

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CASCAS DAS SEMENTES DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *Theobroma*

ISADORA DA SILVA MOITA

MANAUS

2019

ISADORA DA SILVA MOITA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CASCAS DAS SEMENTES DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *Theobroma***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química, na linha de Pesquisa de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M715c Moita, Isadora da Silva
Caracterização química das cascas das sementes de espécies do gênero Theobroma / Isadora da Silva Moita. 2019
153 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Coorientadora: Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Theobroma. 2. Flavonoides. 3. Atividade antioxidante. 4. Metaboloma global. I. Veiga Júnior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Isadora da Silva Moita

**“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CASCAS DAS
SEMENTES DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Theobroma*”**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 20 de setembro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Instituto Militar de Engenharia-RJ

Orientador

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Saraiva Nunomura

Universidade Federal do Amazonas

Membro UFAM

Prof.^a Dr.^a Waldireny Caldas Rocha

**Campus do Instituto de Saúde e Biotecnologia-ISB/Coari-Universidade Federal
do Amazonas**

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder vida, saúde e perseverança a cada dia para concluir meu mestrado.

Aos meus pais, minha base, Dijalmo Vasconcelos e Viviane Moita, por ter me dado todo o amor, apoio, dedicação e investimento para que eu me tornasse uma profissional e ao meu irmão João Paulo da Silva Moita que sempre estar ao meu lado para alegrar.

Ao meu esposo querido Davi Daniel, pelo o amor, companheirismo, incentivo, amizade, paciência, auxílio e compreensão nos momentos de priorizar os estudos. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos meus avós, pelos conselhos de todo domingo à tarde, me ajudando a ter sabedoria para fazer escolhas na vida.

À minha família científica, Q-BiomA, onde a 7 anos iniciei minha jornada na pesquisa. É um grupo de pesquisa que me proporcionou um grande aprendizado, com trabalho árduo, dedicação e tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas que me ajudaram significativamente.

Aos membros atuais do grupo de pesquisa, que são poucos, mas permanecem unidos para vencer as mudanças que já enfrentamos, Milena, Ananda, Davi, Glaucia, Simone, Emily, Thais, Larissa. Aos membros antigos do Q- Bioma, Yasmin minha "irmã científica" (como diz o prof. Vardir, somos os dinossauros do laboratório), Karen Marciel, Renata, Maurício, Karen Alves, Nathália, Steve, Karen Cristine, Virlane, Isabely, Marcos, Leandro, Alane.

À Dr. Klenicy Yamaguchi minha coorientadora e mãe científica, amiga e professora. Sempre estive disposta a ajudar com seu grande conhecimento científico e incentivar seus alunos a se dedicar e amar o que fazem. Você é um exemplo de pesquisadora e mãe para mim

Ao professor Dr. Valdir Veiga, por ter me orientado nos projetos de PIBIC, Monografia e Dissertação. Muito obrigada pelas grandes oportunidades, inúmeros desafios, sermões, confiança e principalmente por me fazer entender o que é fazer ciência.

Ao prof. Dr. Emerson Lima pela colaboração nos ensaios químicos realizados em seu laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Química, seus servidores técnicos e docentes pelo seu trabalho em auxiliar e ensinar de forma eficiente e facilitadora.

Aos companheiros de disciplinas do mestrado, que de alguma forma me encorajaram e apoiaram nos estudos.

À Central Analítica da UFAM pela contribuição nos experimentos espectrométricos.

À FIOCRUZ-AM, por contribuir com os ensaios antimicrobianos, principalmente a Dra. Patrícia Puccinelli, a MSc. Ivanildes Bastos e a doutoranda Emily Soares.

Ao Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico - LADETEC (UFRJ) e ao Instituto Militar de Engenharia (IME) por ter me acolhido para a realização de parte dos experimentos.

À FAPEAM por implementar a minha bolsa de estudos, e as outras agências (CNPq, CAPES, Finep) de fomento, que contribuíram para manutenção dos laboratórios de pesquisa.

RESUMO

As espécies *Theobroma grandiflorum*, *T. cacao* e *T. subincanum* pertencem ao gênero *Theobroma* da família *Sterculiaceae*. Quimicamente, as espécies do gênero são caracterizadas por apresentar triterpenos, esteroides, flavonoides e alcaloides purínicos. Estudos realizados no Grupo de Pesquisa de Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA), relataram perfil químico rico em compostos fenólicos nas cascas das sementes de *T. grandiflorum*. Estes resultados motivaram a execução do presente trabalho de comparação de espécies de *Theobroma* com características físicas e químicas semelhantes e avaliação da atividade antioxidante das espécies. Os extratos hidroalcoólicos das cascas das sementes das três espécies, foram obtidos por maceração exaustiva, a espécie *T. grandiflorum* apresentou maior rendimento. O perfil cromatográfico dos extratos e frações foram avaliados por CCDAE, onde foi possível sugerir a presença de diferentes flavonoides. A análise por EM no modo negativo, evidenciou a semelhança das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. As frações foram analisadas por CLUAE-DAD em uma corrida em modo gradiente de 20min, foi possível observar a presença da teacrina, ao se comparar os dados obtidos com o padrão de teacrina, nas espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. Os resultados obtidos das análises realizadas com todas as frações das espécies em estudo, por CLUAE-EMAR/MS², permitiram identificar diferentes substâncias fenólicas: em *T. subincanum* foram detectados como principais íons, m/z 179 (ácido cafeico), m/z 191 (ácido isocítrico), m/z 329 (ácido vanílico glucosídeo) m/z 431 (vitexina), m/z 477 (hipoleatina-8-O- *O*- β -D-glucoronídeo), m/z 557 (hipoleatina-8- *O*- β -D-glucoronídeo 3''-*O*-sulfato), m/z 461 (isoscutelareína-8-*O*- β -D-glucoronídeo), m/z 541 (teograndina I), estas substâncias foram relatadas pela primeira vez na espécie. A metabolômica global foi aplicada com métodos de análises de PCA e HCA, onde foi possível confirmar a similaridade de todas as frações analisadas, entre as espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum* e a diferenciação da espécie *T. cacao*. O extrato hidroalcoólico de *T. grandiflorum* foi o mais ativo quantitativamente frente aos dois radicais livres, DPPH ($44,50 \pm 3,35 \mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$) e ABTS ($72,17 \pm 0,76 \mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$). A utilização de diferentes técnicas cromatográficas e diferentes detectores, confirmou a semelhança do perfil químico das cascas das sementes das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, sendo este o único trabalho comparativo das cascas das sementes, um resíduo de indústrias de alimentos, envolvendo diferentes técnicas cromatográficas.

