação de fenóis totais para o EPC do cupuaçu apresentaram maiores percentuais nos extratos em etanol. Os percentuais observados para esses extratos podem ser justificados pela escassa

presença de substâncias glicosiladas ou até mesmo devido à presença de agliconas, uma vez que apresentam mais afinidades com o solvente etanol, tornando-o mais seletivo e eficiente no processo de extração.

5.2.1.3. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de flavonoides

O percentual médio de flavonoides totais variou entre 1,73% e 4,16%. O menor percentual médio foi observado para o método soxhlet com etanol/água (7:3) e o maior foi observado para a maceração a quente com etanol (Tabela 10).

Métodos de extração	Etanol (%)	Etanol / água (7:3) (%)
Maceração a frio	3,03 ± 0,09	2,68 ± 0,02
Maceração a quente	4,16 ± 0,08	2,36 ± 0,62
Sonicação	3,59 ± 0,14	2,07 ± 0,33
Soxhlet	2,83 ± 0,20	1,72 ± 0,14

Tabela 10. Percentual médio dos flavonoides nos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*. Valores médios ± o desvio padrão.

Similarmente aos fenólicos, os maiores percentuais de flavonoides foram observados nos extratos em etanol. Todos os métodos apresentaram comportamentos similares com exceção da maceração a frio, sugerindo a existência de interações significativas ou simplesmente efeitos individuais dos fatores método e solventes (Fig.22). Efeitos significativos foram observados pela ANOVA para os fatores método de extração e solvente (Tabela 8, valor-p < 0,05) sobre os percentuais médios de flavonoides, confirmando a análise descritiva do gráfico de interação (Fig. 22).

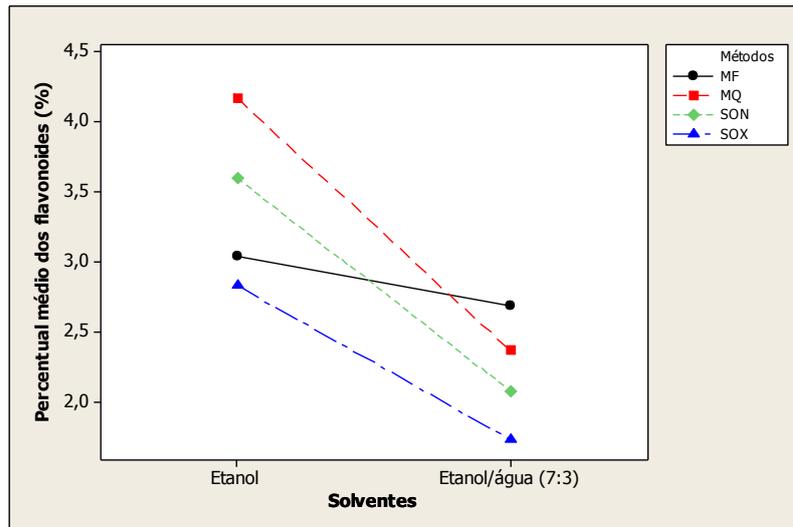


Figura 22. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos flavonoides dos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*.

Os efeitos individuais ocasionados pelos fatores método e solventes, assim como a não interação entre ambos, são visualizados no gráfico de comparação de médias (Fig. 23). O método maceração a quente apresenta efeitos positivos, assim como o solvente etanol proporcionando os maiores percentuais de flavonoides. O método soxhlet, bem como o solvente etanol/água (7:3) apresenta efeitos negativos visto que contribuem para os menores percentuais de flavonoides.

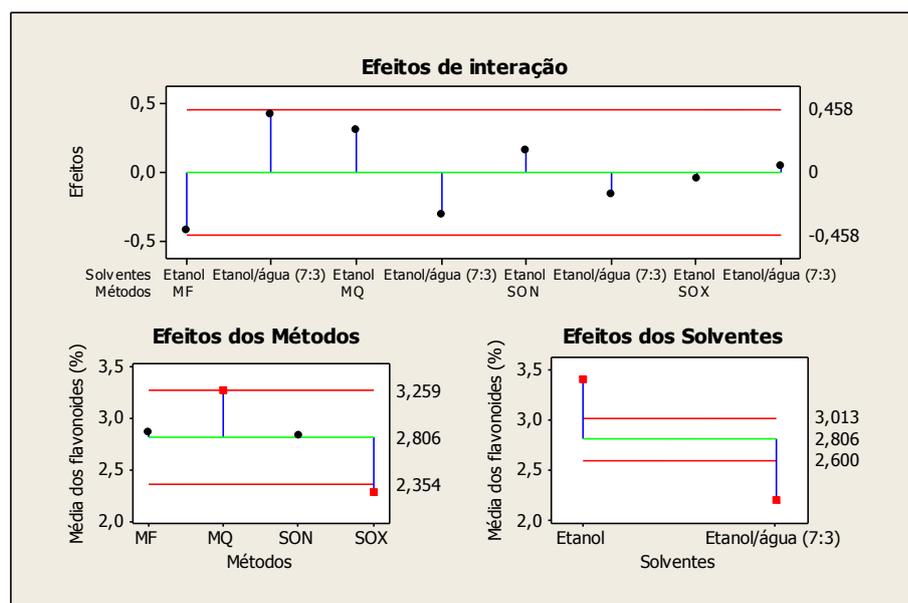


Figura 23. Comparação de médias para os efeitos dos fatores no percentual dos flavonoides nos extratos do epicarpo de *T. grandiflorum*

A seleção do método de extração e da composição do solvente para o EPC do cupuaçu na extração dos flavonoides é de grande relevância (Fig. 24), ao passo que diferenças significativas foram observadas entre os métodos MQ e SOX indicando a maceração a quente como o método mais indicado, assim como os solventes diferem entre si, sugerindo o etanol como o mais adequado para essa matriz (valor-p < 0,05). No entanto, as maiores variações foram observadas para a MQ. Considerando que a MQ difere significativamente apenas do SOX, alternativamente a MF poderia ser utilizada, ao passo que apresenta as menores variações no percentual médio de flavonoides (Fig. 24).

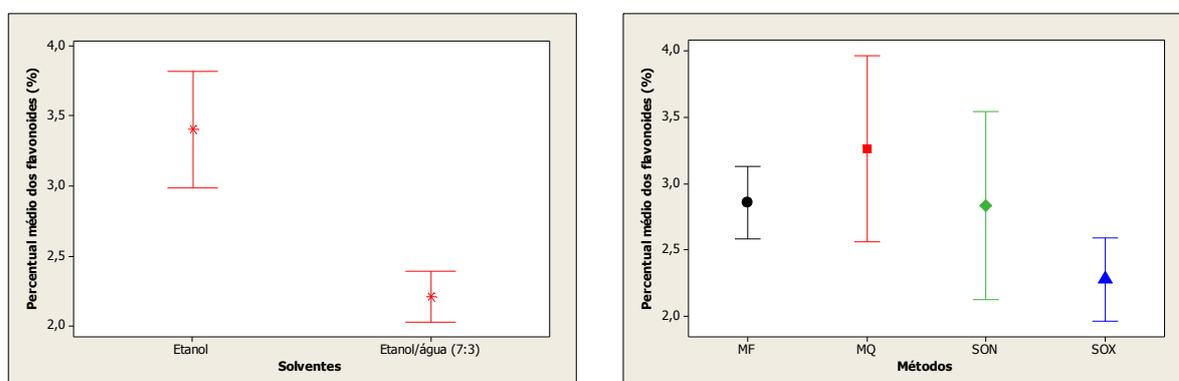


Figura 24. Intervalo de confiança a 95% para o percentual médio dos flavonoides para os solventes (esquerda) e para os métodos (direita).

Muitos são os fatores que interferem no rendimento de compostos fenólicos, de flavonoides e de antioxidantes em geral, como por exemplo, o tamanho da partícula do material a ser extraída, a proporção do material vegetal em relação à quantidade de solventes orgânicos (m/v %), o tempo e o tipo de extração empregado, assim como a composição do solvente e por último, mas não menos importante, a temperatura (ALOTHMAN *et al.*, 2009; POMPEU *et al.*, 2009; BIESAGA, 2011; BIESAGA & PYRZYNSKA, 2013; KAKULA-KOCH *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013).

Em nosso estudo são considerados apenas os efeitos dos métodos de extração e da composição dos solventes. Com base nas observações obtidas neste experimento, verifica-se que para obtenção dos extratos brutos das cascas dos frutos do cupuaçu, o

método maceração a quente pode ser usado tanto para extração de flavonoides quanto para extração de substâncias fenólicas, mostrando a relevância da temperatura durante o processo de extração.

Durante uma extração, a temperatura desempenha um papel excepcionalmente importante, uma vez que o aumento da temperatura favorece a solubilidade de muitos compostos em solventes orgânicos por meio do fornecimento de energia na forma de calor, contribuindo para maiores interações solvente-amostra e proporcionando, desta maneira, extrações mais eficientes.

A partir disto, surge a necessidade de se avaliar adequadamente e otimizar as variáveis envolvidas em um processo de extração, visto que há substâncias que degradam facilmente com o aumento da temperatura e outras que são completamente favorecidas. Os resultados obtidos neste trabalho para o efeito do método estão de acordo com diversos autores (POMPEU *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2013) que descrevem a relação crescente entre temperatura de extração e rendimentos de substâncias fenólicas e de flavonoides.

5.2.2. Seleção do Método de Extração do endocarpo de *Theobroma grandiflorum*

5.2.2.1. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de rendimento.

Para a obtenção dos EEDC do cupuaçu foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item 5.2.1.1 para o EPC e, similarmente foram obtidos 24 extratos. Os rendimentos médios variaram entre 12,97% e 26,5%. O menor rendimento foi observado para o método sonicação com etanol e o maior para o método soxhlet com etanol/água (7:3) (Tabela11).

Métodos de extração	Etanol (%)	Etanol/água (7:3) (%)
Maceração a frio	21,09 ± 1,40	21,47 ± 1,63
Maceração a quente	19,23 ± 0,21	23,87 ± 0,12
sonicação	12,97 ± 2,54	20,77 ± 0,90
Soxhlet	20,83 ± 0,29	26,50 ± 0,71

Tabela 11. Rendimento médio dos extratos do endocarpo de *T. grandiflorum*.

Valores médios ± o desvio padrão.

Os maiores rendimentos percentuais foram observados nos extratos em etanol/água (7:3). Todos os métodos apresentaram comportamentos similares, com exceção da maceração a frio, sugerindo a existência de interações significativas ou de efeitos individuais dos fatores método e solventes (Fig. 25). Conforme ANOVA interações significativas foram observadas entre o método de extração e a composição do solvente (valor-p < 0,05; tabela 8) confirmando a análise descritiva do gráfico de interação (Fig. 25).

O método soxhlet com etanol/água (7:3) é a combinação mais adequada para obtenção do extrato bruto do EDC do cupuaçu, ao passo que proporciona os maiores rendimentos percentuais. Alternativamente, a maceração a quente combinada com etanol/água (7:3) poderia ser utilizada, visto que não diferem significativamente entre si. Em contrapartida, conforme ilustrado graficamente (Fig. 25) a combinação da sonicação com etanol é a menos indicada, ao passo que difere significativamente das demais combinações (valor-p < 0,05) proporcionando os menores rendimentos percentuais.

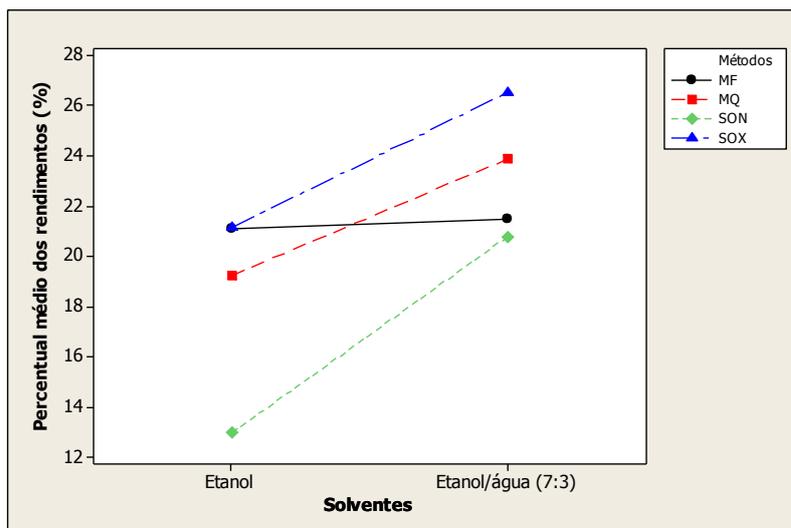


Figura 25. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos rendimentos dos extratos do endocarpo de *T. grandiflorum*.

5.2.2.2. Efeito do Método de Extração e da composição do solvente na variação do percentual de substâncias fenólicas

O percentual médio de fenólicos totais nas extrações do EDC do cupuaçu variou entre 3,17% (64,50 mgEAG/g de extrato) e 12,86% (182,6 mgEAG/g de extrato). O menor percentual médio foi observado para o método maceração a frio com etanol e o maior percentual foi observado para o soxhlet com etanol/água (7:3) (Tabela 12).

Métodos de extração	Etanol (%)	Etanol/água (7:3) (%)
Maceração a frio	3,16 ± 0,09	8,65 ± 0,71
Maceração a quente	5,02 ± 0,17	10,32 ± 0,26
Ultrassom	3,27 ± 0,25	7,63 ± 0,16
Soxhlet	4,73 ± 0,15	12,86 ± 0,54

Tabela 12. Percentual médio dos fenólicos nos extratos do endocarpo de *T. grandiflorum*. Valores médios ± o desvio padrão.

CONTRERAS-CALDERÓN *et al.* (2011) investigando a atividade antioxidante de frutos tropicais obteve as maiores concentrações de fenólicos totais para os extratos das sementes (497 mg EAG/100g de matéria fresca) em relação ao mesocarpo e ao epicarpo do cupuaçu corroborando os resultados apresentados em nosso trabalho, onde os maiores teores de fenólicos foram observados para os extratos do endocarpo. No entanto, uma vez que otimizamos o processo de extração, os teores de fenólicos totais obtidos em nosso trabalho para EDC variaram entre 6.450 e 18.260 mg EAG/100g de extrato, mostrando a relevância do método de extração e da composição do solvente, sendo, portanto, superiores aos valores apresentados por SOTERO *et al.* (2011) que obtiveram 9.691.94 EAG/100g e por CONTRERAS-CALDERÓN *et al.* (2011).

Interações significativas entre o método de extração e a composição do solvente (valor-p < 0,05; tabela 8) foram observadas no percentual médio de fenólicos. O método soxhlet combinado com etanol/água (7:3) mostrou-se mais adequado para a extração dos fenólicos no EDC do cupuaçu, ao passo que difere significativamente das demais combinações (valor-p < 0,05) proporcionando os maiores percentuais de fenólicos. Em contrapartida, os métodos maceração a frio e ultrassom combinados com etanol são menos indicado uma vez que diferem significativamente das demais combinações (valor-p < 0,05) proporcionando os menores percentuais de fenólicos. Os resultados obtidos pelo teste de Tukey, assim como os dados observados pela ANOVA corroboram a análise descritiva do gráfico de interação (Fig. 26).

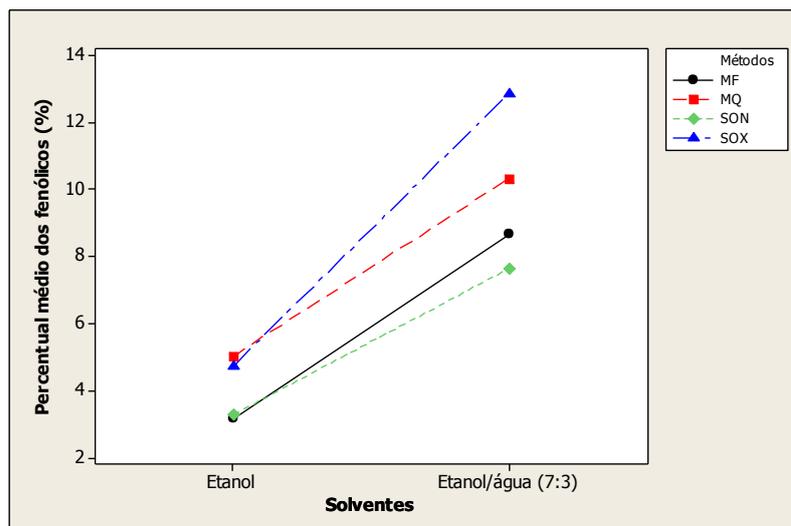


Figura 26. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos fenólicos nos extratos do endocarpo de *T. grandiflorum*.

5.2.2.3. Efeito do método de extração e da composição do solvente na variação do percentual de flavonoides

Os percentuais de flavonoides observados pelo método espectrofotométrico do cloreto de alumínio foram extremamente baixos, variando entre 0,00% e 1,00%. O menor percentual médio foi observado para o método soxhlet em etanol com 0,23% e o maior percentual foi observado para mesmo método, entretanto, usando como solvente de extração o etanol/água (7:3) com 0,93%. Para os métodos ultrassom, maceração a frio e maceração a quente em etanol, não foi possível detectar valor algum para os percentuais de flavonoides (Tabela 13).

Métodos de extração	Etanol (%)	Etanol/água (7:3) (%)
Maceração a frio	-	0,77 ± 0,13
Maceração a quente	-	0,57 ± 0,04
sonicação	-	0,73 ± 0,21
Soxhlet	0,23 ± 0,06	0,94 ± 0,05

Tabela 13. Percentual médio dos flavonoides nos extratos do endocarpo de *T. grandiflorum*. Valores médios ± o desvio padrão.

Os resultados obtidos mostram que provavelmente o método espectrofotométrico do cloreto de alumínio para a quantificação de flavonoides totais não é adequado para o EDC do cupuaçu ou a quantidade de flavonoides existente nessa matriz de fato, deve ser mínima, ou ainda, os métodos utilizados podem não ser apropriados para a extração de flavonoides nessa matriz. Apesar da quantidade de flavonoides ser pequena, os maiores percentuais foram observados nos extratos hidroalcoólicos mostrando a relevância do solvente de extração (Fig. 27).

