



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

HAROLDO ARAUJO DA SILVA

**ESTUDOS FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E MICROBIOLÓGICO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum.) DA
AMAZÔNIA.**

**SANTARÉM, PARÁ
2020**

HAROLDO ARAUJO DA SILVA

**ESTUDOS FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E MICROBIOLÓGICO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum.) DA
AMAZÔNIA.**

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

Orientador: Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata.

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Débora Kono Taketa Moreira.

**SANTARÉM, PARÁ
2020**

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

S586e Silva, Haroldo Araújo da
Estudo fitoquímico, antioxidante e microbiológico de resíduos agroindustriais de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum.*) da Amazônia. / Haroldo Araújo da Silva. – Santarém, 2020.
64 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientador: Lauro Euclides Soares Barata
Coorientadora: Débora Kono Taketa Moreira
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia.

1. Bioprospecção. 2. Fitoquímica. 3. Tecnologia de alimentos. I. Barata, Lauro Euclides Soares, *orient.* II. Moreira, Débora Kono Taketa, *coorient.* III Título.

CDD: 23 ed. 581.19

HAROLDO ARAUJO DA SILVA

**ESTUDOS FITOQUIMICO, ANTIOXIDANTE E MICROBIOLÓGICO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum.) DA
AMAZÔNIA.**

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

Conceito: APROVADO

Data de Aprovação: 24/09/2020

Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata – Presidente/Orientador
PGRNA - Universidade Federal Do Oeste Do Pará

Prof. Dr. Manoel Roberval Pimentel Santos – 1º Examinador
IBEF - Universidade Federal Do Oeste Do Pará

Dr.^a. Isabella Cristhina Gonçalves – 2º Examinador
PGRNA - Universidade Federal Do Oeste Do Pará

Prof. Dr. Bruno Alexandre da Silva – 3º Examinador Externo
ISCO - Universidade Federal Do Oeste Do Pará

Dedico esse trabalho as minhas mães
Záide Araújo e Maria do Carmo, meus
maiores exemplos de determinação,
coragem e gentileza. A elas toda
gratidão e amor.

AGRADECIMENTO

A Deus, Olorum, Oxalá, Iemanjá e todas as forças positivas que regem esse Universo;

As minhas mães **Zaíde Araújo** e **Maria do Carmo**, por me ensinarem a nunca desistir dos meus sonhos e sempre ter resiliência e gentileza em meio as adversidades;

Aos meus amigos **Daniella Oliveira** e **Davi Vale** por me apoiarem em diversos momentos difíceis nessa jornada;

Aos meus irmãos de alma **Cassio Figueira** e **Felipe Corrêa** por sempre me apoiarem em todos os momentos de minha vida desde a graduação;

A minha coorientadora e amiga **Prof.^a Dr.^a Débora Moreira**, por sempre me socorrer nos momentos mais desesperados e partilhar de sua sabedoria com muita nobreza e carisma;

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia por serem pessoas extraordinárias e altruístas, em especial a Técnica **Alciene Viana** por ter um coração gentil e uma aura amável;

Ao **Prof. Dr. Bruno Alexandre** do Instituto de Saúde Coletiva- UFOPA, pela parceria, por abrir as portas de seu laboratório para realização de minha pesquisa, pelos conhecimentos repassados e pelo altruísmo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia pelos ensinamentos repassados;

A secretária do PPGRNA **Rose Gleisy** pela paciência e gentileza em sempre dispor de seu tempo para sanar dúvidas e contratempos;

Ao **Prof. Dr. Lauro Barata** pelas oportunidades concedidas através desse projeto, pela orientação precisa e gentil dada ao longo desse trabalho, pelos conselhos paternos e pelo altruísmo em nortear minha carreira acadêmica em diversas etapas da minha vida, sendo muito mais do que um orientador, um exemplo de determinação, liderança e gentileza que levarei ao longo de minha trajetória acadêmica;

As minhas amigas do laboratório de Farmacognosia da UFOPA, **Alessandra Santos** e **Kelliane Silva** pelas ajudas nas análises, pela companhia sorridente e pelos laços fraternos construídos;

Aos amigos do Instituto de Química da UNESP - Araraquara, **Ph.D. Marcelo Amorim** pela amizade, ensinamentos, gentilezas e altruísmo. Em especial a **Prof.^a Dr.^a Lourdes Campaner** pela atenção e cuidado com meu bem-estar dentro e fora da instituição, pelos ensinamentos acadêmicos repassados e pelo exemplo de mulher resiliente e altruísta que inspira a todos a sua volta, sou grato pelo tempo dedicado para comigo e pelos laços de amizade construído através da ciência;

A Doutoranda do Instituto de Química da UNESP - Araraquara, **Ana Zanatta**, pelos ensinamentos repassados, por dispor de seu tempo para auxiliar nas análises químicas, repassando seus conhecimentos com gentileza e altruísmo, pela amizade construída que transcendeu os limites dos laboratórios e levaremos para vida;

Ao **Ph.D. Felipe Hilário** do Instituto de Química da UNESP - Araraquara, por desprender de seu tempo para me ajudar com as análises microbiológica, pelos ensinamentos repassados e pela amizade construída;

Ao amigo **Pablo Pitanguí**, pela amizade construída e todo apoio emocional e suporte, fomentando meus sonhos e me incentivando a alcançar patamares maiores ao longo de minha jornada acadêmica;

Ao **Prof. Dr. Marcelo Pena** do Instituto de Biociências da USP, pela generosidade e altruísmo em abrir as portas de seu laboratório, disposto a partilhar de sua expertise e contribuir para que eu pudesse galgar níveis mais altos de conhecimento;

A amiga **Noranathan Guimarães**, pelo suporte, apoio emocional, psicológico e pelas conversas construtivas, sou grato pelos laços de amizade construído na graduação e que levamos para a vida;

Ao casal de amigos **Julianny Guimarães** e **Waldir Figueira**, pelo apoio emocional e suporte em São Paulo, pela troca de experiências e conhecimentos, pelo altruísmo, pelos sorrisos compartilhados e por acreditarem nos meus propósitos, me auxiliando a transpor momentos difíceis;

Ao **Programa Nacional de Cooperação Acadêmica** (Procad/CAPES) pelas bolsas concedidas para a realização dos estágios profissionais em laboratórios de excelência;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

A todos, meus mais sinceros agradecimentos!

“O que é sucesso?

Rir muito e com frequência; ganhar o respeito das pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso”.

(Bessie Stanley)

RESUMO

A diversidade de plantas das florestas tropicais da Amazônia verificada taxonomicamente reúne 14.003 espécies das quais 6.727 são árvores incluindo o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) cujo valor agregado está na polpa e na amêndoa que compõe o fruto usado na indústria de alimentos e cosméticos. Entretanto, com a crescente exploração há um aumento expressivo do volume de resíduos orgânicos gerados decorrentes do processamento agroindustrial, o que gera um problema ambiental, principalmente no Pará, principal produtor brasileiro dos frutos do cupuaçu. Os estudos com foco nesses resíduos são escassos, por isso objetivamos analisar os resíduos agroindustriais de *T. grandiflorum* pela via fitoquímica e das atividades biológicas visando produtos bioativos. A caracterização fitoquímica foi obtida pela quantificação dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos condensados. Nos ensaios biológicos a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH e ABTS e atividade antimicrobiana determinada pelo método de difusão em poços para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A caracterização química foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de arranjo de foto-diodos (CLAE-PDA), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas (CLAE-ESI-EM/EM) e anotações de compostos químicos pela rede *Molecular Networking*. Os resultados obtidos mostraram o fruto com peso médio de 1146,2 g, correspondendo a 37,3 % de epicarpo, 36,4 % de mesocarpo, 22,6 % de endocarpo e 3,7 % de fibra central. Na caracterização fitoquímica as sementes e cascas obtiveram maior concentração de compostos fenólicos sem apresentar diferença estatística, no entanto a semente se destacou por apresentar maiores teores de flavonoides e taninos condensados, em relação as demais partes do fruto. Na atividade antioxidante a casca apresentou maior captura dos radicais DPPH e ABTS que as demais amostras, o que conduziu aos extratos etanólico e hidroalcóolico a partir dos resíduos das cascas que na caracterização química por CLAE-PDA apresentou bandas majoritárias no comprimento de onda $\lambda=270$ nm característico de taninos condensados. As análises por CLAE-ESI-EM/EM caracterizaram 16 substâncias e, apresentaram íons de maior intensidade com m/z 341 característico do composto ácido caféico 3-glucosídeo e o íon m/z 289 sugestivo de massa de catequina para os extratos hidroalcóolico e etanólico, respectivamente. As análises por redes moleculares anotaram 23 substâncias correlacionadas com ambos os extratos correspondentes à classe dos ácidos fenólicos e flavonoides. Após a caracterização os extratos foram testados frente a atividade antimicrobiana com resultado positivo para os extratos hidroalcóolicos nas cepas *S. aureus*, *Salmonella sp.*, e *E. coli*. Enquanto o extrato etanólico foi ativo apenas frente a *Salmonella sp.* Este estudo inédito identificou compostos fenólicos da casca de cupuaçu com potencial antioxidante e antimicrobiano, e a estratégia de combinação das técnicas de CLAE-ESI-EM/EM e *Molecular Networking* possibilitou uma interpretação rápida e otimizada dos dados gerados da desreplicação de extratos das cascas de *T. grandiflorum*.

Palavras-chave: Bioprospecção. Fitoquímica. Tecnologia de alimentos. *Molecular networking*.

ABSTRACT

The taxonomically verified diversity of tropical rainforest plants includes 14,003 species, of which 6,727 are trees including cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) Whose added value is in the pulp and almonds that make up the fruit used in the food and cosmetics industry. However, with the increasing exploitation there is a significant increase in the volume of organic waste generated due to agro-industrial processing, which creates an environmental problem, mainly in Pará, the main Brazilian producer of cupuassu fruits. Studies focusing on these residues are scarce, so we aim to analyze the agro-industrial residues of *T. grandiflorum* through the phytochemical and biological activities aimed at bioactive products. Phytochemical characterization was obtained by quantifying the total phenolic compounds, total flavonoids and condensed tannins. In biological tests, the antioxidant activity was evaluated by the methods of DPPH and ABTS and antimicrobial activity determined by the method of diffusion in wells to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Chemical characterization was performed by High Performance Liquid Chromatography coupled to a photo-diode array detector (HPLC-PDA), High Performance Liquid Chromatography coupled to a Mass Spectrometer (HPLC-ESI-MS / MS) and annotations of chemical compounds through the *Molecular Networking* network. The results obtained showed the fruit with an average weight of 1146.2 g, corresponding to 37.3% of epicarp, 36.4% of mesocarp, 22.6% of endocarp and 3.7% of central fiber. In the phytochemical characterization the seeds and peels obtained a higher concentration of phenolic compounds without showing statistical difference, however the seed stood out for presenting higher levels of flavonoids and condensed tannins, in relation to the other parts of the fruit. In the antioxidant activity, the peel showed greater capture of the DPPH and ABTS radicals than the other samples, which led to ethanolic and hydroalcoholic extracts from the bark residues which in the chemical characterization by HPLC-PDA showed major bands in the wavelength $\lambda = 270$ nm characteristic of condensed tannins. The analyzes by HPLC-ESI-MS/MS characterized 16 substances and, presented ions of greater intensity with m/z 341 characteristic of the compound caffeic acid 3-glucoside and the ion m/z 289 suggestive of catechin mass for hydroalcoholic extracts and ethanolic, respectively. The analysis by molecular networks noted 23 substances correlated with both extracts corresponding to the class of phenolic acids and flavonoids. After characterization, the extracts were tested for antimicrobial activity with a positive result for hirdroalcoholic extracts in the strains *S. aureus*, *Salmonella sp.*, and *E. coli*. While the ethanolic extract was active only against *Salmonella sp.* This unprecedented study identified phenolic compounds from cupuaçu bark with antioxidant and antimicrobial potential, and the strategy of combining HPLC-ESI-MS/MS and *Molecular Networking* techniques enabled a quick and optimized interpretation of the data generated from the de-replication of bark extracts *T. grandiflorum*.

Keywords: Bioprospecting. Phytochemistry. Food Technology. *Molecular Networking*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** Esquema da microplaca para a determinação da CIM.....36
- FIGURA 2.** Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-PDA dos extratos de *T. grandiflorum*.....41
- FIGURA 3.** Cromatograma do extrato hidroalcolico da casca de *T. grandiflorum* por CLAE-ESI-EM/EM.....44
- FIGURA 4.** Cromatograma do extrato etanólico da casca de *T. grandiflorum* por CLAE-ESI-EM/EM.....46
- FIGURA 5.** Estruturas químicas das moléculas caracterizadas nos extratos de *T. grandiflorum*.....47
- FIGURA 6.** Espectros de massas por CLAE-ESI-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados nos extratos das cascas de *T. grandiflorum*.....47
- FIGURA 7.** Rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e hidroalcolico de cupuaçu (*T. grandiflorum*) no modo negativo.....51
- FIGURA 8.** Cluster dos ácidos fenólicos da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e hidroalcolico de cupuaçu (*T. grandiflorum*) no modo negativo.....51
- FIGURA 9.** Cluster dos ácidos fenólicos e quercetinas da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e hidroalcolico de cupuaçu (*T. grandiflorum*) no modo negativo.....52
- FIGURA 10.** Cluster dos flavonoides da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e hidroalcolico de cupuaçu (*T. grandiflorum*) no modo negativo.....52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Parâmetros utilizados para geração da rede molecular (Workflow) na plataforma espectral do GNPS.....	34
TABELA 2. Caracterização física dos frutos de cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i>).....	39
TABELA 3. Caracterização fitoquímica e capacidade antioxidante dos extratos hidroalcóolicos de cupuaçu.....	39
TABELA 4. Dados dos principais íons detectados no extrato de <i>T. grandiflorum</i> por CLAE-ESI-EM/EM e sugestões de substâncias de acordo com a literatura.....	43
TABELA 5. Anotações química dos extratos etanólicos e hidroalcóolicos de <i>T. grandiflorum</i> por <i>Molecular Networking</i>	53
TABELA 6. Critério de avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica de poços.....	55
TABELA 7. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e hidroalcóolico de <i>T. grandiflorum</i>	56

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
(% b.s)	Porcentagem de base seca
(m/v)	Massa por volume
≥	Maior ou igual
ABTS [*]	+· 2, 2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato)
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatografia gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cm	Centímetro
Da	Dalton
Ddp	Diferença de Potencial
DPPH [*]	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC	Equivalente de catequina
EGA	Equivalente de ácido gálico
EM	Espectrometria de Massas
ER	Equivalente a rutina
ESI	<i>Eletrospray Ionization</i>
EtOH	Etanólico/Etanol

EtOH:H ₂ O	Hidroalcólico
g	Gramma
GNPS	Global Natural Products Social
h	Horas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IE	Ionização por Elétrons
IT	Ion trap
IV	Infravermelho
Kg	Quilograma
KHz	Quilo-Hertz.
m	Metro
m/z	Razão massa e carga
mg	Miligrama
MH	Miler Hilton
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MS(%)	Porcentagem de massa seca
Ms ²	Fragmento de íons
nm	Nanômetro

°C	Graus Celsius
PDA	Detector de Arranjo de Diodos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Extração fase sólida
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente a trolox
UV	Ultravioleta
v	Volume
λ	Comprimento de onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. <i>Theobroma grandiflorum</i> Schum	18
2.2. Potencial biológico do cupuaçu.....	19
2.3. Compostos antioxidantes.....	21
2.4. Estudos microbiológicos.....	22
2.5. Estudos fitoquímicos	23
2.5.1. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Performance	23
2.5.2. Espectrometria de massas - EM	24
2.6. Molecular Networking	25
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Coleta da matéria-prima.....	29
4.2. Caracterização física dos frutos	29
4.3. Preparo e obtenção dos extratos.....	29
4.4. Caracterização fitoquímica.....	30
4.4.1. Determinação de fenólicos totais	31
4.4.2. Determinação de flavonoides totais	31
4.4.3. Determinação de taninos condensados	31
4.5. Caracterização cromatográfica	31
4.5.1. Preparo das amostras.....	32
4.5.2. Caracterização química por CLAE-PDA	32
4.5.3. Caracterização química por CLAE-ESI-EM/EM	32
4.6. Redes de interações moleculares (<i>Molecular Networking</i>)	33
4.7. Avaliação da atividade biológica	34

4.7.1.	Atividade antioxidante	34
4.7.1.1.	Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH	34
4.7.1.2.	Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS.....	34
4.7.2.	Atividade antimicrobiana	35
4.7.2.1.	Avaliação da atividade antibacteriana	35
4.7.2.1.1.	Padronização da suspensão bacteriana	35
4.7.2.1.2.	Determinação da concentração inibitória mínima.....	35
4.7.2.1.3.	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	36
4.7.2.2.	Avaliação da atividade antifúngica.....	37
4.7.2.2.1.	Padronização da suspensão fúngica.....	37
4.7.2.2.2.	Determinação da concentração inibitória mínima.....	37
4.7.2.2.3.	Determinação da concentração fungicida mínima.....	38
4.8.	Análise estatística	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1.	Caracterização dos frutos e rendimento dos extratos	38
5.2.	Caracterização fitoquímica.....	39
5.3.	Capacidade antioxidante	40
5.4.	Análise química e rendimento dos extratos	41
5.4.1.	CLAE-PDA	41
5.4.2.	CLAE-ESI-EM/EM.....	42
5.5.	Rede molecular (Molecular Networking)	49
5.6.	Atividade antimicrobiana dos extratos.....	55
6.	CONCLUSÃO.....	57
	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	58
	APÊNDICE	65

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é mundialmente conhecida pela biodiversidade de sua flora. Giacometti (1993) descreveu cerca de 250 espécies de frutos comestíveis na região, entre eles o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.), espécie da família Malvaceae. Este fruto tem ganhado destaque no cenário nacional e internacional, devido possuir alto teor em gordura, valor nutricional e baixo custo, movimentando a economia da região com a produção de polpas, sucos, sorvetes e doces (OLIVEIRA; GENOVESE, 2013; SOUZA *et al.*, 2011). Outra vertente da exploração comercial desse fruto, que está em ascensão, é a fabricação de cosméticos e fitofármacos, que tem voltado olhares atentos de pesquisadores para geração de novos produtos e tecnologias a partir dessas matérias-primas (LIMA, 2013).