Palavras-chave: *Theobroma*, Flavonoides, Atividade antioxidante, Metaboloma global

ABSTRACT

The species *Theobroma grandiflorum*, *T. cacao* and *T. subincanum* belong to the genus *Theobroma* of the family *Sterculiaceae*. Chemically, the species of the genus are characterized by presenting purine triterpenes, steroids, flavonoids and alkaloids. Studies conducted by the Amazon Biomolecule Chemistry Research Group (Q-BiomA) reported a chemical profile rich in phenolic compounds in the *T. grandiflorum* seed husks. These results motivated the execution of the present work of comparison of species of *Theobroma* with similar physical and chemical characteristics and evaluation of the antioxidant activity of the species. The hydroalcoholic extracts of the husks of the seeds of the three species were obtained by exhaustive maceration, the species *T. grandiflorum* presented higher yield. Three partition methodologies were tested and by CCDAE and MS analysis and methodology 1 was selected. The chromatographic profile was evaluated by CCDAE, where it was possible to suggest the presence of different flavonoids. Negative mode MS showed similarity of *T. grandiflorum* and *T. subincanum* species. The fractions were analyzed by UHPLC-DAD in a 20min gradient mode run. It was possible to observe the presence of theacrine by comparing the data obtained with the theacrine pattern in the species *T. grandiflorum* and *T. subincanum*. The results obtained from the analyzes performed with all fractions of the species under study, by UHPLC-EMAR/MS², allowed to identify different phenolic substances, in *T. subincanum*, m/z 179 (caffeic acid), m/z 191 (isocitric acid), m/z 329 (vanillic glucoside acid) m/z 431 (vitexine), m/z 477 (hypoleatin-8-O- β -D-glucuronide), m/z 557 (hypoleatin-8-O- β -D-glucuronide 3''-sulfate), m/z 461 (isoscuteallareine-8-O- β -D-glucuronide), m/z 541 (teograndin I), these substances were first reported in the species. The global metabolomics was applied with PCA and HCA multivariate methods, where it was possible to confirm the similarity of all analyzed fractions, between *T. grandiflorum* and *T. subincanum* species and the differentiation of *T. cacao* species. The hydroalcoholic extract of *T. grandiflorum* was the most quantitatively active against the two free radicals, DPPH ($44,50 \pm 3,35 \mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$) and ABTS ($72,17 \pm 0,76 \mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$). The use of different chromatographic techniques and different detectors confirmed the similarity of the chemical profile of the seed husks of *T. grandiflorum* and *T. subincanum* species chromatographic techniques.

Keyword: *Theobroma*, Flavonoids, Antioxidant activity, global metabolom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compostos voláteis presentes em <i>T. grandiflorum</i>	31
Figura 2. Flavonoides relatados na espécie <i>T. grandiflorum</i>	33
Figura 3. Metilxantinas encontradas em <i>T. grandiflorum</i>	34
Figura 4. Terpenóides e esteroides detectados em <i>T. subincanum</i>	36
Figura 5. Esqueleto básico dos flavonoides	37
Figura 6. Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia.	39
Figura 7. Fluxograma geral da metodologia.....	48
Figura 8. Placas de CCD do extrato de <i>T. grandiflorum</i> e frações obtidas das três metodologias utilizadas.....	60
Figura 9. Placas cromatográficas de alta eficiência (CCDAE), das frações da partição 3, com os fatores de retenção (rf) das principais manchas.	61
Figura 10. Placas cromatográficas das frações obtidas das três espécies de <i>Theobroma</i>	63
Figura 11. CCDAE teste do extrato e frações de <i>T. grandiflorum</i>	64
Figura 12. Placas cromatográficas de Alta eficiência de extrato e frações de <i>T. grandiflorum</i> e padrões de flavonoides	67
Figura 13. Placas cromatográficas de Alta eficiência de extrato e frações de <i>T. subincanum</i> e padrões de flavonoides	70
Figura 14. Placas cromatográficas de Alta eficiência de extrato e frações de <i>T. cacao</i> e padrões de flavonoides.....	72
Figura 15. Espectro de fragmentação do íon 179 (ms ²)	87
Figura 16. Espectro da fragmentação do íon 191 e 353 (ms ²).....	88
Figura 17. Espectro da fragmentação do íon 461 (ms ²)	89
Figura 18. Espectro da fragmentação do íon 557 (ms ²)	89
Figura 19. Moléculas correspondentes aos íons fragmentados nas três espécies de <i>Theobroma</i>	92
Figura 20. Cromatogramas das frações em DCM e MeOH de <i>T. grandiflorum</i> , obtidos do método 1.	94
Figura 21. Cromatogramas das frações em DCM e MeOH de <i>T. grandiflorum</i> , obtidos do método 2.	96
Figura 22. Cromatogramas dos padrões de metilxantinas e flavonoides	98
Figura 23. Cromatogramas dos extratos hidroalcoolicos das três espécies de <i>Theobroma</i> ...	100

Figure 24. Espectros de Ultravioleta do pico correspondente a teacrina dos extratos hidroalcoolicos das espécies <i>T. grandiflorum</i> e <i>T. subincanum</i>	101
Figure 25. Espectros de Ultravioleta do pico correspondente a cafeína do extrato hidroalcoolico da espécie <i>T. cacao</i>	102
Figure 26. Espectro de Ultravioleta do pico X da espécie <i>T. cacao</i>	103
Figura 27. Cromatogramas das frações em DCM das três espécies de <i>Theobroma</i>	104
Figure 28. Cromatogramas das frações metanólica das três espécies de <i>Theobroma</i>	106
Figura 29. Alcaloides detectados por CLUAE-EMAR-ESI-MS ²	110
Figura 30. Ácidos fenólicos e flavonoides detectados por CLUAE-EMAR-ESI-MS ²	116
Figura 31. HCA dos dados espectrométricos das frações em DCM no modo positivo das três espécies do gênero <i>Theobroma</i>	117
Figure 32. Gráfico de PCA com as componentes principais 1, 2 e 3 (PC1, PC2 e PC3), com os dados espectrométricos no modo positivo frações em DCM das três espécies de <i>Theobroma</i>	118
Figure 33. Gráfico de PCA com as componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2), com os dados espectrométricos no modo positivo frações em DCM das três espécies de <i>Theobroma</i>	119
Figure 34. HCA dos dados espectrométricos das frações em MeOH no modo positivo das três espécies do gênero <i>Theobroma</i>	121
Figure 35. Gráfico de PCA com as componentes principais 1, 2 e 3 (PC1, PC2 e PC3), com os dados espectrométricos no modo positivo frações metanólica das três espécies de <i>Theobroma</i>	122
Figure 36. Gráfico de PCA com as componentes principais 1 e 3 (PC1 e PC3), com os dados espectrométricos no modo positivo frações metanólica das três espécies de <i>Theobroma</i>	123
Figure 37. Gráfico de PCA com as componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2), com os dados espectrométricos no modo positivo frações metanólica das três espécies de <i>Theobroma</i>	125
Figure 38. HCA dos dados espectrométricos das frações em DCM no modo negativo das três espécies do gênero <i>Theobroma</i>	126
Figure 39. Gráfico de PCA com as componentes principais 1, 2 e 3 (PC1, PC2 e PC3), com os dados espectrométricos no modo negativo das frações em DCM das três espécies de <i>Theobroma</i>	128
Figure 40. HCA dos dados espectrométricos das frações metanólicas no modo negativo das três espécies do gênero <i>Theobroma</i>	129
Figure 41. a) Gráfico de PCA com as componentes principais 1, 2 e 3 (PC1, PC4 e PC3) b) Gráfico de PCA com as componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2)	130

