



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
INSTITUTO DE ENGENHARIA E GEOCIÊNCIAS-IEG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**LUCAS ALVARENGA DA SILVA**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS DA CASCA DO CUPUAÇU  
(*Theobroma grandiflorum* SCHUM.) E EFEITOS DA ADIÇÃO DO EXTRATO NO  
CRESCIMENTO DE *Lactobacillus plantarum* LP 62**

**SANTARÉM  
2022**

**LUCAS ALVARENGA DA SILVA**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS DA CASCA DO CUPUAÇU  
(*Theobroma grandiflorum* SCHUM.) E EFEITOS DA ADIÇÃO DO EXTRATO NO  
CRESCIMENTO DE *Lactobacillus plantarum* LP 62**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos.

Orientador: Prof. Dr. Lauro E. S. Barata

Co-orientador: Prof. Dr. Thalís Ferreira dos Santos

**SANTARÉM  
2022**

**LUCAS ALVARENGA DA SILVA**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS DA CASCA DO CUPUAÇU  
(*Theobroma grandiflorum* SCHUM.) E EFEITOS DA ADIÇÃO DO EXTRATO NO  
CRESCIMENTO DE *Lactobacillus plantarum* LP 62**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais; Universidade Federal do Oeste do Pará; área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos.

Conceito: 8,85

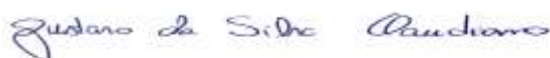
Data de Aprovação: 30/08/2022



Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata – Presidente/Orientador  
Universidade Federal do Oeste do Pará



Profª. Dra. Isabella Cristhina Gonçalves Costa – 1º Examinador  
Instituto Federal do Piauí



Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano – 2º Examinador  
Universidade Federal do Oeste do Pará



Profª. Drª. Silvia Katrine Rabelo da Silva – Suplente  
Universidade Federal do Oeste do Pará

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

S586m Silva, Lucas Alvarenga da

---

Metabólitos secundários em extratos da casca do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* SCHUM.) e efeitos da adição do extrato no crescimento de *Lactobacillus plantarum* LP 62. / Lucas Alvarenga da Silva. – Santarém, 2022.

59 p. : il.

Inclui bibliografias.

Orientador: Lauro E. S. Barata.

Coorientador: Thalys Ferreira dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Engenharia e Geociências, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia.

1. Biotransformação. 2. Resíduo industrial. 3. Probiótico. I. Barata, Lauro E. S., *orient.*  
II. Santos, Thalys Ferreira dos, *coorient.* III Título.

CDD: 23 ed. 634.6098115

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

A minha mãe Ilza, meu pai Manoel, meu irmão Danilo e minha avó querida Maria de Jesus por todo o apoio recebido.

A minha namorada Izolina Jaqueline por ser meu porto seguro em tantos momentos e me incentivar.

Aos meus eternos Tio Paulo, Tia Izaneide e minha avó Eneida que se foram durante essa jornada, mas nunca deixaram de serem pilares em momentos difíceis.

Ao meu tio Podalyro e tia Vera por me acolherem durante minha estadia em São Paulo.

A minha tia Regina por me auxiliar durante a minha estadia em São Paulo e em vários momentos.

Aos membros do laboratório de farmacognosia e fitoquímica.

Aos membros do laboratório de microbiologia, em especial a Dr. Sara Freitas.

Aos componentes do grupo de pesquisa de probióticos e grupo de estudos em sanidade aquícola: Laine, Andrya e Graziela. E a Rosi, membro do grupo Probiotec que se foi durante essa jornada.

Aos membros do laboratório PeDBio, em especial a Janaira Cardoso Sobral e Emilly feitosa, pelo apoio nos processos de extração e análises.

A amiga de graduação e mestrado Fernanda pelo apoio.

Aos membros do laboratório de química de produtos naturais da USP, Bruna, Herlle, Abdelaaty, Lydía e ao professor Dr. Massuo Jorge Kato do IQ-USP, por todos os conselhos, apoio e por terem me recebido em seu laboratório e auxiliado nas análises químicas.

Ao prof. Dr Thalís Ferreira dos Santos pela coorientação, por toda a paciência, por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata, pela orientação, conhecimento compartilhado para o desenvolvimento desse projeto e por me guiar durante essa jornada.

A Fundação Amazônica de Amparo a estudos e pesquisa (FAPESPA) e a Fundação de Integração Amazônica (FIAM) pela bolsa ofertada através do programa FAPESPA-FIAM

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio no custeio de passagens mediante ao programa PROCAD-AM.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram o desenvolvimento dessa pesquisa.

## RESUMO

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) é um dos mais importantes frutos da Amazônia devido ao seu sabor e aroma característicos, além do uso da sua polpa na indústria de alimentos e da gordura das sementes em formulações cosméticas. Cerca de 27 mil toneladas do fruto são produzidas no Estado do Pará, onde 109 toneladas somente do município de Santarém. A exploração do fruto gera uma quantidade significativa de resíduos, já que aproximadamente metade é de cascas que não tem qualquer aproveitamento e que poderiam se tornar fonte de moléculas com poder antioxidante e de interesse biotecnológico. O emprego da biotransformação microbiana como uma estratégia biotecnológica para a produção de moléculas bioativas vem ganhando destaque e para esse fim, bactérias ácido lácticas como *Lactobacillus* spp. despertam interesse pois podem modificar a estrutura química de compostos fenólicos glicosilados potencializando as atividades biológicas. Diante disso, o capítulo 1 teve como objetivo caracterizar quimicamente os extratos obtidos de resíduos agroindustriais de *T. grandiflorum* e avaliar a potencial aplicação como inibidor do crescimento de bactérias patogênicas a peixes; e o capítulo 2 objetivou avaliar os efeitos da fermentação de extratos de resíduos agroindustriais de *T. grandiflorum* por *Lactobacillus plantarum* LP62 e verificar o potencial antimicrobiano do extrato fermentado frente a patógenos de peixes. No capítulo 1 descrevemos que os extratos obtidos a partir de resíduos da casca de *T. grandiflorum* apresentaram concentrações significativas de compostos fenólicos, e que apesar de não demonstrarem potencial bactericida, foram capazes de inibir parcialmente o crescimento microbiano das cepas que desafiaram. Pela análise química utilizando CLAE-ESI-EM/EM sugerimos a presença de 9 compostos nos extratos e membrana interna do fruto, algumas destas com atividades biológicas de interesse industrial. No capítulo 2 não observamos diferença significativa entre o índice de crescimento microbiano nos meios suplementados com o extrato e demonstramos que não houve diferença significativa entre o pH do meio MRS acrescido de extrato quando comparado ao controle. Observamos mudanças no perfil cromatográfico do extrato fermentado em comparação aos controles e o mesmo extrato fermentado demonstrou atividade antimicrobiana frente a *Aeromonas hydrophila*. Concluimos que os extratos da casca do cupuaçu (*T. grandiflorum*) rico em substâncias bioativas tem potencial para serem utilizados em processos fermentativos e na produção de novos bioprodutos funcionais dirigidos a setores industriais da cosmética e aquicultura.

**Palavras chave:** Biotransformação. Resíduo industrial. Probiótico. Fenólicos. *Theobroma grandiflorum*. Cupuaçu.

## ABSTRACT

Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) is one of the most important fruits of the Amazon due to its characteristic flavor and aroma, in addition to the use of its pulp in the food industry and the seeds in cosmetic formulations. About 27 thousand tons of the fruit are produced in the State of Pará, where 109 tons are only in the municipality of Santarém. The exploitation of the fruit generates a significant amount of waste, since approximately half is from peels that have no use and that could become a source of molecules with antioxidant power and of biotechnological interest. The use of microbial biotransformation as a biotechnological strategy for the production of bioactive molecules has been gaining attention and for this purpose, lactic acid bacteria such as *Lactobacillus* spp. are of interest because they can modify the chemical structure of glycosylated phenolic compounds, enhancing their biological activities. Therefore, chapter 1 aimed to chemically characterize the extracts obtained from agro-industrial residues of cupuaçu (*T. grandiflorum*) and evaluate the potential application as an inhibitor of the growth of pathogenic bacteria in fish; and chapter 2 aimed to evaluate the effects of fermentation of extracts from agroindustrial residues of *T. grandiflorum* by *Lactobacillus plantarum* LP62 and to verify the antimicrobial potential of the fermented extract against fish pathogens. In chapter 1 we describe that the extracts obtained from residues of the bark of *T. grandiflorum* showed significant concentrations of phenolic compounds, in addition, despite not showing bactericidal potential, they were able to partially inhibit the microbial growth of the challenged strains. By chemical analysis using HPLC-ESI-MS/MS we suggest the presence of 9 compounds in the extracts and inner membrane of the fruit, many of them with biological activities of industrial interest. In chapter 2 we did not observe a significant difference between the microbial growth index in the media supplemented with the extract and we demonstrated that there was no significant difference between the pH of the MRS medium plus extract when compared to the control. We observed changes in the chromatographic profile of the fermented extract compared to controls and the same fermented extract showed antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. We conclude that cupuaçu (*T. grandiflorum*) bark extracts rich in bioactive substances have the potential to be used in fermentation processes and in the production of new functional bioproducts aimed at the cosmetic and aquaculture industrial sectors.

**Keywords:** Biotransformation. Industrial waste. Probiotic. Phenolic. *Theobroma grandiflorum*. Cupuassu.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - micrograma

BAL - Bactérias ácido lácticas.

BHI -caldo Brain Heart Infusion

CBM -Concentração Bactericida Mínima

CCaf - Extrato acetato de etila do liquido resultante da solubilização do extrato bruto da casca de cupuaçu em água após filtração

CCc - Extrato alcoolico a frio com metanol do epicarpo de cupuaçu

CCf - Extrato acetato de etila do caldo MRS fermentado com extrato de casca de cupuaçu

CCf - Extrato alcoólico a frio com etanol de casca de cupuaçu

CCm - Extrato metanólico membrana interna do epicarpo de cupuaçu

CCsx- Extrato alcoólico via soxhlet com etanol do epicarpo de cupuaçu

CIM -Concentrações Inibitórias Mínimas

CLAE - Cromatografia liquida de alta eficiência

CLAE-ESI-EM/EM - Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massa

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DAD- sigla em inglês para detector por arranjo de diodos.

DMSO - Dimetilsulfóxido

EAG - Equivalente de ácido gálico

EEMF-Extrato etanólico por maceração a frio

EEMQ- Extrato etanólico por maceração a quente

EESON – Extrato etanólico por sonicação

EESOX- Extrato etanólico por soxhlet

EF- Extrato visando o isolamento de flavonoides.

EHMF- Extrato hidroalcoólico por maceração a frio

EHMQ- Extrato hidroalcoólico por maceração a quente

EHP- Extrato hidroalcoólico por percolação



EHson- Extrato hidroalcoólico por sonicação

EHsx- Extrato hidroalcoólico por Soxhlet

EMx-Extrato produzido visando o isolamento de metilxantinas

ESI- Sigla em inglês para fonte de Ionização por Electrospray

FDA- Food and Drug Administration

FDHMF- fração diclorometano de extrato hidroalcoólico a frio

FM- Fórmula molecular

FOS - Frutooligosacarídeos

GOS -Galactooligosacarídeos

MF- Extrato acetato de etila do caldo MRS fermentado sem adição de extrato

MRS- Meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe.

MS- Extrato acetato de etila do caldo MRS sem fermentação ou adição de extrato da casca de cupuaçu

OMS-Organização Mundial da Saúde

PTFE - Politetrafluoroetileno

PTFE- Politetrafluoroetileno

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

TOS- Transgalactoligosacarídeos

TR- tempo de retenção.

TSA- Agar Triptona de Soja

TSB-Caldo Triptona Soja

UFC- Unidade formadora de colônias

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>12</b>
<b>CAPITULO 1- Secondary metabolites of cupuassu bark (<i>Theobroma grandiflorum</i> Schum.)</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1. Introdução</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2. Materiais e métodos</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3. Resultados</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4. Discussão</b> .....	<b>25</b>
<b>1.5. Conclusão</b> .....	<b>33</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>33</b>
<b>Referências</b> .....	<b>34</b>
<b>CAPITULO 2- Effects of the addition of extract of cupuassu residue (<i>Theobroma grandiflorum</i>) on the growth of <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp 62</b> .....	<b>39</b>
<b>2.1. Introdução</b> .....	<b>40</b>
<b>2.2. Materiais e métodos</b> .....	<b>42</b>
<b>2.3. Resultados</b> .....	<b>46</b>
<b>2.4. Discussão</b> .....	<b>51</b>
<b>2.5. Conclusão</b> .....	<b>54</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>54</b>
<b>Referências</b> .....	<b>54</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica é conhecida por sua grande diversidade de flora, com diversas espécies com aplicações na sociedade humana. Nesse contexto a exploração de espécies frutíferas apresenta grande importância. No mundo, cerca de 800 milhões de toneladas de frutas são produzidas todos os anos. Nesse mercado, o Brasil ocupa a terceira posição entre os maiores produtores atrás somente de Índia e China com colheitas de 45 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2017; JACOBSEN et al., 2018; EMBRAPA, 2021). No Brasil o setor de fruticultura encontra-se entre os principais geradores de emprego, renda e desenvolvimento no âmbito rural do agronegócio (JACOBSEN et al., 2018).

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é uma árvore frutífera nativa da Amazônia, no Brasil é naturalmente distribuída nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Rondônia e Acre, enquanto cultivares comerciais podem ser encontrados em estados como Bahia, Amazonas e Pará (SANTOS et al., 2010; PUGLIESE et al., 2013, BARROS et al., 2016, IDAM, 2020). Entretanto, outros países como Costa Rica, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana e Suriname também cultivam essa árvore (PUGLIESE et al., 2013).

O fruto de cupuaçu é composto de casca (43%), polpa (38%), semente (17%) e placenta (2%) (PEREIRA et al., 2018). Sua polpa é apreciada por sua acidez e aroma intenso, entretanto, devido ao seu sabor forte, não é normalmente consumida sozinha, mas é utilizada para fabricação de bebidas (“vinho do cupuaçu” e suco), sorvetes, licores, geleias, conservas e doces (SANTOS et al., 2010; PEREIRA et al., 2018). Das sementes da espécie é extraído um óleo, manteiga do cupuaçu, que pode ser utilizada na produção de produtos alimentícios e cosméticos (PUGLIESE et al., 2013, PEREIRA et al., 2018). Além disso, a semente tem ganhado notoriedade devido a sua potencial aplicação na fabricação de um produto artesanal similar ao chocolate, denominado de cupulate (PUGLIESE et al., 2013, BARROS et al., 2016).

Segundo dados da Secretaria de Estudo de Desenvolvimento Agropecuário e de Pesca do Pará em 2018 foram produzidas 27 mil toneladas do fruto, dos quais 109 toneladas oriundas somente do município de Santarém abastecendo o mercado nacional e exportado para vários países, sendo Japão, Países Baixos, Reino Unido, Alemanha, Estados Unidos, Argentina, Bolívia e Paraguai os maiores consumidores internacionais (GOMES e LIMA, 2019).

A maioria das publicações científicas produzidas sobre a espécie *Theobroma grandiflorum* focam em estudar aspectos diversos de sua semente e polpa do fruto (CAMPOS-

RODRIGUEZ et al., 2021), sendo poucos os estudos que falem acerca de casca e outros subprodutos da cadeia produtiva do cupuaçu.

Esses resíduos são empregados por algumas empresas como adubo orgânico, porém, estudos promissores mostram que esses subprodutos podem ser aplicados como substrato de fermentação para obtenção de enzimas ou metabolitos de origem microbiana (GOLVEIA et al.,2018). A fermentação microbiana destaca-se por ser realizada por organismos estruturalmente simples, em curto período de geração e por apresentarem grande diversidade de processos metabólicos (CONTI, 2001; FARNET & ZAZOPOULOS, 2005, SANTOS, 2015). No âmbito ambiental a biotransformação é considerada como uma estratégia de química verde, devido a produção de efluentes menos nocivos ao meio ambiente, com pouca produção de resíduos e baixo consumo energético (SILVA,2015; HEGAZY et al., 2015).

O processo fermentativo microbiano em matrizes vegetais, realizado por linhagens de bactérias ácido lácticas (BAL) como as pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sp. pode aumentar a biodisponibilização e bioatividade de compostos fenólicos, visto que esses microrganismo podem modificar o conteúdo e a estrutura de antocianinas e outros compostos fenolicos glicosilados, mudando de glicosídeos para formas agliconas que resultam em aumento da atividade biológica (LANDETE et al., 2008; GUERGOLETTO et al., 2017; BARBOSA,2019).

Os resíduos de cupuaçu possuem significativos teores nutricionais, destacando-se o potássio, ferro, selênio e antioxidantes, esse último possuindo a capacidade de retardar o processo de degeneração celular (AVILA-SOSA et al., 2019). Ademais, podem ser fonte de substâncias bioativas como compostos fenólicos, alcaloides, glicosídeos, compostos voláteis (LIMA, 2013; BANERJEE et al., 2016; SAGAR et al., 2018; MOITA, 2019; SILVA ,2020) e de compostos com atividade antimicrobiana (ARBOS et al., 2013). A presença de tais substâncias em matrizes vegetais torna-os atrativa para a indústria cosmeceutica pois podem proteger e curar a pele, e, quando comparados aos produtos cosméticos sintéticos, são brandos e biodegradáveis, possuindo atividades biológicas e terapêuticas (SOTO, FALQUÉ E DOMÍNGUEZ,2015; CHERUBIM et al.,2019).

A aquicultura é outra indústria que pode ser beneficiada compostos bioativos presentes em resíduos de cupuaçu, visto que as substâncias antimicrobianas presentes em extratos vegetais para podem ser uma alternativa ao tratamento tradicional com antibióticos (JANA et al,2018), os quais podem causar poluição ambiental, contaminação dos peixes e de outros organismos envolvidos na cadeia alimentar aquática, devido ao seu uso indiscriminado

(CLAUDIANO et al. 2012). Aliado a isso, a biomassa residual desperta interesse, pois é de baixo custo, renovável e abundante (VÁSQUEZ et al., 2019).