A produção de cupuaçu no Brasil segundo os últimos dados levantados pelo IBGE (2006), foi de 248.710 toneladas em 2006, gerando uma receita média de 363.903 mil, sendo o Pará o estado de maior produção dessas culturas. Em 2017 a área plantada dessa monocultura no estado do Pará foi aproximadamente 9.738 hectares, com produção média de 29.558 toneladas, com rendimento de produção de 3.111 kg/há (SEDAP-PA, 2017). Em consequência da exploração comercial desta espécie, cresce o volume de resíduos orgânicos oriundos do processamento industrial desse fruto, os resíduos industriais do cupuaçu, no final da escala de produção, seriam de aproximadamente 111.919 toneladas a nível nacional, ao passo que em média 45 % do fruto é constituído por cascas (NAZARÉ *et al.*, 1990; GIORDANI JUNIOR; CAVALI; PORTO, 2014). A exploração comercial desse fruto gera expressivas quantidades de resíduos na agroindústria, pois apenas a polpa e as amêndoas possuem valor comercial, o que reflete no aumento da produção de lixo orgânico oriundo do processamento desses frutos, causando impactos ambientais em decorrência do descarte incorreto desses subprodutos (CARVALHO; GARCÍA; AMAYA-FARFÁN, 2006; FREITAS *et al.*, 2015; RODRIGUES, 2010). A conduta mais geral adotada por algumas empresas é empregá-los como adubo orgânico, porém estudos promissores mostram que, esses resíduos possuem significativos teores nutricionais, destacando-se o potássio, ferro, selênio e sobretudo compostos antioxidantes (ANWAR, 2013; AVILA-SOSA *et al.*, 2019; ELIANA *et al.*, 2013).

A busca por novas moléculas bioativas levou pesquisadores a prospectar novos bioprodutos e tecnologias sustentáveis, a partir de recursos naturais, tendo como foco a economia circular, onde o subproduto de uma determinada escala de produção é empregado na geração de um novo produto ou serviço, um dos protagonistas desse novo cenário econômico-industrial é o fruto de cupuaçu onde estudos demonstram que a espécie possui grande potencial para a prospecção de moléculas bioativas (LIMA, 2013; SANTOS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2004; YUKIKOGYO CO.LTD, 2019). São escassos os estudos com foco nos resíduos gerados, a partir, dentro desse contexto, os resíduos de cupuaçu, possuem potencial para serem utilizados tanto na indústria alimentícia, em composições de rações e alimentos funcionais, quanto na indústria farmacêutica, por possuírem compostos bioativos como os fenólicos, que são associados ao tratamento clínico de certas patologias, possibilitando um emprego econômico-sócio-ambiental mais eficiente para esse subproduto, Tendo em vista o grande potencial biotecnológico desse subproduto (KATZ, DOUGHTY, & ALI, 2011; WANG *ET AL.*, 2000; WEISBURGER, 2001).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Theobroma grandiflorum* Schum

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é um fruto nativo da Amazônia, no gênero *Theobroma* essa espécie é o fruto de maior representatividade com peso médio de quatro quilos. As características bromatológicas do fruto são de aproximadamente 45% composto de cascas, 35 % de polpa e 20 % de sementes, sendo o mesocarpo (polpa), a principal fonte de exploração econômica dessa espécie, convertida pela indústria alimentícia em sucos, néctares, licores, geleias, bebidas fermentadas, sorvetes, entre outros (NAZARÉ *et al.*,1990)

Em seu habitat natural, a árvore do cupuaçu é de médio porte, podendo atingir até 20 metros de altura. As folhagens possuem características fisiológicas alongadas com aproximadamente 30 cm de comprimento e 15 cm de largura; a coloração das folhas variando de rósea, quando jovens a verde-escuras, quando atingem o estágio de maturação, suas flores são grandes e possuem coloração avermelhada (GONDIN *et al.*, 2001).

Estudos de Matos (2007) demonstram que não há diferenças significativas em relação às características físico-químicas do fruto com os diferentes formatos.

Todavia, o fruto com formato obovado, apresenta maior rendimento de polpa (39,81 %), enquanto o cupuaçu elíptico, é característico por apresentar maior rendimento de sementes (26,46 %) em relação aos demais.

As características organolépticas descritas em estudos de Roger et al (2004) relata que a polpa de cupuaçu possui caráter ácido (pH 3,4), a sua composição bromatológica é encontrado os valores relevantes de proteínas (8,8 %), lipídios (12,7 %), cinzas (5,3 %), fibras (14,3 %) e matéria seca (12,1 %). O estudo fitoquímico realizado pelo autor descreve a presença de aminoácidos e ácidos graxos na espécie, além da presença de macronutrientes como potássio (34,3 mg/g), fósforo (15,7 mg/g), magnésio (13,1 mg/g), cálcio (5,5 mg/g) e sódio (2,5 mg/g) (LIMA, 2013).

Segundo estudos de Franco, e Shibamoto, (2000), o aroma marcante e característico do fruto é atribuído ao sinergismo de vários compostos voláteis, destacando-se os ésteres, dentre eles, 42 % corresponde ao butanoato de etila e 22 % ao hexanoato de etila, corroborando com os dados relatados por (Alves e Jennings, (1979), onde esses mesmos componentes foram caracterizados como majoritários na polpa do fruto.

Diante dos dados abordados, evidencia-se que a espécie *Theobroma grandiflorum* é um importante recurso natural no cenário agroindustrial da Amazônia, sendo aplicado em diversas vertentes industriais. Na escala de produção do cupuaçu, tem se estudado algumas aplicações aos resíduos oriundos do processo de industrialização, no entanto, a maior parcela desse resíduo ainda encontra-se sem aplicação útil à sociedade e passivo no meio ambiente, desafiando pesquisadores a propor uma exploração mais sustentável, buscando uma bioeconomia circular na escala de produção desse recurso natural (FILHO, 2016).

2.2. Potencial biológico do cupuaçu

Espécies vegetais do bioma amazônico são mundialmente conhecidas por possuírem compostos com atividade biológica frente a diversas patologias, colocando a Amazônia como uma das maiores fontes de conhecimento etnofarmacológico contemporâneo das últimas décadas (RODRIGUES, 2010). Os estudos voltados para a descoberta de novos bioprodutos e tecnologias sustentáveis tem ganhado destaque no cenário industrial e uma das matérias-primas com

potencial para o desenvolvimento de produtos naturais contendo compostos bioativos é o fruto de *T. grandiflorum*.

Com a evolução da indústria farmacêutica e alimentícia, os nutracêuticos e os alimentos funcionais têm ganhado destaque, tanto no cenário econômico quanto na difusão de seu uso pela população. Os avanços na área da fitoquímica atestaram à alta eficiência, baixa toxicidade e biocompatibilidade no uso de produtos naturais de origem vegetal (SANTOS *et al.*, 2011). O gênero *Theobroma* apresenta diversas classes de compostos fenólicos, apresentando uma diversidade química que contribui para versatilidade desses compostos frente as diversas atividades biológicas.

Dentre esses compostos está o ácido caféico, que apresenta atividade antioxidante, neuroprotetora, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antiaterosclerótica e anticancerígena (MAIA, 2015). A Quercetina, um flavonoide polifenólico, apresenta propriedades anti-inflamatórias, anticarginogênica, antiviral, hepatoprotetora, gastroprotetora, melhora o sistema imunológico sendo utilizada na medicina convencional em problemas circulatórios e capilares, sobretudo inflamações (DESCHNER *et al.*, 1991).

Outro composto de importância econômica encontrado em extratos vegetais do gênero *Theobroma* é a Rutina, comumente conhecida como vitamina P, este um flavonoide glicosilado pertencente a classe dos flavonóis. Estudos de Park (2010) descrevem a importância farmacológica e terapêutica dessa substância por ter atividade inibitória do processo de formação de radicais livres. As catequinas são substâncias bioativas também presentes no gênero taxonômico *Theobroma*, pertencentes ao grupo dos polifenóis possui ação direta nas desordens estéticas, como o envelhecimento precoce cutâneo ocasionado pela exposição aos radicais livres e pelo processo inflamatório induzido (Sá, 2010). Estudos conduzidos por Manfredini (2004) relata a bioatividade das catequinas frente a diversas patologias, como: cardiopatias, infecções virais, diabete mellitus, inflamações e doenças degenerativas.

Nesse sentido, o grande potencial biotecnológico das espécies amazônicas, mais precisamente o *T. grandiflorum*, pode-se observar que as biomoléculas naturais ativas, caracterizadas em estudos de espécies vegetais do gênero *Theobroma*, é de grande interesse clínico/industrial, por estarem associados a diversas atividades farmacológicas, como atividade antioxidante, microbiológica e

anti-inflamatória. Nesse sentido, os extratos agroindustriais demonstram alto potencial biotecnológico, tanto para a indústria alimentícia, na elaboração de alimentos funcionais, quanto para indústria farmacêutica, na formulação de fitofármacos para a profilaxia e tratamento de patologias clínicas.

2.3. Compostos antioxidantes

Moléculas que possuem radicais livres instáveis quando presentes em organismos vivos podem levar a um processo denominado de estresse oxidativo, essa desordem acontece quando as células ficam susceptíveis ao desenvolvimento de patologias relacionadas a artrite, câncer, diabetes, doenças cardíacas e neurodegenerativas, dentre outras (AYRES; CHAVES, 2009). Espécies radicalares como o radical hidroxila, hidroperoxila e o ânion radical superóxido possuem a capacidade de oxidar lipídios e proteínas, aumentando a probabilidade de desencadear danos nos processos bioquímicos do DNA e agindo antagonicamente na oxidação de cadeias das moléculas de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios e do colesterol (ELIANA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2010).

Para mitigar esses efeitos no organismo humano, uma alternativa é através da ingestão de antioxidantes naturais, que possuem a capacidade de estabilizar ou inativar os radicais livres antes que iniciem o ataque aos alvos biológicos nas células. Essas substâncias são comumente encontradas em frutas e hortaliças oriundas da dieta alimentar humana ou pela ingestão de suplementos alimentares, onde os principais agentes antioxidantes são os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), os polifenóis, selênio e os carotenoides (HASLAM, 1996; VALKO *et al.*, 2004). Dentre os compostos fenólicos com a atividade antioxidante em plantas, destaca-se os fenóis simples, ácidos fenólicos derivados de ácidos benzoico e cinâmico, cumarinas, flavonoides, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os avanços nas pesquisas em química de produtos naturais e química orgânica demonstram que os antioxidantes podem ser encontrados em plantas de uso medicinal e nutricional, obtidos, a partir, de extratos vegetais e tinturas de diversas espécies de plantas, incluindo o gênero *Theobroma*. Estudos de Oliveira *et al* (2013) descrevem compostos antioxidantes nas espécies *T. grandiflorum* e *T. cacao*, corroborando com os estudos de Freitas *et al.*, (2017) que avaliou a atividade antioxidante e os compostos fenólicos em extratos vegetais de *T. grandiflorum*. comprovando o grande potencial biotecnológico da espécie.

2.4. Estudos microbiológicos

A investigação de novas matrizes vegetais, que possuem compostos bioativos com propriedades antimicrobianas é o alvo de pesquisadores que buscam novas alternativas terapêuticas para bactérias multirresistentes aos antibióticos comerciais. Estudos de extratos vegetais de plantas tem ganhado destaque nesse cenário, uma vez que, diversas espécies apresentam em seu metabolismo secundário, compostos antimicrobianos com acentuada biocompatibilidade e com espectro de inibição satisfatório (LUZ CÁDIZ-GURREA *et al.*, 2019).

Um dos maiores agravantes de saúde pública no mundo são as infecções acometidas por fungos e bactérias. Hoje, os principais casos com alto índice de mortalidade, são por infecções bacterianas generalizadas denominadas septicemia, tendo um crescimento exponencial em detrimento à resistência bacteriana aos antibióticos comerciais, fazendo-se necessário a busca por novos tratamentos alternativos por meio de fármacos efetivos de novas matrizes para o sucesso terapêutico com maior eficiência e menores efeitos colaterais. Nesse âmbito, diversos estudos vêm sendo realizados na tentativa de se obter compostos bioativos de fontes naturais promissoras como agente bactericida e fungicida (DRUMOND *et al.*, 2004).

O surgimento e a disseminação de microrganismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado é um viés da evolução biológica e constitui um sério problema tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (DUARTE, 2006). Em estudos, Baquero e Blázquez (2008) relatam uma probabilidade significativa no surgimento de novas cepas bacterianas resistentes ao arsenal de antibióticos presentes no mercado atual, considerando que a descoberta de novas classes de antibióticos foi discreta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas e avanços das indústrias farmacêuticas.

Dentre os inúmeros microrganismos patogênicos já descritos, as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e a levedura *Candida albicans* destacam-se dentre as bactérias que mais acometem infecções em seres humanos. Esses microrganismos são agentes patogênicos oportunistas que podem causar infecções do trato gástrico, urinário e no sistema respiratório, também podendo acometer infecções de pele, tecidos moles, infecções oftalmológicas, ósseas e articulares, dentre outras infecções sistêmicas (FERREIRA, 2005).

Os antimicrobianos, conhecidos por terem amplo espectro de ação ante os microrganismos, estão tendo sua eficácia comprometida devido à aquisição de resistência por parte dos agentes infecciosos, por este motivo se faz necessário a busca de novas fontes terapêuticas os quais sejam mais eficientes para o tratamento clínico de infecções, como as bacterianas e fungos. Os produtos naturais são uma alternativa, uma vez que, são utilizados pela etnofarmacologia no controle de doenças em países em desenvolvimento, principalmente em regiões isoladas, de difícil acesso (BARBOSA-FILHO JM *et al.*, (2005). Segundo Adongbede (2013) historicamente, os produtos naturais foram precursores para a descoberta e síntese de novas drogas, os princípios ativos de origem natural são uma alternativa para o tratamento clínico de diversas patologias por serem mais biocompatíveis e possuírem menos riscos de efeitos indesejados no paciente (ANWAR, 2013; DRUMOND *et al.*, 2004; KOOLEN *et al.*, 2013).

Nesse sentido, a busca por novas fontes de substâncias com potencial antimicrobiano de origem vegetal, tem ganhado destaque no cenário de produtos naturais, intensificando pesquisas, com viés biotecnológico, nas indústrias farmacêuticas (MENDES *et al.*, 2011). Aproximadamente 250 mil espécies medicinais foram catalogadas pela *United Nations Educational Scientific and Cultural Organization* (UNESCO), sendo o território brasileiro o habitat de uma parcela expressiva dessa biodiversidade, o que permite um volume considerável de espécies com potencial para prospecção de novas moléculas bioativas com atividade terapêutica (DRUMOND *et al.*, 2004).

2.5. Estudos fitoquímicos

2.5.1. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O termo cromatografia possui sua etimologia oriunda das palavras gregas *chrom* e *graphie* que significa cor e escrita, respectivamente. A cromatografia é conceituada como um método físico-químico de separação de misturas, que possui como fundamento a migração diferencial dos analitos de uma amostra, entre duas fases, onde uma denomina-se fase móvel e outra a fase estacionária que possui característica imiscíveis. A versatilidade no amplo uso das técnicas cromatográficas é possível pelo fato da grande variedade de combinações possíveis entre as fases móveis e estacionárias, deixando-as com alto grau de sensibilidade frente a diversas matrizes vegetais, animais ou sintéticas (DEGANI *et al.*, 1998).