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Substância fenólicas descritas em <i>T. cacao</i>	26
Quadro 2. Alcaloides relatados <i>T. cacao</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das cepas de bactérias gram-positivas	55
Tabela. 2 Lista das cepas de bactérias gram-negativas.....	55
Tabela 3. Rendimentos dos extratos hidroalcoolicos obtidos em triplicata das três espécies de <i>Theobroma</i>	57
Tabela 4. Rendimentos das frações obtidas das três metodologias de partição com o extrato de <i>T. grandiflorum</i>	58
Tabela 5. Rendimento das frações obtidas das três espécies de <i>Theobroma</i>	62
Tabela 6. Dados dos principais íons detectados no extrato e frações de <i>T. grandiflorum</i> e sugestões de substâncias de acordo com a literatura	76
Tabela 7. Dados dos principais íons detectados no extrato e frações de <i>T. subincanum</i> e sugestões de substâncias de acordo com a literatura	80
Tabela 8. Dados dos principais íons detectados no extrato e frações de <i>T. cacao</i> e sugestões de substâncias de acordo com a literatura	84
Tabela 9. Dados espectrométricos da fragmentação (ms^2) dos principais íons de <i>T. grandiflorum</i>	86
Tabela 10. Dados espectrométricos da fragmentação (ms^2) dos principais íons de <i>T. subincanum</i>	90
Tabela 11. Dados espectrométricos da fragmentação (ms^2) dos principais íons de <i>T. cacao</i> .	91
Tabela 12. Dados dos íons identificados por CLUAE-EMAR-ESI no modo positivo com suas respectivas	108

Tabela 13. Dados dos íons identificados por CLUAE-EMAR-ESI no modo negativo, com suas respectivas	113
Tabela 14. Composição dos componentes principais das análises de PCA e HCA das frações em DCM no modo positivo	120
Tabela 15. Composição dos componentes principais das análises de PCA e HCA das frações em MeOH no modo positivo	124
Tabela 16. Composição dos componentes principais das análises de PCA e HCA, das frações em DCM no modo negativo	127
Tabela 17. Composição dos componentes principais das análises de PCA e HCA, das frações em MeOH no modo negativo	131
Tabela 18. Atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS, nd: atividade não detectada.	132
Tabela 19. Teste de fenóis totais dos extratos e frações das três espécies de <i>Theobroma</i>	134

LISTA DE UNIDADES, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

m- Metro

ddp- Diferença de Potencial

μm -Micrometro

cm- Centímetro

nm- Nanômetro

g- Grama

mL- Mililitro

μL - Microlitro

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

μg – Micrograma

% - Porcentagem

m/z- Razão massa e carga

h- Horas

mg- Miligrama

mm- Milimetro

mM- Milimolar

min- Minutos

EM- Espectrometria de Massas

UV- Ultravioleta

CLUAE- Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência

DAD- Detector de Arranjo de Diodos

EMAR- Espectrometria de Massas de Alta Resolução

TEAC- Capacidade antioxidante trolox equivalente

DPPH[•]- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

ABTS^{•+}- 2, 2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato)

FRAP- Poder antioxidante redutor férrico

ORAC- Capacidade de absorção de radicais de oxigênio

CG-DIC- Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

CG-EM- Cromatografia gasosa com detector de Espectrometria de Massas

CI₅₀- Concentração Inibitória

EGCG- Epigalocatequina-3-galato

EGA- Equivalente de ácido gálico

EC- Equivalente de catequina

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

CCDAE- Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

IE- Ionização por Elétrons

IQ- Ionização Química

FAB- *Fast Atom Bombardment*

MALDI- *Matrix- assisted laser desorption*

APCI- *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

ESI- *Eletrospray Ionization*

TOF- *Time of Flight*

IT- *Ion trap*

Hex- Hexano

DCM- Diclorometano

MeOH- Metanol

AcOEt- Acetato de Etila

ACN- Acetonitrila

NP-PEG- Difenilboriloxietilamina - polietilenoglicol

RF- Fator de Retenção

PTFE- Politetrafluoretileno

LBCD- Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem

LADETEC- Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico

UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro

LABCEM- Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas

UFAM- Universidade Federal do Amazonas

DDA- *Data dependent acquisition*

PCA- *Principal Component Analysis*

HCA- *Hierarchical Cluster Analysis*

PC-*Principal Component*

FIOCRUZ- AM- Fundação Oswaldo Cruz do Amazonas

DMSO-dimetilsulfoxido

AMH- Ágar Müeller Hinton

CTT- Cloreto de Trifenil Tetrazólio

DP- Desvio Padrão

RCCSB- Fração em DCM de *T. grandiflorum*

RCCSC- Fração metanólica de *T. grandiflorum*

RCUCSB- Fração em DCM de *T. subincanum*

RCUCSC- Fração metanólica de *T. subincanum*

RCACSB- Fração em DCM de *T. cacao*

RCACSC- Fração metanólica de *T. cacao*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 Gênero <i>Theobroma</i>	23
3.1.1 <i>Theobroma cacao</i>	23
3.1.2 <i>Theobroma grandiflorum</i>	29
3.1.3 <i>Theobroma subincanum</i>	35
3.2 Flavonoides	37
3.3 Técnicas cromatográficas e espectrométrica utilizadas para comparação de perfis químicos de espécies vegetais	39
3.3.1 <i>Cromatografia</i>	39
3.3.1.1 <i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)</i>	40
3.3.1.2 <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	41
3.3.1.3 <i>Espectrometria de Massa (EM)</i>	43
3.4 Análise Metabolômica	44
4. METODOLOGIA	48
4.1 Obtenção de extratos e frações	48
4.1.1 <i>Coleta do material vegetal</i>	48
4.1.2 <i>Obtenção dos extratos</i>	49
4.1.3 <i>Partição líquido-líquido</i>	49
4.2.1 <i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	50