Dessa forma, o capítulo 1 desta dissertação teve como objetivo caracterizar quimicamente os extratos obtidos de resíduos agroindustriais de cupuaçu (*T. grandiflorum*) e avaliar a potencial aplicação como inibidor do crescimento de bactérias patogênicas a peixes; e o capítulo 2 objetivou avaliar os efeitos da fermentação de extratos de resíduos agroindustriais de *T. grandiflorum* por *Lactobacillus plantarum* LP62 e verificar o potencial antimicrobiano do extrato fermentado frente a patógenos de peixes

## REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Informa Economics FNP, 2013. 463p., 2017.
- ARBOS, K. et al. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, v.60, n.2, p. 161-165. DOI: <https://dx.Doi.org/10.1590/S0034-737X2013000200003>
- AVILA-SOSA, R. et al.. Antioxidant Properties of Amazonian Fruits: A Mini Review of *in Vivo* and *in Vitro* Studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- BANERJEE, J. et al. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. **Food Chemistry**, v. 225, p. 10–22, 2016.
- BARBOSA, P. P. M. **Efeito da biotransformação enzimática de diferentes resíduos de citros no crescimento e adesão de bactérias do intestino**. Tese (Doutorado) –Programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2019.
- BARROS, H. R. DE M. et al. Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 477–489, 2016.
- CAMPOS-RODRIGUEZ, J. et al. Copoazú (*Theobroma grandiflorum*): Botanical characterization, nutritional composition, antioxidant activity and bioactive compounds. **Agroindustrial Science**, v. 11, p.339 – 343, 2021.
- CHERUBIM, D. J.L. et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.00, p.1–5, 2019.
- CLAUDIANO G. S, PILARSK F., CRUZ C. Avaliação da concentração letal CL 50% (CL (I) (50-96h)) do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em guarus (*Phalloceros caudimaculatus*). **Archives of Veterinary Science** v.17, p.15-19.
- CONTI, R.; RODRIGUES, J.A.R.; MORAN, P.J.S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v. 24, p. 672-675, 2001.
- DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v.7, n.1, p. 1-16 2006.
- EMBRAPA,2021. **Frutas e hortaliças**.( <https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas>) Acessado em 17 de junho de 2022.
- FARNET, C.M.; ZAZOPOULOS, E. Improving drug discovery from microorganisms. In: ZANG, L.; DEMAINE, A.L. **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Totowa :Huma press., 2005.p. 95-106.
- GOLVEIA, J. C. S. et al. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) residue and its potential application in the bioremediation of 17-a-ethinylestradiol as a *Pycnoporus sanguineus* laccase inducer. **Preparative biochemistry and biotechnology**, v.48, p.541-548, 2018.
- GUERGOLETTI, K.B. et al.. Juçara ( *Euterpe edulis* ) pulp as a substrate for probiotic

- bacteria fermentation : Optimisation process and antioxidant activity. **Emirates Journal of Food and Agriculture**,v.29,n.12,p.946-959,2017. DOI: <https://DOI.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i12.1565>
- HEGAZY, M. F. et al. Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 17–33, 2015.
- JACOBSEN, R.H.F. et al. Cadeia produtiva da produção de suco natural na agricultura familiar: estudo de caso suco tropical. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**,v.7,p.1–8, 2018.
- JANA, P. et al. Phytobiotics in aquaculture health management: A review. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.6, p.1422-1429, 2018.
- LANDETE, J.M. et al. Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Chemistry**. v.107, p.320–326, 2008.
- LIMA, M. C. F. DE. **Caracterização de substâncias fenólicas e alcaloides dos resíduos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum.** Dissertação (mestrado)- Programa de pós-graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, 2013.
- MOITA, I.S. **Caracterização química das cascas das sementes de espécies do gênero *Theobroma*.** Dissertação (mestrado)- programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas ,2019.
- PEREIRA, A. L.F.; ABREU, V.K.G.; RODRIGUES, S. **Cupuassu—*Theobroma grandiflorum*.** In: Rodrigues, S.; Silva, E.; Brito, E. Exotic Fruits Reference Guide. 1 ed. Elsevier, p. 159-162,2018.
- PUGLIESE, A. G. et al. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.2720–2728, 2013.
- SAGAR, N. A. et al. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 512–531, 2018.
- SALLOUM, S.; TAWKA, M.; TAYYARA, L. Bacterial resistance to antibiotics and associated factors in two hospital centers in Lebanon from January 2017 to June 2017. **Infection Prevention in Practice**, v. 2, p.100043, 2020.
- SANTOS, G.M. et al. Atividade antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu. **Ciência rural**, v.40,n.7, p.1636–1642, 2010.
- SANTOS, R. X. **Aplicação biotecnológica de extrato de cascas do fruto de cacau: mecanismo de ação, atividade antimicrobiana e não genotóxica.** Tese (Doutorado) - Programa de pós-graduação em genética e biologia molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, 2013.
- SCHMIDT, PC; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Passionsblumenkraut Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von *Passiflorae herba*. **Apoth-Ztg**, v. 133, p. 4457-4466, 1993.

SHAKOUR, Z.T. A.; FAYEK, N. M.; FARAG, M. A. How do biocatalysis and biotransformation affect Citrus dietary flavonoids chemistry and bioactivity? A review. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 40, n. 5, p. 689–714, 2020.

SILVA, H. A. **Estudos fitoquímico, antioxidante e microbiológico de resíduos agroindustriais de cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) da Amazônia.** Dissertação (Mestrado)- Programa de pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 2020.

SILVA, L. S. **Biotransformação dos ácidos gálico e elágico por microorganismos do cerrado brasileiro.** Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 2015.

SOTO, M. L.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ; H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. **Cosmetics**, v. 2015, p.259-276, 2015.

VÁSQUEZ, Z. et al. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. **Waste Management**, v. 90, p. 72–83, 2019.



1 **CAPITULO 1- Secondary metabolites and antimicrobial potential of extracts from**  
2 **cupuassu bark (*Theobroma grandiflorum* Schum.<sup>1</sup>**

3 Lucas Alvarenga da SILVA<sup>1\*</sup>, Emily Thaís Feitosa SOUSA<sup>2</sup>, Bruna Cianciulli Barbosa dos  
4 SANTOS<sup>3</sup>, Herlle Aparecido da SILVA<sup>3</sup>, Abdelaaty HAMED<sup>3</sup>, Lydía Fumiko  
5 YAMAGUCHI<sup>3</sup>, Massuo Jorge KATO<sup>3</sup>, Thalís Ferreira dos SANTOS<sup>2</sup>, Lauro Euclides Soares  
6 BARATA<sup>1</sup>

7 <sup>1</sup>Federal University of West Para (UFOPA), Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais  
8 da Amazônia, Santarém, Brazil

9 <sup>2</sup>Federal University of West Para (UFOPA), Instituto de Biodiversidade e Florestas, Santarém,  
10 Brazil

11 <sup>3</sup> University of Sao Paulo (USP), Instituto de Química, São Paulo, Brazil

12 Correspondence\*

13 Email: [lucas1001stm@gmail.com](mailto:lucas1001stm@gmail.com)

14 **ABSTRACT**

15 The present work aimed to chemically characterize extracts from agro-industrial waste residues  
16 from cupuassu (*T. grandiflorum*) and to evaluate the potential application as an inhibitor of the  
17 growth of pathogenic bacteria in fish. Different methods were used for the obtention of extracts  
18 from the cupuassu peel, in parallel an extract of the inner membrane of the fruit peel was  
19 produced. The quantification of total phenolic compounds was performed in the extracts and  
20 antimicrobial potential tested through Minimum Inhibitory Concentration methodology.  
21 Chemical characterization was performed by High Performance Liquid Chromatography  
22 coupled to a Mass Spectrometer (HPLC-ESI-MS/MS). As result extracts obtained from  
23 residues of *T. grandiflorum* fruit peel showed significant concentrations of phenolic  
24 compounds, and although they did not shown bactericidal potential were able to partially inhibit  
25 the microbial growth of the strains which they challenged. Characterization made by HPLC-  
26 ESI-MS/MS approach suggest the presence of 11 compounds in the extracts of cupuassu peel  
27 and inner membrane of the fruit many of them with biological activities of industrial interest.  
28 The residue extracts from the fruit peel of *T. grandiflorum* have biotechnological potential for  
29 the production of new bioproducts, which may be a source of bioactive substances.

30 **Keywords:** Amazon; Phenolics; cosmetics, aquaculture

31

32

33

---

<sup>1</sup> O artigo apresentado foi redigido conforme as diretrizes de submissão da revista Acta Amazonica. As normas indicadas para a redação de artigos pela revista estão disponíveis no link: [https://acta.inpa.gov.br/guia\\_ingles.php](https://acta.inpa.gov.br/guia_ingles.php).

34 Metabólitos secundários e potencial antimicrobiano de extratos da casca de  
35 cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.).

36

## 37 RESUMO

38 O presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente os extratos obtidos de  
39 resíduos agroindustriais de cupuaçu (*T. grandiflorum*) e avaliar o potencial de aplicação como  
40 inibidor do crescimento de bactérias patogênicas de peixes. Para isso, foram utilizados  
41 diferentes métodos para a produção de extratos da casca do cupuaçu, em paralelo foi produzido  
42 um extrato da membrana interna da casca do fruto. A quantificação dos compostos fenólicos  
43 totais foi realizada nos extratos obtidos, e as amostras tiveram seu potencial antimicrobiano  
44 testado pelo método de Concentração Inibitória Mínima. Além disso, a caracterização química  
45 foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada a um Espectrômetro de  
46 Massa (CLAE-ESI-EM/EM). Os extratos obtidos a partir de resíduos da casca de *T.*  
47 *grandiflorum* apresentaram concentrações significativas de compostos fenólicos, além disso,  
48 apesar de não demonstrarem potencial bactericida, foram capazes de inibir parcialmente o  
49 crescimento microbiano das cepas que desafiaram. Sugerimos a presença de 9 compostos nos  
50 extratos da casca de cupuaçu e membrana interna do fruto, muitos deles com atividades  
51 biológicas de interesse industrial através da abordagem CLAE-ESI-EM/EM. Assim, os extratos  
52 residuais da casca de *T. grandiflorum* possuem potencial biotecnológico para a produção de  
53 novos bioprodutos, que podem ser fonte de substâncias bioativas.

54 **Palavras-chave:** Amazônia; Fenólicos; Cosmético, Aquicultura.

## 55 INTRODUÇÃO

56 O Brasil ocupa a terceira posição entre os maiores produtores de frutas no mundo atrás  
57 somente de Índia e China, com colheitas de 45 milhões de toneladas (Embrapa, 2021). O  
58 cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) é um dos mais importantes frutos na Amazônia,  
59 encontrado naturalmente nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Rondônia e Acre,  
60 enquanto cultivares comerciais podem ser encontrados em estados como Bahia, Amazonas e  
61 Pará (Santos et al., 2010; Pugliese et al., 2013, Barros et al., 2016, Idam,2020).

62 O Pará é o estado com maior produção do fruto, com uma área plantada de 8.900  
63 hectares e uma produção anual de 29 mil toneladas. Nesse panorama, em 2018, somente o  
64 município de Santarém foi responsável pela produção de 109 toneladas (Sedap,2022),  
65 abastecendo o mercado nacional e exportando para vários países, sendo Japão, Países Baixos,  
66 Reino Unido, Alemanha, Estados Unidos, Argentina, Bolívia e Paraguai os maiores  
67 consumidores internacionais (Gomes e Lima, 2019).

68 A maioria das publicações científicas produzidas sobre o cupuaçu focam em estudar  
69 aspectos diversos de sua polpa e sementes (Campos-Rodriguez et al., 2021), já empregadas  
70 comercialmente. A polpa deste fruto é apreciada devido ao seu sabor ácido característico e  
71 aroma floral intenso, sendo utilizada na produção de diferentes produtos alimentícios (Barros

72 et al., 2016), já o óleo extraído de suas sementes pode ser utilizado na produção de produtos  
73 alimentícios e cosméticos (Pugliese et al., 2013, Pereira et al, 2018). Além disso, a semente tem  
74 ganhado notoriedade devido a sua potencial aplicação na fabricação de um produto artesanal  
75 similar ao chocolate, denominado de cupulate (Pugliese et al., 2013, Barros et al., 2016).

76 Nesse contexto, são poucos os estudos que versam acerca da caracterização e  
77 aplicabilidade industrial de sua casca e outros resíduos de sua cadeia produtiva. Esses  
78 subprodutos possuem significativos teores nutricionais, destacando-se o potássio, ferro, selênio  
79 e antioxidantes (Golveia,2018; Avila-Sosa et al., 2019; Silva, 2020), podendo ser fonte de  
80 substâncias bioativas como compostos fenólicos, alcaloides, glicosídeos e compostos voláteis  
81 (Banerjee et al., 2016; Sagar et al., 2018; Silva,2020) e de compostos com atividade  
82 antimicrobiana (Arbos et al., 2013).

83 A presença de tais substâncias em matrizes vegetais torna-os atrativa para a indústria  
84 cosmeceutica pois podem proteger e curar a pele, e, quando comparados aos produtos  
85 cosméticos sintéticos, são brandos e biodegradáveis, possuindo atividades biológicas e  
86 terapêuticas (Soto, Falqué e Domínguez,2015; Cherubim et al.,2019). Ademais, resíduos  
87 vegetais despertam interesse, pois são de baixo custo, renováveis e abundante (Vásquez et al.,  
88 2019).

89 O Brasil se destaca como um dos países com maior potencial de expansão da aquicultura  
90 no mundo, a medida em que a demanda de pescado e produtos derivados de peixes aumenta  
91 devido ao elevado crescimento populacional e a maior preferência por comidas saudáveis  
92 (Assane et al,2021). Entretanto, a intensificação da produção de pescado pode favorecer o  
93 surgimento e proliferação de doenças infecciosas (Claudiano et al., 2019). Devido a esses  
94 problemas, é recorrente na terapêutica dos animais o uso de substâncias químicas, entretanto o  
95 uso indiscriminado desses compostos resulta em poluição ambiental, contaminação dos peixes  
96 e de outros organismos envolvidos na cadeia alimentar aquática (Claudiano et al. 2012). Nesse  
97 contexto, o uso de extratos vegetais para a contenção de doenças na aquicultura é uma  
98 alternativa ao tratamento tradicional com antibióticos, com diversos produtos de origem vegetal  
99 sendo reportados como agentes antimicrobianos (Jana et al,2018).

100 Dessa forma, o presente trabalho objetivou caracterizar quimicamente os extratos  
101 obtidos de resíduos agroindustriais de cupuaçu (*T. grandiflorum*) e avaliar a potencial aplicação  
102 como inibidor do crescimento de bactérias patogênicas a peixes.

103

104

## 105 **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 106 **Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos brutos**

107 O resíduo agroindustrial de casca (epicarpo) de *T. grandiflorum* Schum. foram doados  
108 pela Cooperativa dos Produtores Rurais de Santarém - Cooprusan. A pesquisa foi realizada nos  
109 Laboratórios de Farmacognosia, no Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento de Produtos  
110 Naturais Bioativos (P&DBio) da Universidade Federal do Oeste do Pará (IBEF-UFOPA) e no  
111 Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-USP).

112 Os extratos foram preparados a partir de resíduos da agroindústria (epicarpo = casca) do  
113 fruto de *T. grandiflorum*. O resíduo foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 40°C  
114 durante 72 horas, triturado em moinho de facas e refinado em peneira de 28 mesh (0,6 mm)  
115 para obtenção de um pó de fina granulação homogêneo. Após isso, foi acondicionado e  
116 identificado em embalagens de polietileno e armazenado em freezer a -40 °C até o momento  
117 das extrações.

118 Para o preparo do extrato alcoólico (CCsx), 50 g de casca seca e moída foi submetido  
119 ao método de extração via Soxhlet, que consiste na recirculação de 500 mL de etanol  
120 tratado/destilado PA 96 GL por um período de 8 horas. O extrato foi concentrado em  
121 rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida (Heidolph®, Laborota 4001 – efficient) equipado  
122 com bomba a vácuo (Heidolph®, Rotovac valve control) e armazenados em freezer a -40 °C até  
123 o momento das análises.

124 Para a produção do extrato alcoólico a frio (CCf), 500 g da casca seca e moída foram  
125 submetidas ao método de extração à frio com 1 litro de etanol PA 96 GL sob agitação magnética  
126 por duas vezes.

127 Adicionalmente, frutos de *T. grandiflorum* foram adquiridos de um supermercado em São  
128 Paulo- SP e levados ao LQPN-USP. Após a aquisição, os frutos foram higienizados em água  
129 corrente e o epicarpo separados de suas respectivas polpas. A membrana interna do epicarpo  
130 também foi coletada. Os resíduos foram secos em estufa com circulação de ar a 50 °C, e então  
131 triturados com auxílio de liquidificador

132 Para o preparo do extrato metanólico do epicarpo de cupuaçu, 100 g de material seco e  
133 moído foram submetidas ao método de extração a frio com 200 ml de metanol por duas vezes  
134 e o extrato resultante foi nomeado CCc.

135 De forma semelhante, o extrato metanólico membrana interna do epicarpo de cupuaçu  
136 foi obtido pela extração a frio de 2g de membrana seca e moída com 100 ml de metanol por  
137 duas vezes. O extrato resultante foi nomeado CCm.

138 Todos os processos de extração a frio foram realizados em erlenmeyer com agitação  
139 magnética.

140

#### 141 **Determinação de fenólicos totais**

142 Para a quantificação dos fenólicos totais dos extratos foi utilizado o método de Folin-  
143 Ciocalteau de acordo com Singleton e Rossi (1965). O ensaio consistiu na adição de 0,5 mL da  
144 amostra, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau 5 % e 2,0 mL de carbonato de sódio 4 % em tubo  
145 de ensaio, mantido por 2 horas à temperatura ambiente na ausência de luz. Após este período,  
146 foi realizada a leitura à 740 nm em espectrofotômetro (LGI-VS-721N, LGI scientific, São  
147 Paulo, Brasil). O resultado foi calculado a partir de uma curva padrão de ácido gálico e expresso  
148 em miligramas de equivalente em ácido gálico (EAG) por 100 gramas de amostra.

149 A concentração de compostos fenólicos foi categorizada em quatro classes: Alta (>5000  
150 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>), mediana alta (3000 - 5000 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>), mediana baixa (1000 - 3000  
151 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) e baixa (<1000 mg mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) (Chew et al.,2011).

152

#### 153 **Análises espectrométricas (CLAE-ESI-EM/EM)**

154 Para o preparo das amostras, 1 mg de cada extrato foi pesado e solubilizado em 1 ml de  
155 metanol grau CLAE, filtrados em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, teflon®, Millipore®)  
156 com poro de 0,45 µm e então adicionados em vials de 1,5 ml para análise.

157 As análises por espectrometria de massas foram realizadas em equipamento Shimadzu  
158 Prominence LC (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AD, degaseificador DGU-20A,  
159 amostrador automático SIL-20A, coluna forno CTO-20A e detector SPD-20A UV/Vis. A separação  
160 cromatográfica usou uma coluna de Pentafluorofenil (Luna-Phenomenex®, 5 µm, PFP (2) ,100 Å,  
161 h x φ = 150 x 2 mm) a 40 °C, com uma taxa de fluxo de solvente de 0,2 ml/min infundida diretamente  
162 no espectrômetro de massa e 10 µl de volume de injeção. O gradiente de eluição do método utilizado  
163 nas separações foram constituídos pelos eluentes A: água purificada em sistema Milli-Q  
164 (Millipore®) acidificada com 0,1 % de ácido fórmico e B: Acetonitrila + ácido fórmico 0,1%  
165 (Tabela 1). Os comprimentos de onda de monitoramento no UV foram 254 e 360 nm.