A CLAE é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas com partículas de diminutas granulometrias, sendo estas partículas altamente comprimidas em uma coluna, responsáveis pela alta eficiência da técnica, fazendo-se necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição dos analitos da fase móvel interagir com a fase estacionária (DEGANI et al.,1998). O mecanismo de separação em CLAE pode ocorrer tanto por adsorção, quanto por partição. A fase estacionária comumente utilizada nas colunas é sílica, toda via, há possibilidade de usar modificadores na sílica, o que confere a essa fase estacionária uma amplitude maior em análises robustas e de alta complexidade. A técnica pode ser realizada no modo normal, quando a fase estacionária possui caráter polar e a fase móvel menos polar; e no modo reverso, quando a fase estacionária é mais apolar em comparação com a fase móvel, sendo a última a mais adotada nas análises de produtos naturais que utilizam essa técnica (MOITA, 2019).

2.5.2. Espectrometria de massas - EM

A espectrometria de massas é uma técnica espectrométrica que possui caráter analítico de alta precisão e sensibilidade, utilizada em estudos químicos para caracterizar ou identificar estruturas orgânicas em uma gama diversificada de matrizes, sendo capaz de mensurar compostos isótopos. Essa técnica é aplicada no estudo de metabólitos secundários por conseguir determinar a medida da razão massa carga de um composto, a partir da formação de íons de uma molécula ou de seus fragmentos moleculares (HARRIS & LUCY, 2012; MOITA, 2019).

O equipamento de espectrometria de massas é composto por: uma fonte de íons, um analisador de massas responsável pela seleção de íons, um detector de íon e um processador de sinais que através de um *software* específico em um computador realiza os cálculos para a obtenção do espectro de massas. O analito é injetado na fonte de íon, onde ocorre a conversão do analito em íons através de uma fonte de ionização, os íons podem se formar tanto positivos, quanto negativos, tais íons são acelerados por meio de um campo elétrico e direcionados ao analisador de massa. Em seguida os íons passam pelo detector, onde são convertidos em sinais elétricos sendo processados e armazenados no computador (HARRIS & LUCY, 2012).

A ionização mais comumente utilizada é a por *electrospray* - ESI, principalmente para detecção de substâncias em estudos de química de produtos

naturais. Um dos principais alvos no uso dessa fonte é a caracterização e identificação de compostos fenólicos, ao passo que nessa fonte ocorre a formação de um feixe eletrostático, incidindo na transferência de íons existentes presentes em uma solução para a fase gasosa, onde pequenas gotas carregadas e fragmentadas com a aplicação de uma diferença de potencial, dando origem aos íons de interesse. Esse método pode ser dividido em três etapas: nebulização, liberação de íons e o transporte de íon da região de pressão atmosférica da fonte para a região de alto vácuo do analisador (MOITA, 2019; HAM, 2008).

Para a validação da massa adquirida é utilizado um analisador de massas, o comumente utilizado em experimentos de espectroscopia de massas é o tipo *ion trap* (IT) ou armadilha de íons, o seu princípio baseia-se em um filtro que tem a capacidade de aprisionar em um campo elétrico tridimensional os íons de interesse, esses íons por sua vez são gradativamente liberados por ordem de m/z crescente, gerando um espectro de massas no término da análise. (ALVAREZ-RIVERA et al., 2019).

2.6. Molecular Networking

A descoberta de novos produtos naturais bioativos com potencial para o desenvolvimento de novas terapias clínicas foi inspirado pela etnofarmacologia, esses produtos são alcançados, em sua maioria, através da triagem de extratos de plantas que são submetidos a estudos clínicos, químicos e biológicos usando métodos *in vitro* e *in vivo* (NEWMAN et al., 2012). Todavia, os extratos oriundos de plantas possuem alta complexidade em sua composição química, esse sinergismo entre metabólitos, em alguns casos, é o que confere aos extratos atividades biológicas, porém, quando se trata de caracterizar os compostos químicos através de técnicas espectrofotométricas, há um grande desafio, pois a natureza desses compostos é complexa, induzindo pesquisadores a elaborar métodos de caracterização e identificação cada vez mais sensíveis, precisos e seletivos (NOTHIAS et al., 2018).

Até recentemente os químicos de produtos naturais utilizavam-se de uma ampla gama de análises espectrométricas e espectroscópicas para caracterizar, e sobretudo identificar substâncias orgânicas de baixo peso molecular como os alcaloides, esteroides, flavonoides e outros. Esses métodos eram o Infravermelho (IV) e Ultravioleta (UV) a RMN (Ressonância Magnética Nuclear de H1 e C13) e a

EM (Espectrometria de Massas). Em contra partida, com o advento dos *big data*, computadores de alta velocidade, estes métodos foram adaptados na metabolômica para analisar matrizes complexas como os extratos de plantas (RAHEEM et al., 2019).

Com o desenvolvimento de métodos analíticos mais robustos para análises de matrizes complexas, a metabolômica tem ganhado destaque na pesquisa básica para elucidar os efeitos ambientais, compreender as funções dos genes, e a definição dos processos biológicos de organismos vegetais e animais, em busca de solucionar problemas de diversas vertentes (OLIVEIRA et al., 2017; RAHEEM et al., 2019). Dito isso, a metabolômica pode ser definida como uma análise de amplo espectro de metabolitos, podendo ser qualitativa ou quantitativa, possuindo como objetivo principal o agrupamento da maior quantidade possível de informações metabólicas, a cerca de um organismo ou sistema biológico (FOX RAMOS et al., 2019). O principal interesse nas análises metabolômicas incide na desreplcação de matrizes complexas, elucidando moléculas de baixa massa molar (< 1000 Da), que são responsáveis por funções vitais e atuam na participação de reações metabólicas, auxiliando a compreensão das vias bioquímicas (ARON et al., 2020).

A desreplcação tem por objetivo detectar substâncias conhecidas e bioativas em extratos de origem vegetal ou animal e investigá-los profundamente. Na prática, a desreplcação é frequentemente realizada quando a matriz a ser analisada possui alta complexidade química (GAUDÊNCIO et al., 2015). O princípio da técnica se baseia na separação dos constituintes moleculares usando cromatografia (CLAE/CG) e analisando suas assinaturas espectrais obtidas a partir de dados da espectrometria de massa (EM ou MS)¹, ou da espectroscopia de UV² e em seguida, localizando os compostos com propriedades idênticas (fórmula molecular ou núcleo cromóforo) nas bases de dados de produtos naturais (KIND et al., 2017) ou em ferramentas da quimio-informática de código aberto como, por exemplo, o *Global Natural Products Social Molecular Networking* – GNPS utilizando a Rede de Interações Moleculares - (*Molecular Networking*) (ZANI et al., 2017; HENKE et al., 2016).

A rede de interação molecular (*Molecular Networking*) é uma técnica quimio-informática inserida na metabolômica. A técnica tem como fundamento a realização

¹ MS: Mass Spectrometry

² Ultravioleta

de anotações e desreplicação de derivados químicos estruturalmente relacionados em uma rede molecular. A rede molecular é desenvolvida a partir das correlações baseadas nos dados de espectro de massas (EM/EM) dos metabólitos de uma matriz correlacionando-os uma biblioteca espectral (GNPS). O princípio é baseado na teoria de que metabólitos de estruturas químicas semelhantes apresentam padrões de fragmentação semelhantes sob condições de ionização idênticas. O GNPS é uma plataforma de espectros de massas (EM/EM) gratuita *online*. Dentre suas funções esse banco de dados confere ao usuário o armazenamento e análise de espectro de massas de alta e baixa resolução. A plataforma GNPS permite que seus usuários realizem depósito de dados de espectros brutos para o público, inserção de padrões de referência, anotações contínuas dos dados da biblioteca espectral, agrupamento e aparelhamento de conjuntos de dados através da elaboração de redes moleculares (*Molecular Networking*) (AMARAL, 2018). A rede molecular é complementar à abordagem de desreplicação realizadas por métodos cromatográficos. A rede elaborada é constituída por metabólitos analisados e composta por grupos de nodos, que corresponde aos compostos interconectados de maior similaridade, anotando substâncias de forma otimizada e eficiente para matrizes de alta complexidade e com grandes volumes de dados (OLIVEIRA *et al.*, 2017; LIN; VIANT; TJEERDEMA, 2006).

Com o advento da biotecnologia e os estudos das interações dos mais diversos nichos taxonômicos de espécies vegetais e animais, a ferramenta *Molecular Networking* inserido na grande esfera dos estudos metabolômicos, expande a possibilidade de elucidar o viés químico das interações intraespecífica e interespecíes com uma abordagem mais assertiva e ágil, visando uma correlação no que diz respeito às características intrínsecas e globais de diversas espécies, possibilitando a elucidação de novas moléculas bioativas, a partir de matrizes inovadoras (LIN *et al.*, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a composição química, potencial antioxidante e atividade microbiológica de extratos de resíduos agroindustriais do fruto cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum).

3.2. Objetivos Específicos

- I. Quantificar os compostos fenólicos, flavonoides e taninos condensados das cascas, sementes e polpa de *T. grandiflorum*;
- II. Avaliar o potencial antioxidante dos extratos pelos métodos de DPPH e ABTS;
- III. Caracterizar extratos etanólicos e hidroalcólicos por CLAE-PDA e CLAE-ESI-EM/EM;
- IV. Utilizar a abordagem de desreplicação dos extratos usando redes de interações moleculares (*Molecular Networking*) para as anotações de compostos químicos dos extratos;
- V. Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos frente aos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* (ATCC 19196), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida glabrata* (ATCC 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta da matéria-prima

O resíduo agroindustrial (epicarpo) e o fruto inteiro de cupuaçu (*T. grandiflorum*) foram adquiridos da Cooperativa dos Produtores Rurais de Santarém - Cooprusan³ localizada no município de Santarém no estado Pará, Brasil. Os frutos foram processados e analisados nos laboratórios de Farmacognosia⁴ e Pesquisa & Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos⁴ da Universidade Federal do Oeste do Pará; e no Laboratório de Química da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (Unesp)⁵.

4.2. Caracterização física dos frutos

A fim de caracterizar seus constituintes e avaliar o rendimento, 10 frutos inteiros foram fracionados manualmente em casca (epicarpo), fibra central, semente (endocarpo) e polpa, e pesados com auxílio de balança semi-analítica (Even BL-3200AS-BI) e os resultados expressos em porcentagem (%).

4.3. Preparo e obtenção dos extratos

O preparo dos extratos foi realizado no Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.

Para fins de comparação das diferentes partes do fruto (casca, sementes e polpa) o extrato foi elaborado com material triturado em moinho de facas e realizadas extrações hidroalcólicas com álcool etílico destilado e água destilada 1:1 v/v na proporção de 1 de amostra *in natura* para 100 de solvente (1:100 m/v), utilizando banho Ultrassom (SolidSteel®, modelo SSBu 10 L, 160 watts, SP/Brasil) à 40 KHz de frequência e temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida os extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativo Whatman n° 1 com auxílio de bomba a vácuo, transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, sendo o volume completado com água destilada e armazenado em frascos de vidro âmbar até a realização das análises (fitoquímica e antioxidante).

³ Endereço: Travessa Dália, S/Nº - Aeroporto velho, CEP: 68.030.600, Santarém – PA, Brasil.

⁴ Local: Santarém – Pará, Brasil.

⁵ Local: Araraquara – São Paulo, Brasil.

Para realizar as análises químicas, foi utilizado os resíduos agroindustriais (epicarpo) transformados em torta, por meio da secagem em estufa a 40 °C com circulação forçada de ar durante 72 horas até peso constante, trituração em moinho de facas e homogeneização em peneira de 28 mesh (0,6 mm) para obtenção de um pó homogêneo de fina granulação. O material obtido foi acondicionado em embalagens de polietileno, identificado e armazenado em freezer a -40 °C até o momento das extrações.

Uma alíquota de 45 g da torta do epicarpo foi submetida ao método de extração via Soxhlet, que consiste na recirculação de 500 mL de etanol 96 GL por um período de 8 horas. Os extratos foram concentrados em um rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida (Heidolph®, Laborota 4001 – efficient) equipado com bomba a vácuo (Heidolph®, Rotovac valve control), seco em liofilizador Liotop L101 e armazenados em freezer a -40 °C até o momento das análises. As extrações foram realizadas em triplicata para cálculo de rendimento.

Para fins de comparação, foi realizada extração assistida por ultrassom, utilizando uma alíquota de 45 g da torta do epicarpo para 450 mL de solução hidroalcolica contendo álcool etílico destilado e água destilada na proporção 1:1 (v/v), em erlenmeyer. A mistura foi imersa em banho Ultrassom (SolidSteel®, modelo SSBu 10 L, 160 watts, SP/Brasil) operando à 40 KHz de frequência e 37 °C de temperatura por 60 minutos. O extrato foi subseqüentemente filtrado em papel de filtro qualitativo Whatman n° 1 com auxílio de bomba a vácuo, rotaevaporado sob pressão reduzida equipado com bomba a vácuo para retirar o etanol, liofilizado e armazenado em freezer a -40 °C em frascos de vidro âmbar. O procedimento foi realizado em triplicata para a obtenção do rendimento.

O rendimento dos extratos foi calculado a partir do peso inicial da matéria-prima e expresso em porcentagem em base seca (% b.s).

4.4. Caracterização fitoquímica

Parte dos ensaios fitoquímicos foi realizado com os extratos obtidos a partir das amostras *in natura* no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.

4.4.1. Determinação de fenólicos totais

A quantificação dos fenólicos totais foi realizada por meio do método de Folin-Ciocalteu de acordo com Singleton e Rossi (1965). O ensaio consistiu na adição de 0,5 mL da amostra, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 5 % e 2,0 mL de carbonato de sódio 4 % em tubo de ensaio, e mantido por 2 horas à temperatura ambiente na ausência de luz. Após este período, foi realizada a leitura à 740 nm em espectrofotômetro. O resultado foi calculado a partir de uma curva padrão de ácido gálico e expresso em micrograma de equivalente em ácido gálico (EAG) por miligrama de amostra.

4.4.2. Determinação de flavonoides totais

A determinação dos flavonoides totais foi realizada de acordo com Zhishen (1999) com modificações. O ensaio constituiu da adição de 0,6 mL de amostra e 2,4 mL de solução cloreto de alumínio 0,1% em tubo de ensaio e mantido por 30 min a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após este período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm. O resultado foi calculado a partir de uma curva padrão de rutina e expresso em micrograma de equivalente de rutina (ER) por miligrama de amostra.

4.4.3. Determinação de taninos condensados

Os taninos condensados foram determinados de acordo com Salgado (2011). Para a reação foram adicionados em um tubo de ensaio 0,25 mL de amostra, 1,5 mL de vanilina 4 % em metanol, e 0,75 mL de ácido clorídrico concentrado. A mistura reacional permaneceu em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após este período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm. O resultado foi calculado a partir de uma curva padrão de catequina e expresso em micrograma de equivalente de catequina por miligrama de amostra.

4.5. Caracterização cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP/Araraquara.

4.5.1. Preparo das amostras

Para minimizar a interferência de compostos poliméricos de ordem muito alta e substâncias indesejáveis foi realizado o preparo da amostra utilizando um cartucho de extração em fase sólida (SPE) e álcool etílico grau HPLC (Merck). Uma alíquota de 2 mg do extrato liofilizado foi submetida à SPE usando um cartucho RP18 (33 μm , Chromabond®) eluido com etanol:água destilada 1:1 (v/v) (3 mL). O eluato foi filtrado através da membrana de PTFE (0,22 μm , Millipore®) e analisado diretamente por cromatografia e espectrometria de massa.

4.5.2. Caracterização química por CLAE-PDA

A caracterização dos extratos etanólicos e hidroalcóolicos por CLAE-PDA⁴ foram realizadas em um cromatógrafo líquido preparativo de gradiente binário (Jasco®) acoplado a um detector de arranjo de foto-diodos com faixa de varredura no ultravioleta de 200-450 nm e intervalo mínimo de 1 nm (Jasco®). A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi realizada com o software ChromNAV (Cromatec®) utilizando coluna Kinetex (Phenomenex®, Torrance, CA, USA) de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 μm). O volume de injeção foi de 10 μL e a vazão de 0,7 mL.min⁻¹. Para a eluição das amostras foi utilizado um gradiente linear com fase móvel composta por água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®) acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (solvente A) e EtOH grau HPLC (Merck) (solvente B) de 5 a 100% (B) em 45 min.

4.5.3. Caracterização química por CLAE-ESI-EM/EM

As separações em CLAE foram conduzidas em uma coluna Kinetex (Phenomenex®, Torrance, CA, USA) de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 μm). O volume de injeção foi de 1 μL e a vazão de 0,7 mL.min⁻¹. Para a eluição das amostras foi utilizado um gradiente linear com fase móvel composta por água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®) acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e EtOH grau HPLC (Merck) (solvente B), de 5 a 100% (B) em 45 min. Para as análises de Espectrometria de Massas (EM) de baixa resolução foi utilizado um espectrômetro da Bruker, modelo Amazon SL, equipado com electrospray (ESI) como fonte de ionização e analisador íon Trap.

⁴ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Foto-diodos.

Os experimentos de fragmentação no espectrômetro de massas foram realizados por dissociação induzida por colisão (CID) sendo executados no modo auto MSn (fragmentação inteligente) usando o modo UltraScan para aquisição de EM/EM e um aumento de energia de colisão com a máxima amplitude de fragmentação definida para 60%. A faixa de aquisição foi de m/z 100-1800. Os espectros de massas foram adquiridos no modo negativo, processados no software DataAnalysis (versão 4.3, Bruker®).