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).....	50
4.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado ao Detector de Arranjo de Diodo (CLUAE-DAD)	51
4.2.4 Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas de alta resolução (CLUAE-EMAR/MS ²)	51
4.3 Caracterização química	52
4.3.1 Espectrometria de Massas (EM)	52
4.4 Análise Metabolômica global.....	52
4.5 Ensaio Químicos e Biológicos.....	53
4.5.1 Ensaio de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH	53
4.5.2 Ensaio de atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS	53
4.5.3 Teste quantitativo de Fenóis Totais.....	54
4.5.4 Teste quantitativo e qualitativo de Flavonoides Totais.....	54
4.5.5 Atividade antimicrobiana	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Obtenção dos extratos em microescala e larga escala das três espécies de Theobroma	57
5.2 Particionamento dos extratos das três espécies de Theobroma	58
5.2.1. Partições teste com o extrato de <i>T. grandiflorum</i>	58
5.2.2 Particionamento das espécies <i>T. grandiflorum</i> , <i>T. subincanum</i> e <i>T. cacao</i> e análise por CCD.	62
5.3 Caracterização cromatográfica por CCDAE das espécies de Theobroma	63
5.4 Caracterização espectrométrica das espécies de Theobroma	74
5.4.1 Proposta de fragmentação dos principais íons detectados nas espécies de Theobroma	86
5.5 Caracterização cromatográfica por CLUAE-DAD das espécies de Theobroma.....	92

5.6 Caracterização cromatográfica por CLUAE-EMAR-MS² das espécies de <i>Theobroma</i>	107
.....	
5.6.1 <i>Análise no modo positivo de frações das cascas das sementes das espécies de <i>Theobroma</i></i>	107
5.6.2 <i>Análise no modo negativo de frações das cascas das sementes das espécies de <i>Theobroma</i></i>	110
5.7 Análise Metabolômica Global dos dados espectrométricos de CLUAE-EMAR-MS²	117
.....	
5.7.1 <i>Frações em DCM no modo positivo</i>	117
5.7.2 <i>Frações metanólicas no modo positivo</i>	121
5.7.3 <i>Frações DCM no modo negativo</i>	125
5.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA	131
5.8.1 <i>Atividade Antioxidante Frente ao Radical livre DPPH e ABTS</i>	131
5.8.2 <i>Teste quantitativo de Fenóis Totais</i>	133
6 CONCLUSÃO	136
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	139

1. INTRODUÇÃO

A região amazônica comporta o maior bioma brasileiro, caracterizado pela presença de diversas frutas exóticas ricas em substâncias bioativas e de interesse econômico (YAMAGUCHI et al., 2018). Dentre a diversidade de frutos encontrados na Amazônia destacam-se o açaí (*Euterpe precatoria*), o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), o bacuri (*Platonia insignis*), o taperebá (*Spondias lutea*) e o camu-camu (*Myrciaria dubia*), responsáveis pela expansão da fruticultura na região e geram resíduos que excedem a quantidade de matéria consumida pela indústria (BARROS et al., 2015; CANUTO et al., 2010).

Estudos demonstram que os nutrientes e metabólitos secundários responsáveis pela atividade antioxidante, se concentram em sua maioria nas cascas e nas sementes, sendo estes os principais subprodutos das indústrias de polpa de frutas (BERTO et al., 2015; SOTELO et al., 2015; VALENTINA et al., 2017)

O gênero *Theobroma* apresenta um grande destaque comercial devido suas espécies, *T. grandiflorum* (cupuaçu) e *T. cacao* (cacau). A espécie *T. grandiflorum* é um fruto exótico da Amazônia, conhecido no mercado nacional e internacional, 65% deste fruto é resíduo (cascas e sementes) das indústrias de polpas (GENOVESE & LANNES, 2009; NAZARÉ et al., 1990).

A polpa de *T. grandiflorum* é utilizada na culinária brasileira no preparo de sucos, sorvetes, licores, bolos, bombons entre outros, contribuindo para o desenvolvimento econômico da região (YAMAGUCHI et al., 2018). As cascas do fruto têm sido utilizadas na produção de pães (SALGADO et al., 2011). Das sementes é produzido o cupulate, produto com características similares ao chocolate, sem diferenças significativas em suas características físico-químicas, apresentando uma boa relação custo benefício (NAZARÉ et al., 1990).

As folhas e sementes de *T. grandiflorum* são caracterizadas quimicamente por apresentar metilxantinas como: cafeína, teobromina e teacrina; polifenóis, como: epicatequina,

clovamida, que apresentam atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH (HAMMERSTONE et al., 1994; YANG et al., 2003).

Na literatura são encontrados trabalhos somente com as sementes de *T. subincanum* (cupuí), relatando a presença de alguns triterpenos como, esqualeno, cicloartenol, 24-metilenocicloartenol, o esteroide campesterol, e o alcaloide purínico teacrina (BRUNI et al., 2000; HAMMERSTONE et al., 1994).

O trabalho de Lima (2013), realizado no Grupo de Pesquisa de Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA), detectou um perfil rico em compostos fenólicos nas cascas e sementes de cupuaçu. Além disso, relatou atividade antioxidante nos extratos das cascas e nas cascas das sementes de cupuaçu. O trabalho de Bastos (2016) relatou atividade antimalárica promissora frente ao *Plasmodium falciparum* nos extratos etanólicos das sementes de cupuaçu. Os compostos fenólicos podem ser responsáveis por tais atividades. A caracterização e detecção de tais substâncias pode-se agregar valor aos resíduos de cupuaçu. Isso motivou a execução do presente trabalho de caracterização química de três espécies do gênero *Theobroma*: *T. grandiflorum*, *T. cacao* e *T. subincanum* que são espécies com semelhanças físicas e químicas, vasta utilização comercial na região amazônica e no Brasil e com relatos na literatura escassos quanto a comparação do perfil químico das três espécies.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudos de metabolômica global (untarget) aplicada a extratos das cascas das sementes de 3 espécies amazônicas do gênero *Theobroma*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil químico dos extratos de três espécies de *Theobroma* por métodos cromatográficos, espectroscópicos e espectrométricos (CCDAE-UV, CLUAE-DAD, CLUAE-EMAR, EM).
- Realizar estudos de metaboloma global empregando métodos estatísticos aplicados aos dados de CLUAE-EMAR dos extratos para descrever as similaridades entre as espécies e o perfil de composição química do gênero;
- Comparar as atividades antimicrobianas e antioxidante (DPPH e ABTS) dos extratos das 3 espécies.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Gênero *Theobroma*

A família *Sterculiaceae* pertence a ordem Malvales (THORNE, 1968), é subdividida em três subfamílias: *Sterculioideae*, *Helicterioideae* e *Byttnerioideae*. As espécies da família são distribuídas em quatro tribos: *Helicterereae*, *Byttnerieae*, *Theobromeae* e *Hermannieae* (BYNG et al., 2016; TAIA, 2009).