166 O espectrômetro de massa (Bruker MicrOTOF-QII) foi operado em modo negativo,  
167 utilizando nitrogênio como gás nebulizador (4 Bar) e de secagem (fluxo de 8 L/min). A voltagem  
168 capilar foi ajustada em 3500 V e a temperatura de secagem em 200 °C. A colisão e a energia do  
169 quadrupolo foram ajustadas para 10 e 8 eV, respectivamente. Os funis RF2, 2RF e hexapolo RF  
170 foram programadas para 400, 200 e 200 Vpp, respectivamente. A faixa de massa monitorada foi de  
171 100-1000 kDa.

172 Os dados obtidos foram analisados no software DataAnalysis 4.3 e os espectros de massa  
173 foram caracterizados por comparação com a literatura.

174 Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado em CLAE hifenado a espectrometria de massas.

175	Tempo	% B (ACN+ 0,1%
176	(min)	ácido fórmico)
177	0,1	2
178	3	2
179	32	10
180	34	100

### 181 **Atividade antimicrobiana**

182 Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos dos resíduos de cupuaçu foram  
183 utilizadas as seguintes cepas: *Escherichia coli* (ATCC 0022), *Salmonella* sp. (ATCC 14028),  
184 *Aeromonas hydrophila* (CP007518-2) e *Streptococcus agalactiae* isolado de tilápias  
185 naturalmente infectadas (Marcusso et al., 2021).

186 As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de culturas cultivadas em caldo  
187 Triptona Soja (TSB) para as bactérias *E. coli*, *Salmonella* sp. e *A. hydrophila*, e caldo *brain*  
188 *heart infusion* (BHI) para *S. agalactiae*. As cepas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e então  
189 cada um dos cultivos foi centrifugado, lavado, ressuspensão em solução tampão NaCl 0,9% e  
190 ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland ( $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

191 A avaliação da atividade antibacteriana e a determinação das Concentrações Inibitórias  
192 Mínimas (CIM) dos extratos de *T. grandiflorum* Schum. foi realizada segundo a técnica de  
193 microdiluição em caldo em conformidade com a norma M7-A6 do *Clinical and Laboratory*  
194 *Standards Institute* (CLSI, 2006) com modificações.

195 Para isso, os extratos foram diluídos em DMSO 5% na concentração inicial de 2000 µg  
196 mL<sup>-1</sup>. As soluções produzidas foram adicionadas em placas com 96 poços, nas quais foram  
197 realizadas diluições seriadas de razão 1:1 em caldo TSB para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *A.*  
198 *hydrophila*, e BHI para *S. agalactiae*. Ao final do processo, as concentrações dos extratos  
199 variaram de 7,8 a 1000 µg mL<sup>-1</sup> com os poços contendo 20 µL da suspensão bacteriana  
200 padronizada. Como controle positivo foram utilizados solução de ciprofloxacina a 1000 µg mL<sup>-</sup>  
201 <sup>1</sup> e realizados os controles de esterilidade do meio, crescimento do inóculo, turbidez dos extratos  
202 e controle negativo (DMSO 5%).

203 As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Após esse período,  
204 foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano e avaliação colorimétrica utilizando 30

205  $\mu\text{L}$  resazurina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) como indicador. Assim, a CIM foi determinada como a menor  
206 concentração do extrato bruto onde não foi observado visualmente crescimento microbiano.

207 Aditivamente, as microplacas, sem adição de resazurina, foram submetidas a leitura de  
208 absorvância em leitor de microplacas (DR-200BS-Kasuaki, Wuxi Hiwell Diatek Instruments,  
209 China) em comprimento de onda de 600nm. A partir desse dado foi determinada a viabilidade  
210 microbiana para cada micro-organismo, que foi calculada através da porcentagem de inibição  
211 do crescimento microbiano nas diferentes concentrações dos extratos testados, para cada micro-  
212 organismo de acordo com a equação: % Inibição do crescimento microbiano =  $[1 - (Ac/A0)] \times$   
213 100. Ac representa a média das absorvâncias por concentração de substância testada e subtraída  
214 do valor da absorvância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo  
215 e A0 a média das absorvâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância  
216 testada) (GUDIÑA et al., 2010). Este resultado, portanto, representa a porcentagem de células  
217 microbianas que a substância testada foi capaz de inibir.

218

#### 219 **Análise de dados**

220 As análises estatísticas foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos  
221 à ANOVA e ao Teste t de Student ou teste de Tukey, segundo as necessidades de cada análise,  
222 para determinar as diferenças significativas das médias ao nível de probabilidade de 5 %  
223 ( $p < 0.05$ ), utilizando o software GraphPad Prism 5.

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

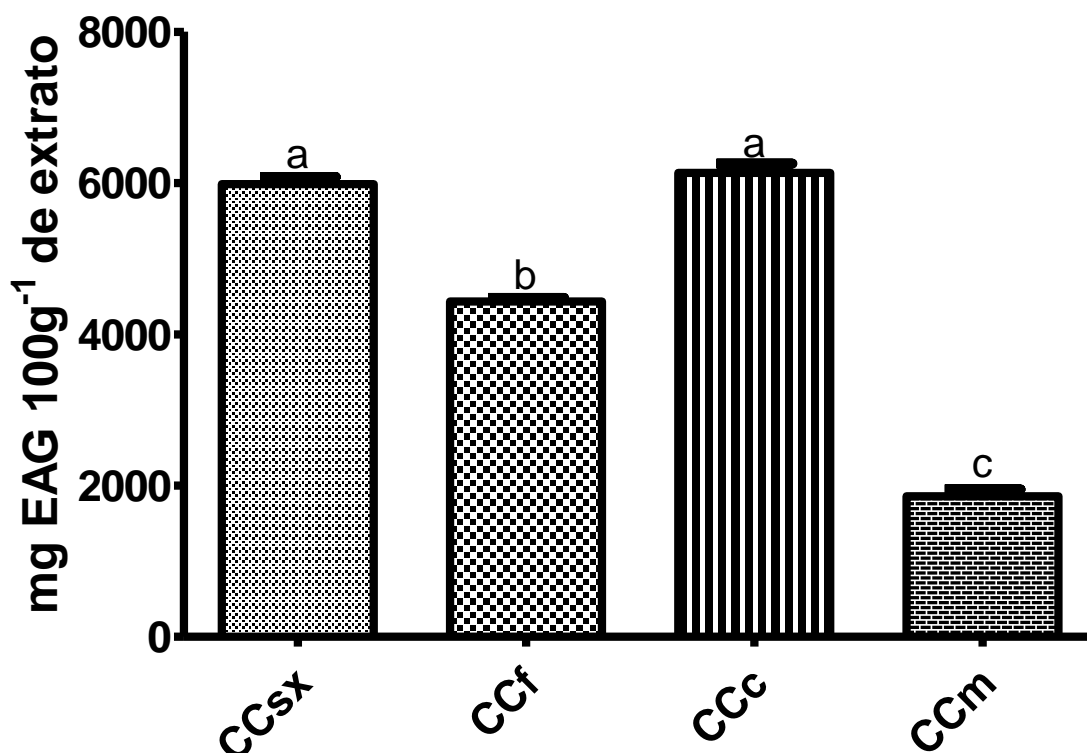
236

237

238

239 **RESULTADOS**240 **Quantificação de compostos fenólicos**

241 Os resultados da quantificação de compostos fenólicos dos extratos estão apresentados na  
 242 figura 1.



243

244 **Figura 1:** Quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu. CCSx-extrato  
 245 etanólico da casca de cupuaçu via soxhlet; CCf- Extrato etanólico a frio da casca de cupuaçu;  
 246 CCc- Extrato metanólico a frio da casca de cupuaçu; CCM- Extrato metanólico a frio da  
 247 membrana interna da casca de cupuaçu.

248 Ao analisar os resultados obtidos dos extratos da casca de cupuaçu obtidos por diferentes  
 249 métodos de extração foi possível verificar que a concentração de compostos fenólicos dos  
 250 extratos CCSx (5985,20 ± 95,59 mg EAG 100g<sup>-1</sup>) e CCc (6135,43 ± 121,49 mg EAG 100g<sup>-1</sup>) não  
 251 diferiram significativamente, entretanto a concentração de fenólicos observada no extrato CCf  
 252 (4435,76 ± 44,48 ug EAG.100g<sup>-1</sup>) foi significativamente menor do que a dos demais. Da mesma  
 253 forma, o extrato da membrana interna da casca de cupuaçu (1858,27 ± 91,84 mg EAG mg<sup>-1</sup>)  
 254 obteve valores de fenólicos totais significativamente menores que os demais extratos brutos  
 255 analisados.



256 **Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de massas (CLAE-ESI-EM/EM)**

257

258 O perfil químico dos extratos foi determinado utilizando a técnica de cromatografia  
 259 líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-ESI-EM/EM) em modo  
 260 negativo onde os respectivos resultados são demonstrados na tabela 2. Ao todo foi possível  
 261 propor a presença de 9 substâncias nos extratos de resíduos de cupuaçu produzidos por  
 262 diferentes métodos. Das substâncias propostas, 6 pertencem a classe dos flavonoides (vitexina,  
 263 quercetina-O-pentosídeo, rutina, hypolaetin 3'-methyl ether 8-O-β-D-glucuronide sulfate,  
 264 isoquercetina e Luteolina-7-glucosídeo), 1 refere-se a taninos (Dímero-proantocianidina), 1  
 265 condizente a ácidos fenólicos (dímero ácido caféico hexoside) e 1 representando a classe de  
 266 triterpenos (ácido asiático).

267 **Tabela 2:** Lista de substâncias propostas ao analisar dados de MS<sup>2</sup> em modo negativo dos  
 268 extratos de resíduos de cupuaçu (*T. grandiflorum*). FM- Fórmula molecular; TR- tempo de  
 269 retenção.

Sub. Prop.	FM	m/z	TR (min)	MS <sup>2</sup>	Extrato encontrado	Referências
Vitexina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.1 181	14.25	311.0697, 283.0737	CCsx;CCc	Pugliese et al.,2013; Koolen et al.,2013; Souza et al., 2017; Moita, 2019; Silva,2020
Quercetina-O-pentosídeo	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	433.0 947	15.06	300.0432,27 1.0381,255. 0365	CCsx;CCf;CCc	Cádiz-Gurrea et al.,2014; D'Souza,2017; Tauchen et al.,2016; Pugliese et al.,2013; Silva,2020
Rutina	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	609.1 653	14.02	300.0403,27 1.0365,255. 0365	CCsx;CCf;CCc	Tauchen et al.,2016; Sanchez-Rabaneda et al, 2003; Silva, 2020
Hipoletina 3'-metil éter 8-O-β-D-glicuronídeo 3'-O-sulfato	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>16</sub> S	571.3 080	21.37	315.0608,25 5.2475,241. 0211,153.00 66	CCsx;CCf,CCc, CCm	Pugliese et al.,2013; Barros et al.,2016; Moita, 2019;
Dímero do ácido caféico hexoside	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	683.2 436	02.10	341.1241,22 1.0802,179. 0667	CCsx;CCf	Spínola;Pinto e Castilho.,2015; Silva,2020;
Isoquercetina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.1 059	14.47	300.0422,27 1.0393,255. 0365	CCsx;CCf,CCc	Tauchen et al.,2016; D'Souza,2017 Moita,2019;
Dímero-proantocianidina	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577.1 507	12.20	407.0883,28 9.0858,245. 0900	CCf	Patras et al.,2014; Cádiz-Gurrea et al.,2014; D'Souza,2017;

						Barros et al.,2016; Spínola;Pinto e Castilho.,2015; Silva,2020
Ácido asiático	C30H48O5	487.3 611	21.65	487.3602,40 9.3283	CCsx; CCf; CCc; CCm	Xia et al.,2015
Luteolina-7- glucosídeo	C21H20O11	447.1 101	14.94	285.0501,28 4.0458,255. 0434, 227.0476	CCf;CCc	Sanchez-Rabaneda et al, 2003; Spínola;Pinto e Castilho.,2015

270

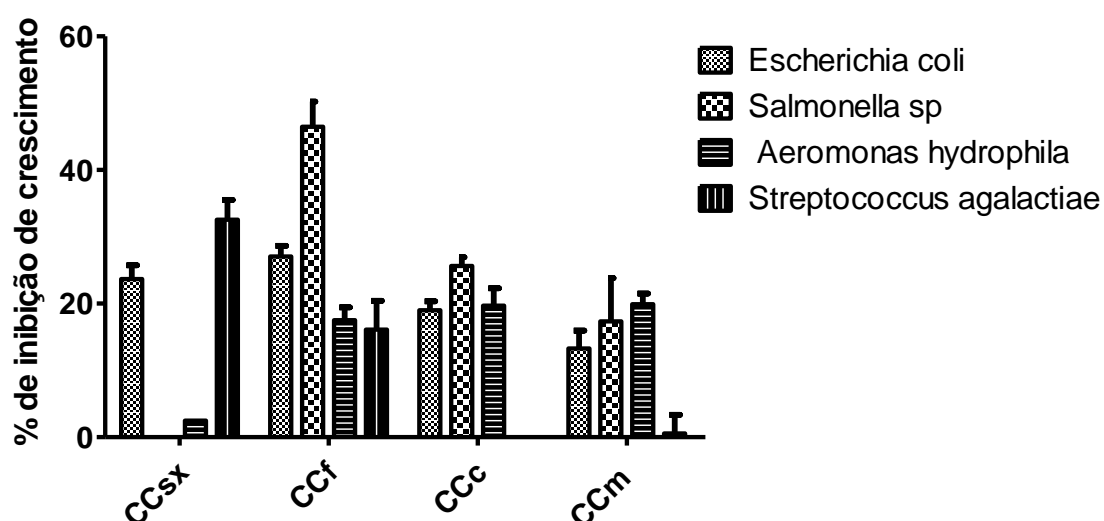
271 **Atividade antimicrobiana**

272 Ao avaliar o potencial antimicrobiano dos diferentes extratos dos resíduos de epicarpo  
273 de cupuaçu e do extrato da membrana interna de cupuaçu, não foi possível observar atividade  
274 antimicrobiana dos extratos frente as bactérias Gram-negativas *E. coli*, *Salmonella* sp. e *A.*  
275 *hydrophila*, e Gram-positiva *S. agalactiae* em nenhuma das concentrações de extratos testadas  
276 pelo método de CMI.

277 Entretanto, ao avaliar a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano avaliado por  
278 leitura de absorbância em leitor de microplacas, foi possível notar que todos os extratos na  
279 concentração de 1000 ug ml<sup>-1</sup> foram capazes de inibir parcialmente o crescimento microbiano  
280 dos patógenos utilizados (Figura 2). O extrato CCf apresentou o melhor resultado na inibição  
281 do crescimento microbiano para as bactérias gram negativas *Salmonella* sp. e *E. coli*, nesse  
282 sentido, o extrato foi capaz de inibir em 46,45 % o crescimento de *Salmonella* sp. e 27,06% *E.*  
283 *coli*. Já para a inibição da bactéria *A. hydrophila*, o melhor resultado de inibição média foi  
284 observado no extrato CCm com 19,92% seguido do extrato CCc com 19,69%. Ao avaliar a  
285 inibição de crescimento da bactéria gram positiva *S. agalactiae*, verificou-se que o extrato CCsx  
286 apresentou o maior potencial bacteriostático frente a esse microrganismo com inibição de  
287 32,54%, entretanto o mesmo extrato foi incapaz de inibir o crescimento de *Salmonella* sp e  
288 retardou a proliferação de *A. hydrophila* em apenas 2,46%.

289

290



291

292 **Figura 2:** Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano avaliado por leitura de  
 293 absorvância em leitor de microplacas. CCsx-extrato etanólico da casca de cupuaçu via sohxlet;  
 294 CCf- Extrato etanólico a frio da casca de cupuaçu; CCc- Extrato metanólico a frio da casca de  
 295 cupuaçu; CCm- Extrato metanólico a frio da membrana interna da casca de cupuaçu;

296

## 297 DISCUSSÃO

298 Segundo a escala proposta por Chew et al. (2011) os extratos CCsx e CCc apresentaram  
 299 valores considerados altos na concentração de compostos fenólicos, já o extrato CCf  
 300 demonstrou concentração considerada mediana alta, enquanto o extrato CCm foi considerado  
 301 mediano baixo na concentração dessas substâncias.

302 Os resultados obtidos no presente trabalho são comparáveis a pesquisas encontradas na  
 303 literatura, que descrevem diversas partes do fruto de *T. grandiflorum*. Tauchen et al. (2016) ao  
 304 analisar extratos do arilo, pericarpo e folhas de *T. grandiflorum* verificaram concentrações de  
 305 antioxidantes da ordem de  $5760 \pm 320$ ,  $16300 \pm 810$  e  $40060 \pm 2590$  mg EAG  $100g^{-1}$  de amostra  
 306 respectivamente. Os dados obtidos referentes aos extratos CCsx e CCc foram superiores quando  
 307 comparados aos extratos de arilo, entretanto, os extratos CCf e CCm demonstraram valores  
 308 menores. Além disso, todos os extratos analisados demonstram concentração de compostos  
 309 fenólicos menores que a encontrados nas folhas da espécie e no pericarpo (composto por casca  
 310 e polpa do fruto) do fruto. Outros trabalhos, como o de Lima (2013) ao averiguar a concentração  
 311 de compostos fenólicos presente nos extratos do epicarpo de cupuaçu feito por diferentes  
 312 métodos de extração, verificou que a concentração desses compostos variou entre 11330  
 313 mgEAG  $100g^{-1}$  de extrato e 15780 mgEAG  $100g^{-1}$  de extrato, sendo a menor concentração

314 observada para o método de sonicação combinado com etanol/água (7:3) e o maior observado  
315 para o método maceração a frio com etanol. Os resultados descritos pelos autores corroboram  
316 com os achados em nossa pesquisa, indicando a presença de concentrações significativas de  
317 compostos fenólicos no cupuaçu e seus resíduos.

318 Em nossa pesquisa buscamos verificar a concentração de compostos fenólicos em resíduos  
319 da agroindústria do cupuaçu como estratégia para a valorização desse subproduto para ser  
320 empregado na indústria cosmética ou na psicultura. Dessa forma, além de demonstrarmos, nas  
321 amostras analisadas, concentrações variando de elevada a mediana baixa, é importante salientar  
322 que não há regulação quanto as concentrações mínimas necessárias dessas substâncias para o  
323 uso dos extratos nas áreas citadas, possibilitando assim, com que o material estudado possa ser  
324 empregado na fabricação de novos produtos.