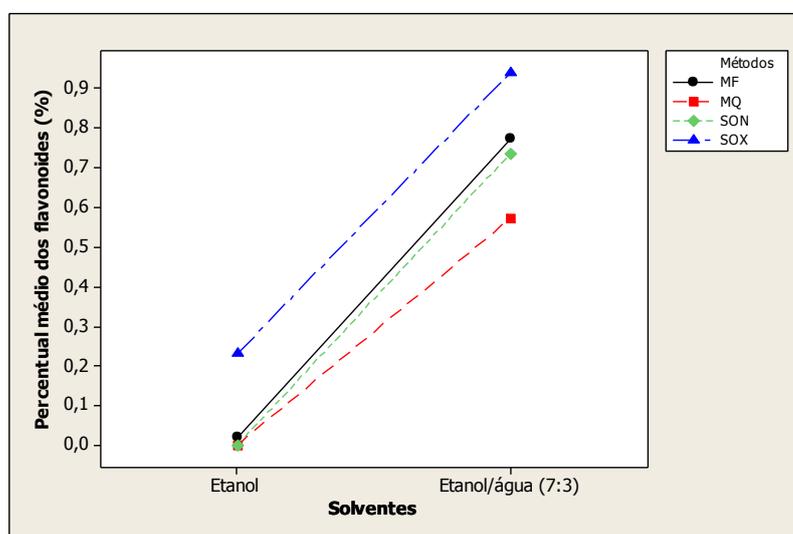


Figura 27. Gráfico de interação entre solvente e método de extração no percentual médio dos flavonoides nos extratos do endocarpo de *T. grandiflorum*.

Efeitos significativos foram observados para o método de extração e para a composição do solvente (valor-p < 0,05; tabela 8) influenciando nos percentuais médios de flavonoides. Avaliando o solvente de extração verifica-se que os maiores percentuais de flavonoides foram observados nos extratos em etanol/água (7:3), embora tenham apresentado maiores variações (Fig. 28). Considerando o efeito do método de extração nota-se que os maiores percentuais de flavonoides foram observados no método soxhlet, que combinado com etanol/água (7:3) é mais indicado para as extrações de flavonoides no EDC do cupuaçu visto que proporcionam os maiores percentuais de flavonoides (Fig. 28).

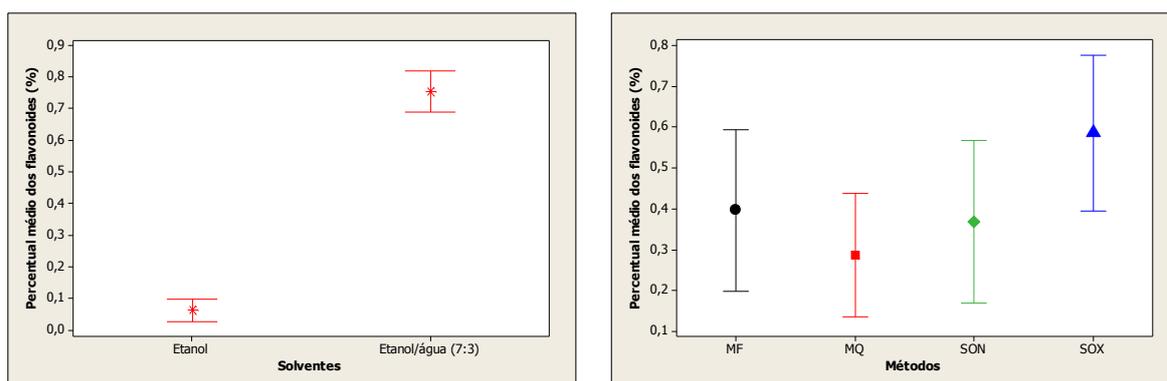


Figura 28. Intervalo de confiança a 95% para o percentual médio dos flavonoides para os solventes (esquerda) e para os métodos (direita).

O método soxhlet mostrou-se adequado para o EDC do cupuaçu ao passo que proporcionou os melhores rendimentos nas extrações e os melhores percentuais de fenólicos e flavonoides. A relevância do soxhlet consiste no fato do solvente estar em constante renovação com o material a ser extraído, contribuindo para extrações mais eficientes. Entretanto, tempos longos de extração devem ser evitados, para impedir possíveis degradações do material extraído (REGINATTO *et al.*, 2009).

MANIRAKIZA *et al.* (2001) enfatizam que o método de extração adequado para cada matriz depende da estrutura e composição da própria matriz. Ao considerar diferentes variáveis ao longo de seu trabalho, verificaram que o método soxhlet é mais indicado para matrizes sólidas, e que um tempo de extração equivalente há duas horas é o ideal, uma vez que a partir desse tempo o aumento do rendimento dos extratos lipídicos não foram significativos.

REGINATTO *et al.* (2009) obtiveram bons rendimentos em suas extrações em matérias-primas de origem animal e vegetal. Entretanto, ressaltam a importância do tempo de extração em função da qualidade do material extraído. Controversos, CARVALHO *et al.* (2009) estudaram a termoestabilidade das extrações em soxhlet, utilizando como ferramenta de apoio a cromatografia líquida de alta eficiência e rutina e o ácido clorogênico como padrões de fenólicos. Seus resultados indicam que o efeito

da temperatura sobre o método soxhlet não provoca degradação dos componentes extraídos.

Todas as variáveis envolvidas em um processo de extração, assim como a seleção do próprio método a ser utilizado, estão totalmente relacionadas com a matriz. O fato do EDC do cupuaçu apresentar bastante gordura em sua composição justifica o elevado rendimento observado para os extratos brutos pelo método soxhlet, visto que esse método é frequentemente utilizado para extração de substâncias apolares e lipídios em gerais em matrizes gordurosas (SANTOS *et al.*, 2013).

A eficiência do método soxhlet associada a solventes hidroalcoólicos, que são frequentemente utilizados para extração de substâncias fenólicas e de flavonoides (YARIWAKE *et al.*, 2005; OTHMAN *et al.*, 2007; ROCKENBACH *et al.*, 2008; POMPEU *et al.*, 2009) devido as afinidades existentes entre seus grupos funcionais, indica que para os EEDC do cupuaçu o método mais adequado foi o soxhlet combinado com etanol/água (7:3), visto que essa combinação apresentou melhores rendimentos para obtenção dos extratos brutos e melhores percentuais para fenólicos e flavonoides.

5.3. Varredura de Radicais Livres

5.3.1. Ensaio Qualitativo (DPPH')

O ensaio qualitativo realizado em placa de CCD, utilizando a solução de DPPH' em metanol, é uma avaliação preliminar da varredura de radicais livres presentes. Na figura 29 são apresentados os resultados do ensaio qualitativo para a varredura de radicais livres pelo método do DPPH' de todos os métodos de extração utilizados ao decorrer do experimento. Verifica-se que os extratos de todos os métodos utilizados, tanto para as cascas dos frutos quanto para as cascas das sementes

apresentaram resultados positivos comparados ao padrão quercetina, sugerindo a presença de substâncias com possíveis atividades antioxidantes.

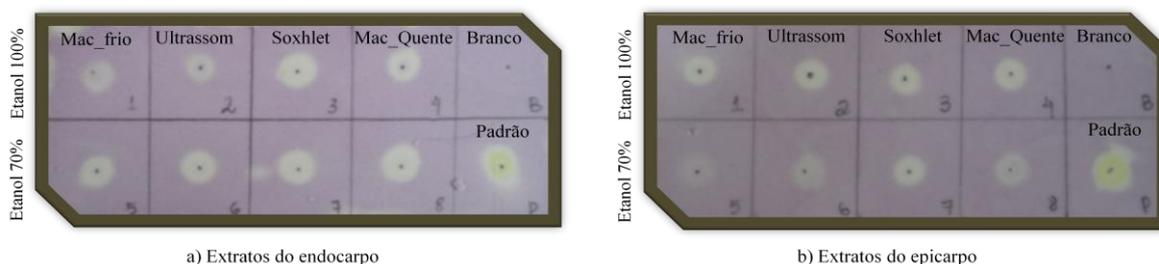


Figura 29. Resultados do ensaio qualitativo para varredura de radicais livres em solução de DPPH.

5.3.2. Ensaio Quantitativo (DPPH[•], ABTS^{•+} e superóxido)

Os métodos utilizados neste trabalho para quantificação da varredura de radicais livres foram DPPH[•], ABTS^{•+} e superóxido. São ensaios colorimétricos que consistem em soluções com espécies radicalares estáveis, tais como o radical DPPH[•], o cátion radical ABTS^{•+} e o ânion radical superóxido. Na tabela 14 são apresentados os resultados obtidos em valores médios realizados em triplicata, na concentração de 100 µg/mL para a quantificação da varredura de radicais livres nos extratos do EPC e EDC do cupuaçu.

O método do DPPH[•] mostrou maior afinidade com as matrizes avaliadas (EPC e EDC), ao contrário do observado para o método do ABTS^{•+}, uma vez que os resultados obtidos para este ensaio não foram satisfatórios. Os valores negativos observados na tabela 14 para o ensaio do ABTS^{•+} mostram a falta de afinidade desse método com a matriz vegetal sugerindo a ausência de substâncias com potencial antioxidante.

Considerando o método do DPPH[•] verifica-se que os extratos hidroalcoólicos apresentaram maiores atividades antioxidantes em relação aos extratos etanólicos, isto foi observado tanto para os EEPC quanto para os EEDC. Para os EEPC, a menor atividade antioxidante observada foi para o método maceração a quente em etanol,

com 22,5%, e a maior foi para o método soxhlet em etanol/água (7:3), com 67,5% de inibição. Para os EEDC as atividades antioxidantes variaram entre 9,8% e 60,5%, sendo o menor percentual atribuído ao método ultrassom em etanol e o maior percentual ao soxhlet em etanol/água (7:3) (Tabela 14).

Inibição (%)							
	Métodos	DPPH* (%)		Superóxido (%)		ABTS** (%)	
		Epicarpo	Endocarpo	Epicarpo	Endocarpo	Epicarpo	Endocarpo
Etanol	MF	23,7 ± 5,03	10,3 ± 0,34	8,24 ± 0,17	7,3 ± 0,56	-82,87 ± 0,97	-23,23 ± 0,31
	SON	22,7 ± 3,20	9,8 ± 0,75	21,0 ± 0,24	6,7 ± 0,49	-82,67 ± 0,11	-49,30 ± 0,65
	SOX	42,3 ± 4,27	26,7 ± 3,00	23,5 ± 1,42	30,2 ± 0,87	-95,5 ± 0,59	-19,60 ± 0,40
	MQ	22,5 ± 0,29	22,0 ± 1,47	13,0 ± 1,13	20,4 ± 0,79	-104,73 ± 1,00	-90,41 ± 2,07
Etanol/água (7:3)	MF	57,3 ± 0,93	45,1 ± 0,15	27,0 ± 1,00	32,9 ± 0,90	-51,36 ± 0,26	-79,95 ± 1,88
	SON	57,6 ± 1,15	44,8 ± 0,79	24,6 ± 1,38	28,8 ± 0,41	-59,14 ± 0,26	-91,30 ± 1,93
	SOX	67,5 ± 0,90	60,5 ± 0,20	21,3 ± 1,13	39,7 ± 0,96	-49,31 ± 0,63	-72,53 ± 2,37
	MQ	52,99 ± 1,21	55,6 ± 1,34	26,9 ± 0,35	39,3 ± 0,15	-115,58 ± 0,13	-124,00 ± 4,02
	Padrão	99,5		99,0		99,5	

Tabela 14. Resultados do ensaio quantitativo para varredura de radicais livres dos extratos do epicarpo e endocarpo de *T. grandiflorum*.

MF=maceração a frio; SON=sonicação; SOX=soxhlet; MQ=maceração a quente. Valores médios ± o desvio padrão.

Pelo método do DPPH*, assim como pelo método do superóxido, é possível notar influências da composição do solvente na extração de substâncias antioxidantes, visto que os maiores percentuais de inibição foram observados para os extratos hidroalcoólicos. Comportamentos similares foram observados tanto para os extratos do epicarpo quanto para os extratos do endocarpo de *T. grandiflorum*. Por exemplo, para os extratos etanólicos do epicarpo o menor percentual de inibição observado foi para o método maceração a quente com 22,5%, sendo possível notar o mesmo comportamento para os extratos hidroalcoólicos. Nesses extratos o menor percentual de inibição observado também foi para o mesmo método com 52,99%, deixando evidente a influência do método de extração discutido nas sessões anteriores.

Analogamente, verifica-se que o maior percentual de inibição observado para os extratos etanólicos do epicarpo foi atribuído ao método soxhlet em etanol com 42,3%, e similarmente, o mesmo método apresenta o maior percentual de inibição nos extratos hidroalcoólicos, com 67,5%.

De forma geral, pelo método do DPPH^{*} verifica-se que todos os extratos de todos os métodos apresentaram percentuais de inibição medianos comparados ao padrão da quercetina, entretanto os resultados apresentados foram maiores para os extratos do epicarpo em relação aos extratos do endocarpo, sugerindo uma quantidade superior de substâncias com potenciais antioxidantes no epicarpo do cupuaçu.

Para o ensaio do superóxido os resultados observados não foram expressivos, visto que todos os percentuais de inibição foram inferiores a 50%. Os resultados observados variaram entre 8,24% e 27,0% para os extratos do epicarpo e entre 6,7% e 39,7% para os extratos do endocarpo. Embora o ensaio do DPPH^{*} seja amplamente utilizado, o radical utilizado para este ensaio representa ou simula a presença de radicais livres, uma vez que não são produzidos pelo nosso organismo. Entretanto, o ânion radical superóxido pode ser gerado pelo nosso próprio metabolismo através de reações enzimáticas, ou até mesmo como subprodutos dessas reações e, conseqüentemente gerar danos à saúde (VARGAS, 2008). Desta maneira, os pequenos percentuais de inibição observados pelo método do superóxido podem estar relacionados com a especificidade do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), sugerindo a ausência de substâncias nos extratos capazes de estabilizar esse ânion radical.

Na tabela 15 são apresentados os percentuais médios de inibição obtidos pelo método DPPH^{*}, acompanhados dos respectivos percentuais de flavonoides e fenólicos totais para cada método de extração utilizado. Verifica-se que para os extratos das cascas dos frutos os maiores percentuais de inibição foram observados para os extratos

hidroalcoólicos, entretanto, os maiores percentuais de flavonoides e fenólicos totais foram observados para os extratos etanólicos, sugerindo que a maior atividade varredora de radicais livres nesses resíduos pode está relacionado com um tipo específico de fenólico ou de flavonoides e não com a quantidade presente.

Para os extratos dos resíduos das sementes verifica-se um comportamento bem regular, visto que os maiores percentuais médios de fenólicos e flavonoides foram observados nos extratos hidroalcoólicos e, conseqüentemente foram observados os maiores percentuais de inibição para varredura de radicais livres.

	Epicarpo				Endocarpo		
	Métodos	DPPH'	Fenólicos	Flavonoides	DPPH'	Fenólicos	Flavonoides
Etanol	MF	23,7 ± 5,03	13,0 ± 3,5	3,0 ± 0,74	10,3 ± 0,34	3,2 ± 0,09	0,02 ± 0,02
	SON	22,7 ± 3,20	11,1 ± 0,92	3,6 ± 1,93	9,8 ± 0,75	3,3 ± 0,25	-
	SOX	42,3 ± 4,27	9,3 ± 1,90	2,8 ± 0,28	26,7 ± 3,00	4,7 ± 0,15	0,23 ± 0,06
	MQ	22,5 ± 0,29	11,5 ± 2,3	4,2 ± 1,65	22,0 ± 1,47	5,0 ± 0,17	-
Etanol /água (7:3)	MF	57,3 ± 0,93	9,5 ± 2,8	2,7 ± 0,41	45,1 ± 0,15	8,7 ± 0,71	0,8 ± 0,13
	SON	57,6 ± 1,15	8,6 ± 3,0	2,1 ± 0,28	44,8 ± 0,79	7,6 ± 0,16	0,7 ± 0,21
	SOX	67,5 ± 0,90	10,1 ± 0,06	1,7 ± 0,13	60,5 ± 0,20	12,9 ± 0,54	0,9 ± 0,06
	MQ	52,99 ± 1,21	8,9 ± 2,1	2,4 ± 0,13	55,6 ± 1,34	10,3 ± 0,26	0,6 ± 0,04
	Padrão	99,5%			99,5%		

Tabela 15. Resultados obtidos para os ensaios de DPPH', fenólicos e flavonoides totais dos extratos.

5.3.3. Concentração Eficiente (CE₅₀) ou Concentração Inibitória (CI₅₀) dos extratos brutos.

A partir da avaliação inicial dos extratos brutos realizados na concentração de 100 µg/mL, por meio da varredura de radicais livres pelos diferentes métodos colorimétricos, selecionou-se os métodos de extração que apresentaram os melhores percentuais de inibição para a realização da concentração inibitória (CI₅₀).

Na tabela 16 é apresentada a concentração inibitória (CI₅₀) dos extratos dos resíduos do fruto do cupuaçu pelos métodos do DPPH' e ABTS⁺⁺ para os diferentes métodos de extração utilizados. Para o epicarpo do cupuaçu, todos os extratos hidroalcoólicos foram selecionados, uma vez que, conforme a tabela 15, todos

apresentaram percentuais de inibição superiores a 50% para a varredura de radicais livres pelo método do DPPH[•].

		DPPH [•] (µg/mL)	
		Epicarpo	Endocarpo
Etanol /água (7:3)	MF	79,0 ± 2,45	NR
	SON	76,9 ± 1,22	NR
	SOX	69,5 ± 2,36	223,6 ± 0,47
	MQ	276,7 ± 2,13	NR
	Quercetina	5,06 ± 0,11	

Tabela 16. Concentração Inibitória (CI50%) dos extratos dos resíduos do cupuaçu pelo método do DPPH[•].

A concentração inibitória dos extratos do EPC variaram entre 69,5 µg/mL e 276,7 µg/mL. A menor concentração inibitória foi observada para o método soxhlet e a maior para o método maceração a quente. Os métodos maceração a frio, ultrassom e soxhlet apresentaram concentração inibitória com valores próximos, entretanto, a concentração de inibição observada para o método soxhlet difere significativamente das inibições observadas para os demais métodos (valor-p < 0,05).