A *Sterculiaceae* é distribuída nas regiões tropicais, principalmente na América e África. Compreende cerca de 70 gêneros e 1500 espécies incluindo árvores tropicais ou arbustos, lianas e ervas. No Brasil são encontrados aproximadamente 14 gêneros e 165 espécies. As espécies apresentam frutos folículos ou cápsulas, que se abrem na maturação e alguns frutos permanecem fechados, suas sementes são envolvidas por uma polpa (CRUZ & ESTEVES, 2009; NYFFELER et al., 2005; WILKIE et al., 2006).

As classes de metabólitos secundários mais comuns na família são: alcaloides, metilxantinas, terpenos, flavonoides e ácidos graxos. Os gêneros, *Helicteres*, *Waltheria* e *Melochia* são os mais estudados e destacam-se por reportar diversas atividades biológicas (AL MUQARRABUN & AHMAT, 2015).

O gênero *Theobroma* é comumente encontrado em florestas úmidas de regiões tropicais, possui cerca de 22 espécies. Todas as espécies possuem valor comercial, porém, algumas são cultivadas para esse fim como as espécies *T. cacao* e *T. grandiflorum*. A espécie *T. cacao*, por exemplo é cultivada em mais de 50 países, como: Equador, Costa Rica, Venezuela, Colômbia, Guiana, Suriname e Guiana Francesa (MOTAMAYOR et al., 2008; RONDÓN & CAMPOS, 2005; SOUZA & LORENZI, 2005).

3.1.1 *Theobroma cacao*

A espécie *T. cacao* é uma árvore que pode atingir aproximadamente 10 metros de altura e se desenvolve melhor em altitudes de 30 a 300 m de altura. É considerada um arbusto

de sub-bosque apresentando um tronco liso, com folhas grandes e suas flores se localizam no tronco onde os frutos florescem em diferentes tamanhos (AFOAKWA, 2010; NAKAYAMA et al., 1996; WEISBURGER, 2001). É uma planta nativa de florestas tropicais do continente americano, com isso é naturalmente encontrada em Honduras, Venezuela, México, assim como nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco (MOTAMAYOR et al., 2008; POHLAN & PÉREZ, 2010).

Motamayor e colaboradores (2008) definiram 10 grupos ou variações para *T. cacao*: Maraño, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purus, Nacional e Guiana. Porém, a classificação mais utilizada é a tradicional, onde temos: Criollo, Forastero e Trinitario. A literatura relata que a variedade mais utilizada é a Forastero, sendo que 80% de sua produção é utilizada para a produção de chocolate, por outro lado o Trinitario e Criollo utiliza-se apenas 10-15% e 5-10%, respectivamente para a produção de chocolate (RUSCONI & CONTI, 2010).

As sementes de *T. cacao* apresentam uma grande importância econômica, pois é a principal matéria prima para a produção de chocolate. Em 2016, o mercado global arrecadou US \$ 98,3 bilhões com a produção de chocolate. Os maiores produtores de cacau hoje são, Costa do Marfim, Gana, Camarões, Nigéria e Indonésia, sendo o Brasil o 5º do ranking. Estima-se que o preço médio de uma tonelada de grãos de cacau seja 3.105,00 dólares o equivalente à 12,5 bilhões de dólares em custos comerciais a cada ano (MARKETSTANDMARKETS, 2016; PATRAS et al., 2014).

As cascas das sementes de cacau constitui de 12 a 20% da semente, é um subproduto das indústrias de produção de chocolate, na maioria das vezes é considerada lixo, pois se utilizada, interfere na qualidade do produto (BECKETT, 2011, 2019). A presença das cascas afeta negativamente as seguintes características: odor, textura e sabor. Outro problema relacionado as cascas das sementes do cacau é o grande teor de fibras, que pode ocasionar abrasão do equipamento que o produto de cacau está sendo produzido. Por isso o teor de cascas

das sementes em qualquer matéria seca de cacau se tornou um parâmetro de qualidade (OKIYAMA et al., 2017; QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2018).

A literatura relata a presença de compostos fenólicos como as procianidinas, que podem ser responsáveis pela atividade antioxidante e antimicrobiana já relatada nas cascas das sementes de cacau (LECUMBERRI et al., 2007; NSOR-ATINDANA et al., 2012; PÉREZ; et al., 2015). Há presença de fibras, metilxantinas e uma grande porcentagem de gordura que se assemelha com o perfil da manteiga de cacau (ARLORIO et al., 2008; MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2015; OKIYAMA et al., 2017).

As aplicações comuns das cascas das sementes do cacau estão relacionadas a combustível para caldeiras, ração para animais, preparação de fertilizantes, produção de biogás, adsorção de Ni^{2+} no tratamento de água, produção de alimentos funcionais (BECKETT, 2009; KALAIVANI et al., 2015; MANCINI et al., 2016; MARTÍNEZ et al., 2012; NTIAMOAH & AFRANE, 2008)

Elevados percentuais de gordura são encontrados nas sementes de *T. cacao* (GENOVESE & BARROS, 2017). Os ácidos palmíticos, esteárico e oleico são predominantes na fração lipídica das sementes (BRUNI et al., 2000). Muitos polifenóis com potencial antioxidante, já foram relatados (PEDAN et al., 2016).

Quimicamente as folhas de *T. cacao* são caracterizadas pela presença flavonoides e fenil propanoides: (-)-epicatequina, isovetexina, leucocianidina, cianidina-3-galactosídeo, (-)-epicatequina 8-C- β -D-galactosídeo, Bis-8,8'-catequinilmetano, 3-O-galactopiranosil cinamtanina B1 (HATANO et al., 2002), ácido *p*-coumaroilquinico, ácido clorogênico (JALAL, 1977). O quadro 1 apresenta a variedade de substâncias fenólicas já relatadas na espécie.