325 Ademais, é importante notar que, embora tenhamos identificado teores igualmente  
326 elevados de compostos fenólicos nos extratos de casca de cupuaçu realizados com etanol via  
327 soxhlet e metanol a frio, o uso de metanol como solvente não é recomendado para a produção  
328 de produtos farmacêuticos (Carmagnani, Mansano e Sobreira, 2020) ou alimentícios, sendo  
329 preferível o emprego do etanol já que é um solvente não tóxico, de custo baixo, fácil  
330 disponibilidade e aprovado para uso por órgão reguladores como o *Food and Drug*  
331 *Administration* (FDA) (Nguang et al., 2017).

332 Os diferentes resultados observados ao analisar os dados de compostos fenólicos presentes  
333 em extratos de casca de cupuaçu, podem ser explicados pela variação de condições nos  
334 processos de extração. Condições de extração como a técnica empregada, o solvente utilizado,  
335 temperatura, tempo de extração e número de ciclos são importantes parâmetros que controlam  
336 o rendimento dos extratos (Kukula-Koch et al., 2013). Ademais, a menor concentração de  
337 compostos fenólicos presentes na amostra CCm em comparação aos observados nos extratos  
338 do casca cupuaçu podem significar que a membrana interna da casca de cupuaçu é responsável  
339 somente por uma pequena fração dos compostos fenólicos presentes nos extratos da casca  
340 completa. Esse resultado aponta que a exploração separada dessa parte do fruto é contra  
341 produtiva, sendo indicado o aproveitamento total dos resíduos da casca sendo esse um material  
342 abundante e barato.

343 Em nossa pesquisa propomos a presença de 9 substâncias nos extratos de resíduos de  
344 cupuaçu analisados. Dentre os íons identificados sugestivos a flavonoides temos: m/z 431  
345 relacionado a vitexina, um flavonoide que já foi demonstrado ter atividade antioxidante e  
346 antimicrobiana (Pugliese et al., 2013; Lima, 2013; Das et al., 2016; Silva, 2020); o íon m/z 433

348 que é característico da massa da quercetina-O-pentosídeo, flavonóide que também possui  
349 atividade antioxidante (Pugliese et al.,2013;Lima, 2013; Tauchen et al.,2016; Silva,2020); o ion  
350 m/z 609 que pode estar relacionado com a massa da rutina, bioflavonoide com alto potencial  
351 antioxidante (Sanchez-Rabaneda et al, 2003;Tauchen et al.,2016; Silva, 2020); o ion m/z 571  
352 que pode estar relacionado ao flavonoide hipoletina 3'-metil éter sulfato de 8-O-β-D-  
353 glicuronídeo (Pugliese et al., 2013); e o ion m/z 463 sugestivo à massa da isoquercetina que  
354 apresenta potencial antioxidante e anti-inflamatório (Valentová et al., 2014; Tauchen et  
355 al.,2016; D'Souza,2017; Moita,2019), já o íon m/z 447 pode ser associado ao flavonoide  
356 glicosilado Luteolina-7-glucosídeo, sendo que diversos glicosídeos de luteolina já demonstram  
357 atividade antioxidante (Matsuta et al., 2011; Tauchen et al.,2016; Silva, 2020).

358 Também foram observados íons possivelmente associados a ácidos fenólicos e taninos.  
359 O ion m/z 683 pode ser característico do dímero ácido caféico hexosídeo (Spínola, Pinto e  
360 Castilho.,2015; Silva, 2020) e o ions m/z 577 que pode ser característico da massa de Dímero-  
361 proantocianidina, composto que compõem a família da proantocianidina, também conhecidos  
362 como taninos condensados( D'Souza et al., 2017; Moita, 2019; Silva,2020).

363 Ademais, o ion m/z 487 pode ser condizente com a substância ácido asiático, um  
364 triterpenóide pentacíclico do tipo ursano que apresenta efeitos antioxidante significativos e  
365 potencial uso no tratamento de machucados na pele, inflamação, tumores e danos em nervos  
366 tendo sido isolado de *Centella asiatica* (Xia et al.,2015) não sendo descrito, até então, na  
367 literatura para a espécie *T. grandiflorum*.

368 A possível presença dessas substâncias nos extratos analisados, reforça que os resíduos  
369 da cadeia produtiva do cupuaçu podem ser fontes de moléculas bioativas com aplicações  
370 industriais e biotecnológicas. Entretanto, é necessário o uso de abordagens de isolamento e  
371 caracterização de cada uma das moléculas proposta nessa matriz vegetal a fim de confirmar a  
372 sua presença, bem como explorá-las de maneira eficiente.

373 Cada um dos extratos analisados demonstrou um perfil químico distinto, conforme  
374 demonstrado na tabela 2. A diferente composição de substâncias encontradas nos diversos  
375 extratos analisados, pode ser explicada pela diferença da matriz vegetal utilizada e pelos  
376 métodos de extração empregadas.

377 O metanol, devido a sua elevada polaridade, é geralmente mais eficiente que o etanol  
378 na obtenção de compostos polares (Sanvido ,2015), entretanto o seu uso é desaconselhado na  
379 produção de produtos cosméticos, farmacêuticos ou alimentícios, sendo sugerido sua

380 substituição por etanol, pois esse solvente é não tóxico, pouco dispendioso e a sua utilização  
381 ser permitida em diversas indústrias (Leocádio,2018).

382 Além disso, em nossa pesquisa observamos que o uso de sohxlet foi eficaz na extração  
383 das substâncias estudadas, visto que a temperatura pode tornar as paredes celulares permeáveis,  
384 aumentando a solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos, facilitando a extração,  
385 no entanto, eventualmente poderia ocasionar a degradação de substâncias termolábeis (Castro  
386 e Capote, 2010), o que poderia explicar a ausência do ion possivelmente associado a Luteolina-  
387 7-glucosídeo no extrato produzido por esse método. Por outro lado, o método de extração a frio  
388 tem como vantagens não requerer equipamento ou local especial para ser realizado, entretanto  
389 seu longo tempo de extração é comumente citado como uma desvantagem (Azmin et al., 2016).

390 De toda forma, decisões devem ser tomadas para a obtenção de um produto com  
391 quantidade adequada de compostos bioativos, bem como para garantir economia geral de  
392 materiais e solvente, o que torna valido o estudo das melhores condições de extração de  
393 determinados princípios ativos (Camarginani et al., 2020).

394 Dados publicados em pesquisas anteriores já demonstravam a presença de diferentes  
395 classes de compostos fenólicos em resíduos de cupuaçu e em outras partes da planta (tabela 3).  
396 Entretanto, não há na literatura relatos das substâncias obtidas da membrana interna da casca  
397 de cupuaçu, sendo esse um resultado inédito.

398 **Tabela 3:** Lista de algumas substâncias propostas ou identificadas em diferentes partes de  
399 cupuaçu (*T. grandiflorum*) descritas na literatura. EESON – Extrato etanólico por sonicação,  
400 EESOX- Extrato etanólico por sohxlet; EEMQ- Extrato etanólico por maceração a quente;  
401 EEMF-Extrato etanólico por maceração a frio; EHSO- Extrato hidroalcoólico por sonicação;  
402 EHSOX- Extrato hidroalcoólico por Soxhlet; EHMQ- Extrato hidroalcoólico por maceração a  
403 quente; EHEMF- Extrato hidroalcoólico por maceração a frio; EMX-Extrato produzido visando  
404 o isolamento de metilxantinas; FDHMF- fração diclorometano de extrato hidroalcoólico a frio;  
405 EHP- Extrato hidroalcoólico por percolação; EF- Extrato produzido visando o isolamento de  
406 flavonoides.

Sub. Prop. e/ou identificada	Método utilizado	Local da planta	Tipo de extrato	Referência na qual a substância é descrita
ácidos cis-caftárico	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap	Epicarpo; Endocarpo	EESON; EESOX; EEMQ; EEMF	Lima,2013
p-coumaroilhexose	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap	Epicarpo; Endocarpo	EESON; EESOX; EEMQ; EEMF	Lima,2013
ácido cafeoil-D-glicose	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap	Epicarpo; Endocarpo	EESON; EESOX; EEMQ; EEMF	Lima,2013
Ácido caféico	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap; detector orbitrap	Epicarpo; Casca da semente	EESON; EESOX; EEMQ; EEMF	Lima,2013; Moita,2019

Derivado de ácido quínico	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap	Epicarpo	EHSO 70%; EHS 70%; EHM 70%	Lima,2013
Dímero de proantocianidinas	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap	Epicarpo	EESOX; EHSOX 70%; EHSO 50%	Lima,2013; Silva,2020
Ácido clorogênico	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap; detector orbitrap	Endocarpo; Casca da semente	EESON 70%; EESOX 70%; EEMQ 70%; EEMF 70%; EHSO; EHM 70%; EHM 70%; EHM 80%	Lima,2013; Moita,2019
Acacetina	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap	Endocarpo	EESOX; EEMQ; EHSO 70%	Lima,2013
Quercetina-3-O-glucoronídeo	CLAE-EM/EM analisador Ion-Trap	Endocarpo	EESOX	Lima,2013
Ácido quínico	CLAE-EM/EM detector orbitrap	Epicarpo; Casca da semente	EHM 80%; EHSO 50%	Moita, 2019; Silva,2020
Ácido p-coumaroil aspartato	CLAE-EM/EM detector orbitrap	Casca da semente	EHM 80%	Moita, 2019
(+)-N-[4'-Hidroxi (E)-cinamoil]-L-aspartico				
Campeferol	CLAE-EM/EM detector orbitrap	Casca da semente	EHM 80%	Moita, 2019
Luteolina	CLAE-EM/EM detector orbitrap	Casca da semente	EHM 80%	Moita, 2019
Isoscutelareína	CLAE-EM/EM detector orbitrap	Casca da semente	EHM 80%	Moita, 2019
(-)-N-[3',4'-dihidroxi-(E)-cinamoil]-3-hidroxi-L-tirosina	CLAE-EM/EM detector orbitrap	Casca da semente	EHM 80%	Moita, 2019
hexanil xilopiranosil glucopiranosídeo	CLAE-EM/EM detector orbitrap	Casca da semente;	EHM 80%	Moita, 2019
isoscuteleína 8-O-β-D-glucoronídeo	CLAE-EM/EM detector orbitrap; CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Casca da semente; Semente	EHM 80%; EF	Pugliese et al.2013; Moita, 2019
Hipolaetina 8-O-β-D-glucoronídeo	CLAE-EM/EM detector orbitrap; CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Epicarpo; Casca da semente; Semente	EHSO 50%; EHM 80%; EF	Pugliese et al.2013; Moita, 2019; Silva,2020
Isoscutelareína-8-O-D-glucoronídeo 3''-O-sulfato	CLAE-EM/EM detector orbitrap; CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Casca da semente; Semente	EHM 80%; EF	Pugliese et al.2013; Moita, 2019;
Hipolaetina 3'-metil éter 8-O-β-D-glucoronídeo 3''-sulfato	CLAE-EM/EM detector orbitrap; CLAE-DAD-EM/EM com padrões; RMN	Casca da semente; Semente	EHM 80%; EF	Pugliese et al.2013; Moita, 2019;
Ácido gálico	CLAE-UV com padrões	Resíduos de semente	EHP	Costa et al.,2020

Ácido protocatecuico	CLAE-UV com padrões	Resíduos de semente	EHP	Costa et al,2020
Epicatequina	CLAE-UV com padrões	Resíduos de semente	EHP	Costa et al,2020
ácido p-cumárico	CLAE-UV com padrões	Resíduos de semente	EHP	Costa et al,2020
Quercetina glicosilada	CLAE-UV com padrões	Resíduos de semente	EHP	Costa et al,2020
Quercetina	CLAE-UV com padrões	Resíduos de semente	EHP	Costa et al,2020
Apigenina 8-C-hexosídeo	CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Semente	EF	Pugliese et al,2013
Quercetina 3-O-pentosídeo	CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Semente	EF	Pugliese et al,2013
Hipoletina 8-O-β-D-glicuronídeo glicosídeo	CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Semente	EF	Pugliese et al,2013
Hipoletina 8-O-β-D-glicuronídeo 3"-O-sulfato	CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Semente	EF	Pugliese et al,2013
Isoscutelareína 8-O-β-D-glicuronídeo	CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Semente	EF	Pugliese et al,2013
Hipoletina 3"-metil éter 8-O-β-D-glicuronídeo	CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Semente	EF	Pugliese et al,2013
Isoscutelareína 8-O-β-D-glicuronídeo 3"-O-sulfato	CLAE-DAD-EM/EM com padrões	Semente	EF	Pugliese et al,2013
Catequina	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva, 2020
Ácido vinílico glucosídeo	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020
Ácido caféico 3-glucosídeo	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EHSO 50%	Silva,2020
Vitexina	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020
Quercetina-O-pentosídeo	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020
Luteolina-7-glucosídeo	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020
Isoscutelareína 8-glucuronídeo	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020
Isoquercetina	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020
Diidroquercetina 6-C-hesoxídeo	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020
Procianidina A	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020



Procianidina B	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EHSO 50%	Silva,2020
Rutina	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EESOX; EHSO 50%	Silva,2020
Dímero ácido caféico hexoside	CLAE-EM/EM analisador ion trap	Epicarpo	EHSO 50%	Silva,2020

407 Nossa pesquisa corrobora com os resultados obtidos por Silva (2020), que, utilizando  
 408 análises de CLAE hifenado com espectrometria de massas e utilizando um detector do tipo *ion*  
 409 *trap*, propôs a presença de 9 compostos da classe dos flavonoides (Catequina, Vitexina,  
 410 Quercetina-O-pentosídeo, Luteolina-7-glucosídeo, Isoscutelareína 8-glucuronídeo,  
 411 Isoquercetina, Diidroquercetina 6-C-hesoxídeo, Hipolaetina-8-O-glucuronídeo e Rutina), 3  
 412 ácidos fenólicos (Ácido vinílico glucosídeo, Ácido caféico 3-glucosídeo, Dímero ácido caféico  
 413 hexoside) e 3 taninos (Procianidina A, Procianidina B e Dímero-proantocianidina) em extratos  
 414 etanolicos e hidroalcoolicos 50 % da casca de *T. grandiflorum*. 7 das 15 substâncias propostas  
 415 pelo autor, também foram propostas em nossa pesquisa.

416 Costa et al. (2020) identificaram a presença de 7 compostos fenólicos (Ácido gálico,  
 417 Ácido protocatecuico, epigalocatequina-galato, Epicatequina, Ácido p-cumárico, Quercetina  
 418 glicosilada e Quercetina) ao analisar o extrato hidroetanólico 70% produzido a partir de  
 419 resíduos de sementes prensadas de *T. grandiflorum*, utilizando substâncias padrão em CLAE-  
 420 UV. Da mesma forma, Moita (2019) empregando a metodologia de CLAE-EM/EM com  
 421 detector orbitrab verificou a presença de 12 possíveis compostos fenólicos em extratos da casca  
 422 de sementes de *T. grandiflorum* produzidos através de maceração a frio com uma solução  
 423 etanol-água a proporção de 8:2. Alguns dos compostos sugeridos pelo autor foram: Ácido  
 424 cafeico, Luteolina, Hipolaetina 8-O-  $\beta$ -D-glucuronídeo, Quercetina 3-O-  $\beta$ -D-glucuronídeo 6''-  
 425 metil éster ou Hipolaetina 3'-metil éter 8-O- $\beta$ -D glucuronídeo, Hipolaetina 3'-metil éter 8-O- $\beta$ -  
 426 D glucuronídeo 3''- sulfato. Já, Pugliese et al. (2013) identificaram a presença de 8 flavonoides  
 427 glicosilados (apigenina 8-C-hexosídeo, hipoletina 8-O- $\beta$ -D-glicuronídeo glicosídeo, quercetina  
 428 3-O-pentosídeo, hipoletina 8-O- $\beta$ -D-glicuronídeo, hipoletina 8-O-  $\beta$  -D-glicuronídeo 3'' -O-  
 429 sulfato, isoscutelareína 8-O- $\beta$ -D-glicuronídeo, hipoletina 3'' -metil éter 8-O-  $\beta$  -D-  
 430 glicuronídeo, isoscutelareína 8-O-  $\beta$  -D-glicuronídeo 3'' -O-sulfato e hipoletina 3'-metil éter  
 431 8-O- $\beta$ -D-glicuronídeo 3'-O-sulfato) em extratos produzidos a partir de sementes de cupuaçu,  
 432 utilizando uma abordagem de isolamento de flavonoides e realizando análises por CLAE-  
 433 EM/EM de alta resolução e RMN. Em nossa pesquisa, propomos a presença de alguns dos

434 compostos descritos pelos autores, sugerindo que os extratos da casca de cupuaçu possam ser  
435 utilizados como fonte alternativa de substâncias obtidas geralmente de sementes do fruto.

436 É importante ressaltar que em nenhum dos trabalhos citados para *T. grandiflorum* foi  
437 descrito ou proposto a presença de ácido asiático.

438 A baixa eficiência da inibição do crescimento de *Salmonella* sp e *A. hydrophila* pelo  
439 extrato CCsx quando comparado aos extratos produzidos a partir do epicarpo de cupuaçu (CCf)  
440 por extração a frio com etanol, pode ser explicado pelo método de extração empregado, visto  
441 que a extração por soxhlet pode ocasionar a degradação de substâncias termolábeis conforme  
442 devido as elevadas temperaturas segundo Castro e Capote (2010). A exemplo disso, o ion  
443 sugerido como pertencente a Luteolina-7-glucosídeo foi encontrado somente nos extratos a  
444 frios com etanol e metanol do epicarpo de cupuaçu, enquanto o um dos ions possivelmente  
445 associado a um Dímero-proantocianidina que foi observado somente no extrato CCf.

446 Os resultados da atividade antimicrobiana encontrados na presente pesquisa são  
447 semelhantes aos demonstrados por outros trabalhos com *T. grandiflorum*. Silva (2020) verificou  
448 que o extrato produzido com etanol 96 GL via Soxhlet apresentou atividade bacteriostática  
449 frente a *Salmonella* sp. Em concentração de 1000 ug ml<sup>-1</sup>, entretanto, o mesmo extrato não  
450 demonstrou atividade biológica contra as demais cepas testadas. Além disso, o autor verificou  
451 que o extrato hidroalcolico assistido por ultrassom do epicarpo de cupuaçu apresentara  
452 atividade antimicrobiana, embora limitada, frente a *S. aureus*, *Salmonella* sp. *E. coli*, com  
453 uma concentração inibitória de 1000 ug ml<sup>-1</sup>. Embora os compostos fenólicos,  
454 flavonoides e outras substâncias analisados nos extratos, possam apresentar atividade  
455 antimicrobiana (Daglia,2012), é possível que substâncias responsáveis pela inibição do  
456 crescimento microbiano estejam em concentrações baixas para demonstrar atividade biológica  
457 significativa.

458 Outra hipótese que pode ser levada em consideração é complexidade dos extratos  
459 analisados, visto que a baixa atividade antimicrobiana pode ter sido suprimida pelo sinergismo  
460 entre as diferentes classes de compostos encontradas (Silva,2020).