Os cromatogramas obtidos de todos os extratos foram caracterizados por comparação com o banco de dados KNApSAcK Core System⁵ e literatura especializada.

4.6. Redes de interações moleculares (*Molecular Networking*)

Os cromatogramas dos extratos por CLAE-ESI-EM/EM foram analisados utilizando a abordagem de redes de interações moleculares (*molecular networking*) através da plataforma GNPS⁶ (Global Natural Products Social Molecular Networking). Os espectros de massa experimentais adquiridos no item 4.5.3 foram convertidos no formato mzXML no software MSConvert (ProteoWizard) e os arquivos mzXML carregados na plataforma GNPS usando um servidor FTP (FileZilla, versão 3.10.1.1) (MINGXUN *et al.*, 2016). Os espectros de massas de segunda ordem foram agrupados com o MS-Cluster para criar os espectros de cosseno. Os espectros foram pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS com um valor de cosseno (Tabela 1), de modo a garantir a correspondência entre os espectros da rede e os da biblioteca utilizada. A visualização e o processamento dos dados da rede molecular foram realizados no software Cytoscape⁷.

⁵ http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/top.html

⁶ <http://gnps.ucsd.edu>

⁷ <http://www.cytoscape.org/>

Tabela 1: Parâmetros utilizados para geração da rede molecular (Workflow) na plataforma espectral do GNPS.

PARÂMETROS	VALORES
<i>Min Pairs Cosseno</i>	0,7
<i>Parent Mass Tolerance</i>	2,0
<i>Ion Tolerance</i>	0,9
<i>Min Matched Peaks</i>	6,0
<i>Cluster_Min_Size</i>	2,0
<i>Maximum Component Size</i>	100,0
<i>Score Threshold</i>	0,7
<i>Minimum Cluster Size</i>	6,0
<i>Maximum Connected Component Size</i>	100,0

Fonte: Autor (2020).

4.7. Avaliação da atividade biológica

4.7.1. Atividade antioxidante

Os ensaios antioxidantes foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.

4.7.1.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH

A análise pelo método de sequestro do radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) foi realizada de acordo com Brand-Williams et al (1995), com algumas modificações. A mistura reacional foi composta pela adição de 2,4 ml de solução etanólica de DPPH (29 µg/ml) e 0,6 ml de extrato. A mistura reacional foi homogeneizada e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 516 nm até a absorbância se manter constante. Os resultados foram calculados a partir de uma curva analítica de Trolox (\pm)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) e expresso em µmol ET.mg⁻¹ de amostra seca.

4.7.1.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS

A capacidade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi determinada conforme metodologia descrita por Brand-Williams et al (1995) e modificada por Rufino et al (2007). A solução estoque do radical ABTS foi composta por 7 mM de ABTS com

140 mM de persulfato de potássio diluído em água e a mistura foi mantida na ausência de luz e em temperatura ambiente por 16 h. A solução estoque foi diluída em álcool etílico até se obter uma absorvância de $0,80 \pm 0,05$ a 734 nm. Para o ensaio, a reação foi composta por 15 μL de amostra e 1500 μL da solução de ABTS e a leitura realizada em espectrofotômetro a 734 nm após 6 min de reação. Os resultados foram calculados a partir de uma curva analítica de Trolox ((\pm)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) e expresso em $\mu\text{mol ET.mg}^{-1}$ de amostra seca.

4.7.2. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Faculdade de Farmácia – UNESP/Araraquara.

4.7.2.1. Avaliação da atividade antibacteriana

4.7.2.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

Os preparos dos cultivos das bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella* sp. (ATCC 19196) foram realizados em caldo Miller Hilton (MH), e incubados a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, foi realizada a padronização das cepas bacterianas. Cada um dos cultivos foi transferido para solução tampão fosfato pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm até obtenção de absorvância de 0,10 a 0,15. Posteriormente, a suspensão foi diluída na proporção 1:10 em caldo MH para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, mantendo em banho de gelo até ser utilizada nos ensaios.

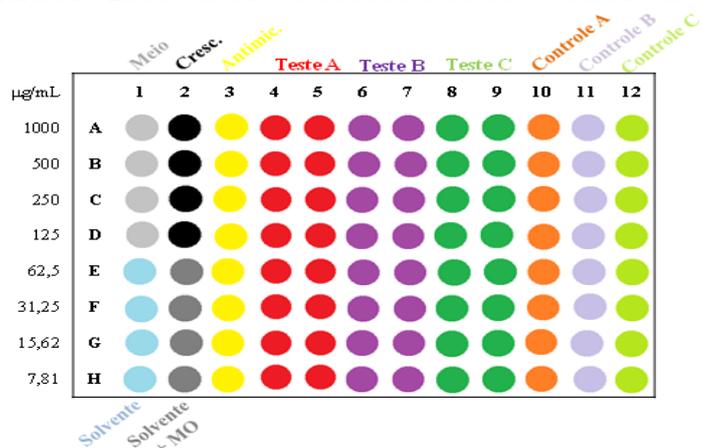
4.7.2.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima

A avaliação da atividade antibacteriana e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos foram realizados segundo a técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M7-A6 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) realizados em triplicata.

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizadas placas com 96 poços nas quais foram realizadas diluições seriadas de razão 1:1 em caldo

MH. Ao final do processo, as concentrações dos extratos variaram de 7,8 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ com os poços contendo 20 μL da suspensão bacteriana padronizada. Como controle positivo foi utilizada solução de ampicilina a 50 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e 5 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*. Também foi realizado o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, controles de turbidez dos extratos e controle negativo (DMSO 20%), ilustrados na Figura 1. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas e para melhor visualização do crescimento bacteriano e inibição pelo extrato, foi adicionado 30 μL resazurina (100 $\mu\text{g/mL}$). Considerou-se a CIM, a menor concentração do extrato que não foi observado crescimento microbiano.

Figura 01. Esquema da microplaca para a determinação da CIM.



Fonte: Adaptado de DUARTE (2005).

4.7.2.1.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CBM antes da adição de resazurina (FIGURA 2) uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo ágar MH, e incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período foram observados os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a CBM definida como a menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura.

4.7.2.2. Avaliação da atividade antifúngica

4.7.2.2.1. Padronização da suspensão fúngica

As suspensões das sete espécies de leveduras *C. albicans* foram padronizadas a partir de uma cultura incubada a 37 °C por 48 h, em caldo sabouraud dextrose (SD), adicionando tampão fosfato (PBS) pH 7,2 estéril até turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland (5×10^6 UFC/mL). Em seguida foi realizado a leitura em espectrofotômetro a 530 nm para confirmação da concentração das leveduras e a suspensão foi diluída na proporção 1:100 em PBS, seguida de outra diluição 1:20 em meio RPMI (Meio Roswell Park Memorial Institute) para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL e ser utilizada nos ensaios (CLSI, 2008).

4.7.2.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima

As determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos foram realizadas em triplicata pela técnica de diluição em microplacas em conformidade com a norma M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e Duarte et al (2005), com modificações.

Os ensaios para determinar a CIM foram realizados em placas de 96 poços e os orifícios foram preenchidos com 100 µL de RPMI 1640 pH 7,0 tamponado com MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Em seguida foram acrescentados 100 µL do extrato diluído em DMSO 20 % e realizada a diluição seriada na razão de 1:1 de 1000 a 7,8 µg/mL. Posteriormente, foram adicionados 100 µL da suspensão de levedura padronizada em cada orifício. Como controle positivo foram utilizados a anfotericina B (16 µg/mL) e o fluconazol (128 µg/mL). Também foram realizados o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, controle dos extratos e controle negativo (DMSO 20 %). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 h e observada primeiramente a turbidez e posteriormente a coloração pela adição de 20 µL de TTC a 2 % (cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio) (TTC) (0,02 g/mL), após 2 horas de incubação a 37 °C. Considerou-se a CIM, a menor concentração do extrato que não foi observado crescimento microbiano.

4.7.2.2.3. Determinação da concentração fungicida mínima

Para a determinação da CFM, antes da adição do indicador TTC nas microplacas, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo agar SD, e incubadas durante 48 horas em estufa a 37 °C. Após esse período foi observado os pontos onde ocorrerem crescimento microbiano, onde a CFM foi definida como a menor concentração testada na qual não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura.

4.8. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram submetidos à ANOVA e ao Teste t de Student ou teste de Tukey, segundo as necessidades de cada análise, para determinar as diferenças significativas das médias ao nível de probabilidade de 5 % ($p < 0.05$), utilizando o *software Minitab16*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos frutos e rendimento dos extratos

Os frutos utilizados para as análises químicas e biológicas apresentam peso médio de $1146,2 \pm 103,9$ (g), como pode ser observado na Tabela 2, a maior proporção do fruto com 37,3 % corresponde ao epicarpo (casca), seguido de 36,4 % de mesocarpo (polpa), 22,6 % de endocarpo (sementes) e 3,7 % de fibra. Os valores de umidade foram diferentes estatisticamente para todos os componentes do fruto, onde a polpa apresentou maior valor e a casca o menor valor. Com isso, a casca apresenta um alto índice de matéria seca e junto com a fibra central são os principais constituintes do cupuaçu responsáveis pelo resíduo gerado nas agroindústrias. Assim, esse resíduo pode se tornar matéria-prima quando empregado na extração de compostos bioativos, como os compostos fenólicos.

Tabela 2. Valores referentes a caracterização física dos frutos de cupuaçu (*T. grandiflorum*).

Amostra	Proporção (%)	Umidade (%) *	MS (%) **
Casca	37,3 ± 5,5	55,5 ± 1,8 ^c	44,5 ± 1,8
Semente	22,6 ± 3,1	67,3 ± 1,7 ^d	32,7 ± 1,7
Polpa	36,4 ± 5,5	87,8 ± 0,8 ^a	12,2 ± 0,8
Fibra	3,7 ± 1,9	83,9 ± 1,5 ^b	16,1 ± 1,5

*Letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste t de Student ($p < 0,05$); **MS – Matéria seca. **Fonte:** Autor (2020).

5.2. Caracterização fitoquímica

Os resultados das análises dos compostos fenólicos, flavonoides e taninos condensados das diferentes partes dos frutos de cupuaçu *in natura*, bem como os resultados da capacidade antioxidante, estão disposto na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização fitoquímica e capacidade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de cupuaçu.

Amostra	Fenólicos (EAG/mg)	Flavonoides (ER/mg)	Taninos condensados (EC/mg)	DPPH** (ET/mg)	ABTS** (ET/mg)
Casca	3,02 ± 0,00 ^a	0,42 ± 0,01 ^b	1,96 ± 0,00 ^b	22,85 ± 0,50 ^a	960,23 ± 49,83 ^a
Semente	3,04 ± 0,07 ^a	0,87 ± 0,03 ^a	4,22 ± 0,01 ^a	12,19 ± 0,14 ^b	700,28 ± 23,41 ^b
Polpa	0,70 ± 0,00 ^b	0,18 ± 0,01 ^c	n.i.	n.i.	n.i.

*n.i. – não identificado; Letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). **Letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste t de Student ($p < 0,05$). **Fonte:** Autore (2020).

O teor de fenólicos totais para os extratos hidroalcoólicos da casca, sementes e polpa em base úmida variou de 0,70 a 3,04 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Tabela 3). Os maiores valores foram encontrados nas sementes com 3,04 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mg}^{-1}$ e nas cascas com 3,02 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mg}^{-1}$ não havendo diferença estatística entre eles, e o menor valor foi encontrado na polpa com 0,70 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mg}^{-1}$. É reportado nos estudos de Lima (2013) o valor médio de fenólicos totais das cascas de cupuaçu com valores de 7,63 ± 0,16 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mg}^{-1}$, e 9,8 ± 0,75 $\mu\text{g EAG}\cdot\text{mg}^{-1}$ para as sementes, corroborando os resultados encontrados nesse estudo onde, as sementes apresentam valores

significativamente maiores de fenólicos em comparação com as cascas. Percentuais de fenólicos totais da polpa são reportados nos estudos de Santos *et al.*, (2010) com variação de 10,85 a 74,90 $\mu\text{g EAG.mg}^{-1}$, resultados superiores ao encontrados na polpa desse estudo. É reportado nos estudos de Sousa *et al.*, (2011) valores de 4,22 $\mu\text{g EAG.mg}^{-1}$ para as cascas de cupuaçu, valores próximos aos encontrados.

Os valores de flavonoides totais variaram de 0,18 a 0,87 $\mu\text{g ER.mg}^{-1}$, onde a semente apresentou maior valor (0,87 $\mu\text{g ER.mg}^{-1}$), seguida da casca (0,42 $\mu\text{g ER.mg}^{-1}$) e a polpa (0,18 $\mu\text{g ER.mg}^{-1}$). Em estudos Lima (2013) relata valores médios de flavonoides totais de 2,21 $\mu\text{g ER.mg}^{-1}$ para as cascas e 0,7 $\mu\text{g ER.mg}^{-1}$ para as sementes resultados inferiores aos encontrados nas cascas e superior aos encontrados nas sementes. É relatado nos estudos de Sousa *et al.*, (2011) valores de flavonoides para as cascas de cupuaçu de 1,08 $\mu\text{g ER.mg}^{-1}$, inferiores aos encontrados nas cascas, porém semelhantes aos encontrados nas sementes desse estudo.

Os valores de taninos nos extratos variaram de 1,96 a 4,22 $\mu\text{g EC.mg}^{-1}$. Os maiores valores foram encontrados nas sementes (4,22 $\mu\text{g EC.mg}^{-1}$) em comparação com a casca (1,96 $\mu\text{g EC.mg}^{-1}$). Em estudos, Salgado *et al.* (2011) descreveu valores de taninos das cascas de cupuaçu correspondentes a $1,08 \pm 0,02 \text{ mg catequina.100 g}^{-1}$, inferiores aos encontrados nos extratos desse estudo. Dessa forma, apesar de não haver diferença significativa entre os valores de fenólicos totais na casca e na semente, a semente apresentou maior teor de flavonoides e taninos condensados em comparação com a casca. A polpa apresentou menores valores de fenólicos e flavonoides em comparação com as cascas e sementes, demonstrando através dos resultados obtidos que tanto as sementes quanto as cascas de cupuaçu possuem compostos antioxidantes.

5.3. Capacidade antioxidante

Os extratos das diferentes partes do cupuaçu apresentaram atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS, com exceção da polpa. Os maiores resultados foram encontrados no teste de captura do radical ABTS, enquanto os melhores resultados foram obtidos pela casca nos dois testes, apresentando diferença significativa entre os valores pelo teste t de Student ($p < 0,05$) (Tabela 3). Esses resultados estão de acordo com estudos realizados por Kuskoski *et al.*, (2005) e Lima (2013) com o cupuaçu, onde observaram potencial antioxidante tanto

para casca como para semente, sendo os melhores valores obtidos pela casca pelo método DPPH. De acordo com os resultados expostos por Yang (2003), observou-se uma correlação entre os polifenóis encontrados em *T. grandiflorum*, associados a flavonoides que apresentam atividade antioxidante, com isso pode-se sugerir que a atividade observada nas cascas e sementes desses resíduos apresenta grande potencial como fonte promissora de compostos antioxidantes.

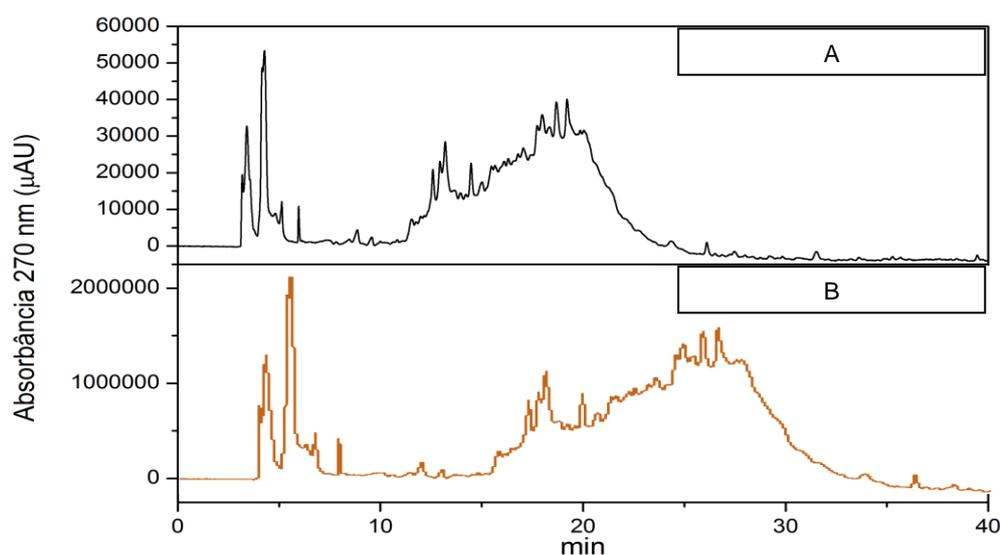
5.4. Análise química e rendimento dos extratos

5.4.1. CLAE-PDA

O rendimento médio dos extratos etanólicos do epicarpo *via soxhlet* e hidroalcoólico assistido por ultrassom, utilizados nas análises químicas e microbiológica, foi de 63,77 % e 52,86 %, respectivamente.