Quadro 1. Substância fenólicas descritas em *T. cacao*

Substâncias	Parte da planta	Referência
(-)-epicatequina	Folhas, cascas, galhos, raiz, caule, sementes	Jalal, 1977; Ortega et al., 2010; Sotelo et al., 2015
(+)-epicatequina	Sementes	Ortega et al., 2010
Ácido clorogênico	Folhas, galhos, raiz, caule, sementes	Jalal, 1977
(+)-catequina	Folhas e sementes	Jalal, 1977; Pedan et al, 2016
(-)-catequina	Folhas e sementes	Jalal, 1977; Pedan et al, 2016
Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo (Isoquercetrina)	Folhas e sementes	Jalal, 1977; Pedan et al, 2016
Quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo	Folhas e sementes	Jalal, 1977 Pereira-Caro,2013
Apigenina-7- <i>O</i> -glucosídeo	Folhas	Jalal, 1977
Luteolina-7- <i>O</i> -glucosídeo	Folhas	Jalal, 1977
Crisoeriol-7- <i>O</i> -glicosídeo	Folhas	Jalal, 1977
Vitexina (Apigenina-8- <i>C</i> -glucosídeo)	Folhas e sementes	Jalal, 1977; Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Isovitexina (Apigenina-6- <i>C</i> -glucosídeo)	Folhas e sementes	Jalal, 1977; Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Ácido cafeico	Caule e sementes	Jalal, 1977
(-)-Epigalocatequina	Sementes	Elwers et al., 2009
Cianidina 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucosídeo	Sementes	Elwers et al., 2009
Cianidina 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinosídeo	Sementes	Elwers et al., 2009
Quercetina	Sementes	Oracz et al, 2015
Quercetina-3- <i>O</i> -arabinosídeo	Sementes	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Epicatequina-5- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosídeo	Sementes	Cádiz-Gurrea et al., 2014
N-cafeoil- <i>L</i> -aspartato	Sementes	Pereira-Caro et al., 2013
Ácido <i>L</i> -aspartico	Sementes	Cádiz-Gurrea et al., 2014
Quercetina glucoronídeo	Sementes	Cádiz-Gurrea et al., 2014
Ácido isocítrico	Sementes	Cádiz-Gurrea et al., 2014
Clovamida	Sementes	Cádiz-Gurrea et al., 2014

Ácido hidroxijasmônico sulfato	Sementes	Patras et al., 2014
Caempferol-3- <i>O</i> -hexosídeo	Sementes	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Caempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	Sementes	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Luteolina	Sementes	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Naringenina hexosídeo	Sementes	D'Souza et al., 2017
Leucocianidina	Sementes	Jalal, 1977
Cianidina-3- <i>O</i> -galactosídeo	Folhas e sementes	Brito et al., 2017; Pereira-Caro et al., 2013
Epicatequina- <i>O</i> -hexosídeo	Sementes	Cádiz-Gurrea et al., 2014; Patras et al., 2014
Dideoxiclovamida	Sementes	Pereira-Caro et al., 2013
Ácido 12-hidroxi jasmônico sulfato	Sementes	Patras et al., 2014
Leucocianidina 1	Sementes	Quesnel, 1968
Apigenina	Sementes	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Naringenina	Sementes	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
Ácido cumárico	Sementes	Katz et al., 2011
Ácido felúrico	Sementes	Katz et al., 2011
Ácido siríngico	Sementes	Katz et al., 2011
Ácido gálico	Cascas e sementes	Valadez-Carmona et al., 2017
(+)-epigallocatequina	Sementes	Wollgast et al., 2000
Orientina (luteolina-8- <i>C</i> -glucosídeo)	Sementes	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
(-)-Catequina-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Catequina-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> ,8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -diglucopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Catequina-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Epicatequina-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Epicatequina-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> ,8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -diglucopyranoside	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Epicatequin-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Catequina-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -galactopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005

(-)-Catequina-6-C- β - _D ,8-C- β - _D -digalactopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Catequina-6-C- β - _D -galactopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Epicatequina-6-C- β - _D ,8-C- β - _D -digalactopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005
(-)-Epicatequina-8-C- β - _D -galactopiranosídeo	Sementes	Stark & Hofmann, 2005

As metilxantinas também são encontradas na espécie *T. cacao*, sendo os mais comuns: teobromina, cafeína e teofilina (SOTELO & ALVAREZ, 1991). Estas substâncias encontram-se distribuídas em todas as partes da planta (AL MUQARRABUN & AHMAT, 2015). Os diferentes alcaloides encontrados em *T. cacao*, podem ser observados no quadro 2.

Quadro 2. Alcaloides relatados *T. cacao*

Substâncias	Parte da planta	Referência
Teobromina	Sementes, folhas e cascas das sementes	Cádiz-Gurrea et al., 2014; Hammerstone et al., 1994
Cafeína	Sementes, folhas e cascas das sementes	Brunetto et al., 2007; Carrillo et al., 2015; Ortega et al., 2010
Teofilina	Sementes, folhas e cascas das sementes	Brunetto et al., 2007; Gurney et al., 1991; Sotelo & Alvarez, 1991
7-metilxantina	Sementes	Gurney et al., 1991
1-metilxantina	Sementes	Koyama et al., 2003
3- metilxantina	Sementes, folhas e cascas das sementes	Koyama et al., 2003
(R)Salsolinol	Cacau em pó	Melzig et al., 2000
Salsolina	Cacau em pó	Melzig et al., 2000
Paraxantina	Sementes	Melzig et al., 2000
Espermidina	Sementes	Brito et al., 2017
Espermina	Sementes	Brito et al., 2017
Tiramina	Sementes	Brito et al., 2017
Triptamina	Sementes	Brito et al., 2017

Pode-se destacar a presença das metilxantinas, cafeína, teofilina e teobromina em várias partes da planta, além disso podem ser encontradas em outras espécies do gênero como, *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. angustifolium*, *T. simiarum*, *T. mammosum* (AL MUQARRABUN & AHMAT, 2015)

3.1.2 *Theobroma grandiflorum*

A espécie *T. grandiflorum* comumente conhecida como cupuaçu, é nativa da Amazônia, com predominância no sul e sudoeste do Pará, parte do Maranhão e Tocantins. Devido a sua importância econômica a espécie é largamente cultivada em outros estados do Brasil assim como em diversos países tropicais da América, como: Equador, Costa Rica, Venezuela, Colômbia, Guiana Suriname e Guiana Francesa (YANG et al., 2003).

A sua árvore (cupuaçuzeiro) é de médio porte, podendo atingir até 20 m de altura sob condições naturais, porém quando cultivada atinge cerca de 8 m. Suas folhas são longas e largas variando de 25 a 30 cm de comprimento e 10 a 15 cm de largura; quando jovens as folhas são róseas e adultas possuem coloração verde-escura com flores vermelhas (GONDIM et al., 2001; QUIJANO & PINO, 2007).

O fruto de *T. grandiflorum* possui um epicarpo marrom e duro, e seu endocarpo carnoso. Quanto ao formato pode ser diversificado: redondo, elíptico, obovado, oblongo e ovado, contudo o diâmetro e comprimento podem variar respectivamente de 12 a 25 cm e de 10 a 12 cm e por consequência o peso do fruto também varia, sendo de 500 a 4.500 g. Cada fruto possui cerca de 20 a 50 sementes, sendo este o maior fruto do gênero (GONDIM et al., 2001).