461 Há interesse crescente sobre substâncias oriundas de plantas como alternativas ao uso  
462 de antibióticos e produtos químicos no combate a patógenos em piscicultura (Jana et al,2018).  
463 Neste sentido, deve-se dar importância ao potencial bacteriostático observado nos nossos  
464 extratos frente aos microrganismos, principalmente *A. hydrophila* e *S. agalactiae*, visto que

465 esses patógenos são responsáveis por infecções e mortes na produção de pescados (Madhuri et  
466 al,2012). Dessa forma, nossos resultados podem indicar que os extratos obtidos da casca de  
467 cupuaçu poderiam ser empregados na profilaxia de doenças causadas por bactérias em peixes  
468 ou diminuindo o ritmo de proliferação de um microrganismo já instalado no sistema, no entanto,  
469 há necessidade de haver estudos mais aprofundados sobre essa possível aplicação. Ademais, a  
470 inibição do crescimento microbiano observado em nosso estudo pode indicar seu potencial uso  
471 na indústria como um conservante natural em produtos cosméticos, pois, o resíduo  
472 agroindustrial é barato, abundante e sustentável (Balboa et al.,2014).

## 473 **CONCLUSÃO**

474 Em nossa pesquisa, verificamos que os extratos obtidos à partir da casca de *T.*  
475 *grandiflorum* mostraram concentrações significativas de compostos fenólicos. A análise  
476 empregando a abordagem CLAE-ESI-QTOF sugeriu a presença de 9 compostos nas amostras  
477 indicando que os extratos estudados podem ser uma fonte alternativa de compostos de interesse  
478 industrial e biotecnológico. Importante observar que a presença do composto Ácido asiático no  
479 fruto do cupuaçu é original e pela primeira vez proposto.

480 Embora, não tenha sido observado potencial bactericida nos extratos analisados, foi  
481 possível verificar o potencial inibidor do crescimento de bactérias patogênicas, apontando um  
482 possível uso industrial no controle do crescimento microbiano em setores da cosmética e  
483 aquicultura. Pontuamos que ainda são necessários estudos para a verificação exata de quais  
484 substâncias seriam responsáveis pelas atividades biológicas relatadas.

485 Os resultados em conjunto apontam que os extratos de resíduos de *T. grandiflorum*  
486 apresentam potencial biotecnológico para a produção de novos bioprodutos, podendo ser fonte  
487 de substâncias bioativas que poderiam ser utilizados em diferentes setores industriais agregando  
488 valor a esse resíduo.

489

## 490 **AGRADECIMENTOS**

491 Agradecemos a Fundação Amazônica de Amparo a Estudos e Pesquisa do estado do  
492 Pará (FAPESPA) e a Fundação de Integração Amazônica (FIAM) pela bolsa obtida através do  
493 programa FAPESPA-FIAM assim como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
494 Nível Superior (CAPES) pelo auxílio no custeio de passagens mediante ao programa PROCAD.  
495 À Cooperativa dos Produtores Rurais de Santarém – Cooprusan pelo material de estudo

496

497 **REFERÊNCIAS**

- 498 Arbos, K.; Aparecida, S.; Pamela, C. C.; Fátima, R. 2013. Atividade antimicrobiana,  
499 antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. *Revista*  
500 *Ceres* 60:161-165. DOI: <https://dx.DOI.org/10.1590/S0034-737X2013000200003>
- 501 Assane, I. M.; Sousa, E. L. ; Valladao, G. M. R.; Tamashiro, G. D. ; Urbinati, E. C., et al. 2021.  
502 Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities  
503 of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil. *Aquaculture* 541: 736848
- 504 Avila-sosa, R.; Montero-Rodríguez, A. F.; Aguilar-Aalonso, P.; Vera-López, O.; Lazcano-  
505 Hernández, M.; Morales-Medina, J. C. ; Navarro-cruz, A. R; et al. 2019 . Antioxidant  
506 properties of amazonian fruits: a mini review of in vivo and in vitro studies. *Oxidative*  
507 *Medicine and Cellular Longevity* 2019: 8204129.
- 508 Azmin, S. N. H. M.; Manan, Z. A.; Alwi, S. R. W.; Chua, L. S.; Mustaffa, A. A.; Yunus, N. A.  
509 2016. Herbal Processing and Extraction Technologies. *Separation & Purification Reviews* 45:  
510 305–320.
- 511 Balboa, E. M.; Soto, M. L.; Nogueira, D. R.; González-López, N.; Condea, E.; Mourea, A.;  
512 Vinardell, M. P.; Mitjans, M.; Domínguez, H. .2014. Potential of antioxidant extracts  
513 produced by aqueous processing of renewable resources for the formulation of cosmetics.  
514 *Industrial Crops and Products* 58: 104–110.
- 515 Banerjee, J.; Singh, R.; Vijayaraghavan, R.; MacFarlane, D.; Patti, , A.F.; Arora, A. 2016.  
516 Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food*  
517 *Chemistry* 225: 10–22.
- 518 Barros, H. R. de M.; García-Villalba, R.; Tomás-Barberán, F. A. ; Genovese, M. I. 2016.  
519 Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu  
520 (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. *Journal of*  
521 *Functional Foods* 22: 477–489
- 522 Cádiz-Gurrea, M.L.; Lozano-Sanchez, J.; Contreras-Gámez, M.; Legeai-Mallet, L. Fernández-  
523 Arroy, S.; Segura-Carretero, A. 2014. Isolation, comprehensive characterization and  
524 antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. *Journal of Functional Foods* 10: 485–498.
- 525 Campos-Rodriguez, J.; Aguayo-Flores, M.; Mendoza-Narvaez, A.; Acosta-Baca, A.; Paucar-  
526 Menacho, L. M. 2021. Copoazú (*Theobroma grandiflorum*.): Botanical characterization,  
527 nutritional composition, antioxidant activity and bioactive compounds. *Agroindustrial Science*  
528 11: 339 – 343.
- 529 Carmagnani, H. J.; Mansano, G. B.; Sobreira, F. 2020. Otimização do processo extrativo de  
530 *Phyllanthus niruri* L. *Mundo da Saúde* 44:134-143.

- 531 Carvalho, A. V.; García, N. H. P.; Amaya-Farfán, J. 2006. Physico-chemical properties of the  
532 flour, protein concentrate, and protein isolate of the cupuassu (*Theobroma grandiflorum*  
533 Schum) seed. *Journal of Food Science* 71: 573-578.
- 534 Castro, M.D. L.; Priego-Capote, F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal*  
535 *of Chromatography* 1217 :2383–2389
- 536 Cherubim, D. J.L.; Martins, C. V. B.; Fariña, L. O.; Lucca, R. A. S. 2019. Polyphenols as  
537 natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology* 00:1–5.
- 538 Chew, Y. L.; Chan, Elaine, W. L.; Tan, P. L.; Lim, Y. Y.; Stanslas, J.; Goh, J. K. 2011.  
539 Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and  
540 antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia.  
541 *Complementary and Alternative Medicine* 11:12.
- 542 Claudiano G. S, Pilarsk F., Cruz C. 2012. Avaliação da concentração letal CL 50% (CL (I) (50-  
543 96h)) do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em guarus (*Phalloceros caudimaculatus*).  
544 *Archives of Veterinary Science* 17: p.15-19.
- 545 Claudiano, G. S.; yunis-aguinaga, J. marinho-neto, F. A.; miranda, R. L.; Martinsa, I. M.;  
546 Otanib, F. S.; Mundimd, A. V.; Marzocchi-Machado, C. M.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R. 2019.  
547 Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by  
548 *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* .88: p.259-265.
- 549 CLSI - clinical and laboratory standards institute document m7-a6. 2006. Methods for dilution  
550 antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard.  
551 *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne, PA.
- 552 Costa, R. S.; Santos, O. V.; Lannes, S. C. da S.; Casazza, A. A.; Aliakbarian, B.; Perego, P. et  
553 al. 2020. Bioactive compounds and value-added applications of cupuassu (*Theobroma*  
554 *grandiflorum* Schum.) agroindustrial by-product. *Food Science and Technology* 40: 401-407.
- 555 D'souza, R. N.; Grimbs, S.; Behrends, B.; Bernaert, H.; Ullrich, M. S.; Kuhnert, N. 2017.  
556 Origin-based polyphenolic fingerprinting of *Theobroma cacao* in unfermented and fermented  
557 beans. *Food Research International* 99: 550–559.
- 558 Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agentes. *Current Opinion in Biotechnology*  
559 23:174–181.
- 560 Das, M. C.; Sandhu, P.; Gupta, P.; Rudrapaul, P.; De, U. C.; Tribedi, P. et al. 2016. Attenuation  
561 of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with  
562 azithromycin and gentamicina. *Scientific Reports* 6:23347.
- 563 EMBRAPA, 2021. Frutas e hortaliças. ([https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-](https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas)  
564 [a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas](https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas)) Acessado em 17 de junho de 2022.
- 565 Golveia, J. C. S.; Santiago, M. F.; Sales, P. T. F.; Sartoratto, A.; P. A. N.; Thomaz, D. V. et al.  
566 2018. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) residue and its potential application in the

- 567 bioremediation of 17-A-ethinylestradiol as a *Pycnoporus sanguineus* laccase inducer.  
568 *Preparative biochemistry and biotechnology* 48:541-548.
- 569 Gomes, C. DA S.; Lima, R. A. 2019. Bibliographical review of the malvaceae family, with  
570 emphasis in species *Theobroma cacao* L. and *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.)  
571 Schum. *SAJEBTT* 6:218-228.
- 572 Gudiña, E. J.; Rocha, V.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, L. R. 2010. Antimicrobial and antiadhesive  
573 properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. *Letters*  
574 *in Applied Microbiology* 50: 419-424.
- 575 Idam.2020. Boas práticas de produção sustentável no Amazonas: Cupuaçu  
576 (<http://www.idam.am.gov.br/cultura-cupuacu/>) acessado em 17 de junho de 2022.
- 577 Jana, P.; Karmakar, S.; Roy, U.; Paul, M.; Singh, A. K.; Bera, K. K.2018. Phytobiotics in  
578 aquaculture health management: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6:  
579 1422-1429
- 580 Koolen, H. H. F.; Da Silva, F. M. A.; Gozzo, F. C.; De Souza, A. Q. L.; De Souza, A. D. L.  
581 2013. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from  
582 buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-EM/EM. *Food Research International* 51: 467–  
583 473.
- 584 Kukula-Koch, W.; Aligiannis, N.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, A. L.; Glowniak, K.;  
585 Kalpoutzakis, E. 2013. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant  
586 activity of Cretan barberry herb. *Food Chemistry* 138: 406–413
- 587 Leocádio, J.C.S. 2020. *A influência do método de extração na bioatividade e perfil*  
588 *metabólico de extratos de rosmaninho*. Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra,  
589 Coimbra.p.102.
- 590 Lima, M. C. F. 2020. *Caracterização de substâncias fenólicas e alcaloides dos resíduos do*  
591 *cupuaçu (Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum)*". Dissertação de mestrado,  
592 Universidade Federal do Amazonas,Manaus, Amazonas, p.132.
- 593 Madhuri, S.; Mandloi, A.K.; Govind, P.; Sahni,Y.P. 2012. Antimicrobial activity of some  
594 medical plants against fish pathogens. *International Research Journal of Pharmacy* 3:28-30
- 595 Marcusso, P. F.; Claudiano, G. S.; Yunis-Aguinaga, J.; Marinho-Neto, F. A.; Eto, S. F.;  
596 Fernandes, D. C. et al.2021. Immunogenicity in *Oreochromis niloticus* vaccinated with  
597 sonicated antigens against streptococcosis. *Fish & Shellfish Immunology* 115: 134-141.
- 598 Matsuta, T.; Sakagami, H.; Satoh, K.; Kanamoto, T.; Terakubo, S.; Nakashima, H; Kitajima,  
599 M; Oizumi, H.; Oizumi, T. 2011. Biological Activity of Luteolin Glycosides and Tricin from  
600 *Sasa senanensis* Rehder. *in vivo* 25: 757-762

- 601 Moita, I.S. 2019. *Caracterização química das cascas das sementes de espécies do gênero*  
602 *Theobroma*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus,  
603 Amazonas, p.153.
- 604 Nguang, S.L.; Yeong, Y. L.; Pang, S. F.; Gim bun, J.2017. Ultrasonic Assisted Extraction on  
605 Phenolic and Flavonoid Content from *Phyllanthus niruri* Plant. *Indian Journal of Science and*  
606 *Technology* 10. DOI: 10.17485/ijst/2017/v10i2/110391.
- 607 Patras, M. A.; Milev, B. P.; Vrancken, G.; Kuhnert, N. 2014. Identification of novel cocoa  
608 flavonoids from raw fermented cocoa beans by CLAE–MSn. *Food Research International* 63:  
609 353–359.
- 610 Pereira, A. L.F.; Abreu, V.K.G.; Rodrigues, S.2018. Cupuassu—*Theobroma grandiflorum*.  
611 In: Rodrigues, S.; Silva, E.; Brito, E. *Exotic Fruits Reference Guide*. 1 ed. Elsevier, p. 159-  
612 162.
- 613 Pugliese, A. G.; Tomas-Bbarberan, F. A.; Ttruchado, P.; gGenovese, M. I. 2013. Flavonoids,  
614 proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum*  
615 (Cupuassu) pulp and seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61:, n. 11, p.  
616 2720–2728, 2013.
- 617 Sagar, N. A.; Pareek, S.; Sharma, S.; Yahia, E. M.; Lobo, M. G. 2018. Fruit and vegetable  
618 waste: bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive*  
619 *Reviews in Food Science and Food Safety* 17: 512–531.
- 620 Sanchez-Rabaneda, F.; Jauregui, O.; Casals, I.; Andres-Lacueva, C.; Izquierdo-Pulido, M.;  
621 Lamuela-Raventos, R. M. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass  
622 spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass*  
623 *Spectrometry* 38: 35–42.
- 624 Santos, G.M.; Maia, G.A.; Henrique, P.; Sousa, M.; Figueiredo, R.W.2010. Atividade  
625 antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu.  
626 *Ciência Rural* 40:1636–1642.
- 627 Sanvido, E. M. 2015. Avaliação de atividades biológicas de extratos não voláteis de *Baccharis*  
628 *uncinella* obtidos por maceração e por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico. *Revista da Graduação*  
629 8:1-21.
- 630 SEDAP. 2022. Dados de produção de  
631 cupuaçu(<http://www.sedap.pa.gov.br/content/cupua%C3%A7u#:~:text=Com%20uma%20C3%A1rea%20plantada%20de,em%20todo%20o%20territ%C3%B3rio%20paraense.>)  
632  
633 Acessado em 17 de junho de 2022.
- 634 Silva, H.A. 2020. *Estudos fitoquímico, antioxidante e microbiológico de resíduos*  
635 *agroindustriais de cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum.) da Amazônia*. Dissertação de  
636 mestrado, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará.p.66

- 637 Singleton, V. L.; RossiOSSI, S. A. 1965. Colorimetric of total phenolics with  
638 phosphomolibic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology & Viticulture*  
639 16: 144–158.
- 640 Soto, M. L.; Falqué, E.; Domínguez; H. 2015. Relevance of Natural Phenolics from Grape  
641 and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics* 2015: 259-276.
- 642 Spínola, V.; Pinto, J.; Castilho, P. C.2015. Identification and quantification of phenolic  
643 compounds of selected fruits from Madeira Island by CLAE-DAD-ESI-MSn and screening for  
644 their antioxidant activity. *Food Chemistry* 173:14–30.
- 645 Tauchen, J.; Bortl, L.; Huml, L.; Miksatkova, P.; Daskocilf, I.; Marsika, P. 2016. Phenolic  
646 composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from  
647 the Peruvian Amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26: 728–737
- 648 Valentová, K.; Vrba, J.; Bancířová, M.; Ulrichová, J.; Křen V. 2014. Isoquercitrin:  
649 pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* 68:267-82. DOI:  
650 10.1016/j.fct.2014.03.018.
- 651 Vásquez, Z.; Carvalho, D. P.; Pereira, N. G. V.M.; Vandenberghe, L. P.S.; Oliveira, P. Z.;  
652 Tiburcio, P. B.; Rogez, H. L.G.; Neto, A. G.; Soccola, C. R. 2019. Biotechnological  
653 approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management* 90: 72–83.
- 654 Xia, B.; Bai, L.; X. Li; Xiong, J.; Xu, P.; Xue, M. 2015. Structural Analysis of Metabolites of  
655 Asiatic Acid and Its Analogue Madecassic Acid in Zebrafish Using LC/IT-MSn. *Molecules* 20:  
656 3001-3019.



1 **CAPITULO 2-** Effects of the addition of cupuassu residue extract (*Theobroma*  
2 *grandiflorum*) on the growth of *Lactobacillus plantarum* Lp 62 and antimicrobial  
3 potential of the fermented extract.<sup>2</sup>

4 Lucas Alvarenga da SILVA<sup>1\*</sup>, Emily Thaís Feitosa SOUSA<sup>2</sup>, Bruna Cianciulli Barbosa dos  
5 SANTOS<sup>3</sup>, Herlle Aparecido da SILVA<sup>3</sup>, Abdelaaty HAMED<sup>3</sup>, Lydia Fumiko  
6 YAMAGUCHI<sup>3</sup>, Massuo Jorge KATO<sup>3</sup>, Thalís Ferreira dos SANTOS<sup>2</sup>, Lauro Euclides Soares  
7 BARATA<sup>1</sup>

8 <sup>1</sup>Federal University of West Para (UFOPA), Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais  
9 da Amazônia, Santarém, Brazil

10 <sup>2</sup>Federal University of West Para (UFOPA), Instituto de Biodiversidade e Florestas, Santarém,  
11 Brazil

12 <sup>3</sup> University of Sao Paulo (USP), Instituto de Química, São Paulo, Brazil

13 Correspondence

14 Email: [lucas1001stm@gmail.com](mailto:lucas1001stm@gmail.com)

15

16 **ABSTRACT**

17 The present study aimed to evaluate the effects of fermentation of extracts from agro-industrial  
18 residue from the bark of *T. grandiflorum* by *Lactobacillus plantarum* LP62 and to verify the  
19 antimicrobial potential of the fermented extract against fish pathogens. To evaluate how the  
20 addition of cupuassu bark extract could influence the growth of the *L. plantarum* LP62 strain, a  
21 microbial growth curve was performed in which MRS media supplemented with different  
22 concentrations of the ethanolic extract were used and the results of this test were used to select  
23 fermentation parameters. The fermented broth and controls were subjected to liquid liquid  
24 partition with ethyl acetate. In parallel, the pH of the fermentation process was measured. The  
25 resulting extracts were analyzed in HPLC-DAD and tested for their antimicrobial potential. As  
26 a result, it was possible to observe a trend towards a higher microbial growth rate in the media  
27 supplemented with the extract, although the difference was not significant. There was no  
28 significant difference between the pH of the MRS medium plus extract when compared to the  
29 control. Changes were observed in the chromatographic profile of the fermented extract  
30 compared to controls and the fermented extract showed antimicrobial activity against  
31 *A. hydrophila*. Thus, the use of fermentation processes can be a viable strategy for the use of *T.*  
32 *grandiflorum* residues in the production of new functional bioproducts..