Sob a condição de eluição descrita na sessão 4.5.2, as principais bandas eluídas durante as análises por CLAE-PDA dos extratos etanólico (EtOH) e hidroalcoólico (EtOH:H₂O) foram identificados pela comparação dos seus espectros na região do UV ($\lambda=270$ nm) e pela comparação dos seus tempos de retenção com o de padrões de substâncias da mesma espécie vegetal em literatura especializada (Figura 2).

Figura 2. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-PDA do extrato etanólicos (A) e hidroalcoólicos (B) de *T. grandiflorum* *via soxhlet* e assistido por ultrassom, respectivamente.



Fonte: Autor (2020)

Os perfis cromatográficos obtidos (Figura 2) demonstraram a alta complexidade dos analitos. Foi detectado no comprimento de onda de 270 nm uma banda muito alargada nos cromatogramas, de eluição característica de taninos condensados. Estudos de Paulista (2007) obteve perfil com as mesmas características sugestivas de taninos condensados, atribuindo dessa forma semelhanças nas bandas de absorção de UV dos extratos de cupuaçu com a literatura. Os taninos condensados caracterizados por CLAE-PDA corroboram os testes fitoquímicos realizados na sessão 4.4, sugerindo uma concentração expressiva dessa classe de polifenóis de alto peso molecular nos resíduos agroindustriais de *T. grandiflorum*. A ausência de compostos fenólicos de baixo peso molecular nos comprimentos de onda analisados, pode ter ocorrido pelo fato dessa classe de compostos apresentarem-se em pequenas concentrações nos extratos desses resíduos, sendo necessário empregar uma metodologia analítica mais sensível e seletiva para a classe de compostos dos fenólicos. Estudos de Lima (2013) apresentaram as mesmas limitações de análises desse método para os extratos de *T. grandiflorum*, demonstrando a alta complexidade dessa matriz.

5.4.2. CLAE-ESI-EM/EM

Foram realizadas análises cromatográficas e espectrométricas com os extratos de *T. grandiflorum* a fim de comparar os resultados experimentais obtidos do perfil químico com as bases dados da literatura especializada. A fonte de ionização das amostras foi por *eletrospray* (ESI) no modo de ionização negativo, a escolha do modo se deu pela ocorrência da perda de um próton, o que confere maior estabilidade dos metabólitos para análise.

As análises espectrais dos íons observados nos espectros teve como foco os compostos fenólicos e flavonoides, classes já descritas em literatura para o gênero *Theobroma* que possuem atividade biológica diversificada sendo de grande interesse das indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícia (FREITAS *et al.*, 2015; GABBAY ALVES *et al.*, 2019; LEW KAN *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2014). Os resultados dos íons mais intensos foram dispostos na Tabela 4 com suas respectivas razão massa carga (m/z), tempo de retenção, fragmentação Ms^2 e sugestões das substâncias correspondentes a cada íon detectado, bem como, a referência bibliográfica para cada composto.

Tabela 4. Registro dos principais íons detectados no extrato de *T. grandiflorum* e sugestões de substâncias de acordo com a literatura.

Possíveis Substâncias	Espécie			<i>T. grandiflorum</i>		Referência	
	*m/z [M-H] ⁻	**TR (min)	Fragmentos Ms ²	Ext. EtOH	Ext. EtOH:H ₂ O		
1	Ácido quínico	191	3,64	191, 173	-	Presente	Fraige <i>et al.</i> , (2017)
2	Catequina	289	13,26	245, 205, 179	Presente	Presente	Wang <i>et al.</i> (2017)
3	Ácido vinílico glucosídeo	329	6,51	167, 123	Presente	Presente	Li <i>et al.</i> , (2016)
4	Ácido caféico 3-glucosídeo	341	4,29	281, 179, 113	-	Presente	Wang <i>et al.</i> , (2017)
5	Vitexina	431	4,23	341, 311, 283	Presente	Presente	Koolen <i>et al.</i> , (2013) / Wang <i>et al.</i> , (2017)
6	Quercetina-O-pentosídeo	433	9,75	301, 179, 151	Presente	Presente	Fraige <i>et al.</i> , (2017)
7	Luteolina-7-glucosídeo	447	19,52	284, 255, 227	Presente	Presente	Wang <i>et al.</i> , (2017)
8	Isoscutelareina 8-glucuronídeo	461	8,80	315, 225, 153	Presente	Presente	Yang <i>et al.</i> , (2003)
9	Isoquercetina	463	17,40	301	Presente	Presente	El Sayed <i>et al.</i> , (2016)
10	Diidroquercetina 6-C-hexosídeo	465	9,23	345, 303, 285	Presente	Presente	Roriz <i>et al.</i> , (2014)
11	Hipolaetina-8-O-glucuronídeo	477	18,04	301, 175	-	Presente	Pugliese <i>et al.</i> , 2013
12	Procianidina A	575	14,25	423, 327, 285, 245	Presente	Presente	D'Souza <i>et al.</i> , (2017)
13	Procianidina B	576	10,07	451, 413, 289, 229, 165	-	Presente	D'Souza <i>et al.</i> , (2017)
14	Dímero-proantocianidina	577	11,44	451, 425, 407, 289	Presente	Presente	Fraige <i>et al.</i> , (2017)
15	Rutina	609	17,38	300, 271, 255, 178	Presente	Presente	Wang <i>et al.</i> , (2017)
16	Dímero ácido caféico hexosídeo	683	4,29	342, 341	-	Presente	Spínola <i>et al.</i> , (2015)

*m/z [M-H]⁻: razão massa carga do espectro de massas no modo negativo; **TR (min): tempo de retenção (minutos); (-): não encontrado no modo de análise realizado. Ext.EtOH: Extrato etanólico; EtOH:H₂O: Extrato hidroalcolólico. **Fonte:** Autor (2020)

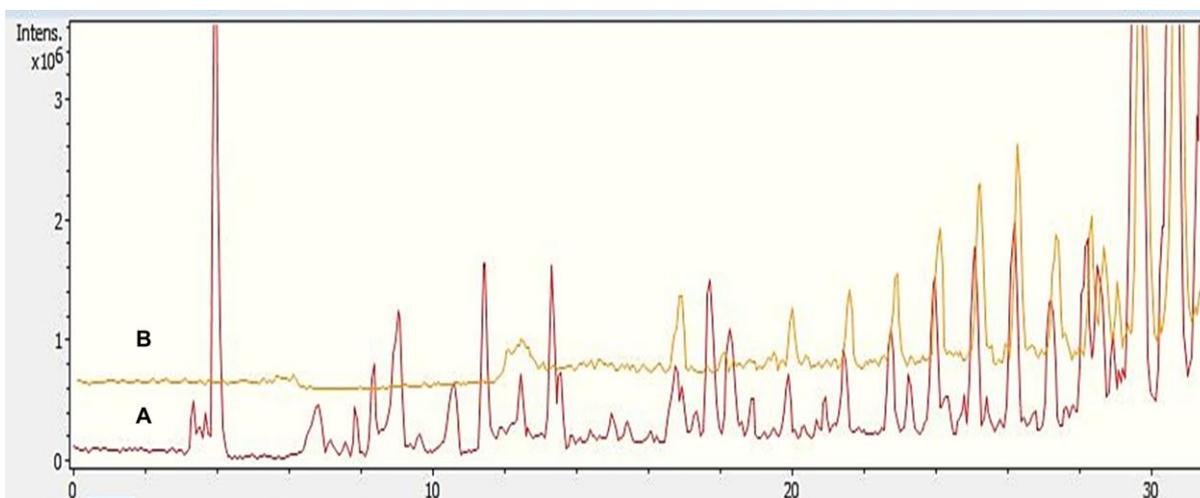
O cromatograma do extrato hidroalcolólico (Figura 3), apresentou a banda cromatográfica de maior intensidade em m/z 341 característico da substância ácido caféico 3-glucosídeo, identificada nos estudos de extratos vegetais do gênero *Theobroma* relatados por Wang *et al.* (2017). Outras sugestões de substâncias da classe dos ácidos fenólicos foram observados no extrato, a exemplo do ácido quínico (m/z 191) e o ácido vinílico glucosídeo (m/z 329), todos já relatados em estudos do gênero *Theobroma* (D'SOUZA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017).

Foi observado ainda no extrato hidroalcolólico, íons que sugerem a classe dos flavonoides, os mais intensos sendo m/z 289 característico de catequina; m/z 433

podendo estar relacionado com a massa da Quercetina-O-pentosídeo; m/z 463 sugestivo a massa da isoquercetina; m/z 465 característico da Diidroquercetina 6-C-hesoxídeo; m/z 477 cuja massa pode estar relacionada com o flavonoide Hipolaetina-8-O-glucuronídeo encontrado nas sementes de *T. grandiflorum* (Pugliese *et al.*, 2013); m/z 577 característico da massa do Dímero-proantocianidina; m/z 609 que pode estar relacionado com a massa da rutina, bioflavonoide com alto potencial antioxidante, já identificado nas sementes de *T. grandiflorum* e em outras espécies do gênero e o íon m/z 683 característico do dímero ácido caféico hexoside (EL SAYED *et al.*, 2016; SALIH *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2003).

Ainda sobre a classe dos flavonoides, o perfil espectrométrico observado na Figura 3 apresentou os seguintes íons de intensidades relevantes, m/z 447 característico da luteolina-7-glucosídeo, m/z 431 que pode ser relacionado com a massa da vitexina, uma flavona derivado da apigenina identificada nos estudos das cascas de *T. grandiflorum* por Koolen *et al.*, (2013); íon m/z 461 característico da isoscutelareina 8-O-β-D-glucuronídeo identificado em *T. grandiflorum* nos estudos de Yang *et al.* (2003); íons m/z 575 e m/z 576 que foram relacionados com a massa da procianidina A e procianidina B, respectivamente, compostos que constituem a família da proantocianidina, também conhecidos como taninos condensados, íons estes identificados por D'souza *et al.*, (2017) em sementes de cacau. Não sendo relatado em literatura até o momento para os resíduos das cascas de *T. grandiflorum*.

Figura 3. Cromatograma correspondente ao extrato hidroalcolólico da casca de *T. grandiflorum* por CLAE-ESI-EM/EM no modo de análise negativo. (A) Espectro experimental; (B) Branco da amostra.

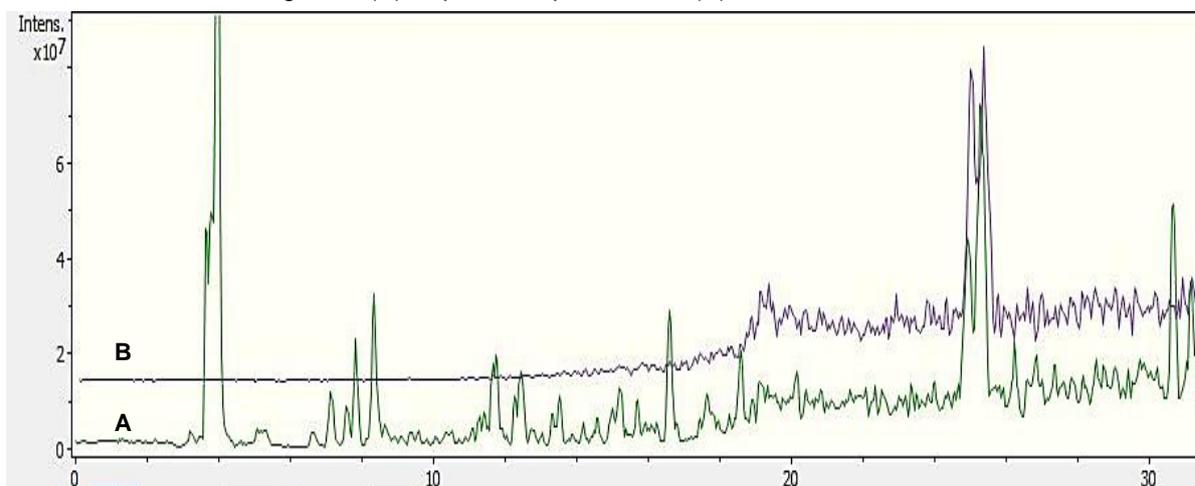


Fonte: Autor (2020)

Ao analisar o cromatograma do extrato etanólico (Figura 4), a banda cromatográfica de maior intensidade foi o m/z 289 característico da substância catequina, polifenol que possui ação antioxidante o qual já foi relatado para o gênero *Theobroma* e identificado nos estudos de Wang *et al.*, (2017).

Analisando os dados experimentais, foi observado que o íon m/z 329 é característico da massa do ácido vinílico glucosídeo como reportado por LI *et al.* (2016). O íon m/z 431 pode estar relacionado com a massa da vitexina, pertencente a classe dos flavonoides com atividade antioxidante (PUGLIESE *et al.*, 2013) e identificado por Koolen *et al.* (2013). O íon m/z 433 característico da massa da quercetina-O-pentosídeo, substancia que também possui atividade antioxidante (LIMA, 2013) e foi identificado no trabalho de Fraige *et al.* (2017). O íon m/z 447 pode estar relacionado com a massa da luteolina-7-glucosídeo e o íon m/z 461 característico da massa da isoscutelareina 8-O-β-D-glucuronídeo, como identificado no trabalho de Yang *et al.* (2003), este último, pertencente ao grupo dos compostos fenólicos do gênero *Theobroma* (MOITA, 2019). O íon m/z 463 pode estar relacionado com a massa da isoquercetina (EL SAYED *et al.*, 2016; ORFALI *et al.*, 2017). O íon m/z 465 possui massa característica da diidroquercetina 6-C-hesoxídeo, flavonoide com atividade antioxidante identificado nos estudos de Roriz *et al.* (2014). O íon m/z 575 pode ser relacionado com a massa da procianidina tipo A, classe de flavonoide identificado e relatado em estudos de D'SOUZA *et al.* (2017). O íon m/z 577 característico da massa do dímero-proantocianidina, um flavonoide com alta atividade antioxidante identificado e relatado nos estudos de Fraige *et al.* (2017). O íon m/z 609 pode estar relacionado com a massa da rutina, um bioflavonoide identificado nos estudos de Wang *et al.*, (2017). O íon m/z 683 sugestivo da massa do dímero-ácido caféico hexoside, identificado nos estudos de Spínola *et al.* (2015), um composto polifenólico com diversas atividades biológicas, dentre elas antioxidante e anticarginogênica (ANWAR, 2013; ARAÚJO, 2014).

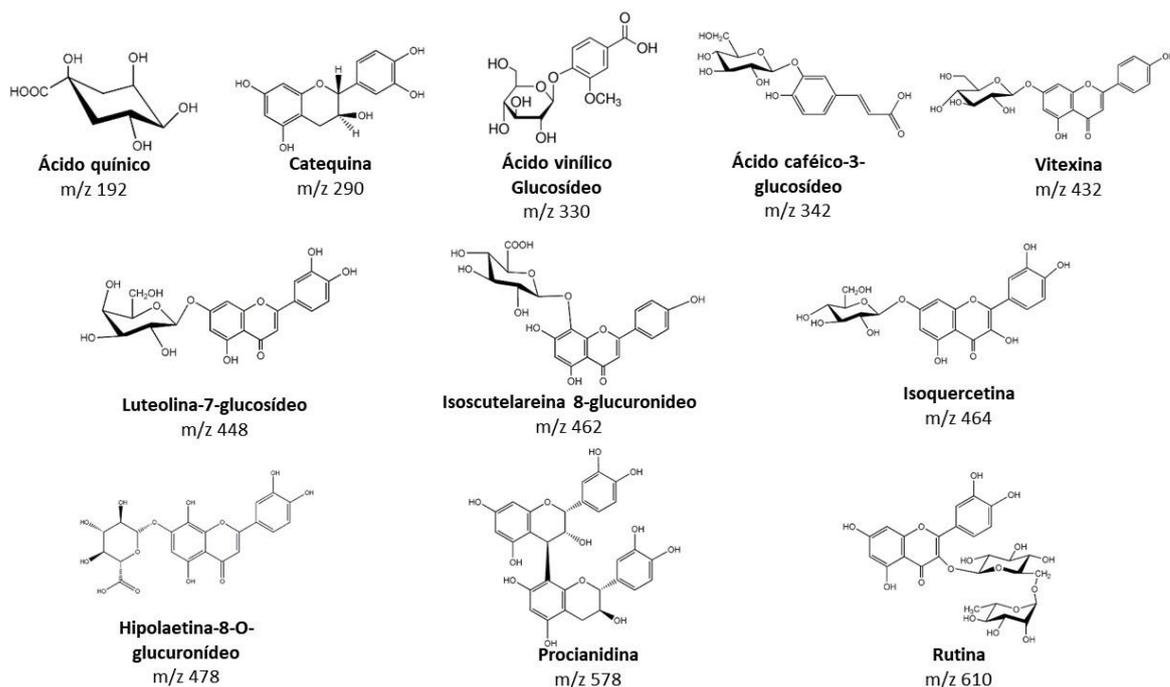
Figura 4. Cromatograma do extrato etanólico da casca de *T. grandiflorum* por CLAE-ESI-EM/EM no modo de análise negativo. (A) Espectro experimental; (B) Branco da amostra.