O epicarpo do fruto representa 42,16 % do peso integral do fruto, sendo que as sementes representam cerca de 14,20%, com isso nota-se que maior parte do fruto é resíduo do seu processamento. Estas partes normalmente são descartadas por falta de utilidade, por esse

fato se dá a importância de estudos da composição química desses resíduos atribuindo valor e utilidade para esses resíduos (LIMA, 2013)

O cupuaçu é apreciado devido à acidez de sua polpa e aroma. É tipicamente utilizada para produzir sucos, doces, sorvetes, licores, cremes (CUCAITA et al., 2014). O epicarpo do fruto é utilizado para a produção de pães, tendo em vista, a presença de 79,8% de fibra alimentar, não ocasionando alterações físicas, químicas ou sensoriais nos pães produzidos (SALGADO et al., 2011). As sementes são utilizadas na produção do cupulate, assim como as sementes do cacau, sem apresentar alteração significativa nas características físico-químicas, além disso, as indústrias de cosméticos e farmacêutica utilizam as sementes do fruto como matéria prima, o que desenvolve o valor comercial do fruto (YAMAGUCHI et al., 2018).

O mesocarpo do fruto de *T. grandiflorum* possui um pH de 3,4, o que caracteriza o aroma e o sabor ácido. Apresenta-se rico em fibras (14,3%), mas também em proteínas, lipídios, cinzas e matéria seca. Segundo Rogez e colaboradores (2004) o mesocarpo é rico em aminoácido e ácidos graxos, como: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido α -linoleico. Os minerais presentes em maior quantidade são: potássio, magnésio e fósforo. As substâncias responsáveis pelo aroma particular do cupuaçu são o ácido butanoico (**2**), linalol (**3**), hexanoato de etila (**1**), encontrados majoritariamente no mesocarpo do fruto (QUIJANO; PINO, 2007). Outros compostos voláteis já foram relatados na literatura, sendo estes, ácido acético (**6**), eugenol (**4**), terpinoleno (**5**) e entre outros (figura 1) (ROGEZ et al., 2004).

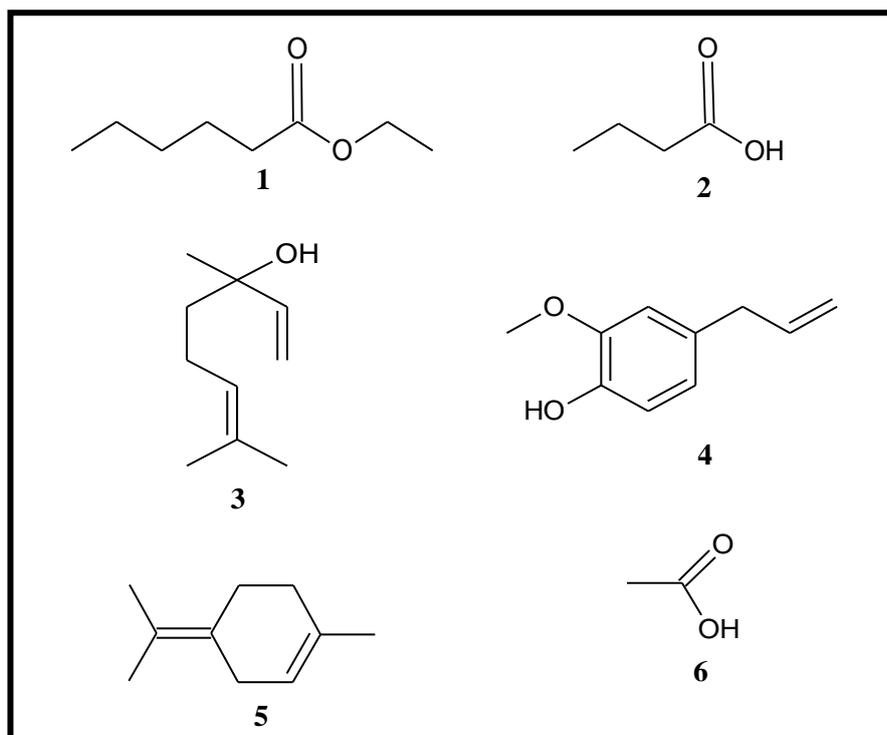


Figura 1. Compostos voláteis presentes em *T. grandiflorum*

Segundo Vasconcelos e colaboradores (1975) os ácidos graxos encontrados no endocarpo de *T. grandiflorum*, são também encontrados no endocarpo de *T. cacao*, porém com percentuais diferentes, um exemplo é o ácido oleico que no cupuaçu encontra-se com 42,8% e no cacau com 29,6 %, sendo um indicativo de semelhança na composição química das espécies. O método de extração utilizado com maior êxito para obter compostos voláteis é a partição líquido-líquido e a forma de detectá-lo é utilizar a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) ou com detector de massas (CG-EM) (QUIJANO & PINO, 2007).

O cupuaçu é conhecido por apresentar atividade antioxidante, tanto na polpa quanto nas sementes. O potencial antioxidante é maior nas sementes, pois estas são ricas em compostos fenólicos (CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2011; PUGLIESE et al., 2013), como: clovamida (7) (BARROS et al., 2016), (+)-catequina (8), (-)-epicatequina (9), quercetina (10), quercetina 3-*O*- β -*D*-glucoronídeo 6''-metil éster (11), quercetina 3-*O*- β -*D*-glucoronídeo (12), campeferol (13), isoscutelareina 8-*O*- β -*D*-glucoronídeo 3''-*O*-sulfato (Teograndina I) (14), hipolaetina 3'-

metil éter 8-*O*- β -*D*- glucoronídeo sulfato (Teograndina II) (**15**), hipolaetina 8-*O*- β -*D*- glucoronídeo (**16**), isolcutelareina 8-*O*- β -*D*- glucoronídeo 6''- metil éster (**17**) (figura 2) (PUGLIESE et al., 2013; YANG et al., 2003).