Na figura 30 é apresentada a curva correspondente à varredura de radicais livres pelo método do DPPH[•] para a extração em soxhlet utilizando etanol/água (7:3) como solvente de extração.

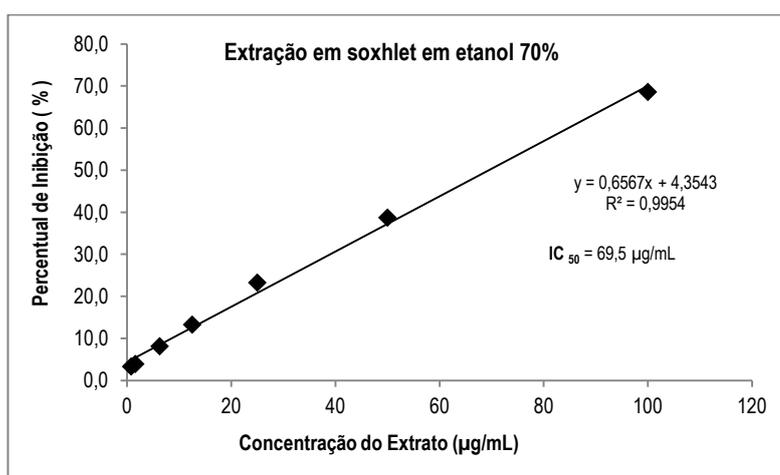


Figura 30. Curva correspondente a varredura de radicais livres pelo método do DPPH[•] para extração em soxhlet do epicarpo de *T. grandiflorum*.

Para os EEDC, somente o método soxhlet em etanol/água (7:3) apresentou percentual de inibição superior a 50% (Tabela 15) e conforme visualizado na tabela 16 verifica-se que a concentração inibitória observada para este método foi de 223,6 $\mu\text{g/mL} \pm 0,47$ que se apresentou bastante elevada, assim como a concentração inibitória observada para o método maceração a quente (276,66 $\mu\text{g/mL} \pm 2,13$) para o epicarpo do cupuaçu.

A concentração inibitória (CI_{50}) observada neste trabalho pelo método do DPPH' para os resíduos dos frutos do cupuaçu foi menor em todos os nossos extratos quando comparados com os resultados obtidos por SOUSA *et al.* (2011), sugerindo maior potencial antioxidante em nossos extratos. Em seu trabalho, obteve uma concentração inibitória correspondente a 554,87 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos hidroalcoólicos (etanol/água (8:2)). Entretanto, o método de extração utilizado foi maceração a frio por 1 hora, sob agitação constante em agitador e, em seguida centrifugação para obtenção dos extratos; além disso, utilizou material fresco para a realização de seus ensaios. A diferença entre os valores observados em nosso trabalho com os resultados obtidos por SOUSA *et al.* (2011) provavelmente poderá ser explicado pelo fato de termos trabalhado com material vegetal seco, e principalmente pela diferença do método de extração utilizado e pela composição do solvente, uma vez que a melhor concentração inibitória observada em nosso trabalho foi de 69,5 $\mu\text{g/mL}$ para o método soxhlet em etanol/água (7:3).

A concentração inibitória observada para o EEDC em nosso trabalho (223,6 $\mu\text{g/mL}$) foi inferior a concentração inibitória observada para os extratos das sementes de cacau (1,3 mg/mL) estudadas por OTHMAN *et al.* (2007) com maior atividade para sequestro de radicais livres em nossos extratos. A baixa atividade para varredura de radicais livres observada para os extratos das sementes de cacau, pode ser explicada

devido a falta de afinidade e seletividade do ensaio em relação à matriz, ou, talvez, devido ao fato de ter-se trabalhado com toda a semente, incluindo a amêndoa, que provavelmente é rica em gorduras e pode gerar interferentes durante o ensaio. Assim, pelo método do DPPH^{*} verifica-se que os resultados obtidos para os EEDC indicam maiores atividades para varredura de radicais livres em relação às sementes de cacau.

5.4. Análise dos extratos brutos por Espectrometria de Massas

A Espectrometria de Massas (EM) é uma das ferramentas de elucidação de compostos orgânicos que nos auxiliou no processo de caracterização das substâncias fenólicas presentes nos extratos do epicarpo e do endocarpo de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), um fruto amazônico de grandes perspectivas econômicas.

Os extratos brutos, tanto do EPC quanto do EDC, obtidos pelas diferentes metodologias e composição do solvente, foram avaliados por EM com o objetivo de analisar o perfil da composição química dos extratos produzidos por cada método utilizado, a fim de contribuir para a seleção do método mais adequado para a extração das substâncias fenólicas presentes nos resíduos do cupuaçu. Os espectros de massas foram obtidos todos nas mesmas condições de análises, no modo negativo de ionização $[M - H]^-$ e são apresentados nas figuras 31 e 32.

Na figura 31 são apresentados os espectros de massas das extrações do epicarpo do cupuaçu conforme as metodologias e solventes utilizados.

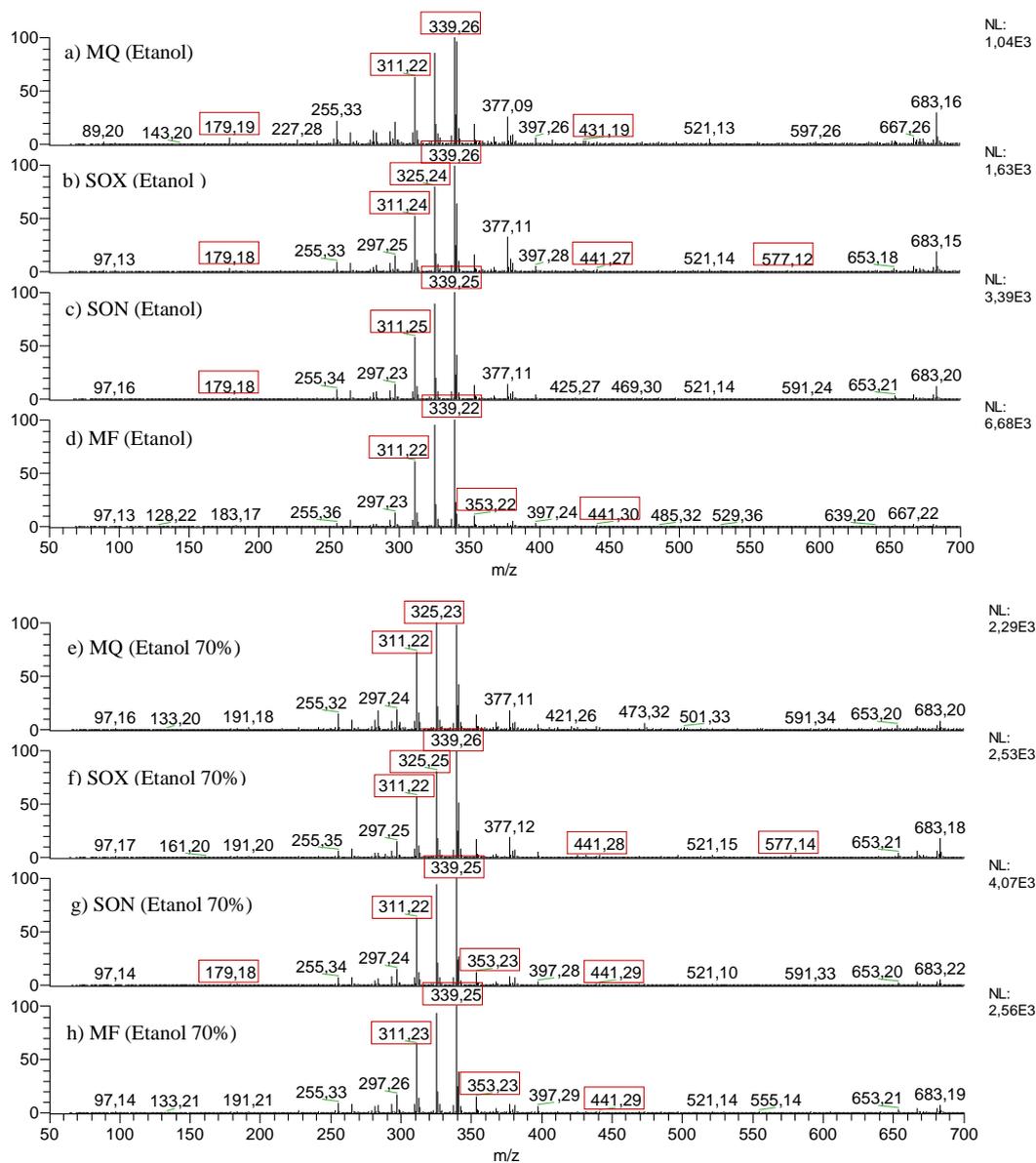


Figura 31. Perfil das extrações do epicarpo do cupuaçu por espectrometria de massas conforme as metodologias e solventes utilizados.

MQ = maceração a quente; SOX = soxhlet; SON = sonicação; MF = maceração a frio.

Os principais picos observados nos EEPC do cupuaçu foram os íons de m/z 311, 325 e 339 com abundâncias relativas superiores a 50%. De acordo com o trabalho descrito por CHEN *et al.* (2012) esses picos podem estar relacionados respectivamente com a massa dos ácidos cis-cafárico, ρ -coumaroilhexose e o ácido cafeoil-D-glicose. Os picos de m/z 179, 353, 431, 441 e 577 característicos de substâncias fenólicas

também foram observados nas diferentes extrações, mesmo com abundâncias relativas inferiores a 15%.

Nas extrações em etanol o método soxhlet apresentou maior variedade de picos característicos de substâncias fenólicas. Em contrapartida, o método maceração a frio mostrou-se menos eficiente, ao passo que poucos íons característicos de fenólicos foram observados. Nas extrações utilizando solventes hidroalcoólicos, os métodos sonicação e soxhlet foram melhores comparados com a maceração, visto que se observou maior variedade de picos característicos de fenólicos para estes métodos.

O íon de m/z 179, cuja massa pode estar relacionada com a massa do ácido caféico (KAJDŽANOSKA *et al.*, 2010) mostrou maior afinidade com o solvente etanol, uma vez que este íon foi detectado principalmente nas extrações em etanol. Comportamento similar foi observado para o íon de m/z 441 que mostrou maior afinidade com solventes hidroalcoólicos. Conforme a literatura a massa deste íon pode estar relacionado com um derivado do ácido quínico (KAJDŽANOSKA *et al.*, 2010).

De acordo com os espectros de massas verifica-se que a maior parte dos picos característicos de fenólicos foi observada nas extrações em etanol corroborando os resultados discutidos na sessão 5.2.1.2. Entretanto, conforme observado na sessão anterior, os extratos hidroalcoólicos apresentaram as maiores atividades varredora de radicais livres. Conforme discutido anteriormente, o método soxhlet combinado com etanol/água (7:3) mostrou maior eficiência em relação à extração de substâncias antioxidantes. Provavelmente a maior atividade varredora de radicais livres observada deve ser atribuída à presença do íon de m/z 577 característico de um dímero de proantocianidinas, observada apenas na extração em soxhlet tanto em etanol quanto em etanol/água (7:3).

Os resultados observados para os extratos do epicarpo na sessão 5.2.1.2 indicam que os métodos maceração a frio, ultrassom e maceração a quente, todos em etanol apresentam os maiores percentuais de fenólicos. Entretanto, conforme os espectros de massas, verifica-se que o método soxhlet em etanol apresenta maior quantidade de íons característicos de substâncias fenólicas. Esta diferença observada se deve ao fato da quantificação de fenólicos totais ter sido realizada por métodos espectrofotométricos, que são métodos colorimétricos baseados em reações químicas. Por sua vez, a espectrometria de massas é uma técnica de alta sensibilidade que possibilita a detecção de íons em concentrações baixíssimas, sendo, portanto, mais confiável.

Os espectros de massas das extrações do EDC do cupuaçu são apresentados na figura 32 conforme as metodologias e solventes utilizados. Os picos mais abundantes são os íons de m/z 311, 325 e 339, também observados nas extrações do EPC do cupuaçu. No entanto, é possível notar a presença do íon de m/z 353 em todas as extrações do endocarpo, cuja massa pode estar relacionada com a massa do ácido clorogênico (SÁNCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2003).

Em relação ao epicarpo, três novos íons foram observados nas extrações do endocarpo (m/z 283, m/z 477 e m/z 557). O íon de m/z 283 pode estar relacionado com a massa do flavonoide acacetina (JUSTESEN *et al.*, 2001), o íon de m/z 477 pode estar relacionado com a massa da quercetina-3-O-glucoronideo (KAJDZANOSKA *et al.*, 2010) e o íon de m/z 557 pode estar relacionado com a massa da teograndina II, um flavonoide glicosilado com atividade antioxidante relevante, isolado e identificado nas sementes do cupuaçu (YANG *et al.*, 2003).

É possível notar a seletividade de alguns métodos, mesmo com pequenas intensidades. O íon de m/z 477 é observado apenas na extração por soxhlet em etanol, assim como o íon de

m/z 557 é observado somente na extração por maceração a frio em etanol, além do íon de m/z 283 detectado apenas em algumas extrações.

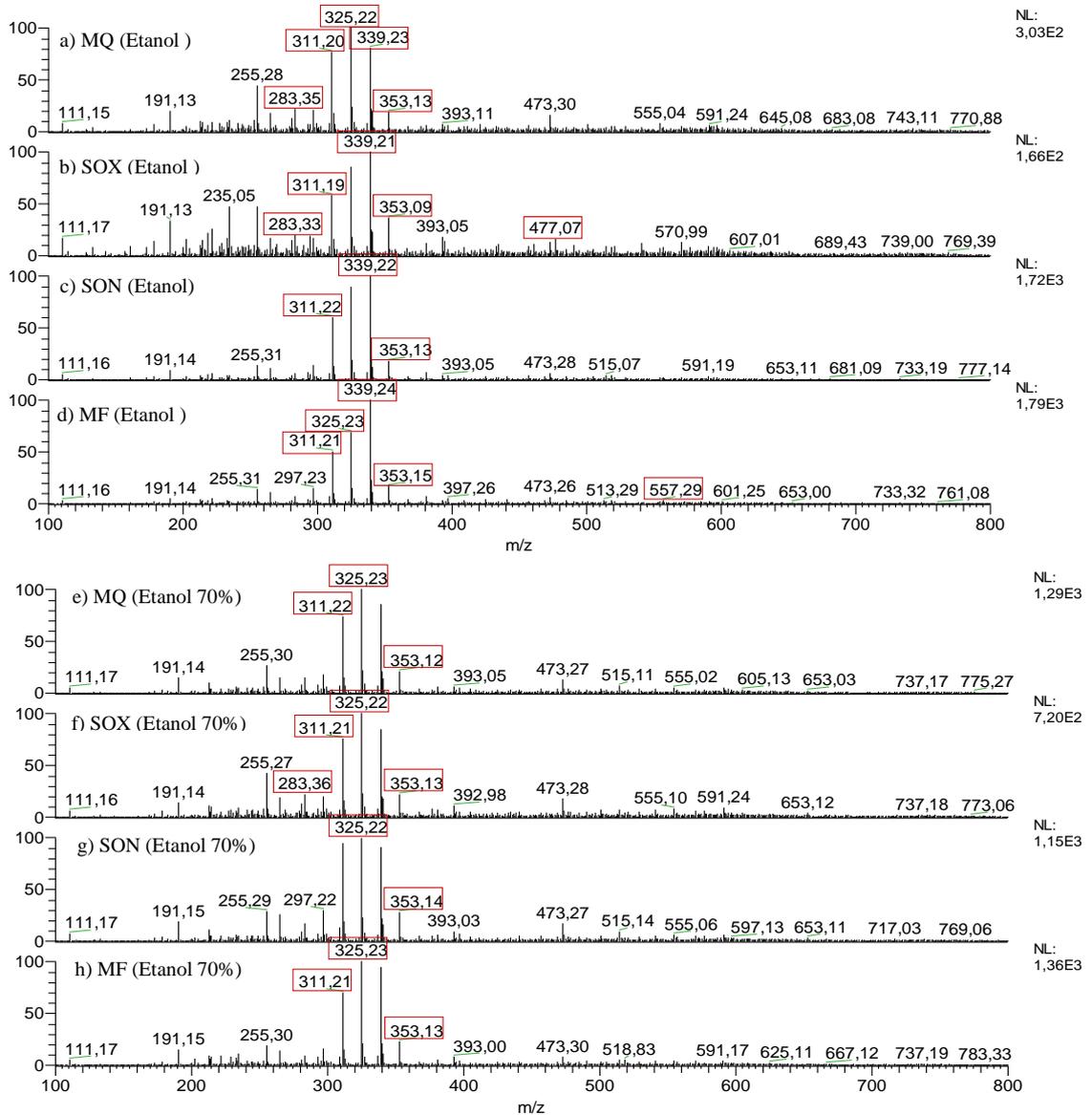
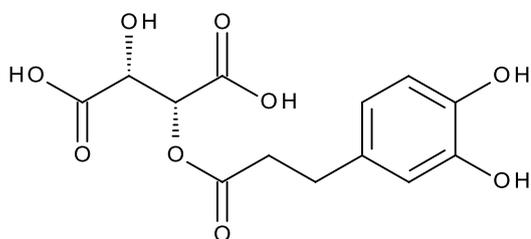


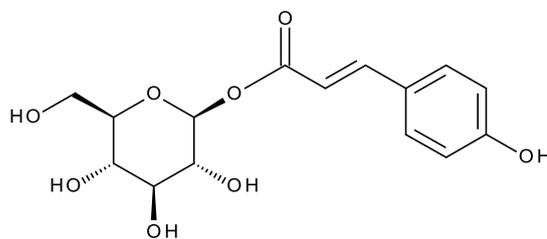
Figura 32. Perfil das extrações do endocarpo do cupuaçu por espectrometria de massas conforme as metodologias e solventes utilizados.