Fonte: Autor (2020).

Ao analisar as bandas mais intensas, foi possível observar tanto similaridade quanto diferenças entre o perfil químico de ambos os extratos, das 16 substâncias caracterizadas, todas foram observadas no extrato hidroalcolólico e 11 foram observadas no extrato etanólico, com exceção dos íons m/z 191, m/z 341, m/z 477, m/z 576, m/z 683 (Figura 4), evidenciando que o método de extração influencia diretamente na seletividade e eficácia da extração dos compostos, ao comparar os métodos de extração, o solvente etanol:água (1:1) v/v assistido por ultrassom demonstrou maior eficiência em relação ao solvente etanol grau 96 GL para os compostos fenólicos e flavonoides. Estudos de Lima (2013) corroboram essa hipótese, em seus resultados o extrato que obteve desempenho otimizado e proporcionou os melhores rendimentos de percentuais de substâncias fenólicas e flavonoides foi o etanol:água (7:3) v/v. As estruturas químicas dos principais compostos caracterizados nos extratos de *T. grandiflorum*, seguido de suas respectivas massas molares, podem ser observadas na Figura 5, bem como os espectros de massa dos íons de maior abundância relativa na Figura 6.

Figura 5. Estruturas moleculares dos principais íons caracterizadas nos extratos de *T. grandiflorum*.



Fonte: Autor (2020).

Figura 6. Espectros de massas por CLAE-ESI-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados nos extratos das cascas de *T. grandiflorum*. As letras correspondem aos respectivos íons moleculares: A (m/z 191), B (m/z 289), C (m/z 329), D (m/z 341), E (m/z 433), F (m/z 447), G (m/z 461), H (m/z 463), I (m/z 465), J (m/z 575), K (m/z 576), L (m/z 577), M (m/z 609), N (m/z 683).

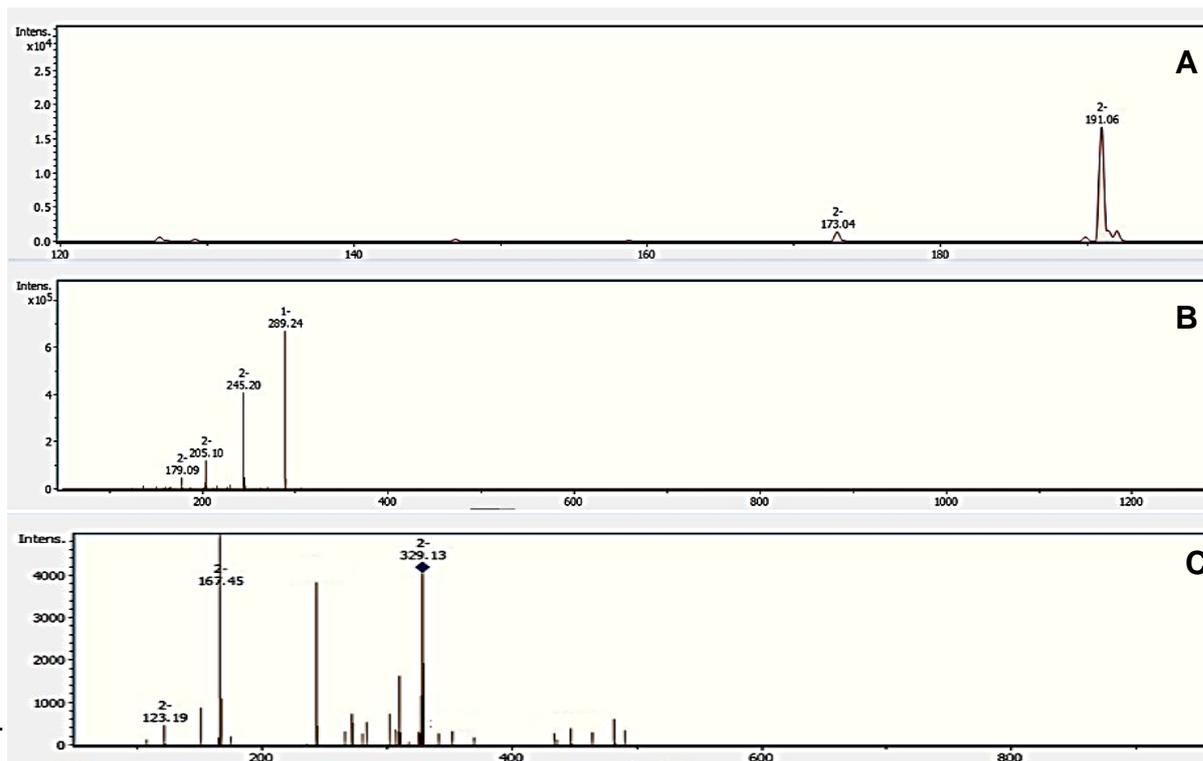


Figura 6 (Continuação). Espectros de massas por CLAE-ESI-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados nos extratos das cascas de *T. grandiflorum*. As letras correspondem aos respectivos íons moleculares: A (m/z 191), B (m/z 289), C (m/z 329), D (m/z 341), E (m/z 433), F (m/z 447), G (m/z 461), H (m/z 463), I (m/z 465), J (m/z 575), K (m/z 576), L (m/z 577), M (m/z 609), N (m/z 683).

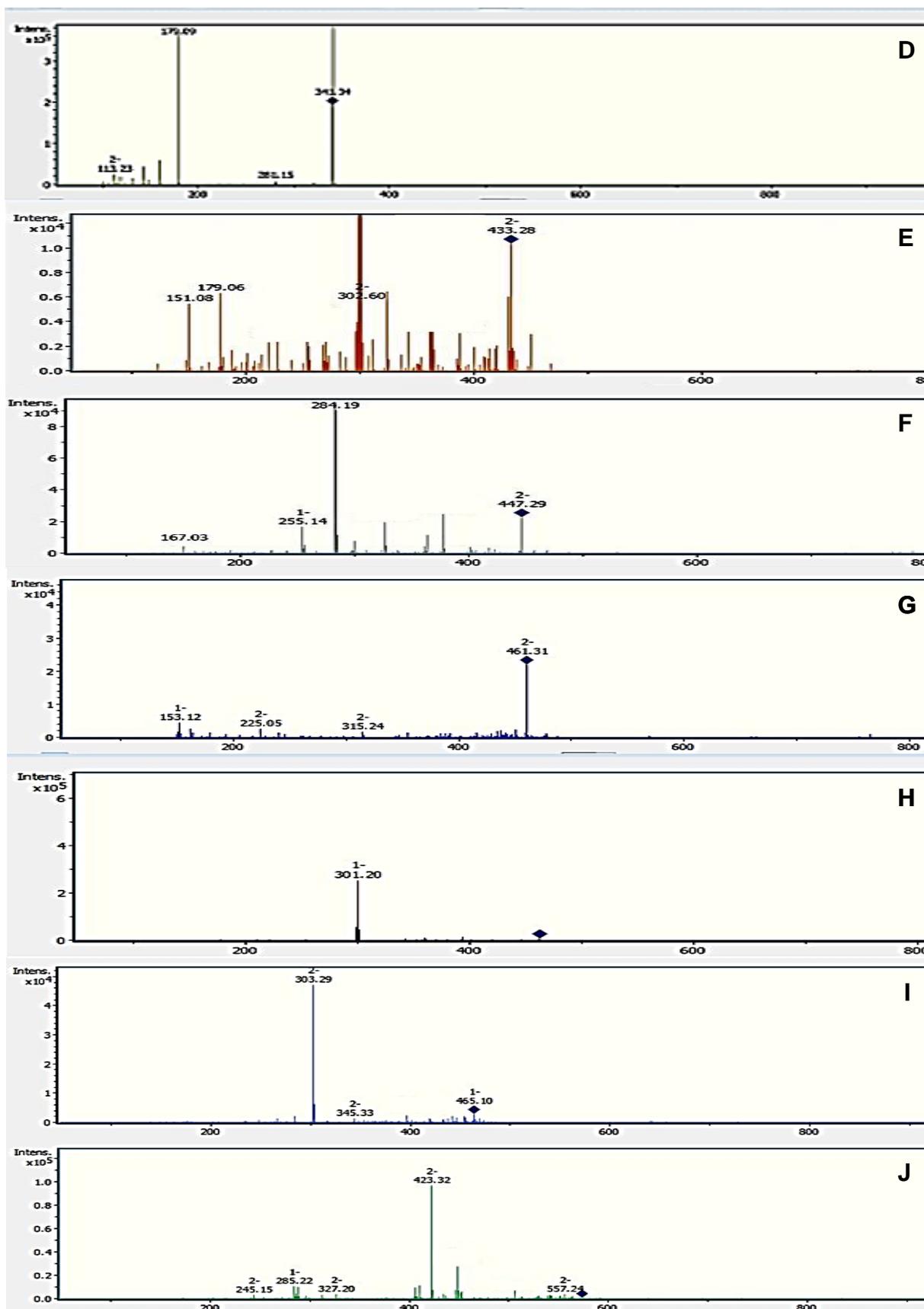
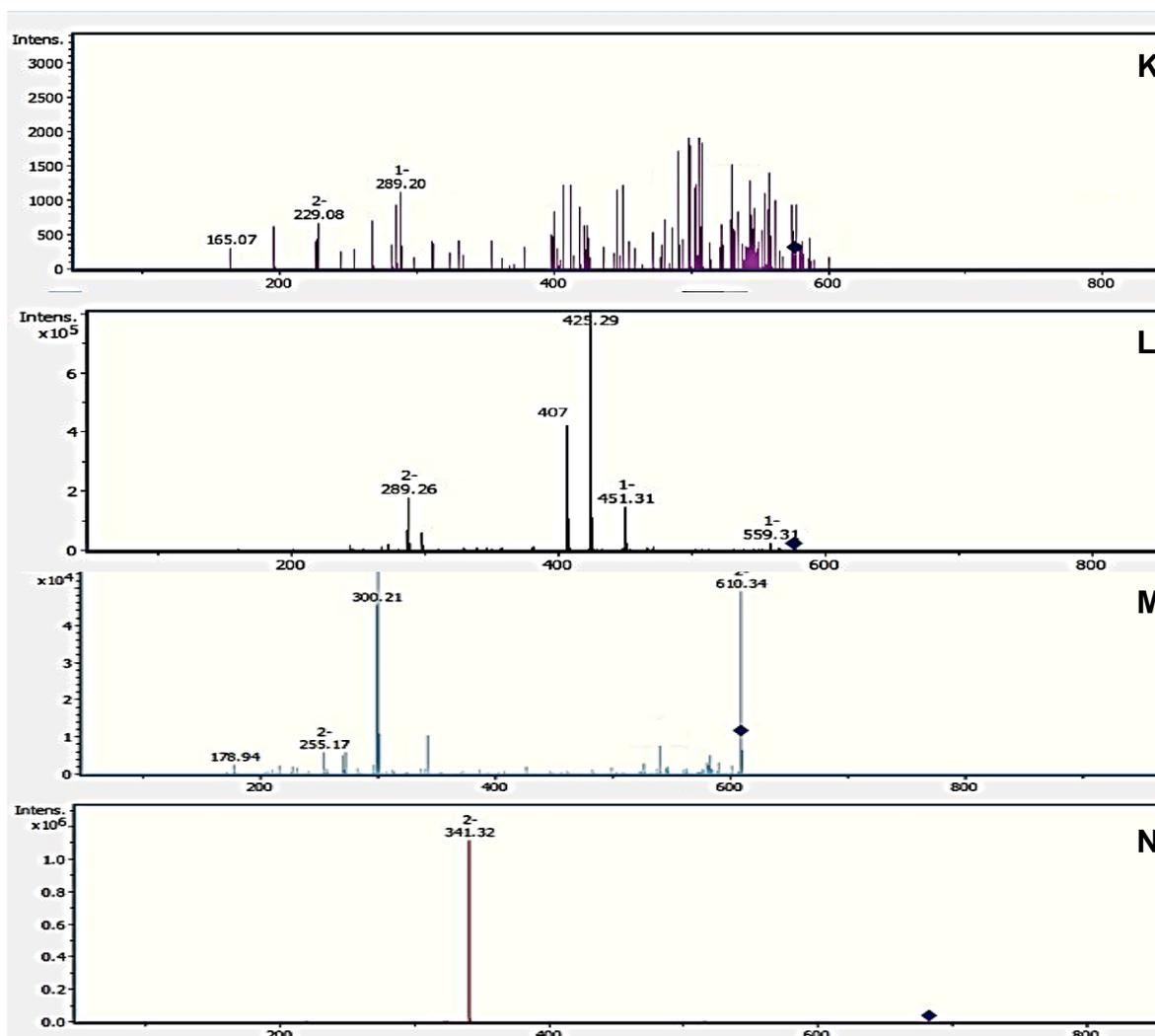


Figura 6 (Continuação). Espectros de massas por CLAE-ESI-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados nos extratos das cascas de *T. grandiflorum*. As letras correspondem aos respectivos íons moleculares: A (m/z 191), B (m/z 289), C (m/z 329), D (m/z 341), E (m/z 433), F (m/z 447), G (m/z 461), H (m/z 463), I (m/z 465), J (m/z 575), K (m/z 576), L (m/z 577), M (m/z 609), N (m/z 683).



Fonte: Autor (2020).

5.5. Rede molecular (*Molecular Networking*)

A rede molecular forneceu uma abordagem sensível e otimizada para a análise simultânea da composição química dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos dos resíduos de *T. grandiflorum*. A organização por similaridade de cosseno dos espectros de EM/EM possibilitou a caracterização de 23 metabólitos, em sua maioria ácidos fenólicos e flavonoides.

As redes moleculares desenvolvidas neste estudo foram criadas conforme descrito na sessão 4.6, utilizando espectros de massas no modo negativo correspondentes aos extratos etanólico e hidroalcoólico das cascas de *T.*

grandiflorum. Foi elaborada a rede molecular através da combinação de aproximadamente 188 mil espectros de EM/EM da biblioteca espectral do GNPS com janela espectral de 50 a 1800 m/z baseados na similaridade de cosseno entre os íons dos espectros experimentais com os da biblioteca do GNPS e agrupados em 228 nodos. Os agrupamentos foram organizados de acordo com os seguintes fatores básicos: (1) força da aresta, que representa o nível de similaridade (cosseno) entre os nodos, variando de 0,7 a 1,0; (2) cor do nodo, que representa a origem da amostra na qual a substância foi detectada; (3) legenda do nodo, que corresponde ao íon precursor, ilustrado na Figura 7.

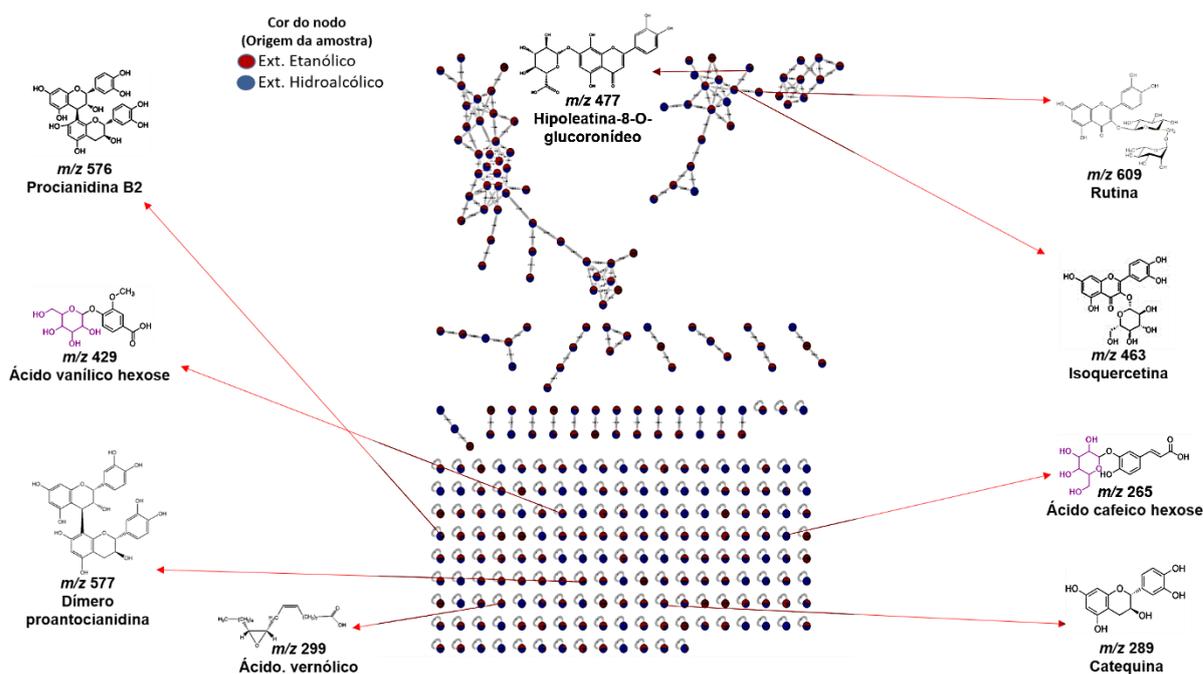
A identificação de cada nodo (substância) foi baseada nas informações obtidas nas anotações realizadas pela biblioteca espectral do GNPS e na comparação com a literatura especializada e com o banco de dados, sendo primeiramente analisados os nodos que agruparam nos mesmos *clusters* dos padrões seguido daqueles que apresentam íon precursor m/z das substâncias já caracterizadas no item 5.4.2.