33 **Keywords:** Probiotic, enterobacteria, fish farming, chromatography.

34

35

36

37

---

<sup>2</sup> O artigo apresentado foi redigido conforme as diretrizes de submissão da revista Acta Amazonica. As normas indicadas para a redação de artigos pela revista estão disponíveis no link: [https://acta.inpa.gov.br/guia\\_ingles.php](https://acta.inpa.gov.br/guia_ingles.php).

38

39 Efeitos da adição de extrato de resíduo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)  
40 sobre o crescimento de *Lactobacillus plantarum* Lp 62 e potencial  
41 antimicrobiano do extrato fermentado.

## 42 RESUMO

43 O presente estudo visou avaliar os efeitos da fermentação de extratos do resíduo agroindustrial  
44 da casca de *T. grandiflorum* por *Lactobacillus plantarum* LP62 e verificar o potencial  
45 antimicrobiano do extrato fermentado frente a patógenos de peixes. Para avaliar de que forma  
46 a adição do extrato da casca de cupuaçu poderia influenciar o crescimento da linhagem *L.*  
47 *plantarum* LP62, foi realizado uma curva de crescimento microbiano na qual foram utilizados  
48 meios MRS suplementados com diferentes concentrações do extrato etanólico e os resultados  
49 desse teste foram usados para selecionar os parâmetros da fermentação. O caldo fermentado e  
50 controles foram submetidos a partição líquido-líquido com acetato de etila. Paralelamente, o  
51 pH do processo fermentativo foi aferido. Os extratos resultantes foram analisados em CLAE-  
52 DAD e testados quanto ao seu potencial antimicrobiano. Como resultado foi possível observar  
53 uma tendência de maior índice de crescimento microbiano nos meios suplementados com o  
54 extrato, embora a diferença não tenha sido significativa. não houve diferença significativa entre  
55 o pH do meio MRS acrescido de extrato quando comparado ao controle. Foram observadas  
56 pequenas mudanças no perfil cromatográfico do extrato fermentado em comparação aos  
57 controles e o extrato fermentado demonstrou atividade antimicrobiana frente a *A. hydrophila*.  
58 Dessa forma, o uso de processos fermentativos pode ser uma estratégia viável para o emprego  
59 de resíduos de *T. grandiflorum* na produção de novos bioprodutos funcionais.

60 **Palavras-chave:** Probiótico, enterobacterias, piscicultura, cromatografia.

61

## 62 INTRODUÇÃO

63 A aquicultura vem se destacando como um importante setor de produção animal nos  
64 últimos anos, com um crescimento anual de 4,5% e movimentando cerca de 243,26 bilhões de  
65 dólares (Dawood et al., 2021; Assane et al,2021). Entretanto, a intensificação da produção de  
66 pescado pode favorecer o surgimento e proliferação de doenças infecciosas (Claudiano et al.,  
67 2019), sendo *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* DOIs dos microrganismos  
68 responsáveis por grandes perdas econômicas no setor da aquicultura global (Dawood et al.,  
69 2021).

70 Devido a esses problemas é recorrente na terapêutica dos animais o uso de substâncias  
71 químicas, entretanto o uso indiscriminado desses compostos resulta em poluição ambiental,  
72 contaminação dos peixes e de outros organismos envolvidos na cadeia alimentar aquática  
73 (Claudiano et al. 2012).

74 Extratos vegetais, entre estes os obtidos de resíduos da fruticultura Amazônica,  
75 mostram rica composição química com substâncias que possuem atividade antimicrobiana

76 (Arbos et al., 2013; Jana et al.,2018) e podem ser uma alternativa adequada para a contenção  
77 de doenças na aquicultura, em detrimento aos tratamentos tradicionais com antibióticos.

78 O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo com colheitas anuais de 45  
79 milhões de toneladas (Embrapa, 2021). O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) se  
80 mostra como um dos mais importantes frutos na Amazônia encontrado no estado nativo nos  
81 estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Rondônia e Acre, enquanto cultivares comerciais  
82 podem ser encontrados em estados como Bahia, Amazonas e Pará (Santos et al., 2010; Pugliese  
83 et al., 2013, Barros et al., 2016, Idam,2020). O Pará é o estado com maior produção do fruto,  
84 com uma área plantada de aproximadamente 9mil hectares e uma produção anual de 29 mil  
85 toneladas (Sedap, 2022), abastecendo o mercado nacional e exportando para vários países,  
86 sendo Japão, Países Baixos, Reino Unido, Alemanha, Estados Unidos, Argentina, Bolívia e  
87 Paraguai os maiores consumidores internacionais (Gomes e Lima, 2019).

88 A exploração desse fruto gera uma quantidade significativa de resíduos, visto que  
89 somente a polpa e as sementes são empregadas na indústria (Carvalho et al., 2006; Costa et al,  
90 2020). Esses subprodutos possuem significativos teores nutricionais, destacando-se o potássio,  
91 ferro, selênio e antioxidantes (Golveia,2018; Avila-Sosa et al., 2019; Silva, 2020), e podem ser  
92 fonte de substâncias bioativas como compostos fenólicos, alcaloides, glicosídeos e compostos  
93 voláteis (Banerjee et al., 2016; Sagar et al., 2018, Silva,2020). A composição química de  
94 extratos da casca do cupuaçu foi analisada por Silva (2020) mostrando que extratos brutos da  
95 casca de cupuaçu apresentaram atividade antimicrobiana.

96 O emprego da biotransformação microbiana como uma estratégia biotecnológica para a  
97 produção de moléculas bioativas vem ganhando destaque, visto que essa ferramenta pode  
98 produzir uma variedade de novos produtos ou pode ser empregada na síntese de substâncias já  
99 conhecidas de forma mais eficiente e de baixo custo (Santos,2013). O processo fermentativo  
100 microbiano em matrizes vegetais, realizado por linhagens de bactérias ácido lácticas (BAL)  
101 como as pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sp. pode aumentar a biodisponibilização e  
102 bioatividade de compostos fenólicos, visto que esses microrganismo podem modificar o  
103 conteúdo e a estrutura de antocianinas e outros compostos fenolicos glicosilados, mudando de  
104 glicosídeos para formas agliconas que resultam em aumento da atividade biologica (Landete et  
105 al., 2008; Guergoletto et al., 2017; Barbosa et al.,2020).

106 A linhagem *Lactobacillus plantarum* Lp62 foi isolada a partir da fermentação natural  
107 de amêndoas de uma espécie próxima do Cupuaçu, o cacau (*Theobroma cacao*) e teve seu  
108 potencial anti-inflamatório atestado em modelo animal de colite experimental e em modelo

109 celular *in vitro* inibindo a inflamação após o desafio de macrófagos, linfócitos e células  
110 epiteliais com *Salmonella enterica* (Dos Santos et al., 2016a; Dos Santos et al., 2016b). Além  
111 disso, foi demonstrado seu potencial antimicrobiano contra *Gardnerella vaginalis* e sua  
112 capacidade de inibir a adesão desse patógeno a células da mucosa vaginal *in vitro* (Pessoa et  
113 al., 2017). Adicionalmente a linhagem demonstrou potencial de aumentar o poder antioxidante  
114 de suco de cupuaçu ao utilizá-lo como substrato de fermentação para a produção de uma bebida  
115 funcional (Silva, 2019). Dessa forma, o conjunto de características apresentado fazem dessa  
116 bactéria candidata adequada ao desenvolvimento de produtos funcionais

117 Ademais, não há na literatura referências dos efeitos da fermentação microbiana sobre  
118 a disponibilidade de substâncias bioativas em extratos de resíduos da indústria de cupuaçu  
119 (*Theobroma grandiflorum*), podendo ser essa uma estratégia para o desenvolvimento de  
120 produtos terapêuticos ou nutracêuticos. Dessa forma, o presente estudo visou avaliar os efeitos  
121 da fermentação de extratos de resíduos agroindustriais de *T. grandiflorum*. por *Lactobacillus*  
122 *plantarum* LP62 e verificar o potencial antimicrobiano do extrato fermentado frente a patógenos  
123 de peixes.

## 124 **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 125 **Coleta da matéria-prima e obtenção do extrato bruto**

126 O resíduo agroindustrial de casca de *T. grandiflorum* foram doados pela Cooperativa  
127 dos Produtores Rurais de Santarém - Cooprusan. A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de  
128 Farmacognosia, Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento de Produtos Bioativos  
129 (P&DBio/UFOPA), Laboratório de Reprodução, Sanidade e Nutrição Animal  
130 (Larsana/UFOPA) e Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN/USP)

131 O extrato bruto foi preparado a partir de resíduos da agroindústria (epicarpo ou casca)  
132 do fruto de *T. grandiflorum*. O resíduo foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 40°C  
133 durante 72 horas, triturado em moinho de facas e refinado em peneira de 28 mesh (0,6 mm)  
134 para obtenção de um pó de fina granulação homogêneo. Após isso, o material resultante foi  
135 acondicionado e identificado em embalagens de polietileno, e então armazenado em freezer a -  
136 40 °C até o momento das extrações.

137 Para o preparo do extrato alcoólico, 50 g de material moído foram submetidas ao método  
138 de extração a quente via Soxhlet, que consiste na recirculação de 500 mL de etanol tratado PA  
139 96 GL por um período de 8 horas. O extrato concentrado em rotaevaporador rotativo sob  
140 pressão reduzida (Heidolph®, Laborota 4001 – efficient) equipado com bomba a vácuo

141 (Heidolph®, Rotavac valve control) e armazenados em freezer a -40 °C até o momento das  
142 análises. Esse extrato foi denominado CCsx

143

#### 144 **Bactéria, condições de cultivo e preparo do inóculo**

145 A linhagem *Lactobacillus plantarum* Lp62 foi doada pela Universidade Estadual de  
146 Santa Cruz (Ilhéus-BA) e mantida em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) acrescido de 20%  
147 de glicerol em freezer -80°C. Para a realização dos experimentos, a bactéria foi reativada em  
148 caldo MRS por cultivo *overnight* a 37°C em estufa microbiológica. Para a padronização do  
149 inóculo bacteriano, a linhagem foi cultivada por 16 horas em caldo MRS, centrifugada, lavada  
150 e ressuspendida em solução salina NaCl 0,9% até atingir a concentração de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 151 **Curva de crescimento microbiano**

152 Para avaliar os efeitos da adição do extrato sobre o crescimento da linhagem *L.*  
153 *plantarum* LP62 e determinar as condições do meio de cultura a ser fermentado, foi realizado  
154 uma curva de crescimento microbiano.

155 Para isso, o extrato foi solubilizado em água destilada, filtrado utilizando filtração a  
156 vácuo usando filtro de 0,22µm e então foi adicionado ao meio de cultura MRS. Foram  
157 produzidos meios com 8 diferentes concentrações de extrato variando de 0,07 mg ml<sup>-1</sup> a 5 mg  
158 ml<sup>-1</sup>, utilizando fator de diluição de 1:1.

159 O crescimento microbiano foi observado em placas de 96 poços. Os poços foram  
160 preenchidos com 150 µL de meio de cultura acrescido de extrato nas concentrações referidas  
161 acima, e então inoculados com 15 µL da suspensão bacteriana previamente confeccionada. As  
162 microplacas foram incubadas a 37°C e foram realizadas leituras de absorbância a 620 nm com  
163 o auxílio de um leitor de microplacas (DR-200BS-Kasuaki, Wuxi Hiwell Diatek Instruments,  
164 China) nos tempos (0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 e 24 h).

165 O cálculo do índice de crescimento microbiano em cada tempo é dado pela formula: IC  
166 = 1- Abs final/Abs inicial (0h).

#### 167 **Biotransformação bacteriana**

168 A concentração de extrato a ser utilizada no processo de fermentação foi definida  
169 baseado no resultado obtido no teste anterior e na quantidade de extrato disponível.

170 O inóculo foi adicionado no meio de cultura MRS contendo 2,5 mg ml<sup>-1</sup> de extrato, e  
171 incubado a 37°C por 24 horas. O meio de cultura foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min e

172 filtrado utilizando filtração a vácuo em filtro de 0,22µm. Paralelamente, o pH do meio de  
 173 cultura acrescido do extrato da casca de cupuaçu, bem como do meio de cultura sem a adição  
 174 de extrato foi aferido antes e após 24h de fermentação.

#### 175 **Preparo do extrato fermentado**

176 O líquido fermentado obtido foi submetido a extração por partição com acetato de etila  
 177 e a fase orgânica obtida concentrada em rotaevaporador. O extrato resultante foi denominado  
 178 CCf.

179 Aditivamente, foram produzidos extratos controles originados de caldo MRS sem a  
 180 adição de extrato de casca de cupuaçu (MS); do líquido resultante da solubilização do extrato  
 181 bruto da casca de cupuaçu em água após filtração (CCaf) e do caldo MRS fermentado sem  
 182 adição de extrato (MF), pelo mesmo método descrito anteriormente. O extrato fermentado e  
 183 controles foram analisados quimicamente e quanto ao seu potencial antimicrobiano.

#### 184 **Cromatografia de alta eficiência acoplada à detector de matriz de diodo (CLAE-DAD)**

185 Para o preparo das amostras, 1 mg de cada extrato foram pesados e solubilizados em 1 ml  
 186 de metanol grau CLAE, filtrados em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, teflon®,  
 187 Millipore®) com poro de 0,45 µm e então adicionados em vials de 1,5 ml para análise.

188 As amostras para CLAE-DAD foram analisadas no equipamento Shimadzu Prominence LC  
 189 munidos de duas bombas LC-20AD, desgaseificador DGU-20A, amostrador automático SIL-20A,  
 190 coluna forno CTO-20A e detector de matriz de diodo SPD-M20A. A coluna de fase reversa *C18*  
 191 (Luna-Phenomenex®, 5 µm, 100 Å, h x φ = 250 x 4,6 mm) acoplada à uma pré-coluna de material  
 192 equivalente. O volume de injeção foi de 10 µL e a vazão de 10 mL.min<sup>-1</sup>. Os dados foram obtidos  
 193 com o software LC Solutions V.1.25.

194 O gradiente de eluição do método do CLAE utilizado nas separações para determinação do perfil  
 195 cromatográfico dos extratos foi constituído pelos eluentes A: água purificada em sistema Milli-Q  
 196 (Millipore®) acidificada com 0,1 % de ácido fórmico e B: Metanol (Tabela 1). Os comprimentos  
 197 de onda de monitoramento foram em 254, 270 e 365 nm.

198 **Tabela 1.** Gradiente de eluição utilizado em CLAE para a determinação do cromatograma dos  
 199 extratos analisados.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% B (Metanol)</b>
0,1	2
3	2
32	100
34	100

## 201 **Atividade antimicrobiana**

202 Para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato fermentado com adição de extrato da  
203 casca de cupuaçu e extratos controles foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* (ATCC 0022),  
204 *Salmonella* sp. (ATCC 14028), *Aeromonas hydrophila* (CP007518-2) e *Streptococcus*  
205 *agalactiae* isolado de tilápias naturalmente infectadas (Marcusso et al., 2021).

206 As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de culturas cultivadas em caldo  
207 Triptona Soja (TSB), para as bactérias *E. coli*, *Salmonella* sp. e *A. hydrophila*, e caldo brain  
208 heart infusion (BHI) para *S. agalactiae*. As cepas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e cada  
209 um dos cultivos foi centrifugado, lavado e ressuspensão em solução tampão salina NaCl 0,9% e  
210 ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

211 A avaliação da atividade antibacteriana e a determinação das Concentrações Inibitórias  
212 Mínimas (CIM) do extrato de *T. grandiflorum* fermentado e controles foram realizados segundo  
213 a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M7-A6 do *Clinical and*  
214 *Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) com modificações.

215 Para isso, os extratos foram diluídos em DMSO 5% na concentração inicial de 2000 µg  
216 mL<sup>-1</sup>. As soluções produzidas foram adicionadas em placas com 96 poços, nas quais foram  
217 realizadas diluições seriadas de razão 1:1 em caldo TSB para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *A.*  
218 *hydrophila*, e BHI para *S. agalactiae*. Ao final do processo, as concentrações dos extratos  
219 variaram de 7,8 a 1000 µg mL<sup>-1</sup> com os poços contendo 20 µL da suspensão bacteriana  
220 padronizada. Como controle positivo foi utilizado solução de ciprofloxacina a 1000 µg mL<sup>-1</sup> e  
221 realizados os controles de esterilidade do meio, crescimento do inóculo, turbidez dos extratos e  
222 controle negativo (DMSO 5%).

223 As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Após esse período,  
224 foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano e avaliação colorimétrica utilizando 30  
225 µL resazurina (100 µg mL<sup>-1</sup>) como indicador. Assim, a CIM foi determinada como a menor  
226 concentração do extrato bruto onde não foi observado visualmente crescimento microbiano.

227 Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) antes da adição de  
228 resazurina uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo Agar Triptona  
229 de Soja (TSA), e incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período foram observados os  
230 pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a CBM definida como a  
231 menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da  
232 subcultura.

233

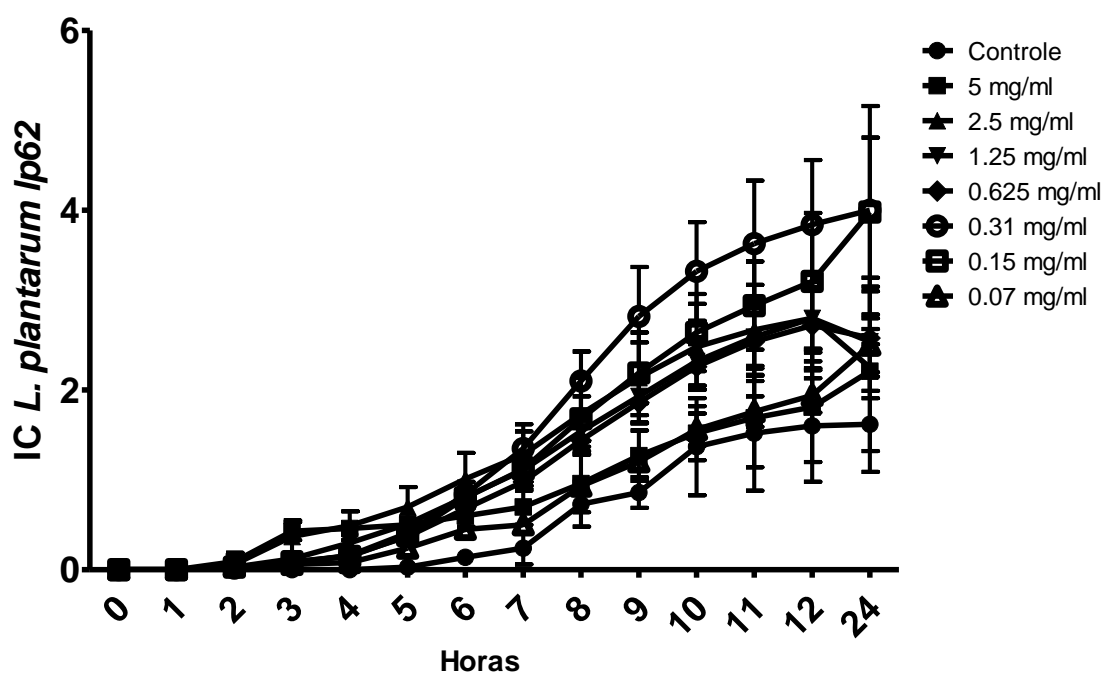
234 **Análise de dados**

235 Todas as análises estatísticas foram realizadas em triplicata e os resultados foram  
 236 submetidos à ANOVA e ao Teste t de Student ou teste de Tukey, segundo as necessidades de  
 237 cada análise, para determinar as diferenças significativas das médias ao nível de probabilidade  
 238 de 5 % ( $p < 0.05$ ), utilizando o *software* GraphPad Prism 5.