O perfil das extrações observado tanto para o epicarpo quanto para o endocarpo apresenta como componentes majoritários íons que indicam massas características de ácidos fenólicos (Fig. 33), corroborando os resultados observados experimentalmente onde os valores de pH inicialmente observado para as extrações foram aproximadamente entre 3 e 4. Fragmentações sucessivas foram realizadas a fim de

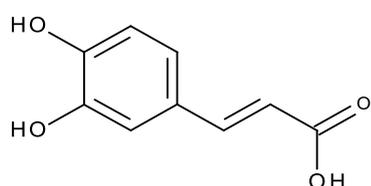
confirmar a identidade dos íons, entretanto, devido a baixa abundância relativa observada para a maioria dos picos característicos de flavonoides não foi possível obter fragmentações semelhantes ao padrão ou de acordo com a literatura.



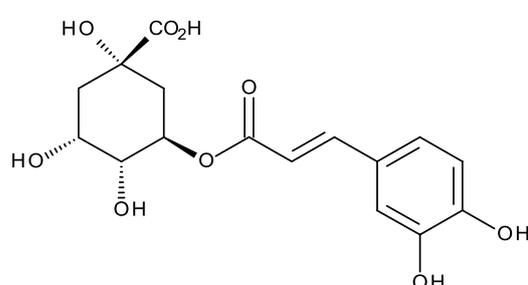
(XXV) - Ácido cis-caftárico (m/z 311)



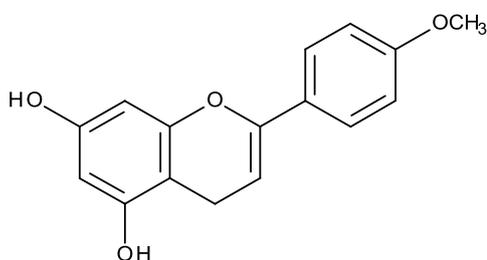
(XXVI) - Ácido-p-coumaroilhexose (m/z 325)



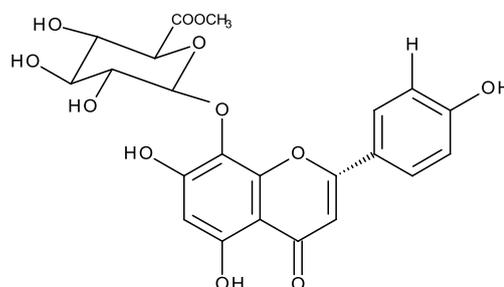
(XXVII) - Ácido caféico (m/z 179)



(XXVIII) - Ácido clorogênico (m/z 353)



(XXIX) - Acetina (m/z 283)



(XXX) - Teograndina II (m/z 557)

Figura 33. Sugestão das estruturas dos principais íons detectados por Espectrometria de Massas nas extrações do EPC e EDC do cupuaçu.

Diferentes condições de extração foram usadas, assim como a variação da composição do solvente com o único objetivo de otimizar o processo de extração e encontrar as condições ótimas para a extração das substâncias fenólicas presentes nos resíduos do cupuaçu para posterior caracterização por CLAE-UV.

Considerando todas as variáveis observadas tais como os percentuais de rendimentos, fenólicos, flavonoides e principalmente os espectros de massas e a atividade varredora de radicais livres, verifica-se que as condições mais adequadas para a extração de substâncias fenólicas tanto no epicarpo quanto no endocarpo do cupuaçu é alcançada utilizando o método soxhlet combinado com etanol/água (7:3).

5.5. Avaliação dos Extratos brutos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)

As frações das partições obtidas das condições ótimas discutidas na sessão anterior foram avaliadas por CLAE-UV. Os cromatogramas são apresentados em anexo, uma vez que não obtivemos sucesso na detecção das substâncias fenólicas por CLAE-UV. Diferentes condições cromatográficas foram experimentadas, entretanto, os íons observados não eram característicos de fenólicos e sim do componente majoritário presente nos resíduos do cupuaçu, que são discutidos nas sessões seguintes (sessão 5.6.3). Isto provavelmente pode ter ocorrido pelo fato dos compostos fenólicos apresentarem-se em pequenas concentrações nos extratos desses resíduos, sendo portanto, necessário um fracionamento para posterior análise por CLAE-UV.

5.6. Extração dos Alcaloides Purínicos ou Metilxantinas

Para a extração das metilxantinas utilizou-se quatro metodologias. A primeira metodologia utilizada foi descrita por REGINATTO *et al.* (1999). Durante o processo de extração o material vegetal (epicarpo e endocarpo) foi fervido em meio ácido por 10 minutos seguido por um processo de neutralização. Devido à solubilidade das metilxantinas em água, durante o processo de aquecimento as substâncias de interesse são extraídas e rapidamente são protonadas, uma vez que estão em meio ácido. Durante a neutralização com hidróxido de amônio (NH₄OH), teoricamente as

metilxantinas deixam sua forma iônica e assumem a forma neutra no extrato aquoso, tornando-se extraíveis por solventes orgânicos. Na figura 34 é apresentado o esquema de protonação e desprotonação das metilxantinas durante o processo de extração.

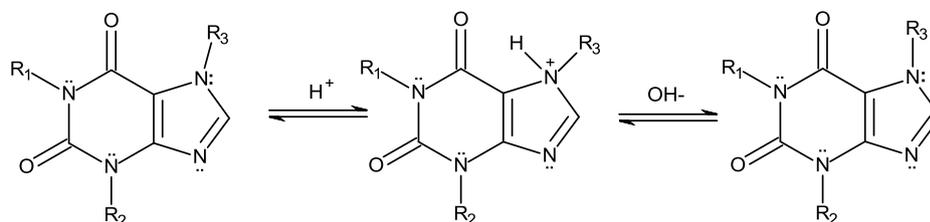


Figura 34. Esquema de protonação e desprotonação durante o processo de extração das metilxantinas na metodologia descrita por REGINATTO *et al.* (1999).

A segunda metodologia utilizada foi descrita por LI *et al.* (1990). O diferencial dessa metodologia está no fato de que antes de iniciar o processo de extração utiliza-se uma solução de acetato básico de chumbo que tem a função de eliminar os interferentes durante a extração das metilxantinas, uma vez que o chumbo possui a característica de formar complexos inorgânicos, removendo macromoléculas tais como as proteínas e outras substâncias que não são do nosso interesse, e dessa maneira torna a extração mais específica. E, além disso, ressaltam a importância da extração das metilxantinas cafeína e teobromina em diferentes fases orgânicas.

A terceira metodologia utilizada é bastante aplicada em laboratório de fitoquímica, ela faz uso do carbonato de cálcio em pó antes de iniciar o processo de extração das metilxantinas, com o mesmo propósito de eliminar os interferentes no decorrer da extração. A quarta metodologia, descrita por GIORDANI *et al.* (2008), é a tradicional partição ácido-base utilizada para extração de alcaloides. Assim como as demais metodologias também ocorre o processo de protonação e desprotonação das metilxantinas. O princípio dessa metodologia é bem semelhante ao da metodologia descrita por REGINATTO *et al.* (1999) diferindo apenas na etapa do aquecimento. Com exceção da quarta metodologia, todos os métodos utilizados são realizados em

meio aquoso e sob aquecimento, com intervalos de tempo que variam entre 5 e 30 minutos, seguidos do processo de protonação e desprotonação, para finalmente extrair as metilxantinas.

5.6.1. Análise das Extrações das Metilxantinas por Espectrometria de Massas

Com o objetivo de caracterizar as metilxantinas, fez-se uma varredura inicial por espectrometria de massas através do modo “full scan” em uma ampla faixa de massas no modo positivo de ionização. Entretanto, não foi possível visualizar nenhum pico relacionado às metilxantinas. A partir disso, delimitou-se uma região de massas específicas para fazer uma varredura de íons mais direcionada por monitoramento seletivo de íons (SIM), objetivando a massa das principais metilxantinas, como a cafeína (XXXI), (m/z 195), a teobromina (XXXII), (m/z 181), a teofilina (XXXIII), (m/z 181) e a teacrina (XXXIV), (m/z 225), (Fig. 35).

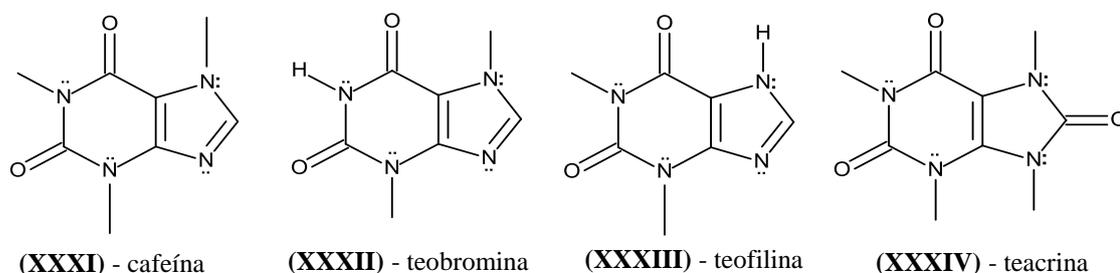


Figura 35. Principais metilxantinas.

A tabela 17 mostra o resumo dos íons das principais metilxantinas observadas nos espectros de massas apresentados nas figuras 36 e 37. O pico de m/z 181 pode estar relacionado tanto com a teobromina quanto com a teofilina, uma vez que são isômeros constitucionais, diferindo apenas na posição de uma metila, ambos com a massa molar correspondente a 180. O pico de m/z 195 pode estar relacionado com a cafeína, uma vez que sua massa molar é 194 e o pico de m/z 225 de acordo com LU *et*

al. (2009) pode estar relacionado com a metilxantina teacrina. Os picos característicos das metilxantinas foram observados em todos os métodos de extração utilizados, tanto no epicarpo quanto no endocarpo do cupuaçu apresentando apenas diferenças na abundância relativas dos íons (%).

Abundância Relativa dos íons (%)						
Métodos	<i>m/z</i> 181		<i>m/z</i> 195		<i>m/z</i> 225	
	Epicarpo	Endocarpo	Epicarpo	Endocarpo	Epicarpo	Endocarpo
1	62	10	67	2	30	3
3	100	6	24	6	52	100
4	4	3	6	1	13	5

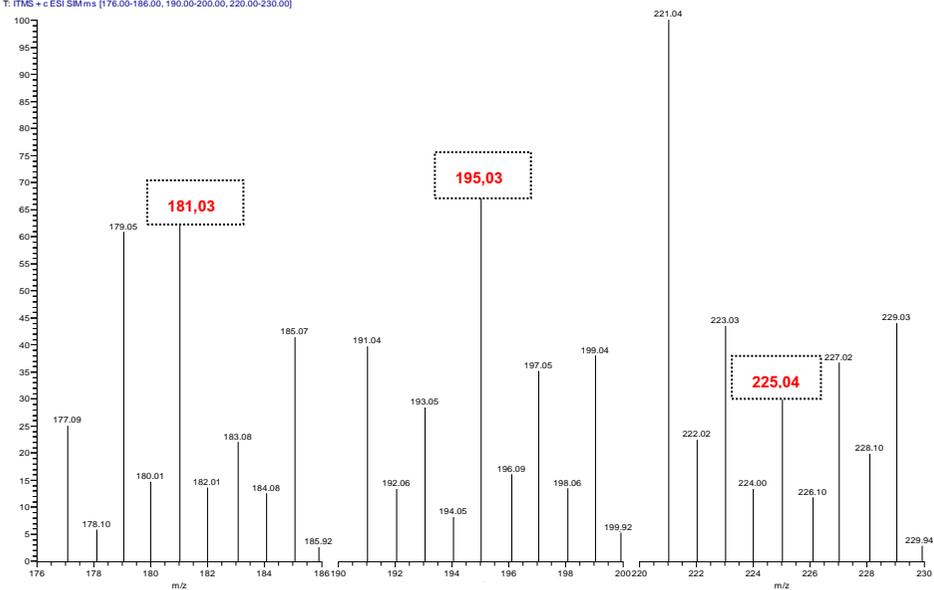
Tabela 17. Abundância relativa (%) dos íons das principais metilxantinas observadas nos espectros de massas dos extratos do epicarpo e endocarpo do cupuaçu.

As metodologias (2 e 3) em que foram utilizados reagentes específicos para remover os interferentes no processo de extração das metilxantinas foram aquelas que apresentaram as melhores extrações, como pode ser verificado pelos perfis dos extratos realizados por espectrometria de massas apresentados nas figuras 36 e 37. O método 3 foi o mais adequado para as extrações das metilxantinas tanto no epicarpo quanto no endocarpo, ao passo que apresenta as maiores abundâncias relativas dos íons *m/z* 181, *m/z* 195 e *m/z* 225. Entretanto, o tradicional método ácido-base utilizado para as extrações de alcaloides mostrou-se inadequado para os resíduos do cupuaçu.

Com exceção do íon *m/z* 225 no método 3, os demais picos observados para os extratos do epicarpo apresentaram maiores abundâncias relativas (%) em relação ao endocarpo. Isto pode ter ocorrido por duas razões: pode ser que nos extratos do epicarpo exista uma quantidade maior de substâncias ou a ionização não foi adequada para os extratos do endocarpo. A ionização das substâncias está relacionada com vários fatores, dentre eles a fonte de ionização (ESI ou APCI) que por sua vez está relacionada com a composição da matriz. Um dos fatores que pode ter contribuído para as baixas

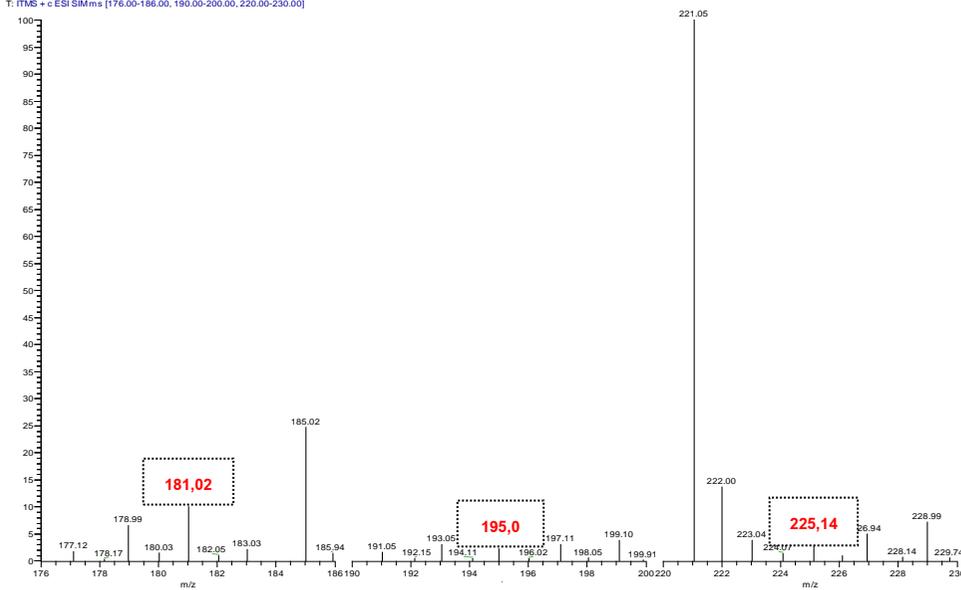
ionizações observadas no endocarpo pode ser o fato da matriz ser bastante gordurosa, devido o contato muito próximo com as amêndoas e mesmo que os extratos tenham sido desengraxados, ainda podem existir resquícios de substâncias apolares que possam atrapalhar a ionização das metilxantinas presentes nos extratos do endocarpo do cupuaçu.

milena_amostras_SIM_130215120052 #82 RT: 2.58 Av: 1 NL: 7.54E2
T: ITMS + c ESI SIM ms [176.00-186.00, 190.00-200.00, 220.00-230.00]



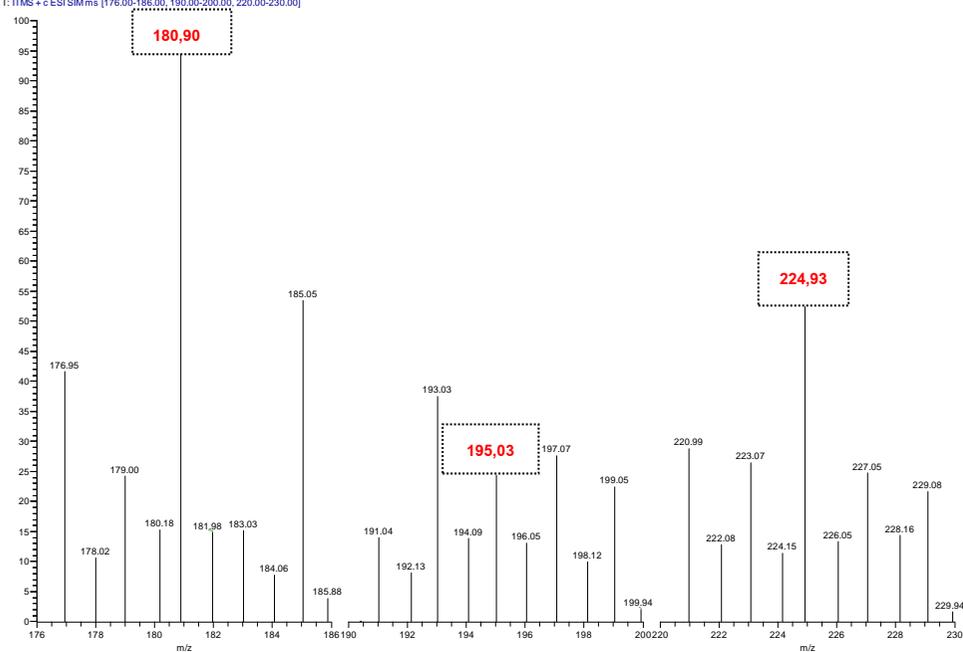
a) Epicarpo: metodologia 1

milena_amostras_SIM_130215120052 #42 RT: 1.31 Av: 1 NL: 7.52E3
T: ITMS + c ESI SIM ms [176.00-186.00, 190.00-200.00, 220.00-230.00]