Seguindo essa ordem, primeiramente foi observado que, para ambos os extratos, houve a formação de mapas de redes moleculares com famílias moleculares tendo como elemento básico substâncias (nodos) da classe dos fenólicos, e do grupo dos flavonoides (Figura 7), corroborando com as análises por CLAE-PDA e que detectou a presença de taninos condensados em ambos os extratos. Dentre todas as substâncias anotadas (Tabela 5), 17 foram agrupadas no mapa da rede molecular, tanto para o extrato etanólico, quanto para o hidroalcolólico, e no geral foram caracterizadas 23 substâncias a partir da biblioteca espectral do GNPS.

A partir da organização do *Molecular Networking* foi possível observar que, embora as redes moleculares apresentem como principais famílias nodos referentes aos fenólicos, a exemplo dos ácidos fenólicos, como o ácido caféico hexose (m/z 265), Ácido dihidroxistearico (m/z 315), ácido vanílico hexose (m/z 429) e ácido vernólico (m/z 299). A rede relativa aos extratos também exibiu agrupamentos da classe dos flavonoides, sendo anotados nos extratos os compostos, como a isoquercetina (m/z 463), rutina (m/z 609), Hipoleatina-8-O-glucorinideo (m/z 477), catequina (m/z 289), procianidina B2 (m/z 576) e o Dímero proantocianidina (m/z 577).

Um fator positivo a respeito dessa classe de compostos que foram conectados na mesma família espectral foi o valor de cosseno superior a 0.71, demonstrando a similaridade relevante entre eles, como podem ser observadas nas Figuras 8, 9 e 10.

Figura 7. Rede de interação molecular (*Molecular Networking*) dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos de cupuaçu (*T. grandiflorum*) no modo negativo.



Fonte: Autor (2020)

Figura 8. Cluster dos ácidos fenólicos da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos de cupuaçu (*T. grandiflorum*) no modo negativo.

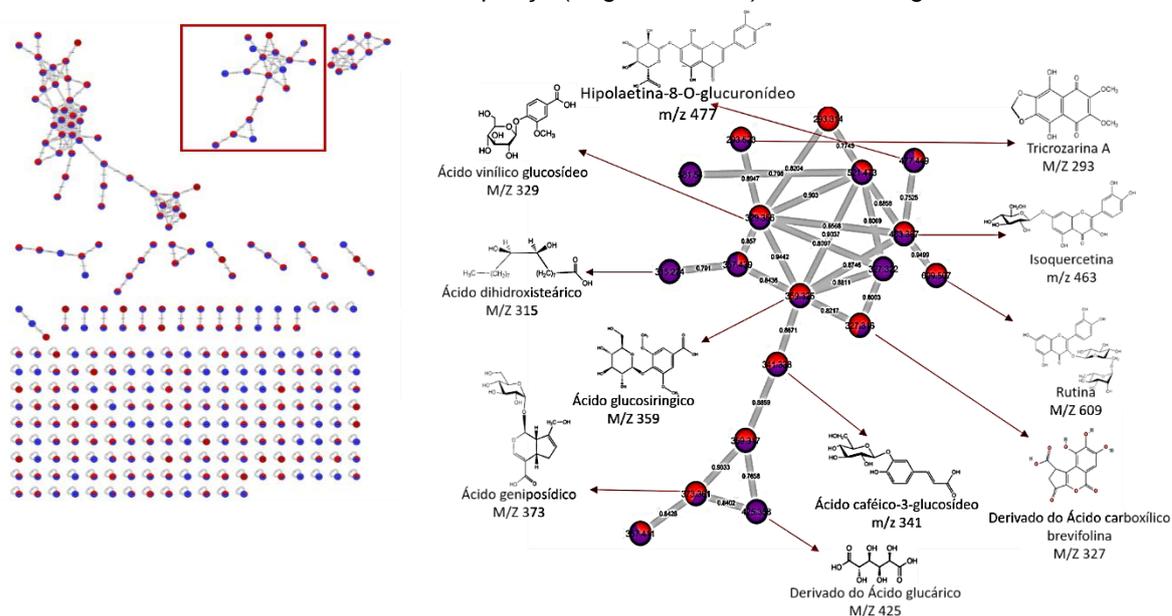
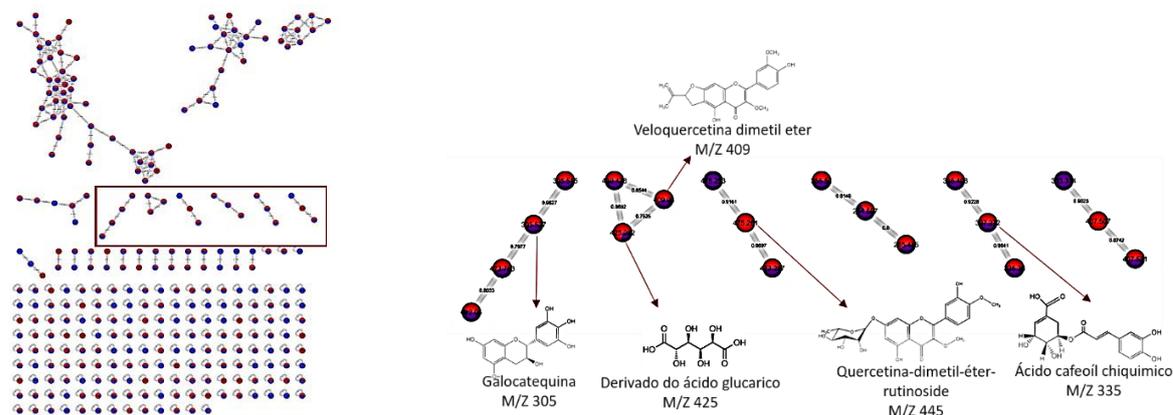
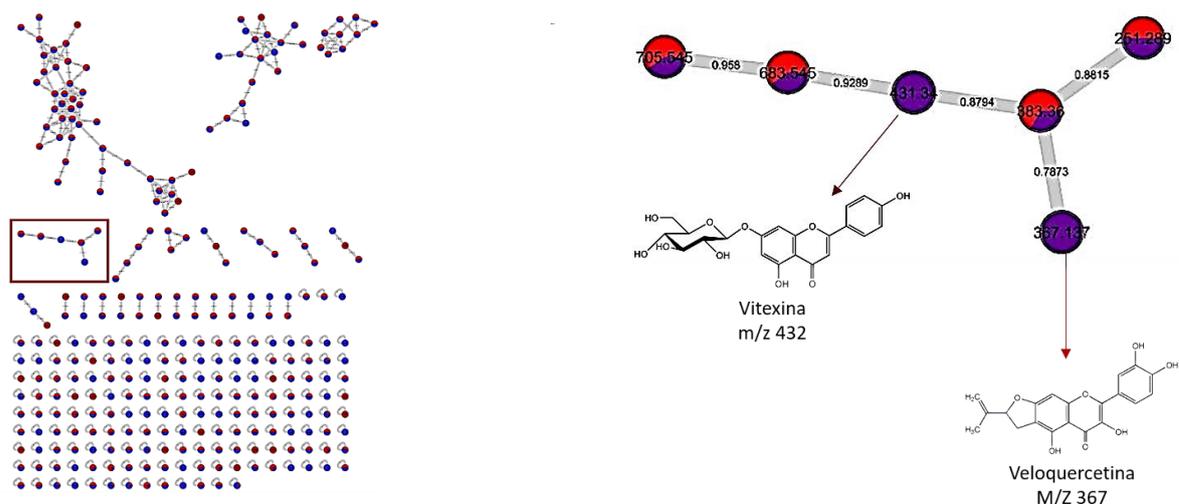


Figura 9. Cluster dos ácidos fenólicos e quercetinas da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos de cupuaçu (*T. grandiflorum*) no modo negativo.



Fonte: Autor (2020).

Figura 10. Cluster dos flavonoides da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos de cupuaçu (*T. grandiflorum*) no modo negativo.



Fonte: Autor (2020).

Nas redes moleculares das cascas de cupuaçu, foi observado o agrupamento de espectros que demonstraram diferenças entre os extratos etanólico e hidroalcoólico. Os compostos Ácido caféico hexose (m/z 265), Ácido dihidroxisteárico (m/z 315), Veloquercetina (m/z 367), Dímero do ácido glucarico (m/z 425) e a Vitexina (m/z 431) foram observados apenas nos extratos hidroalcoólicos dentro dos parâmetros dos valores de cosseno na biblioteca do GNPS. No entanto, o extrato etanólico apresentou o íon m/z 429 correspondente a

substância ácido vanílico hexose, anotado apenas para esse extrato na biblioteca do GNPS com valor de cosseno igual a 1,0.

A rede molecular caracterizou 13 substâncias que não haviam sido detectadas nas bandas cromatográficas mais intensas dos extratos, esses íons correspondem as substâncias: Ácido caféico hexose (m/z 265), Tricrozarina A (m/z 293), Ácido vernólico (m/z 299), Galocatequina (m/z 305), Ácido dihidroxisteárico (m/z 315), Ácido carboxílico brevifolina (m/z 327), Ácido cafeoil chiquimico (m/z 335), Ácido glucosiringico (m/z 359), Veloquercetina (m/z 367), Ácido geniposídico (m/z 373), Veloquercetina-3'3 dimetil-éter (m/z 409), Derivado do ácido glucarico (m/z 425), Ácido vinílico hexose (m/z 429), Quercetina-dimetil-éter-rutinoside (m/z 475). A rede molecular anotou também substâncias já caracterizadas através da análise individual das fragmentações dos íons precursores dos espectros de massa pelo software *DataAnalysis*, demonstrando seletividade e precisão na desreplicação de substâncias nos extratos das cascas de *T. grandiflorum*. Todas as substâncias caracterizadas por Molecular Networking estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Tabela de caracterização química dos extratos etanólico e hidroalcolólico de *T. grandiflorum* por *Molecular Networking*.

Metabólitos secundários		Espécie			<i>T. grandiflorum</i>	
		*m/z [M-H] ⁻	**TR (min)	Valor de Cosseno (0,7-1,0)	Presença nos extratos	Referência
1	Ácido caféico hexose	265	28,03	1,0	EtOH:H ₂ O	GNPS / Wang et al (2017)
2	Catequina	289	13,23	0,93	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Wang et al (2017)
3	Tricrozarina A	293	13,57	0,83	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Wang et al (2017)
4	Ácido vernólico	299	30,83	0,84	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / D'Souza et al., (2017)
5	Galocatequina	305	15,03	0,89	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Wang et al (2017)
6	Ácido dihidroxisteárico	315	6,05	0,89	EtOH:H ₂ O	GNPS / Wang et al (2017)

Tabela 5. (Continuação) Tabela de caracterização química dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos de *T. grandiflorum* por *Molecular Networking*.

7	Ácido carboxílico brevifolina	327	7,19	0,79	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Spínola <i>et al.</i> , (2015)
8	Ácido vanílico glucosídeo	329	6,51	0,87	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Li <i>et al.</i> , (2016)
9	Ácido cafeoil chiquimico	335	13,86	0,87	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Spínola <i>et al.</i> , (2015)
10	Ácido caféico-3-glucosídeo	341	4,39	0,85	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Fraige <i>et al.</i> , (2017)
11	Ácido glucosiringico	359	5,87	0,86	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Li <i>et al.</i> , (2016)
12	Veloquercetina	367	10,31	0,8	EtOH:H ₂ O	GNPS / Fraige <i>et al.</i> , (2017)
13	Ácido geniposídico	373	7,52	0,87	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Li <i>et al.</i> , (2016)
14	Veloquercetina-3'3 dimetil-éter	409	14,21	0,79	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Fraige <i>et al.</i> , (2017)
15	Derivado do ácido glucarico	425	11,57	0,75	EtOH:H ₂ O	GNPS / Spínola <i>et al.</i> , (2015)
16	Ácido vinílico hexose	429	38,97	1,0	EtOH	GNPS / Wang <i>et al.</i> (2017)
17	Vitexina	431	4,23	0,82	EtOH:H ₂ O	GNPS / Wang <i>et al.</i> , (2017)
18	Isoquercetina	463	17,59	0,88	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / El Sayed <i>et al.</i> , (2016)
19	Quercetina-dimetil-éter-rutinoside	475	13,63	0,78	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Wang <i>et al.</i> , (2017)
20	Hipoleatina-8-O-glucorinideo	477	18,77	0,78	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Pugliese <i>et al.</i> , 2013
21	Procianidina B2	576	10,07	0,71	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / D'Souza <i>et al.</i> , (2017)
22	Dímero proantocianidina	577	11,38	0,85	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Fraige <i>et al.</i> , (2017)
23	Rutina	609	17,30	0,74	EtOH:H ₂ O/EtOH	GNPS / Wang <i>et al.</i> , (2017)

m/z [M-H]⁻ : Razão massa carga do espectro de massas no modo negativo; **TR (min): tempo de retenção(minutos); EtOH:H₂O- Extrato hidroalcoólico das cascas. EtOH- Extrato etanólico das cascas. **Fonte: Autor (2020).

5.6. Atividade antimicrobiana dos extratos

Os dois extratos de *T. grandiflorum* apresentaram atividade no teste de CIM, por meio do método usado neste estudo. Alguns critérios sugeridos por Holetz et al, (2002) descritos na Tabela 6, foram usados como parâmetro de atividade, pois o mesmo descreve em seus estudos que extratos vegetais com atividade antimicrobiana em concentrações acima de 1000 µg/mL nos testes CIMs são considerados inativos, sendo de difícil uso farmacêutico no tratamento clínico de infecções bacterianas e antifúngicas.

Tabela 6. Critério de avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica de poços.

AVALIAÇÃO	CIMs DO EXTRATO
Boa atividade antimicrobiana	Abaixo de 100 µg/mL
Moderada atividade antimicrobiana	Entre 100 e 500 µg/mL
Fraca atividade antimicrobiana	Entre 500 e 1000 µg/mL
Inativo	Acima de 1000 µg/mL

Fonte: Holetz *et al*, (2002).

A CIM foi determinada para os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana. Na Tabela 7 foram expressos os resultados da atividade antifúngica e antibacteriana dos extratos vegetais de cupuaçu (*T. grandiflorum*) frente a microrganismos patogênicos humanos. Observa-se que as leveduras *C. albicans* (ATCC 1023); *C. albicans* (ATCC 18804); *C. tropicalis* (ATCC 750); *C. krusei* (ATCC 6258); *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. glabrata* (ATCC 2001) não foram inibidas por nenhuma concentração de ambos os extratos. Os extratos etanólicos e hidroalcoólicos de *T. grandiflorum* apresentaram pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana até a concentração de 1000 µg/mL.

O extrato hidroalcoólico da casca de cupuaçu apresentou atividade antimicrobiana mais expressiva frente às bactérias *S. aureus* (ATCC 25922), *Salmonella sp.* (ATCC 19196) e *E. coli* (ATCC 25923) na concentração de 1000 µg/mL. Entretanto, este não apresentou atividade para os ensaios de concentração bactericida mínima (CBM), sugerindo que sua atividade microbiológica frente a esses patógenos é bacteriostática (Tabela 7). Já o extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana apenas para *Salmonella sp.* (ATCC 19196), em concentração de 1000 µg/mL, não apresentando atividade nos ensaios de

concentração bactericida mínima (CBM), tendo sua atividade também caracterizada como bacteriostática. Resultados semelhantes foram observados por Venancio (2019) em extratos das folhas de *T. grandiflorum*, onde encontrou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com atividade moderadamente sensíveis. A atividade antimicrobiana do *T. grandiflorum* também foi observada por Lew *et al* (2016) em estudos *in vitro* dos extratos das folhas, polpa e sementes frente à linhagem de *S. aureus*, não obtendo efeito inibitório sobre as bactérias. Já os resultados encontrados por Moita (2019) obteve atividade inativa dos extratos das cascas de sementes de *T. grandiflorum* frente às mesmas espécies de microrganismos deste estudo.

Os extratos vegetais testados apresentam atividade antimicrobiana para microrganismos de cepas padrões, não sendo ativos para cepas resistentes (Tabela 7). Embora tenha sido encontrado efeito inibitório para os microrganismos *S. aureus*, *Salmonella sp.* e *E. coli*, no geral esta atividade foi limitada. Toda via, resultados de atividade antimicrobiana inibitória frente aos microrganismos testados para a casca de *T. grandiflorum* não foram encontrados na literatura até o momento, o que tornam esses resultados inéditos.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e hidroalcolóico de *T. grandiflorum*.