239

240 **RESULTADOS**

241 Ao analisar a curva de crescimento de *L. plantarum* Lp62 na presença de diferentes  
 242 concentrações de extratos etanólicos do resíduo de epicarpo de *T. grandiflorum* Schum.(figura  
 243 1), embora seja possível observar uma tendência de maior índice de crescimento microbiano  
 244 nos meios suplementados com o extrato, não foi observado diferença significativa entre os  
 245 dados de controle (meio de cultura MRS sem extrato) e os meios MRS com a adição dos extratos  
 246 nas concentrações de 5; 2,5;1,25;0,625;0,31;0,15;0,07 mg ml<sup>-1</sup>. Dessa forma, optou-se pela  
 247 realização da fermentação com a concentração 2,5 mg/ml de extrato etanolico de casca de  
 248 cupuaçu em meio de cultura MRS.



249

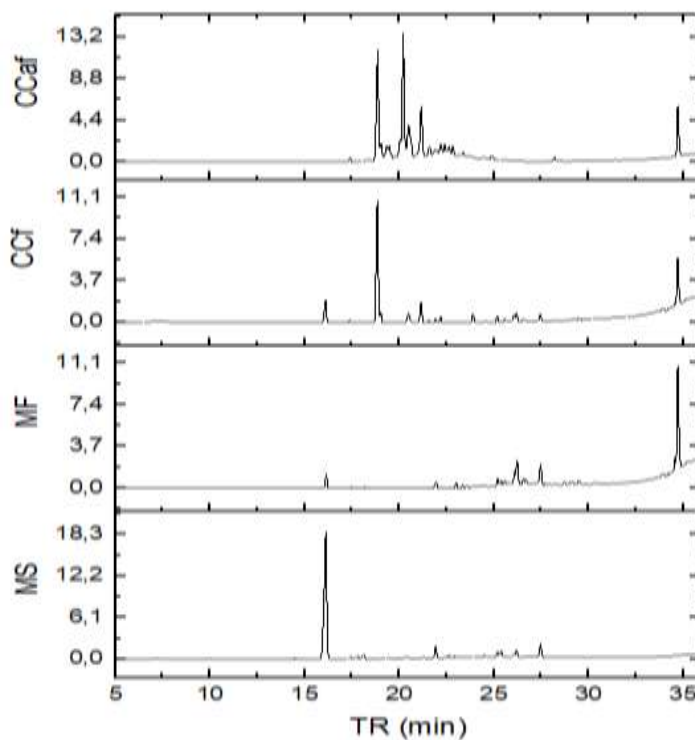
250 **Figura 1:** Curva de crescimento de *L. plantarum* Lp62 na presença de diferentes concentrações  
 251 de extratos etanólicos do epicarpo para a espécie *T. grandiflorum*.

252

253 Ao analisar o perfil cromatográfico dos extratos, foi possível notar diferenças quanto a  
 254 intensidade de sinal de alguns picos presentes nos extratos CCf e CCaf, em comprimento de



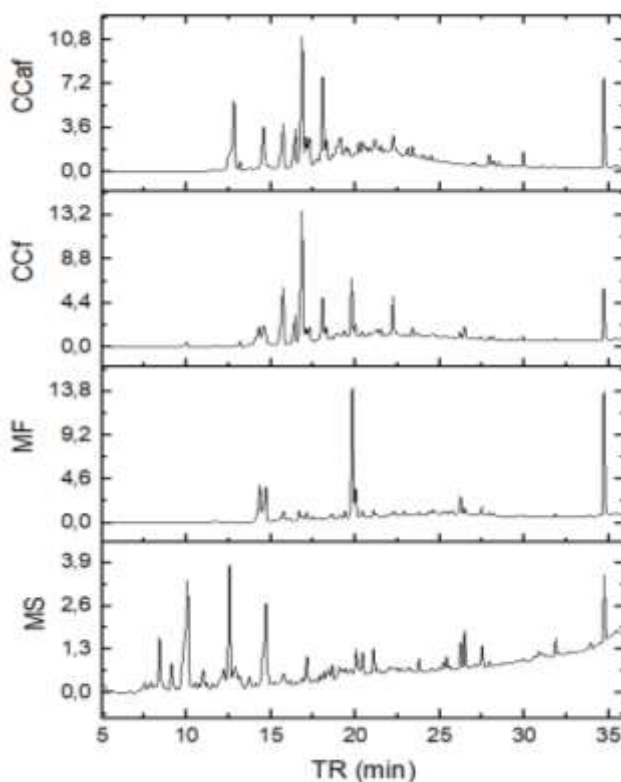
255 onda atribuído a absorbância de compostos fenólicos de baixo peso molecular (Figura 2).  
256 Resultados semelhantes foram observados ao analisar os cromatogramas obtidos nos demais  
257 comprimentos de onda (Figura 3 e 4).  
258



259 **Figura 2.** Perfil cromatográfico (CLAE-DAD,  $\lambda = 365$  nm) do extrato fermentado da  
260 casca de *T. grandiflorum* e controles. TR- tempo de retenção; CCaf- Extrato acetato de etila  
261 produzido a partir do extrato bruto da casca de *T. grandiflorum* (CCsx) em água destilada e  
262 posterior filtração; CCf- Extrato da casca de *T. grandiflorum* obtido via acetato de etila do caldo  
263 fermentado por *L. plantarum* Lp62; MF- Extrato acetato de etila do caldo fermentado por *L.*  
264 *plantarum* Lp62 sem adição de extrato; MS-Extrato acetato de etila de caldo MRS sem  
265 fermentação.  
266

267

268

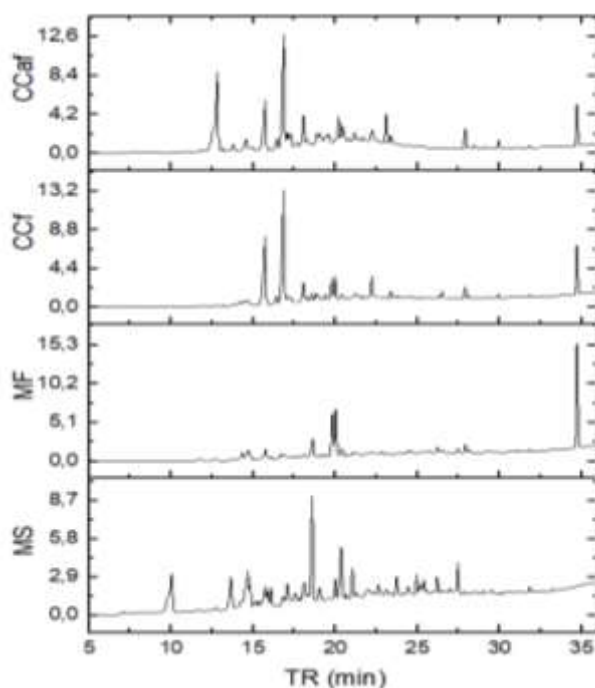


269

270

271 **Figura 3.** Perfil cromatográfico (CLAE-DAD,  $\lambda = 270$  nm) do extrato fermentado da  
272 casca de *T. grandiflorum* e controles. TR- tempo de retenção; CcAf- Extrato acetato de etila  
273 produzido a partir do resultado da solubilização do extrato bruto da casca de *T. grandiflorum*  
274 (CCsx) em água destilada e posterior filtragem; CCf- Extrato acetato de etila do caldo  
275 fermentado por *L. plantarum* Lp62 contendo extrato da casca de *T. grandiflorum*; MF- Extrato  
276 acetato de etila do caldo fermentado por *L. plantarum* Lp62 sem adição de extrato; MS-Extrato  
acetato de etila de caldo MRS sem fermentação.

277



278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

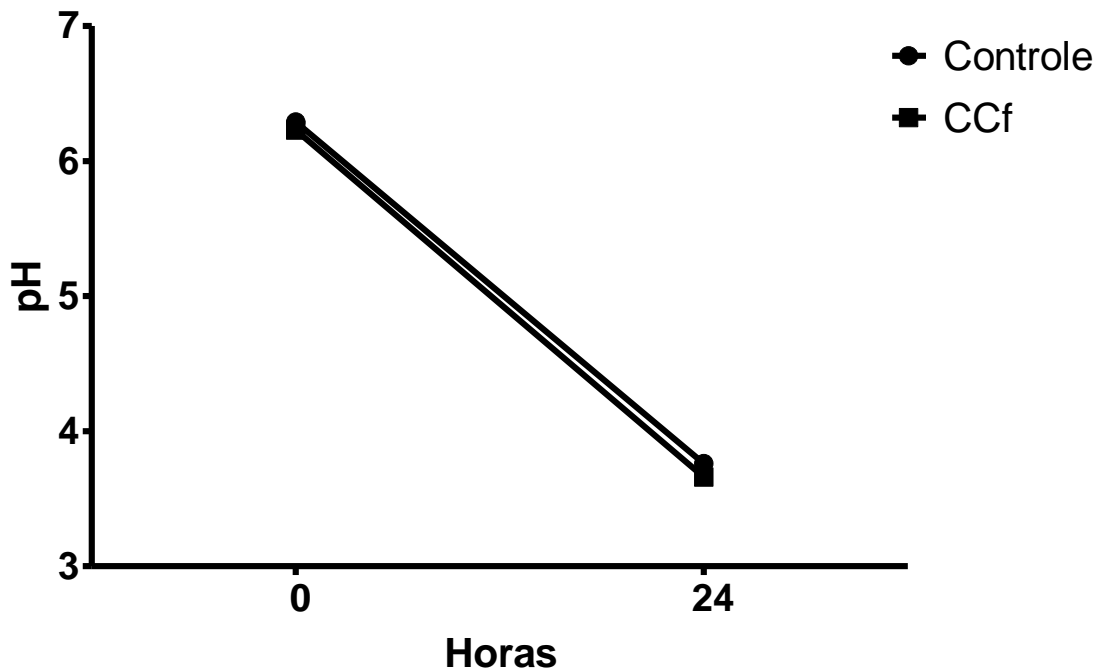
290

291

292

**Figura 4.** Perfil cromatográfico (CLAE-DAD,  $\lambda = 254$  nm) do extrato fermentado da casca de *T. grandiflorum* e controles. TR- tempo de retenção; CCaf- Extrato acetato de etila produzido a partir do resultado da solubilização do extrato bruto da casca de *T. grandiflorum* (CCsx) em água destilada e posterior filtragem; CCf- Extrato acetato de etila do caldo fermentado por *L. plantarum* Lp62 contendo extrato da casca de *T. grandiflorum*; MF- Extrato acetato de etila do caldo fermentado por *L. plantarum* Lp62 sem adição de extrato; MS-Extrato acetato de etila de caldo MRS sem fermentação.

Ao analisar o pH do meio de cultura no início e ao fim do processo fermentativo, não foi observado diferença significativa na redução de pH (Fig5). Entretanto, foi possível notar que o pH do meio MRS acrescido de extrato foi ligeiramente menor que o controle ao final de 24h. O pH médio final de MRS controle e de MRS acrescido com extrato etanólico da casca de cupuaçu foram de  $3,74 \pm 0,01$  e  $3,66 \pm 0,03$  respectivamente.



293

294 **Figura 5.** pH antes e após 24 horas de fermentação de meio MRS na presença e ausência de  
295 extratos etanólicos do epicarpo para a espécie *T. grandiflorum* por *L. plantarum* Lp62. CCF-  
296 Extrato acetato de etila do caldo fermentado por *L. plantarum* Lp62 contendo extrato da casca  
297 de *T. grandiflorum*

298

299 Ao verificarmos o potencial antimicrobiano dos extratos CCaf, MS e MF não foi  
300 possível observar atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados (tabela 2).  
301 Entretanto, o extrato CCF apresentou atividade antimicrobiana frente a *A. hydrophila* na  
302 concentração de 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . porém, ao se verificar a CBM observou-se que a atividade do  
303 extrato demonstrou ser bacteriostático.

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313 **Tabela 2.** Resultado do teste de atividade antimicrobiana. CCaf- Extrato acetato de etila  
 314 produzido a partir do resultado da solubilização do extrato bruto da casca de *T. grandiflorum*  
 315 (CCsx) em água destilada e posterior filtragem; CCf- Extrato acetato de etila do caldo  
 316 fermentado por *L. plantarum* Lp62 contendo extrato da casca de *T. grandiflorum*; MF- Extrato  
 317 acetato de etila do caldo fermentado por *L. plantarum* Lp62 sem adição de extrato; MS-Extrato  
 318 acetato de etila de caldo MRS sem fermentação.  
 319

AMOSTRA	CMI ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )			
	<i>S.agalacteae</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. hydrophila</i>
CCaf	-	-	-	-
CCf	-	-	-	1000
MS	-	-	-	-
MF	-	-	-	-

320

## 321 DISCUSSÃO

322 Em nossa pesquisa buscamos avaliar os efeitos da fermentação de extratos de resíduos  
 323 agroindustriais de *T. grandiflorum*. por *Lactobacillus plantarum* LP62 e verificar o potencial  
 324 antimicrobiano do extrato fermentado frente a patógenos de peixes, como uma estratégia para  
 325 a valorização e aplicação de um resíduo que atualmente é descartado, podendo causar dano ao  
 326 meio ambiente. Para tanto, inicialmente precisávamos verificar de que forma a adição do extrato  
 327 da casca de cupuaçu poderia influenciar sobre o crescimento da linhagem *L. plantarum* LP62.

328 A possível presença de compostos com potencial prebióticos no extrato da casca de  
 329 cupuaçu pode ser uma das explicações para a tendência de maior crescimento microbiano  
 330 observado nos meios de cultura suplemento com o extrato do resíduo em comparação ao  
 331 controle. Prebióticos podem ser definidos como um substrato que é utilizado seletivamente por  
 332 microrganismos hospedeiros, conferindo um benefício à saúde, e, embora seja estabelecido que,  
 333 de maneira geral, essas substâncias sejam baseados em carboidratos (ex: Frutooligosacarídeos  
 334 (FOS), galactooligosacarídeos (GOS) , transgalactoligosacarídeos (TOS) e inulina) (Davani-  
 335 Davari et al., 2019), alguns compostos como polifenóis, minerais e ácidos graxos  
 336 poliinsaturados tem sido propostos como candidatos a prebióticos (Neri-Numa e Pastore, 2020)

337           Dados publicados em pesquisas anteriores já demonstraram a presença de diferentes  
338 classes de compostos fenólicos em resíduos de cupuaçu e em outras partes da planta (Pugliese  
339 et al.,2013; Lima,2013; Barros et al., 2016; Tauchen et al,2016; Moita,2019; Costa et al.,2020;  
340 Silva,2020). Algumas espécies de *Lactobacillus*, incluindo linhagens de *L. plantarum* isoladas  
341 a partir de matrizes vegetais, são capazes de tolerar altas concentrações de compostos fenólicos,  
342 essa tolerância pode ser atribuída a conversão dessas substâncias em outras menos tóxicas ao  
343 microrganismo por meio de glicolil hidrolase, ácido fenólico descarboxilase e redutase, e ação  
344 de esterases (Yu et al.,2020). Ademais, ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cafeico, p-cumárico e  
345 ferúlico) podem ser utilizados como aceptores externos de elétrons por esses microrganismos  
346 (Filannino et al., 2014).

347           Essa hipótese pode ser reforçada ao analisar os resultados obtidos do perfil  
348 cromatográfico dos extratos fermentados e controle por meio de CLAE-DAD, onde pode-se  
349 notar diferenças na intensidade de sinal e presença ou ausência de alguns picos em diferentes  
350 comprimentos de onda.

351           No entanto, é importante ressaltar que em nossa pesquisa não identificamos ou  
352 quantificamos as classes de substâncias presentes em cada um dos extratos estudados, tão pouco  
353 elucidamos quais compostos poderiam ou não ser metabolizados pelo microrganismo. Dessa  
354 forma, a hipótese de que substâncias presentes no extrato da casca de *T.grandiflorum* podem  
355 ser metabolizadas e biotransformadas por *L.plantarum* LP62 ainda precisa ser confirmada.

356           Diversos trabalhos apontam para o potencial de biotransformação de bactérias do gênero  
357 *Lactobacillus* quando fermentando matrizes vegetais. Em pesquisa anterior Silva (2019) a  
358 mesma linhagem utilizada no presente estudo, demonstrou potencial de aumentar o poder  
359 antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides de suco de cupuaçu ao utiliza-  
360 lo como substrato de fermentação para a produção de uma bebida funcional. Zhou et al.(2020)  
361 observou que a fermentação da polpa de kiwi por *L.plantarum* aumentou a atividade  
362 antioxidante do material fermentado, bem como elevou as concentrações de compostos  
363 fenolicos e flavonoides. Além disso, a fermentação influenciou no perfil de compostos fenolicos  
364 presentes na amostra, com a concentração de 6,7-dihidroxicumarina, ácido p-cumárico e ácido  
365 protocatecuico se elevando na polpa fermentada enquanto Ácido gálico, ácido clorogênico,  
366 epicatequina e catequinas foram degradadas.

367           A diminuição do pH observada em nosso estudo é um processo esperado, pois durante  
368 o processo fermentativo bactérias láticas liberam ácidos orgânicos, em especial ácido láctico.  
369 Outros trabalhos verificaram a redução de valores de pH em meios de cultura com presença de  
370 extratos vegetais. Sung et al. (2013) verificaram que o processo fermentativo de diferentes

371 misturas de extratos de *Rhodiola sachalinensis* e ginseng vermelho reduziu o pH do meio  
372 significativamente. Da mesma forma, Jung et al. (2017) observaram que o Ph, durante a  
373 fermentação do extrato de ginseng vermelho por *L. plantarum* KCCM 11613P, reduziu de 6.45  
374 para 3.64.