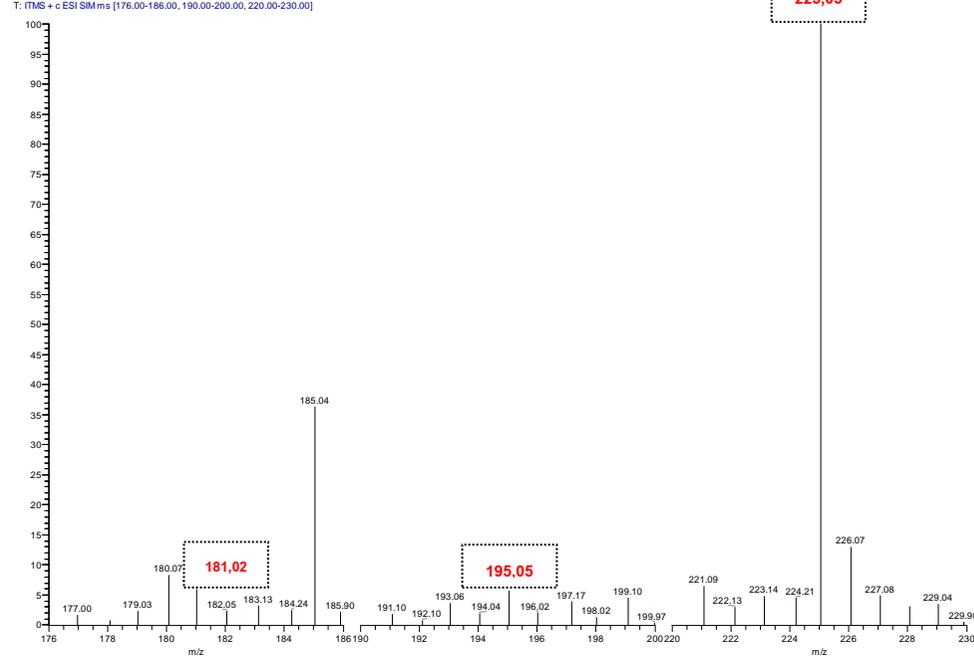
b) Endocarpo: metodologia 1

milena_amostras_SIM_130215120052 #117-130 RT: 3.70-4.11 Av: 14 NL: 4.79E2
T: ITMS + c ESI SIM ms [176.00-186.00, 190.00-200.00, 220.00-230.00]



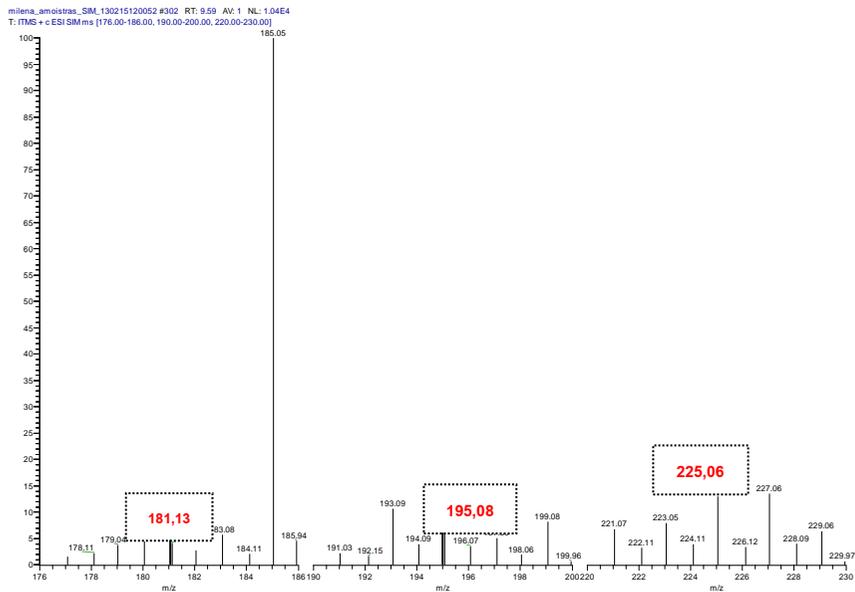
c) Epicarpo: metodologia 3

milena_amostras_SIM_130215120052 #153 RT: 4.85 Av: 1 NL: 3.51E3
T: ITMS + c ESI SIM ms [176.00-186.00, 190.00-200.00, 220.00-230.00]

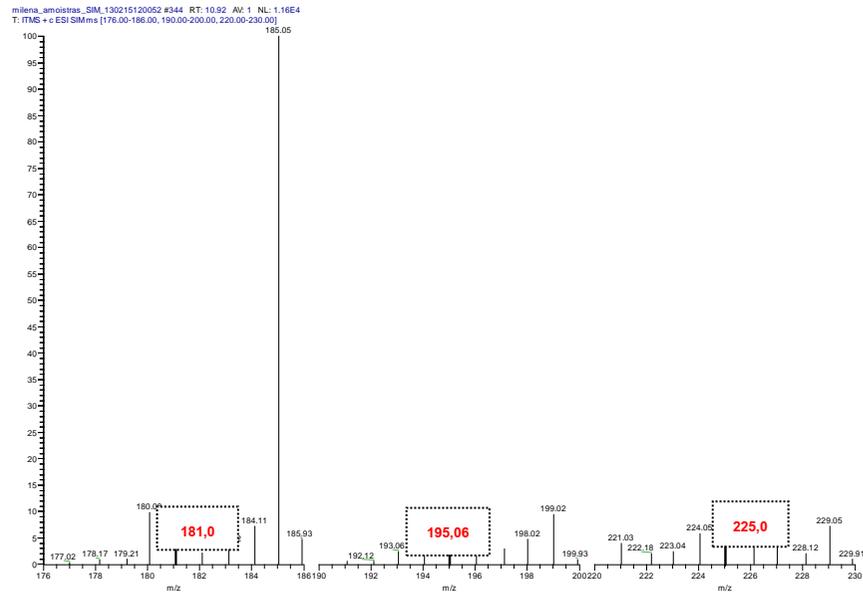


d) Endocarpo: metodologia 3

Figura 36. Espectro de massas das extrações das metilxantinas do epicarpo e endocarpo de *T. grandiflorum*.



e) Epicarpo: metodologia 4



f) Endocarpo: metodologia 4

Figura 37. Espectro de massas das extrações das metilxantinas do epicarpo e endocarpo de *T. grandiflorum*.

5.6.2. Fragmentação dos Íons m/z 195, m/z 181 e m/z 225

A autenticidade dos picos observados por espectrometria de massas foi realizada através da fragmentação m/s dos principais íons e comparados com seus respectivos padrões. Todas as fragmentações foram realizadas nas mesmas condições, no modo positivo de ionização utilizando a fonte APCI. Conforme observado nas figuras 36 e 37 o íon de m/z 195 característico da cafeína foi observado em todos os métodos utilizados. Entretanto, conforme a fragmentação do padrão da cafeína (Fig. 38a) somente a metodologia 3 apresentou o mesmo padrão de fragmentação, tanto nos extratos do epicarpo quanto nos extratos do endocarpo (Fig. 38b e Fig. 38c), mostrando a eficiência e seletividade do método, sugerindo a presença da cafeína nos resíduos do cupuaçu.

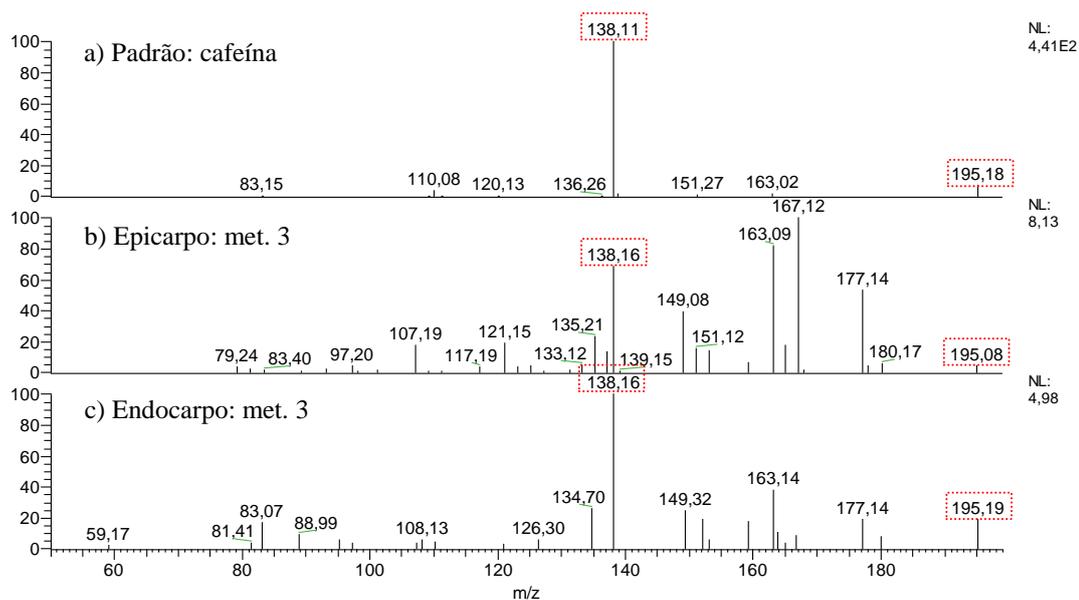


Figura 38. Fragmentos do íon m/z 195 nas extrações das metilxantinas em fonte APCI.

Na figura 39 é apresentada a fragmentação dos padrões de teobromina (m/z 181) e teofilina (m/z 181). Por comparação aos espectros dos padrões nenhuma das metodologias utilizadas apresentam fragmentos semelhantes aos padrões, sugerindo a ausência da teobromina e da teofilina nos extratos dos resíduos do cupuaçu. Portanto, os

picos m/z 181 observados inicialmente nas extrações podem estar relacionados a outras substâncias que apresentem massas molares correspondentes a 181.

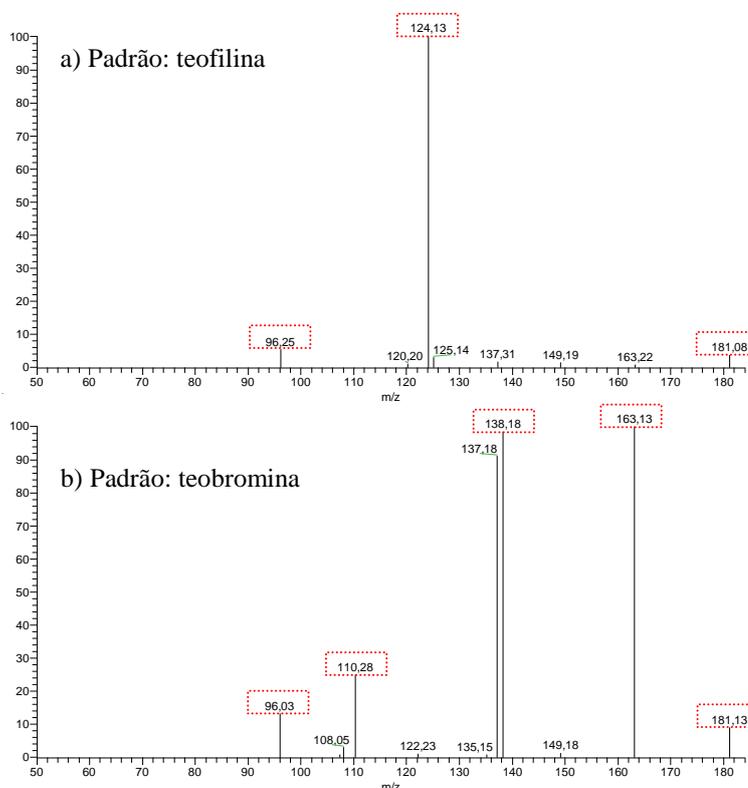


Figura 39. Fragmentos dos padrões de teobromina (b) e teofilina (a) em fonte APCI.

Na figura 40 é apresentada a fragmentação do padrão de teacrina (m/z 225) e do pico correspondente a esse íon nas diferentes metodologias utilizadas para as extrações das metilxantinas. Por comparação ao padrão (Fig. 40a) é possível notar a presença do íon m/z 225 em todas as extrações do epicarpo e do endocarpo. Entretanto, verifica-se que independente da metodologia utilizada este íon apresenta-se como componente majoritário nos extratos do endocarpo. Assim, as características das fragmentações do íon m/z 225 por comparação ao padrão sugere que este íon pode estar relacionado com a metilxantina teacrina.

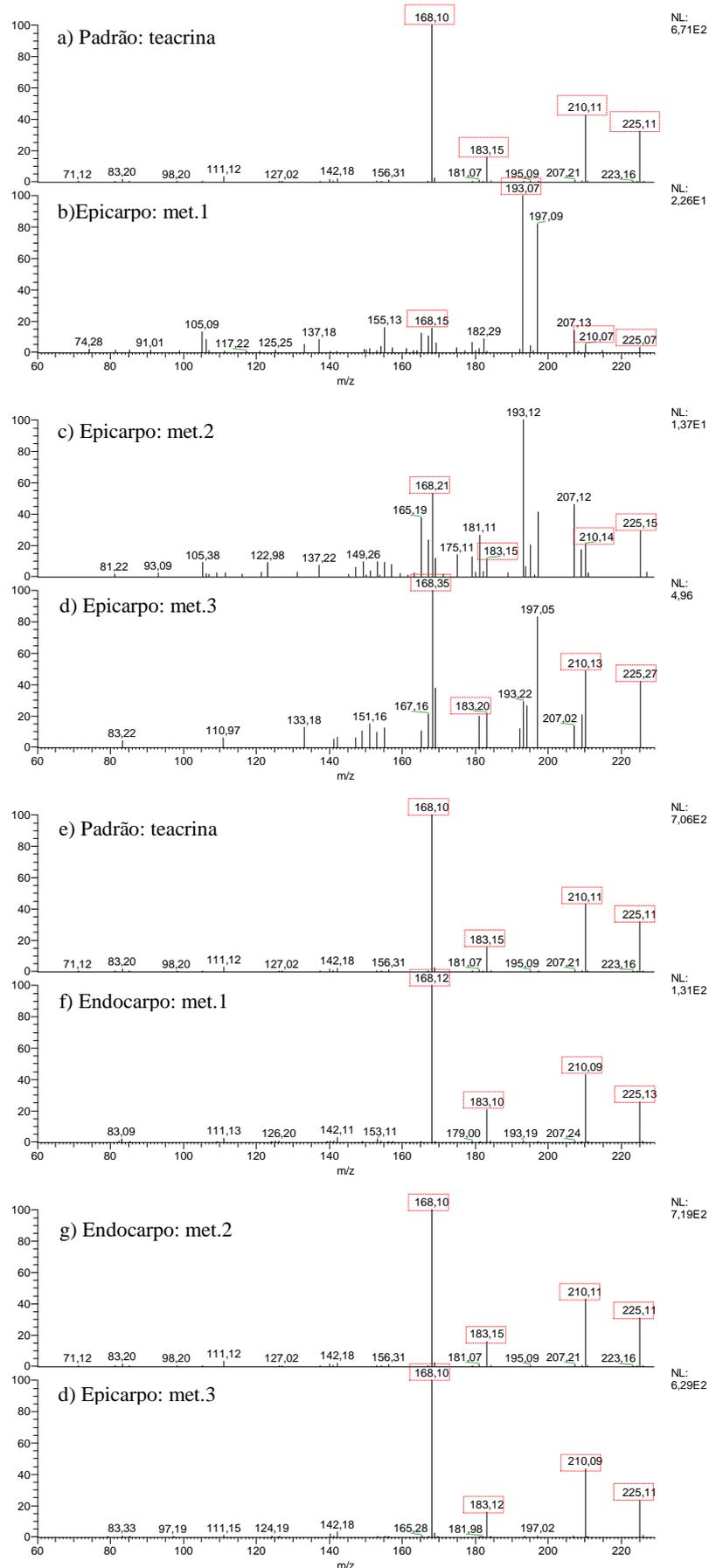


Figura 40. Fragmentos do íon m/z 225 nas extrações das metilxantinas em fonte APCI.

5.6.3. Avaliação dos Extratos das Metilxantinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)

O cromatograma da mistura dos padrões das metilxantinas teobromina (A), teofilina (B) e cafeína (C) realizado por CLAE-UV é apresentado na figura 41. As análises foram realizadas em programação com corrida inferior a 15 minutos. Os tempos de retenção observados para as metilxantinas, em minutos, foram 11,18 para a teobromina, 12,28 para a teofilina e 13,77 para a cafeína.

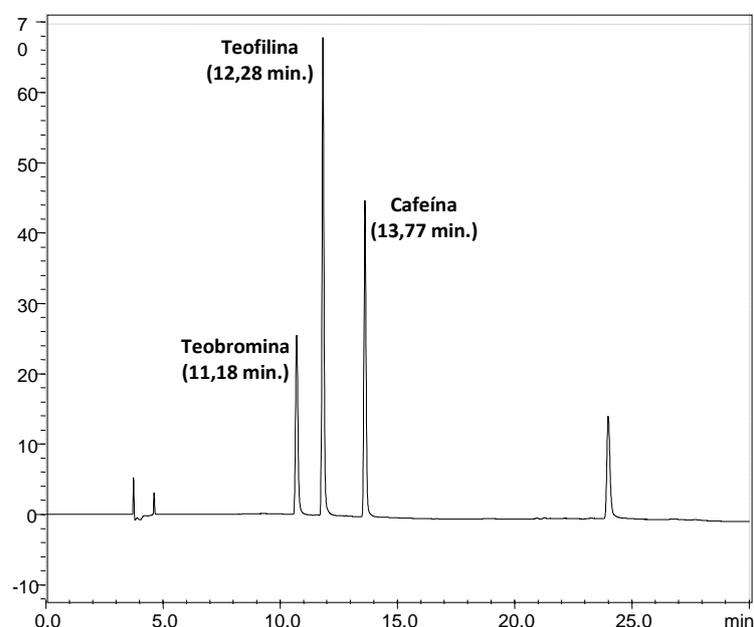


Figura 41. Cromatograma dos padrões das metilxantinas teobromina (A), teofilina (B) e cafeína (C).

O tempo de retenção obtido em nosso trabalho para os padrões das metilxantinas cafeína, teobromina e teofilina foram melhores do que os tempos de retenção descritos na literatura (MARX & MAIA, 1991; LU *et al.*, 2009; PEREIRA-CARO *et al.*, 2013) ao passo que obtivemos menor tempo de análise e melhor resolução dos picos.