AMOSTRA	CIM (CFM) ^a					CIM (CBM) ^a			
	<i>C. albicans</i> * ATCC 10231	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	<i>Salmonella</i> <i>sp.</i> ATCC 19196	<i>E. coli</i> ATCC 25923
CA/CPC/US	–	–	–	–	–	–	–	1000 (–)	–
CA/CPC/SXL	–	–	–	–	–	–	1000 (–)	1000 (–)	1000 (–)
(+) ^{b1}	0.03	0.06	0.12	0.12	0.06	0.12	NA	NA	NA
(+) ^{b2}	R (64)	2.0	8.0	32	4.0	32	NA	NA	NA
(+) ^{b3}	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.30	25.0	12.5

^a valores em µg/mL; *Resistente ao Fluconazol; ^{b1} Anfotericina B; ^{b2} Fluconazol para leveduras; e ^{b3} Anfotericina para bactérias; (–) CBM/CFM > 1000 µg/mL; NA: Não aplicável; R: Resistente; CA/CPC/US Extrato da casca de cupuaçu (ultrassom); CA/CPC/SXL Extrato da casca de cupuaçu (sohxlet). **Fonte:** Autor (2020).

Os flavonoides e os ácidos fenólicos caracterizados nos estudos químicos dos extratos, apresentam em literatura atividade antimicrobiana, podendo estar relacionados aos resultados encontrados neste trabalho (DUARTE, 2006; GABBAY ALVES *et al.*, 2019; JALAL, 1977; ROTH, 2009; SANTOS *et al.*, 2010). Segundo

Drumond *et al.*, (2004) a baixa atividade antimicrobiana pode ter sido suprimida pelo sinergismo entre as diferentes classes de compostos encontradas. Este fator pode estar relacionado a matriz complexa dos extratos, e a alta interação dos compostos bioativos encontrados nesse material. Contudo, a atividade bacteriostática desses extratos pode ser empregada para o aumento da vida de prateleira de diversos produtos que venham a utilizar as cascas de *T. grandiflorum* em sua composição, a exemplo, o estudo de Rodrigues *et al.*, (2010) que utilizou as cascas de cupuaçu para a elaboração de pães, conferindo ao produto final a propriedade de alimento funcional.

6. CONCLUSÃO

Os extratos dos resíduos de *T. grandiflorum* oriundos da agroindústria apresentaram resultados promissores frente aos estudos executados. As diferentes partes que compõe o fruto de *T. grandiflorum* (casca, sementes e polpa) apresentaram compostos fenólicos, flavonoides e taninos, as cascas considerada um subproduto da indústria, pode ser utilizada como matéria-prima fonte desses compostos antioxidantes.

As cascas e as sementes apresentaram atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS, onde as cascas apresentaram maior atividade frente ao radical ABTS.

Não foi possível confirmar a presença de compostos químicos de baixo peso molecular pelo método cromatográfico CLAE-PDA possivelmente devido à baixa concentração dessas substâncias nos extratos e a presença de taninos condensados, sendo um método pouco seletivo para a análise desses extratos brutos.

A análise espectrométrica por CLAE-ESI-EM/EM caracterizou no total 16 compostos e a metodologia mostrou-se seletiva para os extratos, caracterizando majoritariamente compostos fenólicos.

A estratégia de combinação das técnicas de CLAE-ESI-EM/EM e de *Molecular Networking* possibilitou a interpretação mais rápida e otimizada dos dados espectrais gerados. A aplicação das redes moleculares para a desreplicação de extratos das cascas de *T. grandiflorum* anotou 23 substâncias na biblioteca espectral do GNPS, características da família dos ácidos fenólicos e flavonoides,

corroborando com os resultados encontrados nas análises por CLAE-ESI-EM/EM. A aplicação da rede molecular e os resultados obtidos oriundos dessa metodologia são inéditos em literatura para a espécie *T. grandiflorum*.

Levando em consideração as variáveis de compostos fenólicos, flavonoides e taninos encontrados nos extratos, as sementes de cupuaçu apresentaram estatisticamente maior concentração desses compostos, seguida das cascas e polpa.

A atividade antimicrobiana apresentou resultados positivos para o extrato hidroalcoólico das cascas de *T. grandiflorum* frente a duas espécies bacterianas Gram+ (*S. aureus*) e uma Gram- (*Salmonella sp.* e *E. coli*). Adicionalmente, o extrato etanólico da casca apresentou resultado positivo apenas para a espécie bacteriana Gram- (*Salmonella sp.*). Todos os extratos apresentaram atividade limitada, classificada como baixa, segundo os critérios de avaliação adotados nesse estudo. Todavia, os resultados antimicrobianos positivos obtidos para os extratos das cascas de *T. grandiflorum* para os microrganismos testados possui caráter bacteriostático.

Os extratos de *T. grandiflorum* possuem potencial biotecnológico para a geração de bioprodutos com atividade biológica. Contudo, ainda se faz necessário estudos voltados para a otimização da extração desses compostos presentes na casca de *T. grandiflorum*. O isolamento dessas substâncias químicas possuem potencial para agregar valor econômico a esse subproduto, ao passo que, os compostos encontrados nos estudos desse resíduo é de grande interesse industrial.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABUD, Ana Karla de Souza; NARAIN, Narendra. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas – SP, v. 12, n. 4, p. 257-265, 2009.

ADONGBEDE, Erute; EGBODUKU, Wisdom. Screening of some *Nigerian* medicinal plants for antibacterial activity. **American Journal of Drug Discovery and Development**. v. 3, n. 2, p. 60-71, 2013.

ANWAR, Javed. **Os efeitos do ácido caféico e do éster fenetil do ácido caféico sobre as atividades da acetilcolinesterase e das ecto-nucleotidases em ratos**. 2013. 166 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências

Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2013.

ALVES, Sérgio De Mello; JENNINGS, Walters. Volatile Composition of Certain Amazonian Fruits. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1263 - 1265, 2003.

AMARAL, Juliano Geraldo. **Passiflora L. (Passifloraceae):** estudos fitoquímicos suportados no desenvolvimento de estratégias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. 2018. 226 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

ARAÚJO, Vivianne Machado de. **Estudo do potencial terapêutico do ácido caféico em protocolos de diabetes e dislipidemia em camundongos.** 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

ARON, Allegra T *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954 -1991, 2020.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis.** 18. ed. Washington, 2010.

AYRES, Mariane Cruz Costa *et al.* Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. Et Zucc. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.

AVILA-SOSA, Raúl *et al.* Antioxidant Properties of Amazonian Fruits: A Mini Review of in Vivo and in Vitro Studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v 2019, p. 11, 2019.

BAQUERO, Fernando; BLÁZQUEZ, Jesús. Evolution of antibiotic resistance. Trends in Ecology and Evolution. Elsevier. v. 12, p. 482–487, 1997.

BARBOSA-FILHO, José M *et al.* Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 15, p. 392–413, 2005.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, Claudette. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, Claudette. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1999.

CARVALHO, Ana Vânia; GARCÍA, Nelson Horacio Pezoa; FARFÁN, Jaime Amaya. Physico-chemical properties of the flour, protein concentrate, and protein isolate of the cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum) seed. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 8, p. 1-8, 2006.

CÁDIZ-GURREA, María de la Luz *et al.* Bioactive Compounds from *Theobroma cacao*: Effect of Isolation and Safety Evaluation. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, n. 1, p. 40–46, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE DOCUMENT (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**. Ed. M7-A6. Wayne, PA, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standard**, Ed. M27-A3. Wayne, PA, 2008.

D'SOUZA, Roy *et al.* Origin-based polyphenolic fingerprinting of *Theobroma cacao* in unfermented and fermented beans. **Food Research International**, v. 99, n. June, p. 550–559, 2017.

DRUMOND, Milana Ramos Santana *et al.* Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. **Pesquisa Brasileira de Odontopediatria Clínica Integrada**, v. 4, p. 8–33, 2004.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira *et al.* Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira *et al.* Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v. 7, p. 16, 2006.

GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ. Secretaria estadual de agricultura e abastecimento em Belém, Pará. Disponível em: <http://www.sedap.pa.gov.br/agricultura.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2020.

KUSKOSKI, Marta *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 726–732, 2005.

FERREIRA, Luciana Lobianco. **Estrutura clonal e multirresistência em *pseudomonas aeruginosa***. 2005, 99 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FILHO, Gilberto de Andrade Fraife *et al.* **Cultivo do cupuaçuzeiro**. Bahia: Comissão executiva do plano da lavoura cacaueira (CEPLAC), Bahia, 2016.

FOX RAMOS, Alexander *et al.* Natural products targeting strategies involving molecular networking: Different manners, one goal. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 7, p. 960–980, 2019.

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

FREITAS, Erlania do Carmo *et al.* Processamento e Caracterização Físico-Química de Farinhas de Resíduos de Polpas de Frutas Congeladas da *Theobroma grandiflorum* e *Fragaria vesca*. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 4, p. 425–432, 2015.

FREITAS, Erlania do Carmo *et al.* Phenolic compounds and screening of the antioxidant capacity of *theobroma grandiflorum* dehydrated coproducts. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2193–2203, 2017.

GABBAY ALVES, Taís Vanessa *et al.* Bioactive compounds and antioxidant potential for polyphenol-rich cocoa extract obtained by agroindustrial residue. **Natural Product Research**, v. 33, n. 4, p. 589–592, 2019.

GIACOMETTI, D. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPOSIO NACIONAL DE RECURSOS GENETICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas, BA. **Anais** [1]. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMP, 1993. p.13-27.

GIORDANI, Rudimar Junior; CAVALI, Jucilene; PORTO, Marlos Oliveira. Resíduos agroindustriais e alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 93–104, 2014.

HOLETZ, Fabíola Barbiéri *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027–1031, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Agropecuário**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/2233.2006.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2020.

MOITA, Isadora da Silva. **Caracterização química das cascas das sementes de espécies do gênero *Theobroma***. 2019. 53 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2019.

OLIVEIRA, Gibson Gomes de *et al.* Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximiliani* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. **Planta Medica**, v. 83, n. 7, p. 636–646, 2017.

OLIVEIRA, Thiago Belchior de; GENOVESE, Maria Inés. Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetic rats. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 929–935, 2013.

JALAL, Mahbulul AF; COLLIN, Hamish A. Polyphenols of Mature Plant , Seedling and Tissue. **Fitoquímica**, v. 16, p. 1377–1380, 1977.

KOOLEN, Hector HF *et al.* Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 467–473, 2013.

LEW, Kan Sprenger *et al.* In vitro antibacterial effect of euterpe *oleracea* mart. And *theobroma grandiflorum* hydroalcoholic extracts. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, p. 1–12, 2016.

LI, Sensen *et al.* Rapid Identification and Assignment of the Active Ingredients in Fufang Banbianlian Injection Using HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 7, p. 1225–1237, 2016.

LIMA, Milena Campelo Freitas de. **Caracterização de substâncias fenólicas e alcaloides dos resíduos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (willd. Ex spreng.) Schum).** 2013. 132f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

LIN, Chingyu *et al.* Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, n. 3, p. 245–251, 2006.

MATOS, Carlily Brito. **Caracterização Física, Química, Físico-Química De Cupuaçus (*Theobroma Grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng.) Shum.) Com Diferentes Formatos.** 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Santa Cruz – Ilhéus, Bahia, 2007.

MENDES, Lorena Paula Mercês *et al.* Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 32, p. 121–125, 2011.

MINGXUN, Wang *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, p. 828–837, 2016.

NAZARÉ, Raimunda Fátima Ribeiro de; BARBOSA, Wilson Carvalho; VIEGAS, Rosemary Moraes Ferreira. Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate. **Embrapa Amazônia Oriental**: v. 108, p. 38, 1990.

NOTHIAS, Louis Félix *et al.* Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 4, p. 758–767, 2018.

ORFALI, Guilherme Di Camillo *et al.* Mecanismo Antitumorigênico da Isoquercetina no Adenocarcinoma De Cólon: um Estudo Experimental Com Camundongos Atímicos. **Journal of Coloproctology**, v. 37, n. S 1, p. 14–15, 2017.

PUGLIESE, Alexandre *et al.* Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2720–2728, 2013.

RAHEEM, Dotsha *et al.* Application of metabolomics and molecular networking in investigating the chemical profile and antitrypanosomal activity of British bluebells (*Hyacinthoides non-scripta*). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

RODRIGUES, Clenilson Martins. **Caracterização Quali E Quantitativa De Metabólitos Secundários Em Extratos Vegetais**. 2007. 197 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. São Paulo, 2007.

RODRIGUES, Bruno Sanches. **Resíduos da agroindústria como fonte de fibras para elaboração de pães integrais**. 2010. 96 f. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RORIZ, Lobo Roriz *et al.* Pterospartum tridentatum, Gomphrena globosa e Cymbopogon citratus : um estudo fitoquímico com foco em compostos antioxidantes. **Food Research International**. v. 62, p. 684-693, 2014.

ROTH, Jonathan V. Prediction interval analysis is underutilized and can be more helpful than just confidence interval analysis. **Journal of Clinical Monitoring and Computing**, v. 23, n. 3, p. 181–183, 2009.

RUFINO, Maria do Socorro Moura *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Ed. 1, p. 1-4, ISSN: 1679-6535, 2007.

SAYED, Abeer Mohamed *et al.* In vivo diabetic wound healing effect and HPLC–DAD–ESI–MS/MS profiling of the methanol extracts of eight *Aloe species*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 352–362, 2016.

SALGADO, Jocelim Mastrodi *et al.* Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) Peel as Potential Source of Dietary Fiber and Phytochemicals in Whole-Bread Preparations. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 4, p. 384–390, 2011.

SALIH, Enass Yousif Abdelkarim *et al.* LC-MS/MS tandem mass spectrometry for analysis of phenolic compounds and pentacyclic triterpenes in antifungal extracts of *Terminalia brownii* (Fresen). **Antibiotics**, v. 6, n. 4, p. 1–18, 2017.

SANTOS, Geresa Matias dos *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, Eyde Cristianne Saraiva dos *et al.* Aproveitamento da casca do cupuaçuzeiro para a produção de energia. In: Encontro de Energia do Meio Rural, 5, 2004, Manaus – AM, **Anais** [5], Enc. Energ. Meio Rural, 2004, p.1-8.

SILVA, Celia Eliane de Lara da *et al.* Evaluation of antioxidant activity and phenolic compounds content in methanol extract obtained from leaves *Commiphora Myrrha*. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 34, n.1, p. 117–124, 2013.

SILVA, Arinalva Maria *et al.* Valor nutricional de resíduos da agroindústria para

alimentação de ruminantes. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 4, p. 370–379, 2014.

SINGLETON, Vernon. L; ROSSI, Joseph A. Jr. Colorimetric of total phenolics with phosphomolibic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology & Viticulture, California, US**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SOUSA, Mariana S. Bezerra *et al.* Caracterização nutricional e compostos em resíduos de polpas de frustas tropicais. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554–559, 2011.

SOUZA, Aparecida das Graças Claret de *et al.* Boas práticas na colheita e pós-colheita do cupuaçu. **Embrapa Amazônia Ocidental**. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/7257>. Acesso em: 25 Jan. 2020.

SPÍNOLA, Vítor; PINTO, Joana; CASTILHO, Paula C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14–30, 2015.

WANG, Jinfeng *et al.* Analysis of chemical constituents of melastoma dodecandrum Lour. By UPLC-ESI-Q-Exactive Focus-MS/MS. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 1-20, 2017.

YANG, Hui *et al.* New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“Cupuaçu”). **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1501–1504, 2003.

YUKIKOGYO Co.Ltd, D. Integrity Issue. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato etanólico de folhas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum) FRENTE À *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Ayan**, v. 8, n. 5, p. 1-55, 2019.

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

APÊNDICE

CRONOGRAMA

ATIVIDADES	MESES (2019 - 2020)												
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	
Levantamento bibliográfico.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Elaboração do Projeto de Pesquisa para Qualificação.	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
Coleta do material alvo de estudo e caracterização bromatológica.	x	x											
Obtenção dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos.				x	x								
Aquisição dos espectros de massa dos extratos via HPLC-ESI-MS/MS e HPLC-PDA.						x	x						
Obtenção da Rede molecular dos extratos: <i>Molecular Networking</i> .								x	x				
Ensaio biológico: Concentração Inibitória Mínima – CIM dos extratos.									x	x			
Ensaio biológico: Atividade Antioxidante.											x	x	x
Conclusão dos créditos do mestrado: Atividades extras, Disciplinas obrigatórias, Disciplinas optativas, Seminários e Estágio docente.	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
Qualificação.												x	
ATIVIDADES	MESES (2020 - 2021)												
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	
Análise estatística dos dados fitoquímico e microbiológicos.	x												
Otimização da Rede molecular dos extratos: <i>Molecular Networking</i> .		x											
Tratamento e análise dos dados de Antioxidante e <i>Molecular Networking</i> .		x	x	x									
Elaboração dos artigos científicos				x	x								
Submissão do artigo científico							x						
Defesa da dissertação								x					