375 Uma das hipóteses que podem explicar o potencial inibitor observado em CCf, pode ser a  
376 liberação de compostos do metabolismo microbiano no meio. Pessoa et al. (2017) apuraram o  
377 potencial antagonista do sobrenadante livre de células de *L. plantarum* Lp62, sobre *Gardnerella*  
378 *vaginalis*, associando-o ao baixo pH e a liberação de ácidos orgânicos pela cepa. Além da  
379 diminuição do pH, a atividade antimicrobiana de bactérias lácticas pode estar associada a  
380 produção de acetaldeído, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, polissacarídeos  
381 e bacteriocinas (Rodrigues et al. 2011), a produção desses compostos é cepa e espécie  
382 dependente, mas também está relacionado com as características dos substratos fermentados  
383 (Ricci et al,2019).

384 No presente estudo, o extrato MF, que representa o metabolismo microbiano na ausência do  
385 extrato da casca de *T. grandiflorum*, não apresentou atividade antimicrobiana, logo a produção  
386 de ácidos ou metabolitos secundários pelo microrganismo não pode ser apontada como único  
387 ou principal mecanismo de antagonismo frente ao *A. hydrophila* no extrato fermentado testado.

388 Outra possível explicação para os resultados observados pode ser a possível presença de  
389 compostos fenólicos na matriz fermentada, visto que alguns compostos fenólicos com atividade  
390 antimicrobiana, podem ter sua concentração aumentada ou produzidos *ex novo* durante a  
391 fermentação láctica (Ricci et al,2019).

392 Silva (2020) verificou que o extrato produzido com etanol 96 GL via Soxhlet apresentou  
393 atividade bacteriostática frente a *Salmonella sp.* em concentração de 1000 ug/ml, entretanto, o  
394 mesmo extrato não demonstrou atividade biológica contra as demais cepas testadas. Além disso,  
395 o autor verificou que o extrato hidroalcolico assistido por ultrassom do epicarpo de cupuaçu  
396 apresentara atividade antimicrobiana, embora limitada, frente a *S. aureus*, *Salmonella sp.* e *E.*  
397 *coli*, com uma concentração inibitória de 1000 ug ml<sup>-1</sup>.

398 Embora os compostos fenólicos, flavonoides e outras substâncias possivelmente  
399 presente no extrato CCaf, possam apresentar atividade antimicrobiana (Daglia,2012), é possível  
400 que substâncias responsáveis pela inibição do crescimento microbiano estejam em  
401 concentrações baixas para demonstrar atividade biológica significativa devido à baixa  
402 eficiência da água em solubilizar parte dos compostos presentes no extrato bruto da casca de  
403 cupuaçu.

404 Há interesse crescente em substâncias oriundas de plantas como alternativas ao uso de  
405 antibióticos e produtos químicos no combate a patógenos em piscicultura (Jana et al,2018).  
406 Neste sentido, deve-se dar importância ao potencial bacteriostático observado no extrato CCF  
407 frente ao microrganismo *A. hydrophila*, visto que esse patógeno é responsável por infecções e  
408 mortes na produção de pescados (Madhuri et al,2012).

## 409 CONCLUSÃO

410 Em nossa pesquisa foi possível verificar a possível aplicação do extrato da casca de  
411 cupuaçu em processos fermentativos como uma estratégia para a valorização e aplicação desse  
412 resíduo quase sempre menosprezado. Observou-se que a adição do extrato solubilizado em água  
413 teve um efeito positivo, embora não significativo, sobre o crescimento da bactéria *L. plantarum*  
414 Lp62. Além disso, observou-se que o processo fermentativo foi capaz de alterar o perfil químico  
415 do extrato, bem como aumentou o potencial antimicrobiano do mesmo.

416 Esses resultados em conjunto apontam que o uso de processos fermentativos pode ser  
417 uma estratégia viável para o emprego de resíduos de *T. grandiflorum* na produção de novos  
418 bioprodutos funcionais. Entretanto, ainda são necessários outros estudos para a elucidação  
419 correta dos processos de biotransformação que podem ou não ocorrer durante o processo  
420 fermentativo, bem como a melhor forma de empregar o extrato resultante dentro da cadeia  
421 industrial.

422

## 423 AGRADECIMENTOS

424 Gostaríamos de agradecer a Fundação Amazônica de Amparo a estudos e pesquisa  
425 (FAPESPA) e a Fundação de Integração Amazônica (FIAM) pela bolsa ofertada através do  
426 programa FAPESPA-FIAM e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
427 (CAPES) pelo auxílio no custeio de passagens mediante ao programa PROCAD-AM.

## 428 REFERÊNCIAS

- 429 Arbos, K.; Aparecida, S.; Pamela, C. C.; Fátima, R. 2013. Atividade antimicrobiana,  
430 antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. *Revista*  
431 *Ceres* 60:161-165. DOI: [https://dx.Doi.org/10.1590/S0034-737X2013000200003](https://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2013000200003)
- 432 Assane, I. M.; Sousa, E. L.; Valladao, G. M. R.; Tamashiro, G. D.; Urbinati, E. C., et al. 2021.  
433 Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities  
434 of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil. *Aquaculture* 541: 736848
- 435 Avila-sosa, R.; Montero-Rodríguez, A. F.; Aguilar-Aalonso, P.; Vera-López, O.; Lazcano-  
436 Hernández, M.; Morales-Medina, J. C .; Navarro-cruz, A. R; et al. 2019 . Antioxidant  
437 properties of amazonian fruits: a mini review of in vivo and in vitro studies. *Oxidative*



- 438 *Medicine and Cellular Longevity* 2019: 8204129.
- 439 Banerjee, J.; Singh, R.; Vijayaraghavan, R.; MacFarlane, D.; Patti, A.F.; Arora, A. 2016.  
440 Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food*  
441 *Chemistry* 225: 10–22.
- 442 Barbosa, P. de P. M.; Ruviano, A. R.; Martins, I. M.; Macedo, J. A.; LaPointe, G.; Macedo,  
443 G. A. 2020. Effect of enzymatic treatment of citrus by-products on bacterial growth, adhesion  
444 and cytokine production by Caco-2 cells. *Food & Function* 11: 8996-9009
- 445 Barros, H. R. de M.; García-Villalba, R.; Tomás-Barberán, F. A.; Genovese, M. I. 2016.  
446 Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu  
447 (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. *Journal of*  
448 *Functional Foods* 22: 477–489
- 449 Carvalho, A. V.; García, N. H. P.; Amaya-Farfán, J. 2006. Physico-chemical properties of the  
450 flour, protein concentrate, and protein isolate of the cupuassu (*Theobroma grandiflorum*  
451 Schum) seed. *Journal of Food Science* 71: 573-578,
- 452 Claudiano G. S, Pilarsk F., Cruz C. 2012. Avaliação da concentração letal CL 50% (CL (I) (50-  
453 96h)) do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em guarus (*Phalloceros caudimaculatus*).  
454 *Archives of Veterinary Science* 17: p.15-19.
- 455 Claudiano, G. S.; Yunis-Aguinaga, J. Marinho-Neto, F. A.; Miranda, R. L.; Martins, I. M.;  
456 Otani, F. S.; Mundim, A. V.; Marzocchi-Machado, C. M.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R. 2019.  
457 Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by  
458 *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* .88: p.259-265.
- 459 CLSI - clinical and laboratory standards institute document m7-a6. 2006. Methods for dilution  
460 antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard.  
461 *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne, PA.
- 462 Costa, R. S.; Santos, O. V.; Lannes, S. C. da S.; Casazza, A. A.; Aliakbarian, B.; Perego, P. et  
463 al. 2020. Bioactive compounds and value-added applications of cupuassu (*Theobroma*  
464 *grandiflorum* Schum.) agroindustrial by-product. *Food Science and Technology* 40: 401-407.
- 465 Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agentes. *Current Opinion in Biotechnology*  
466 23:174–181.
- 467 Davani-Davari, D.; Negahdaripour, M.; Karimzadeh, I.; Seifan, M.; Mohkam, M.; Masoumi, S.  
468 J.; Berenjian, A.; Ghasemi, Y. 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and  
469 Clinical Applications. *Foods* 8: 92. DOI:10.3390/foods803009
- 470 Dawood, M. A. O.; Basuini, M. F. E.; Zaineldin, A. I.; Yilmaz, S.; Hasan, M. T.; Ahmadifar,  
471 E.; Asely, A. M. E.; Abdel-Latif, H. M. R.; et al. 2021. Antiparasitic and Antibacterial  
472 Functionality of Essential Oils: An Alternative Approach for Sustainable Aquaculture.  
473 *Pathogens* 10:185. <https://DOI.org/10.3390/pathogens10020185>
- 474 Dos Santos, T.F.; Melo, T.A.; Santos, D.S.; Rezende, R.P.; Dias, J.C.T.; Romano, C.C. 2016.  
475 Efficacy of oral administration of lactic acid bacteria isolated from cocoa in a fermented milk  
476 preparation: reduction of colitis in an experimental rat model. *Genetics and Molecular*  
477 *Research* 15: gmr.15038097 .DOI: 10.4238/gmr.15038097.
- 478 Dos Santos, T.F.; Alves, M.T.; Almeida, M.E.; Rezende, R. P.; Romano, C.C.  
479 Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* Lp62 on intestinal epithelial and

- 480 mononuclear cells. *BioMed Research International* 2016: 8404156.
- 481 EMBRAPA,2021. Frutas e hortaliças.( [https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-](https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas)  
482 [agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas](https://www.embrapa.br/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas)) Acessado em 17 de junho de 2022.
- 483 Filannino, P.; Gobbetti, M.; Angelis, M.D.; Cagno, R.D. 2014. Hydroxycinnamic acids used as  
484 external acceptors of electrons: an energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid  
485 bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 7574–7582.
- 486 Golveia, J. C. S.; Santiago, M. F.; Sales, P. T. F.; Sartoratto, A.; P. A. N.; Thomaz, D. V. et al.  
487 2018. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) residue and its potential application in the  
488 bioremediation of 17-A-ethinylestradiol as a *Pycnoporus sanguineus laccase* inducer.  
489 *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 48:541-548.
- 490 Gomes, C. DA S.; Lima, R. A. 2019. Bibliographical review of the malvaceae family, with  
491 emphasis in species *Theobroma cacao* L. and *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.)  
492 Schum. *SAJEBTT* 6:218-228.
- 493 Guergoletto, K.B.; Saori, C.; Mauro, I.; Garcia, S. 2017. Juçara (*Euterpe edulis*) pulp as a  
494 substrate for probiotic bacteria fermentation : Optimisation process and antioxidant activity.  
495 *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29:946-959.  
496 <https://DOI.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i12.1565>
- 497 Idam.2020. Boas práticas de produção sustentável no Amazonas-cupuaçu  
498 (<http://www.idam.am.gov.br/cultura-cupuacu/>) acessado em 17 de junho de 2022.
- 499 Jana, P.; Karmakar, S.; Roy, U.; Paul, M.; Singh, A. K.; Bera, K. K.2018. Phytobiotics in  
500 aquaculture health management: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6:  
501 1422-1429
- 502 Jung, J.; Jang, H. J.; Eom, S. J.; Choi, N. S.; Lee, N.K.; Paik, H.D.2019. Fermentation of red  
503 ginseng extract by the probiotic *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P: ginsenoside  
504 conversion and antioxidant effects. *Journal of Ginseng Research* 43: 20-26
- 505 Landete, J.M.; Curiel, J.A.; Rodríguez, H.; Rivas, B. de L.; Munoz, R. 2008. Study of the  
506 inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by  
507 *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry* 107:320–326.
- 508 Lima, M. C. F. 2020. *Caracterização de substâncias fenólicas e alcaloides dos resíduos do*  
509 *cupuaçu (Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum)*” . Dissertação de mestrado,  
510 Universidade Federal do Amazonas ,Manaus, Amazonas, p.132.
- 511 Madhuri,S.; Mandloi, A.K.; Govind, P.; Sahni,Y.P. 2012. Antimicrobial activity of some  
512 medical plants against fish pathogens. *International Research journal of Pharmacy* 3:28-30
- 513 Marcusso, P. F.; Claudiano, G. S.; Yunis-Aguinaga, J.; Marinho-Neto, F. A.; Eto, S. F.;  
514 Fernandes, D. C. et al.2021. Immunogenicity in *Oreochromis niloticus* vaccinated with  
515 sonicated antigens against streptococcosis. *Fish & Shellfish Immunology* 115: 134-141.
- 516 Moita, I.S. 2019. Caracterização química das cascas das sementes de espécies do gênero  
517 *Theobroma* . Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus,  
518 Amazonas, p.153.
- 519 Neri-Numa, I. A.; Pastore, G. M.2020. Novel insights into prebiotic properties on human health:

- 520 A review. *Food Research International* 131:108973.
- 521 Pessoa, W.F.B.; Melgaço, A.C.C.; De Almeida, M.E.; Ramos, L.P.; Rezende, R.P.; Romano,  
522 C.C.2017. In vitro activity of lactobacilli with probiotic potential isolated from cocoa  
523 fermentation against *Gardnerella vaginalis*. *BioMed Research International* 2017: 3264194.
- 524 Pugliese, A. G.; Tomas-Barberan, F. A.; Truchado, P.; Genovese, M. I.2013. Flavonoids,  
525 proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum*  
526 (Cupuassu) pulp and seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:2720–2728.
- 527 Ricci, A.; Bernini, V.; Maoloni, A.; Cirilini, M. , Galaverna , G.; Neviani, E.; Lazzi, C. 2019.  
528 Vegetable By-Product Lacto-Fermentation as a New Source of Antimicrobial Compounds.  
529 *Microorganisms* 7: 607
- 530 Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A., Pereira, C. I., Gomes, A. M., Malcata, F. X. and Freitas, A.  
531 C. 2011. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled  
532 milk matrices. *LWT-Food Science and Technology* 44: 100-108.
- 533 Sagar, N. A.; Pareek, S.; Sharma, S.; Yahia , E. M.; Lobo, M. G. 2018.Fruit and vegetable  
534 waste: bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive*  
535 *Reviews in Food Science and Food Safety* 17: 512–531.
- 536 Sanchez-Rabaneda, F.; Jauregui, O.; Casals, I.; Andres-Lacueva, C.; Izquierdo-Pulido, M.;  
537 Lamuela-Raventos, R. M. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass  
538 spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass*  
539 *Spectrometry* 38: 35–42.
- 540 Santos, G.M.; Maia, G.A.; Henrique, P.; Sousa, M.; Figueiredo, R.W.2010. Atividade  
541 antioxidante e correlações com componentes bioativos de produtos comerciais de cupuaçu.  
542 *Ciência rural* 40:1636–1642.
- 543 Santos, R. X. *Aplicação biotecnológica de extrato de cascas do fruto de cacau: mecanismo de*  
544 *ação, atividade antimicrobiana e não genotóxica*. 2013.Tese de Doutorado, Programa de pós-  
545 graduação em genética e biologia molecular/Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus,  
546 Bahia, p.133.
- 547 SEDAP. 2022. Dados de produção de  
548 cupuaçu(<http://www.sedap.pa.gov.br/content/cupua%C3%A7u#:~:text=Com%20uma%20C3%A1rea%20plantada%20de,em%20todo%20o%20territ%C3%B3rio%20paraense.>)  
549 Acessado em 17 de junho de 2022.
- 551 Silva, H.A. 2020. *Estudos fitoquímico, antioxidante e microbiológico de resíduos*  
552 *agroindustriais de cupuaçu (Theobroma grandiflorum schum.) da amazônia*. Dissertação de  
553 mestrado, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará.p.66
- 554 Silva, L. A..2019. *Suco de cupuaçu (Theobroma grandiflorum) como veículo para*  
555 *administração do probiótico Lactobacillus plantarum lp62: otimização, potencial*  
556 *antioxidante e estabilidade*. Trabalho de conclusão de curso, Bacharelado em Biotecnologia/  
557 Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, p.44.
- 558 Sung, S.K.; Rhee, Y.K.; Cho, C.W.; Kim, Y.C.; Lee, O.H.; Hong, H.D. 2013 Physicochemical  
559 properties and antioxidative activity of fermented *Rhodiola sachalinensis* and Korean red  
560 ginseng mixture by *Lactobacillus acidophilus*. *Korean Journal of Food And Nutrition*  
561 26:358–65.

- 562 Tauchen, J.; Bortl, L.; Huml, L.; Miksatkova, P.; Doslak, I.; Marsika, P. 2016. Phenolic  
563 composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from  
564 the Peruvian Amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26: 728–737
- 565 Yu, A. O.; Leveau, J. H. J.; Marco, M. L. 2020. Abundance, diversity and plant-specific  
566 adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. *Environmental Microbiology Reports*  
567 12:16–29.
- 568 Zhou, Y.; Wang, R.; Zhang, Y.; Yang, Y.; Sun, X.; Zhang, Q.; Yang, N. 2020. Biotransformation  
569 of phenolics and metabolites and the change in antioxidant activity in kiwifruit induced by  
570 *Lactobacillus plantarum* fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100:  
571 3283–3290.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No capítulo 1 desta dissertação verificamos que os extratos obtidos de resíduos da casca de *T. grandiflorum* demonstraram concentrações significativas de compostos fenólicos. Sugerimos a presença de 9 compostos nas amostras analisadas empregando a abordagem de CLAE-ESI-QTOF e, pela primeira vez, foi proposto a presença do composto Ácido asiático no fruto do cupuaçu, indicando que os extratos estudados podem ser uma fonte alternativa de compostos de interesse industrial e biotecnológico. Ademais, embora, não tenha sido observado potencial bactericida nos extratos analisados, foi possível verificar o potencial inibidor do crescimento de bactérias patogênicas, apontando para um possível uso industrial no controle do crescimento microbiano em áreas como cosmética e aquicultura.

No capítulo 2 foi possível verificar a possível aplicação do extrato da casca de cupuaçu em processos fermentativos como uma estratégia para a valorização e aplicação desse resíduo quase sempre menosprezado. Observou-se que a adição do extrato solubilizado em água teve um efeito positivo, embora não significativo, sobre o crescimento da bactéria *L. plantarum* Lp62. Além disso, observou-se que o processo fermentativo foi capaz de alterar o perfil químico do extrato, bem como aumentou o potencial antimicrobiano do mesmo.

Os resultados apontam que os extratos de resíduos de *T. grandiflorum* apresentam potencial biotecnológico para a produção de novos bioprodutos, podendo ser fonte de substâncias biotativas e utilizado em processos fermentativos. Entretanto, ainda são necessários outros estudos para a verificação de quais substâncias estão presentes nesse material vegetal, bem como quais são responsáveis pelas atividades biológicas relatadas. Ademais, estudos mais aprofundados precisam ser realizados para a elucidação correta dos processos de biotransformação que podem ou não ocorrer durante processos de fermentação, bem como verificar a melhor forma de empregar os extratos dentro da cadeia industrial.