MARX & MAIA (1991) investigando as sementes de várias espécies de *Theobroma* obteve em sua mistura de padrões um tempo de retenção de aproximadamente 16,0 min. para a cafeína, 11,5 min. para a teobromina e 13,0 min.

para a teofilina. LU *et al.* (2009) fazendo estudo de caracterização química nos extratos das folhas de de *Camellia assamica* var. *Kucha*, obteve um tempo de retenção de 30,5 min. para a cafeína e 17,3 min. para a teobromina. PEREIRA-CARO *et al.* (2013) investigando os extratos das sementes de *T. cacao* em vários estágios de maturação obteve um tempo de retenção de 11,0 min. para a teobromina e 25,3 min. para a cafeína.

No entanto, ARAGÃO *et al.* (2009) avaliaram as melhores condições cromatográficas, tais como a força de eluição da fase móvel, o efeito da acidez e o tempo de análise, a fim de se obter uma boa resolução e separação dos picos dos padrões das metilxantinas. Na mistura dos padrões obteve um tempo de retenção de 5,52 min. para a cafeína, 2,88 min. para a teobromina e 3,68 min. para teofilina, sendo portanto, melhores do que os tempos de retenção obtidos em nosso trabalho.

Considerando a mesma fase estacionária (fase reversa), as pequenas variações observadas no tempo de retenção das metilxantinas em relação aos trabalhos descritos por MARX & MAIA (1991), ARAGÃO *et al.* (2009), LU *et al.* (2009) e PEREIRA-CARO *et al.*(2013), podem estar relacionadas com a força de eluição da fase móvel, visto que a fase móvel em cromatografia líquida desempenha um papel excepcionalmente importante, ao passo que participa tanto do processo de eluição quanto do processo de separação das substâncias de interesse.

Na figura 42 são apresentados os cromatogramas das extrações das metilxantinas para o endocarpo do cupuaçu conforme as metodologias utilizadas.

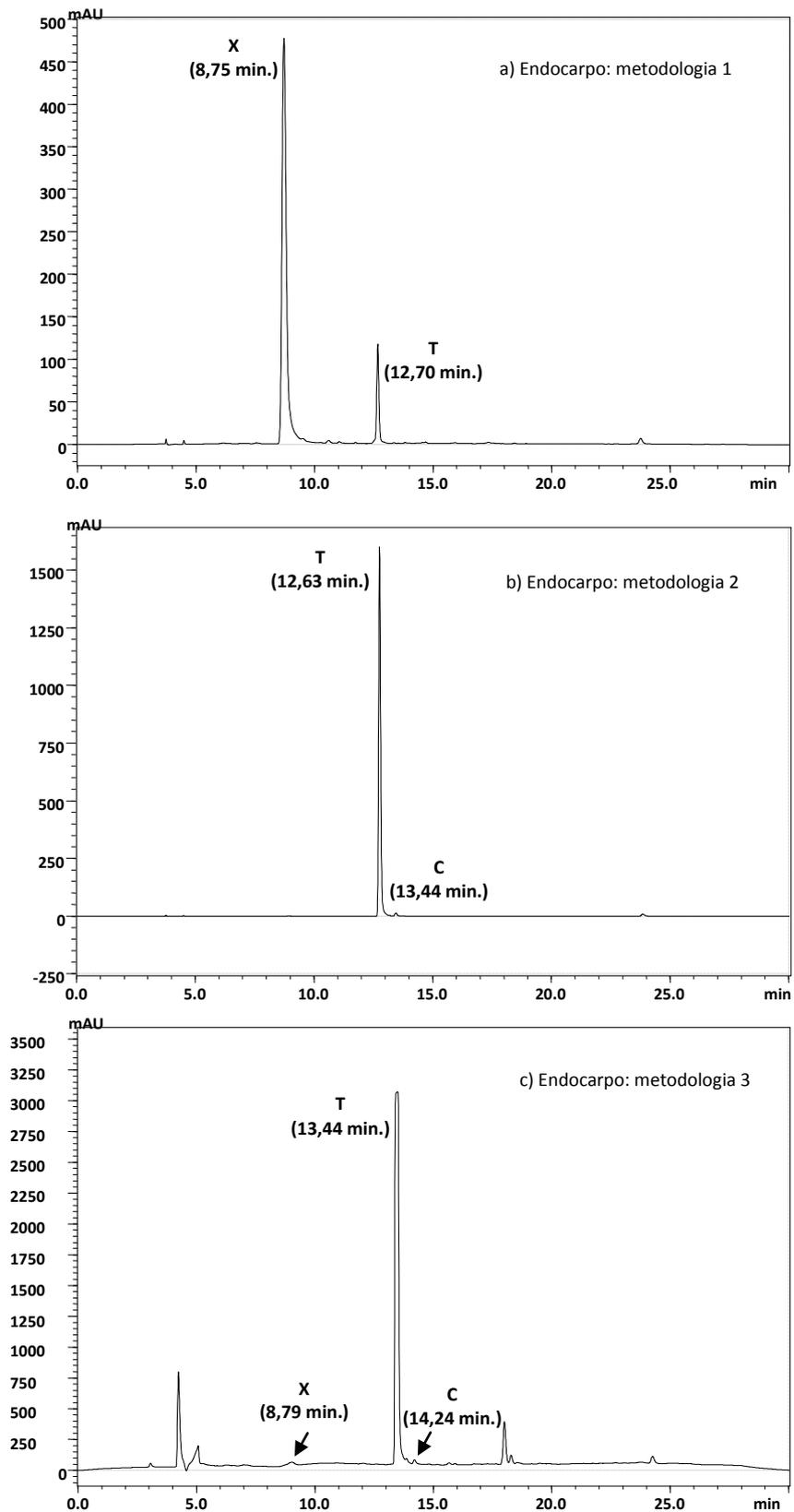


Figura 42. Cromatogramas das extrações do endocarpo do cupuaçu por diferentes metodologias de extração. Pico C = cafeína; pico T = teacrina; pico X = pico não identificado.

Por comparação com os padrões, baseado em seus tempos de retenção (Fig. 41) é possível notar a ausência dos picos das metilxantinas teobromina e teofilina e a presença do pico característico da cafeína (Pico C). É possível notar pequenas variações no tempo de retenção dos picos das substâncias avaliadas nas diferentes metodologias de extração, no entanto, variações significativas são observadas aqueles correspondentes à terceira metodologia. Fato este que pode estar relacionado com aumento da acidez da fase móvel, uma vez que a análise cromatográfica para esta metodologia foi realizada em dias posteriores.

As informações obtidas pelo perfil dos extratos realizados por EM, a fragmentações do íon de m/z 195, a comparação do tempo de retenção com o padrão da cafeína e os espectros de U. V. com absorção característica das metilxantinas (270nm) (Fig. 43) indicam a presença da cafeína nos extratos do endocarpo do cupuaçu.

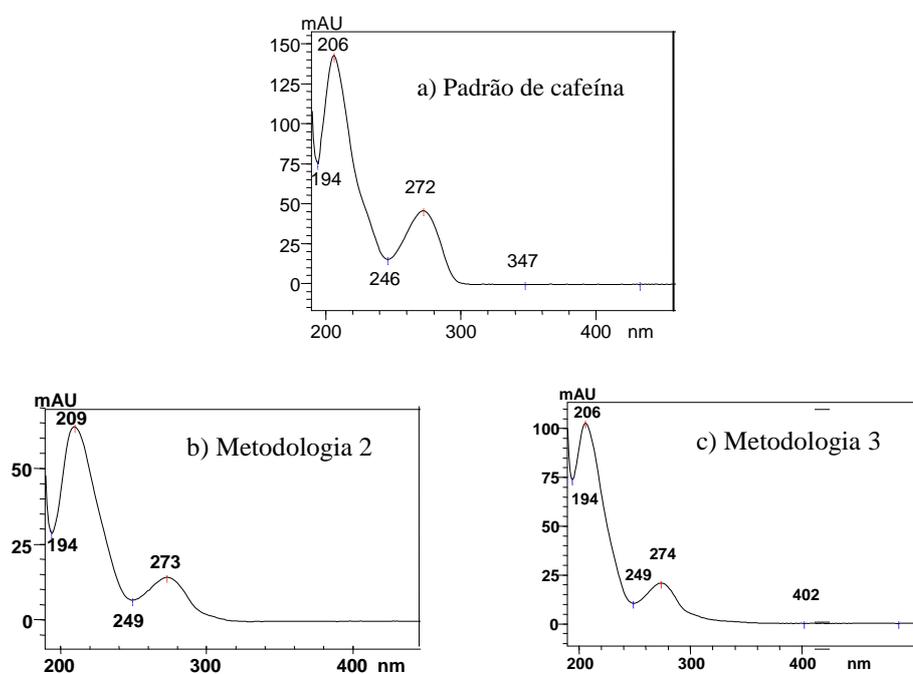


Figura 43. Espectros de Ultravioleta do pico C (cafeína) nas diferentes metodologias utilizadas.

VASCONCELOS *et al.* (1975) e HAMMERSTONE *et al.* (1994) usando técnicas de extração e identificação distintas, isolaram e identificaram no endocarpo do cupuaçu, uma substância com características estruturais semelhantes ao pico T, chamada de teacrina (1, 3, 7, 9 - tetrametilurato). Os espectros de ultravioleta observados para esses picos (Fig. 44) são característicos de xantinas metiladas em 9. Conforme CAVALIERI *et al.* (1954) além da absorção em aproximadamente 270nm, xantinas metiladas em 9 apresentam uma banda de absorção secundária em torno de 240nm. Portanto, as informações obtidas em nosso trabalho pelos espectros de massas somados aos espectros de ultravioleta e o tempo de retenção desses picos sugere a presença da teacrina, uma metilxantina metilada na posição 9, cuja massa é 224.

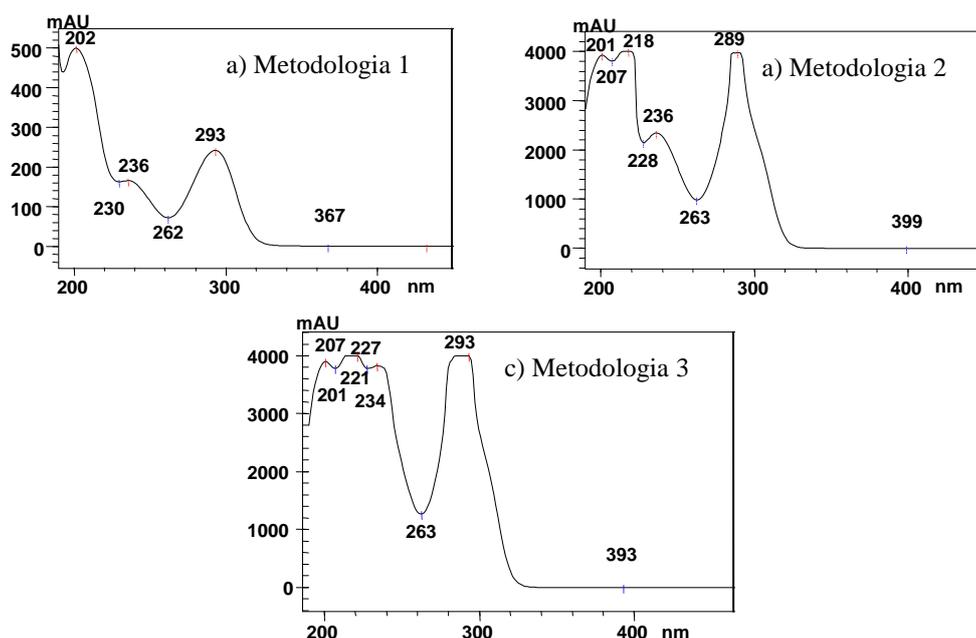


Figura 44. Espectros de Ultravioleta do pico T (teacrina) nas diferentes metodologias utilizadas.

Entretanto, a presença da cafeína detectada no endocarpo do cupuaçu em nosso estudo discorda os resultados apresentados por VASCONCELOS *et al.* (1975), MARX & MAIA (1991) e HAMMERSTONE *et al.* (1994), que constataram total

ausência da cafeína e da teobromina em seus estudos, considerando a teacrina como único e exclusivo componente do endocarpo do cupuaçu.

Além dos picos característicos da cafeína e da teacrina, o pico X observado nas metodologias 1 e 3 apresentou-se como componente majoritário no método 1 e como componente minoritário no método 3. Seus espectros de absorção no ultravioleta (Fig. 45) são característicos de metilxantinas, sugerindo a presença dessa classe ou de derivados de xantinas.

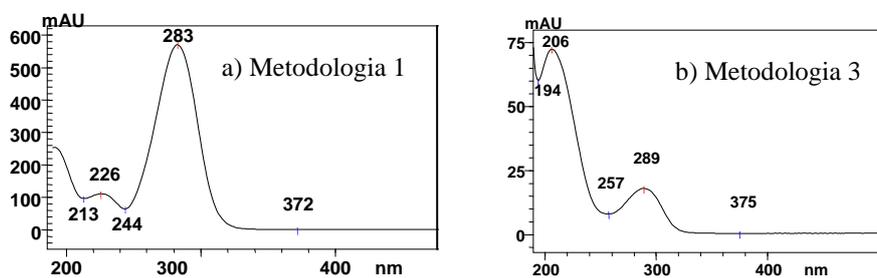


Figura 45. Espectros de Ultravioleta do pico X (pico não identificado) nas diferentes metodologias

Na figura 46 é apresentado o espectro de massas do pico X no modo positivo de ionização $[M+H]^+$. Conforme o espectro abaixo verifica-se que trata-se de uma substância com massa molar de 140 que apresenta a perda de dois fragmentos: o primeiro fragmento pode estar relacionado com a saída do grupo metileno ($-CH_2$) e o segundo fragmento pode estar relacionado com a perda de uma molécula de água (H_2O). Entretanto, são apenas suposições, ao passo que trata-se de um derivado de xantinas, há possibilidades da ocorrência desses fragmentos. No entanto, as informações obtidas foram insuficientes para identifica a molécula relacionada a esse pico.

Observando os cromatogramas apresentados na figura 42 verifica-se a importância da extração, ao passo que as três metodologias utilizadas apresentaram perfis distintos, visto que, na metodologia 1 o componente majoritário foi representado pelo pico X e nas metodologias 2 e 3 o componente majoritário foi representado pelo

pico T. A metodologia 3 extraiu maior variedade de metilxantinas, a metodologia 1 foi mais específica e a metodologia 2 foi a mais seletiva.

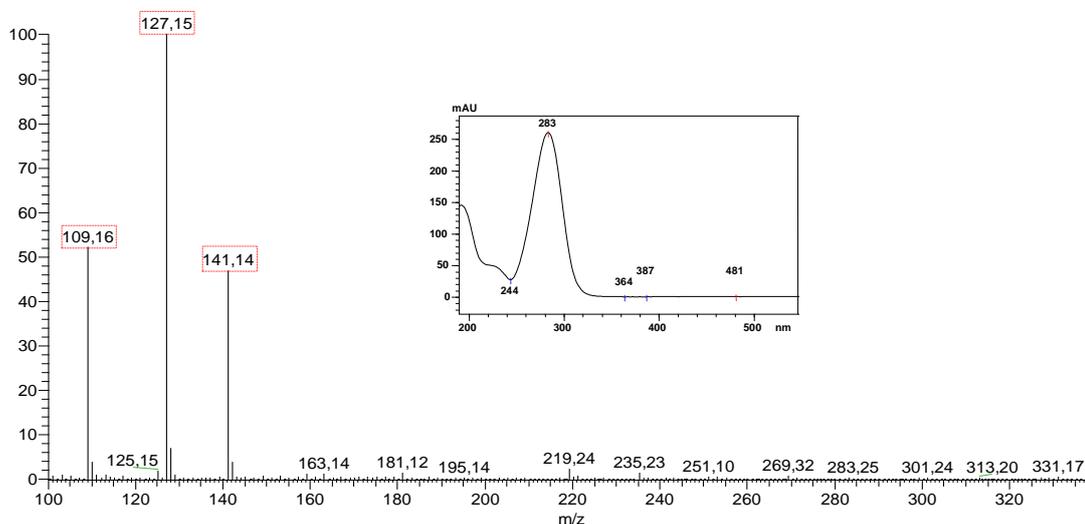


Figura 46. Espectro de massas do pico X obtido em fonte APCI no modo positivo de ionização $[M+H]^+$ e seu espectro de U.V.

Na figura 47 são apresentados os cromatogramas das extrações das metilxantinas para o epicarpo do cupuaçu conforme as metodologias utilizadas. Por comparação com os padrões baseado em seus tempos de retenção (Fig. 41) e com os espectros de U.V. é possível notar, mesmo em pequenas concentrações a presença da cafeína (Pico C) em todas as metodologias utilizadas. E, por comparação com os cromatogramas do endocarpo verifica-se a presença da teacrina (Pico T) nas metodologias 1 e 2. O pico X conforme discutido anteriormente é característico de xantinas ou de seus derivados, sendo observado somente no método 1 apresentando-se como componente majoritário (Fig. 47a).

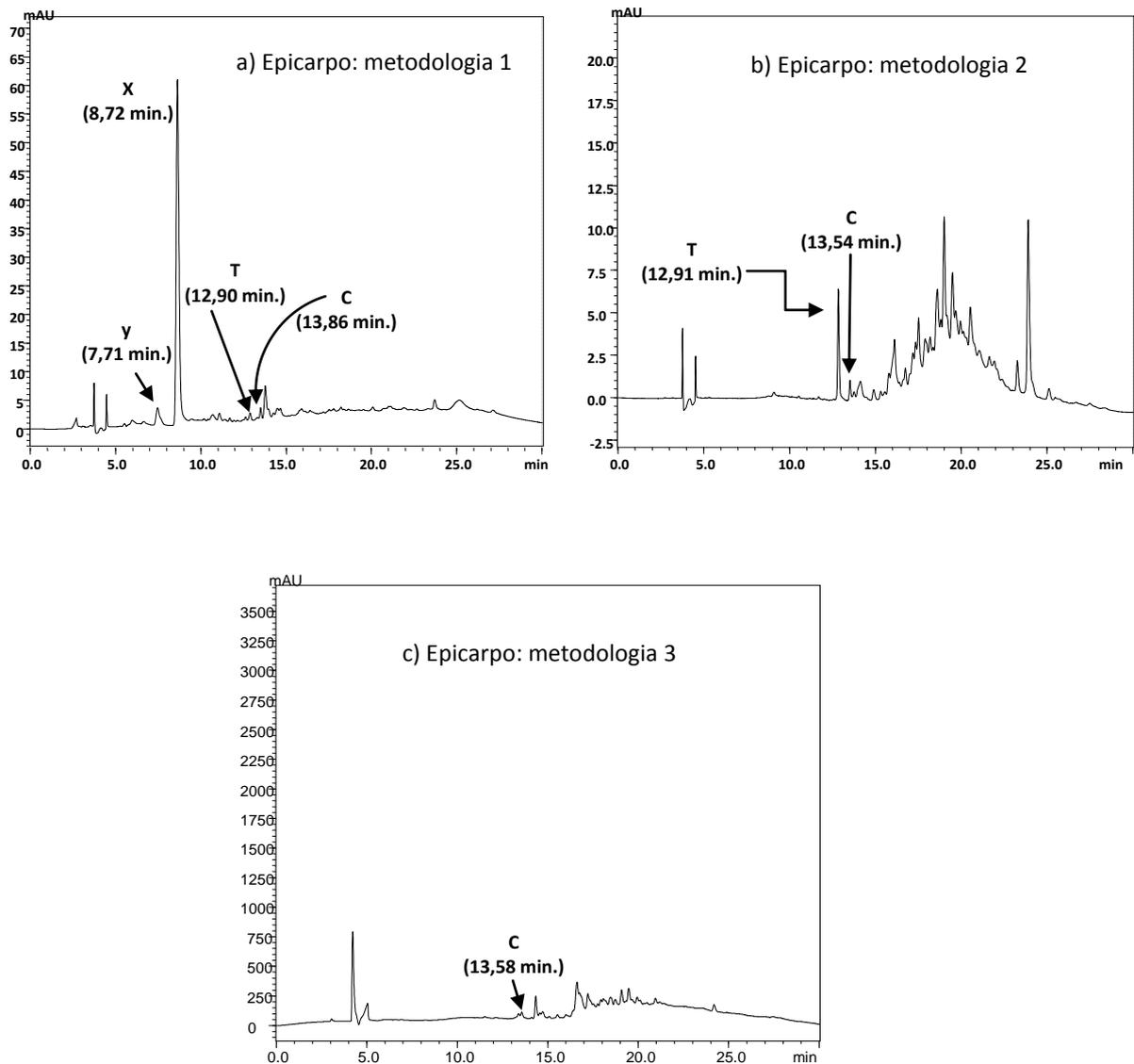


Figura 47. Cromatogramas das extrações do epicarpo do cupuaçu por diferentes metodologias de extração. Pico C = cafeína; pico T = teacrina; pico X = pico não identificado e pico Y = pico não identificado.

Além do pico X não identificado, observou-se a presença do pico Y na metodologia 1 com espectros de massas e U.V. apresentados na figura 48. Conforme o espectro de massa desse pico é possível notar as mesmas perdas de massas observadas para o pico X, mostrando pequenas semelhanças entre ambos.

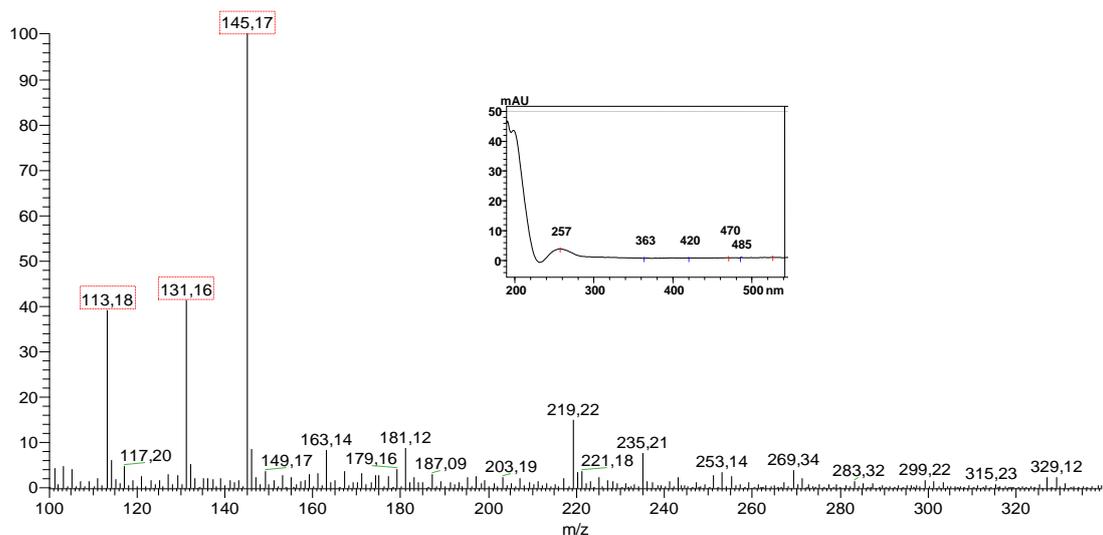


Figura 48. Espectro de massas do pico Y obtido em fonte APCI no modo positivo de ionização $[M+H]^+$ e seu espectro de U.V.

As extrações realizadas para o epicarpo (Fig.47) apresentaram perfis cromatográficos diferentes conforme as metodologias utilizadas. O método 1 mostrou-se mais eficiente para a extração da substância representada pelo pico X, assim como o método 2 para a extração da teacrina (Pico T), esse comportamento foi observado tanto para as extrações do endocarpo quanto do epicarpo. Apesar de não ter-se realizado a quantificação das substâncias por CLAE, verifica-se que os componentes observados no epicarpo apresentam-se em concentração bem inferiores em relação ao endocarpo do cupuaçu.

5.6.4. Identificação da molécula da teacrina por Ressonância Magnética Nuclear

Devido o grau de pureza e a seletividade observada para a extração do endocarpo pela metodologia 2, análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) e Carbono (RMN ^{13}C) foram realizadas para esse extrato com o propósito de confirmar a identidade do pico majoritário observado na figura 42b. No espectro de RMN 1H (Fig. 49) são observados cinco sinais ($\delta_{H1} = 3,36$; $\delta_{H2} = 3,57$; $\delta_{H3} = 3,62$; $\delta_{H4} = 3,72$; $\delta_{H5} = 7,26$). Conforme SILVERSTEIN *et al.*(2007) o δ_5 é

característico do solvente utilizado (CDCl_3), representado por um pequeno singlete. Os demais deslocamentos observados representam ambientes químicos diferentes, característicos de hidrogênios de compostos alifáticos (provavelmente do grupo metila), sugerindo a presença de quatro tipos de hidrogênios distintos na molécula. Conforme a área dos sinais observados é possível notar a presença de doze átomos de hidrogênios, sendo três hidrogênio para cada ambiente químico (A, B, C e D).

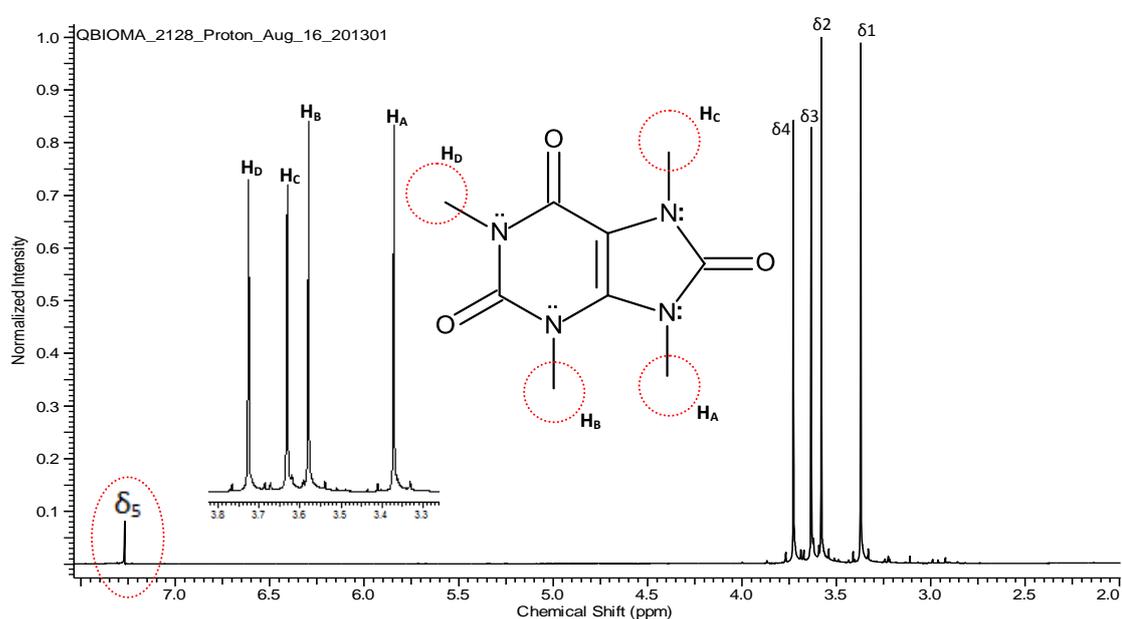


Figura 49. Espectro de RMN ^1H da extração das metilxantinas obtido pela metodologia 2.

No espectro de RMN ^{13}C (Fig. 50) são observados a presença de 10 sinais, onde o mais intenso ($\delta_5 = 78,0$), característico do solvente utilizado é representado por tripleto (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Os deslocamentos $\delta\text{C}_1=28,50$, $\delta\text{C}_2= 29,61$, $\delta\text{C}_3=30,88$ e $\delta\text{C}_4=31,93$ são característicos de carbonos metílicos, localizado na região mais protegida do espectro. E, cinco sinais característicos de carbono quaternário $\delta\text{C}_6=99,73$ (C=C), $\delta\text{C}_7=135,82$ (C=C), $\delta\text{C}_8= 151,04$ (C=O), $\delta\text{C}_9=152,26$ (C=O) e $\delta\text{C}_{10}=153,85$ (C=O) foram observados.

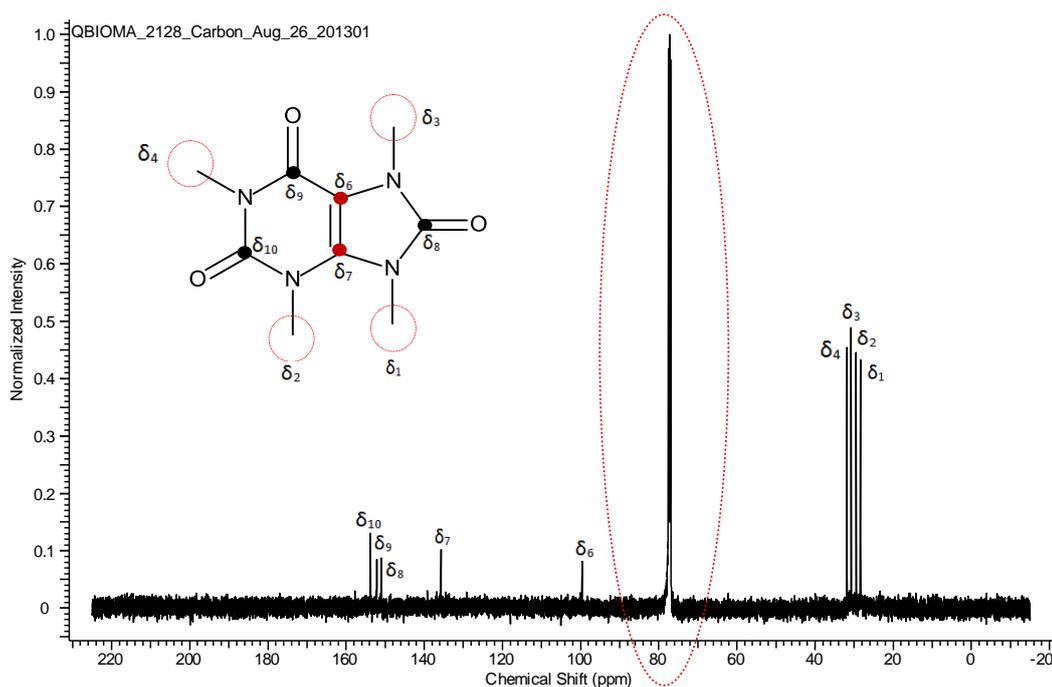


Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C do extrato das metilxantinas obtido pela metodologia 2.

As informações obtidas pelos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C estão de acordo com a estrutura proposta para a molécula da teacrina e conforme a descrição na literatura (HAMMERSTONE *et al.*, 1994). Os doze átomos de hidrogênios distribuídos em quatro ambientes químicos diferentes são observados assim como os carbonos característicos das metilas. Os demais sinais de carbonos observados, característicos de carbono quaternário apresentam os maiores deslocamentos devido ao fato de estarem mais desprotegidos em função da eletronegatividade do átomo de oxigênio, deixando o carbono da carbonila mais desprotegido. Os demais sinais de carbonos com deslocamentos inferiores são característicos de dupla ligação entre carbonos.

As informações obtidas por Espectrometria de Massas, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com detector de ultravioleta e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C) sugerem a presença da teacrina (1, 3, 7, 9 -

tetrametilurato) como principal alcaloide purínico detectado nos extratos do endocarpo do cupuaçu.

VASCONCELOS *et al.* (1975), em estudos comparativos das sementes do cupuaçu com as sementes do cacau mostraram a notável presença da cafeína e da teobromina nos extratos do cacau e total ausência nos extratos das sementes do cupuaçu. Comportamento inverso foi observado em relação à teacrina isolada exclusivamente do endocarpo do cupuaçu e identificada por Espectroscopia de Infravermelho, Ultravioleta e RMN ¹H.

HAMMERSTONE *et al.* (1994), utilizando diferentes técnicas de elucidação de compostos orgânicos descrevem a presença da teacrina em várias espécies do gênero *Theobroma*, inclusive nos extratos do endocarpo de *T. grandiflorum*. Os resultados experimentais obtidos em nosso trabalho, tais como a massa da molécula da teacrina obtida por Espectrometria de Massas, assim como seus principais fragmentos; os deslocamentos observados pela RMN ¹H para os hidrogênios da teacrina e seus espectros de absorção no ultravioleta confirmam os resultados apresentados por HAMMERSTONE *et al.* (1994). Entretanto, é importante destacar que nossos resultados corroboram os resultados apresentados por VASCONCELOS *et al.* (1975) e HAMMERSTONE *et al.* (1994), somente em relação a identificação da teacrina, uma vez que detectamos a presença da cafeína nos resíduos do cupuaçu.

A teacrina é um alcaloide purínico assim como a cafeína, a teobromina e a teofilina, entretanto, os efeitos observados no sistema nervoso central (SNC) são diferentes para a teacrina (XU *et al.*, 2007). A cafeína e a teobromina apresentam efeitos estimulantes ao passo que a teacrina apresenta efeitos sedativos e hipnóticos. A teacrina é um dos principais componentes presentes nas folhas de *Cammelia assamica* var. *Kucha*, bastante utilizada na forma de chás pela população chinesa devido seus efeitos benéficos à saúde (XU *et al.*, 2007).

Apesar de ter sido descrita pela primeira vez em 1937, pouca atenção lhe foi atribuída (JOHNSON, 1937). No entanto, como componente majoritário nos extratos do endocarpo do cupuaçu, até então descartados como subprodutos pelas indústrias de polpas da Amazônia, esses resíduos apresentam-se como excelentes matérias-primas para futuras análises relacionadas ao SNC afim de transforma-se em algo útil a população da Amazônia e do Brasil contribuindo para o desenvolvimento da sociedade e favorecendo ao meio ambiente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

✓ Considerando as variáveis rendimentos, fenólicos, flavonoides, atividade varredora de radicais livres e os espectros de massas foi possível otimizar o processo de extração das substâncias fenólicas e dos flavonoides presentes no epicarpo e endocarpo do cupuaçu.

✓ As condições mais adequadas que proporcionaram melhores percentuais de substâncias fenólicas e flavonoides no epicarpo do cupuaçu foram alcançadas utilizando o método maceração a quente combinado com o solvente etanol.

✓ Para os extratos do endocarpo do cupuaçu as condições ótimas foram alcançadas utilizando o método soxhlet combinado com etanol/água (7:3), ao passo que proporcionaram melhores rendimentos e maiores percentuais de substâncias fenólicas e flavonoides.

✓ O perfil dos extratos brutos obtido por Espectrometria de Massas do epicarpo e do endocarpo do cupuaçu foram bem similares. Os íons de m/z 339, 325 e 311 característicos de ácidos fenólicos foram observados em todas as extrações.

✓ Não foi possível confirmar a presença dos compostos fenólicos por CLAE-UV. Possivelmente, devido à existência dessas substâncias em baixas concentrações nos extratos.

✓ Dos ensaios colorimétricos utilizados para avaliar a atividade varredora de radicais livres, somente o ensaio do DPPH• mostrou-se eficaz nos extratos dos resíduos do cupuaçu.

✓ Os extratos obtidos do epicarpo apresentaram melhores atividades contra radicais livres ($CI_{50}=69,5 \mu\text{g/mL}$) no ensaio com DPPH• em relação aos extratos do endocarpo do cupuaçu ($CI_{50}=223,6 \mu\text{g/mL}$).

✓ Para as extrações do epicarpo, os métodos soxhlet ($CI_{50}=69,5 \mu\text{g/mL}$), ultrassom ($CI_{50}=76,9 \mu\text{g/mL}$) e maceração a frio ($CI_{50}=79,0 \mu\text{g/mL}$) combinados com etanol/água (7:3) apresentaram as melhores atividades varredoras de radicais livres (CI_{50}).

✓ A concentração inibitória da atividade varredora de radicais livres obtida em nosso trabalho para os extratos do epicarpo ($CI_{50}=69,5 \mu\text{g/mL}$) e do endocarpo ($CI_{50}=223,6 \mu\text{g/mL}$) do cupuaçu foram melhores do que a concentração inibitória descrita na literatura para esses resíduos ($554,87 \mu\text{g/mL}$).

✓ O perfil das extrações das metilxantinas realizado por CLAE-UV indica as metodologias 1 e 2 como as mais seletivas e a tradicional partição ácido-base como menos eficiente.

✓ Através de técnicas espectroscópicas e cromatográficas confirmou-se a necessidade e a importância da adição de reagentes para remover os interferentes no processo de extração das metilxantinas.

✓ A molécula da cafeína (m/z 195) pela primeira vez foi detectada e identificada nos extratos do epicarpo do cupuaçu por Espectrometria de massas pela fragmentação MS do seu íon e por CLAE-UV por comparação com padrões.

✓ A molécula da teacrina (m/z 225) foi confirmada nos extratos do endocarpo e do epicarpo do cupuaçu por Espectrometria de massas pela fragmentação MS de seu íon, por CLAE-UV por comparação com padrões e por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C).

✓ As atividades biológicas descritas na literatura para a molécula da teacrina agrega valores aos resíduos do cupuaçu, que são subprodutos das indústrias de polpas da Amazônia. O estudo de aproveitamento desses resíduos realizados em nosso trabalho indica o endocarpo do cupuaçu como excelente matéria-prima fonte da metilxantina teacrina.

✓ Estudos posteriores são necessários a fim de obter informações mais detalhadas sobre o potencial biológico e farmacológico da teacrina, contribuindo para o desenvolvimento econômico da Amazônia, favorecendo o meio ambiente atribuindo um destino adequado a esses resíduos que são subprodutos da indústria de polpa na Amazônia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, v. 115, p. 785-788, 2009.

ALHO, C. J. R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. *Estudos Avançados*, v. 26, p. 151-165, 2012.

ALVES, S.; JENNINGS, W. G. Volatile Composition of Certain Amazonian Fruits. *Food Chemistry*, v. 04, p. 149-159, 1979.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; BISPO, M. S.; ANDRADE, J. B. Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. *Química Nova*, v. 32, p. 2482-2486, 2009.

BARREIROS, A. L. B. S. ; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies oxidativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, p. 123-130, 1999.

BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. v. 1218, p. 2505-2512, 2011.

BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry*, v. 136, p. 46-54, 2013.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, v. 33, p. 229-239, 2010.

BRUNI, R.; BIANCHINI, E.; BETTARELLO, L.; SACCHETTI, G.; Lipid Composition of Wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* Mart. Seeds and Comparison with Two Varieties of *Theobroma cacao* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 691 – 694, 2000.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 78, p. 98-106, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E., P.; Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In In: C. M. O. Simões *et al.* (Eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 20, Florianópolis, 2007.

CARVALHO, J. L. S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., por sistema soxhlet modificado. *Química Nova*, v. 32, p. 1031-1035, 2009.

CAVALIERI, L. F.; STONE, A.; CHANG, N. On the Nature of Xanthine and Substituted Xanthines in Solution. *Journal of the American Chemical Society*, v. 76, p. 1119-1122, 1954.

CEVA-ANTUNES, P. M. N.; BIZZO, H. R.; ALVES, S. M.; ANTUNES, A. C. Analysis of Volatile Compounds of Taperebá (*Spondias mombin* L.) and Cajá (*Spondias mombin* L.) by Simultaneous Distillation and Extraction (SDE) and Solid Phase Microextraction (SPME). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1387-1392, 2003.

CONTRERAS-CALDERÓN, J. ; CALDERON-JAIMES, L.; GUERRA- HERNANDEZ, E.; GRACÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, v. 44, p. 2047-2053, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, 01, p. 241-256, 2009. Disponível em <http://www.uff.br/rvq>. Acesso em 10/06/2012.

CHEN, H. J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 260-285, 2012.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). Editora American Society of Plant Physiologists, 2000.

DEWICK, P. M.; *Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach*. 3ª edição: Editora Wiley, 2009.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES DAS DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAJEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, p. 241-249, 2007.

FORSYTH, W. G. C.; Cacao Polyphenolic Substances. *Biochemistry Journal*, v. 60, p. 108-111, 1955.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile Composition of Some Brazilian Fruits: Umbu-cajá (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 1263-1265, 2000.

GEDER - Gerência de Desenvolvimento Regional: O Banco da Amazônia e o financiamento da fruticultura regional. N. 05, p. 1-4, 2008.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S.; DUTILH, J. H. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, v. 31, p. 2042-2046, 2008.

GONDIN, T. M. S.; THOMAZINI, M. J.; CAVALCANTE, M. J. B.; SOUZA, J. M. L. Aspectos da Produção de Cupuaçu. EMBRAPA: documento 67 - Rio Branco-Acre, 43p., 2001.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4666-4674, 2010.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In In: C. M. O. Simões *et al.* (Eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 01, Florianópolis, 2007.

HAMMERSTONE, J. F.; ROMANCZYK, L. J.; AITKEN, W. M. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. *Phytochemistry*, v. 35, p. 1237-1240, 1994.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides generalidades e aspectos gerais. In In: C. M. O. Simões *et al.* (Eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 29, Florianópolis, 2007.

IBRAF – Instituto Brasileiro de frutas - Frutas e Derivados/Frutos do Brasil: Desafios e Expectativas movimentam produção e comercialização em um ano difícil. V. 01, p. 06-46, 2006.

JOHNSON, T.B. Purines in the plant kingdom: the discovery of a new purine in tea. *Journal of the American Chemical Society*, v. 59, p. 1261-1263, 1937.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. 6ª edição/ Ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey, capítulo 06, 2007.

JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal Of Mass Spectrometry*, v. 36, p. 169-178, 2001.

KAJDŽANOSKA, L.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from macedônia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, v. 29, p. 181-194, 2010.

KAKULA-KOCH, W.; ALIGIANNIS, N.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A-L.; GLOWNIAK, K.; KALPOUTZAKIS, E. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. *Food Chemistry*, v. 138, p. 406-413, 2013.

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry*, v. 133, p. 671-677, 2012.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews*, v. 04, p. 206-220, 2005.

LI, S.; BERGER, J.; HARTLAND, S. UV spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa beans. *Analytica Chimica Acta*, v. 232, p. 409-412, 1990.

LU, J. L.; WANG, D. M. SHI, X. G.; YANG, D. P.; ZHENG, X. Q.; YE, C. X. Determination of purine alkaloids and catechins in different parts of *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.89, p. 2024-2089, 2009.

MANIRAKIZA, P. COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of food composition and analysis*, v. 14, p. 93-100, 2001.

MATOS, C. B. Caracterização Física, Química, Físico-química de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (willd. Ex. Spreng.) Shum.) Com diferentes formatos. 2007. 41f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz – Ilhéus, Bahia.

MARX, F.; MAIA, J. G. S. Purine alkaloids in seeds of *Theobroma* species from the Amazon. *Z Lebensm Unters Forsch*, v. 193, p. 460-461, 1991.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*, v. 26, p. 211-219, 2004.

NAZARÉ, R. F. R.; BARBOSA, W. C.; VIEGAS, R. M. F. Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate. EMBRAPA: documento 108 – Belém/Pará, 38p., 1990.

OLIVEIRA, T. T.; SILVA, R. R.; DORNAS, W. C.; NAGEM, T. J. Flavonoides e Asterosclerose. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 42, p. 49-54, 2010.

OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; GHANI, N. A.; ADENAN, I.; Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1523-1530, 2007.

OZTURK, M.; AYDOGMUS-OZTURK, F.; DURU, M.E.; TOPÇU, G. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, v. 103, p. 623–630, 2007.

PEREIRA-CARO, G.; BORGES, G.; NAGAI, C.; JACKSON, M. C.; YOKOTA, T.; CROZIER, A.; ASHIHARA. Profile of Phenolic compounds and Purine Alkaloids during the Development of seeds of *Theobroma cacao* cv. Trinitario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 427-434, 2013.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6076-6082, 2009.

QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1123-1126, 2007.

RATES, S, M, K.; Metilxantinas. In In: C. M. O. Simões *et al.* (Eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 34, Florianópolis, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENT, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS+ radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, v. 26, p. 1231–1237, 1998.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* Species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and Other *Ilex* Species. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 10, p. 443-446, 1999.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B.; *Botânica Econômica Brasileira*. 2ª edição, Rio de Janeiro: Editora Âmbito Cultural Edições LTDA, 1995.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 238-244, 2008.

ROGEZ, H. ; BUXANT, R.; MIGNOLET, E. ; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacurí (*Platonia insignis*) and cupuaçú (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research and Technology*, v. 218, p. 380-384, 2004.

ROSSO, V. V.; MARCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, Pp. 5062-5072, 2007.

SALGADO, J. M.; RODRIGUES, B. S.; DONADO-PESTANA, C. M.; DIAS, C. T. S.; MORZELLE, M. C. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) Peel as Potential Source of

Dietary Fiber and Phytochemicals in Whole-Bread Preparations. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2011.

SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 454-457, 1998.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; JÁUREGUI, O.; CASALS, I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTOS, M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, v. 38, p. 35-42, 2003.

SANTOS, R. I. ; Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In In: C. M. O. Simões *et al.* (Eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 16, Florianópolis, 2007.

SANTOS, D. S.; SILVIA, I. G.; JUNIOR, C. A. L.; MONÇÃO, N. B. N.; CITÓ, A. M. G. L.; SOUZA, M. H. S. L.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; COSTA, M. C. P. Extraction and Evaluation of Fatty Acid Composition of *Orbignya phalerata* Martius Oils (Arecaceae) from Maranhão State, Brazil. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 24, p. 355-362, 2013.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOTO-VACA, A.; GUTIERREZ, A.; LOSSO, J. N.; XU, Z.; FINLEY, J. W. Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 6658-6677, 2012.

SOTELO, A.; ALVAREZ, R. G. Chemical Composition of Wild *Theobroma* Species and Their Comparison to the Cacao Bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 1940 - 1943, 1991.

SOTERO, V.; MACO, M.; VELA, J.; MERINO, C.; DÁVILA, E.; GARCIA, D. Evaluación de la actividad antioxidante y Compuestos fenólicos en pulpa y semillas de Cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 77, p. 66 – 74, 2011.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, p. 202-210, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

VARGAS, F. S. Estudo comparativo entre técnicas para avaliação de atividades antioxidantes de espécies de plantas da Amazônia. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

VASCONCELOS, M. N. L.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S.; GOTTLIEB, O. R. Estudo químico das sementes do cupuaçu. *Acta Amazônica*, v. 05, p. 293-295, 1975.

VENTURIERI, G. A.; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. O cultivo do cupuaçuzeiro. *Informativo SBF*, Campinas, v. 04, n. 01, p. 15-17, 1985.

VENTURIERI, G. A.; AGUIAR, J. P. L. Composição do chocolate caseiro de amêndoas do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) Shum). *Acta Amazônica*, vol. 18, p. 3-8, 1988.

XU, J. K.; KURIHARA, H.; ZHAO, L.; YAO, X. S. Theacrine, a special purine alkaloid with sedative and hypnotic properties from *Cammelia assamica* var. *kucha* in mice. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 09, p. 665-672, 2007.

XU, Q.; SHEN, Y.; WANG, H.; ZHANG, N.; XU, S.; ZHANG, L. Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from fructus sophorae. *Food Chemistry*, v. 138, p. 2122-2129, 2013.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGET, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* ("Cupuaçu"). *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1501-1504, 2003.

YANG, Y-C.; WEY, M-C.; HUANG, T-C.; LEE, S-Z.; LIN, S-S. Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from *Radix Scutellariae*. *Industrial Crops and Products*, v. 45, p. 182-190, 2013.

YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 162-168 2005.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, v.64, p. 555-559, 1999.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANA, J. A. ; Flavonóides. In In: C. M. O. Simões *et al.* (Eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 23, Florianópolis, 2007.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, p. 423-447, 2000.

8. ANEXO

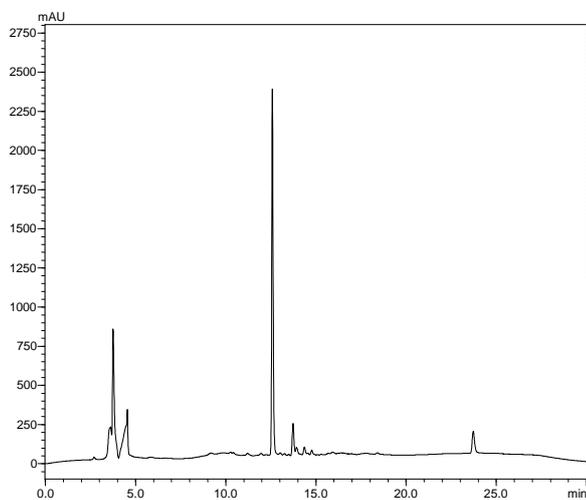


Figura 51. Cromatograma da partição em diclorometano do extrato obtido pelo método soxhlet em etanol 70% do endocarpo do cupuaçu.

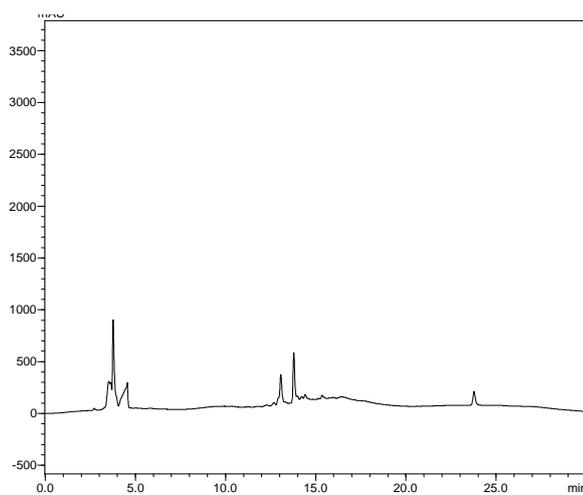


Figura 52. Cromatograma da partição em acetato de etila do extrato obtido pelo método soxhlet em etanol 70% do endocarpo do cupuaçu.

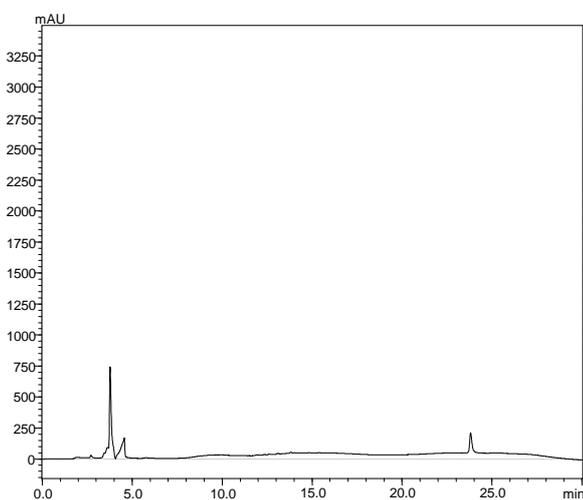


Figura 53. Cromatograma da partição em metanol do extrato obtido pelo método soxhlet em etanol 70% do endocarpo do cupuaçu.

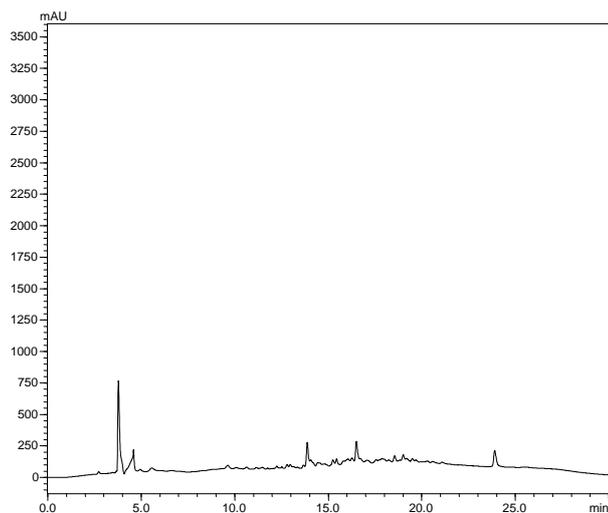


Figura 54. Cromatograma da partição em diclorometano do extrato obtido pelo método maceração a quente em etanol 100% do epicarpo do cupuaçu.

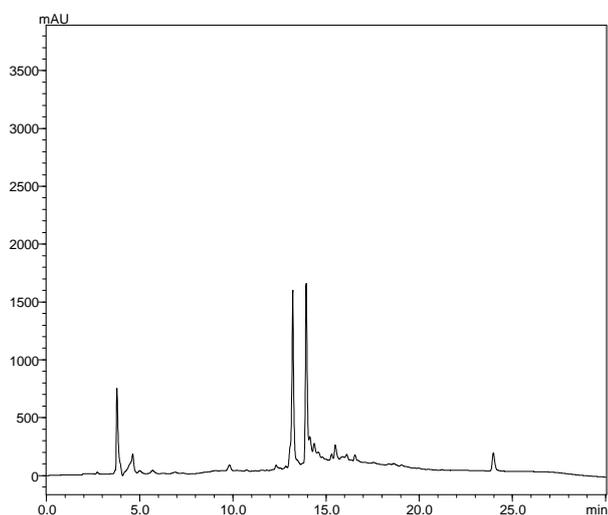


Figura 55. Cromatograma da partição em acetato de etila do extrato obtido pelo método maceração a quente em etanol 100% do epicarpo do cupuaçu.

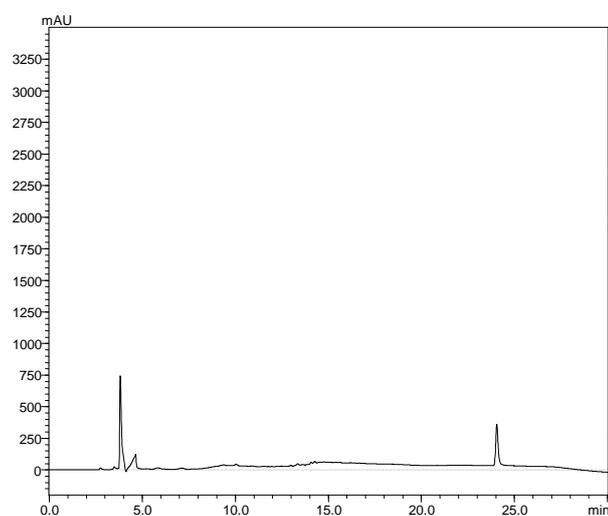


Figura 56. Cromatograma da partição em metanol do extrato obtido pelo método maceração a quente em etanol 100% do epicarpo do cupuaçu.