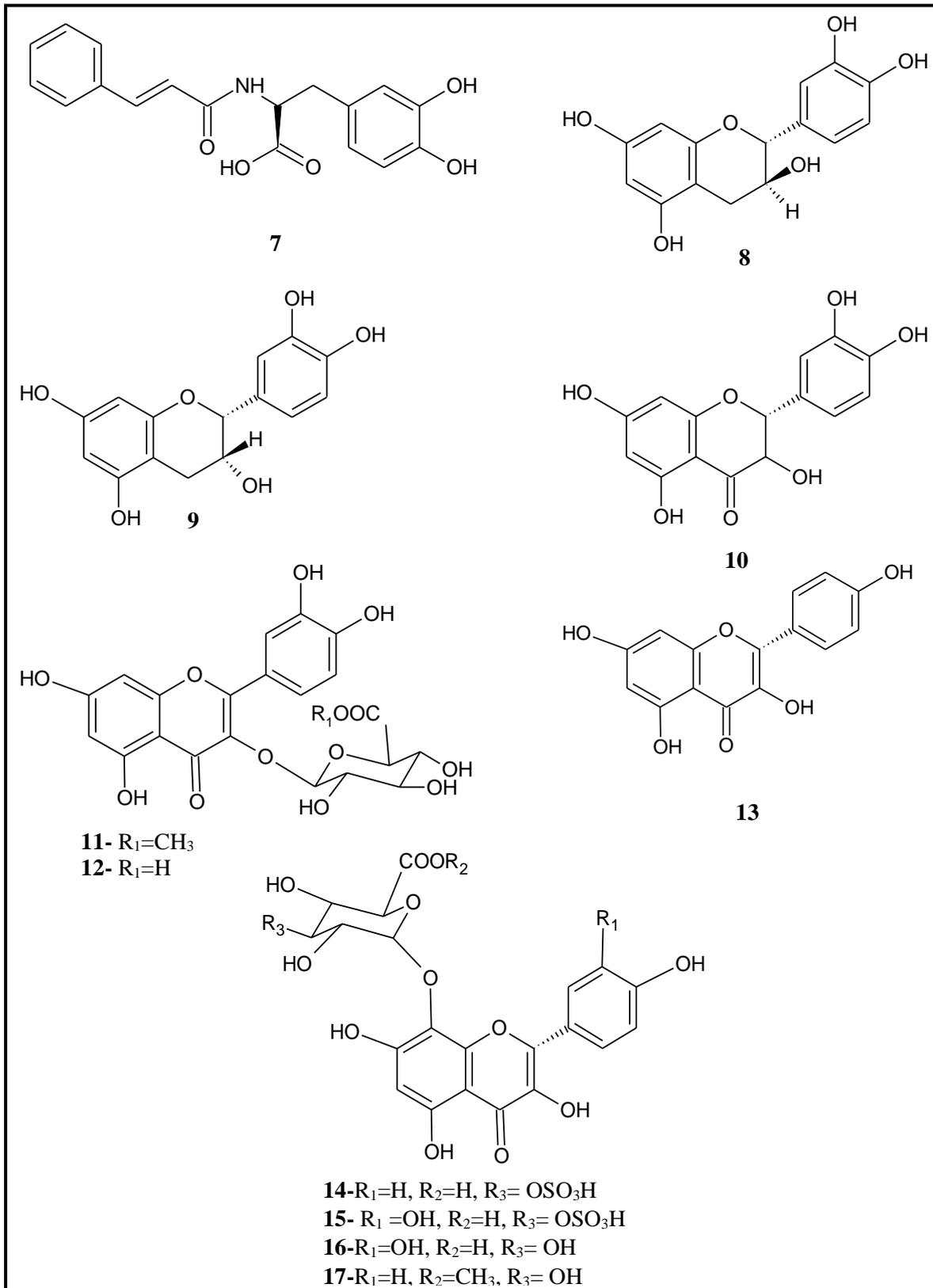


Figura 2. Flavonoides relacionados na espécie *T. grandiflorum*

As cascas de cupuaçu apresentam um potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH, de acordo com o trabalho de Lima (2013) o extrato hidroalcoólico das cascas apresenta

um CI_{50} de 69,5 $\mu\text{g/mL}$, que por sua vez possui compostos fenólicos que podem ser responsáveis por essa atividade. Os compostos fenólicos detectados por Espectrometria de Massas foram: ácido cis-caftárico, ácido-p-coumaroilhexose, ácido cafeico, ácido clorogênico, catequina e teograndina II.

É necessário um estudo mais aprofundado dos compostos fenólicos das cascas de cupuaçu, devido à escassez de trabalhos encontrados na literatura. As cascas representam 42,16% de resíduo gerado pelas indústrias alimentícias, sendo assim uma possível matéria prima para um bioproduto, tendo em vista o seu potencial antioxidante (LIMA, 2013).

Além de compostos voláteis e fenólicos, alcaloides também podem ser encontrados na espécie *T. grandiflorum*. Os alcaloides já relatados na literatura são do tipo purínico, como: cafeína (**18**), teobromina (**19**), teofilina (**20**) e teacrina (**21**), que podem ser observados na figura 3 (HAMMERSTONE et al., 1999; LIMA, 2013; VASCONCELOS et al., 1975).

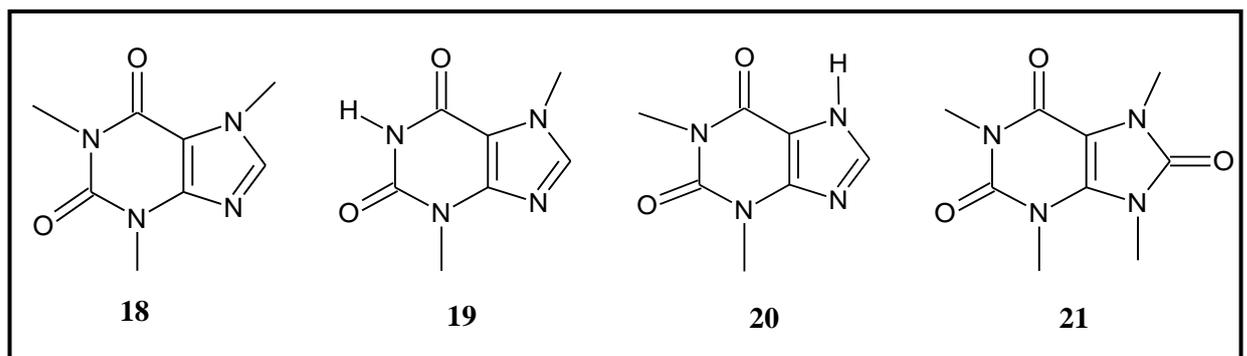


Figura 3. Metilxantinas encontradas em *T. grandiflorum*

As metilxantinas apresentam grande importância comercial, pois possuem atividades farmacológicas, como: atuação no sistema nervoso central, cardiovascular, renal e digestório. Dentre as metilxantinas a que mais se destaca é a cafeína, sendo o alcaloide mais consumido no mundo. Apresenta o papel de estimulante natural, em bebidas, chás e refrigerantes. A cafeína, também é utilizada em diferentes medicamentos, com ação analgésica e antiinfluenza relacionada ao ácido acetilsalicílico e ao paracetamol. A teofilina é utilizada como droga, para alívio de asma (DEWICK, 2002; RATES, 2007).

3.1.3 *Theobroma subincanum*

T. subincanum é uma espécie frutífera nativa da Amazônia, conhecida como cupuí. Encontra-se distribuída por toda bacia Amazônica, Venezuela e Guiana Francesa. Apesar de seus frutos apresentarem menor importância econômica em relação a espécie *T. grandiflorum* e *T. cacao*, são consumidos tanto como fruta fresca, quanto o suco da polpa (CUATRECASAS, 1964).

A árvore da espécie pode atingir de 6 a 12 m de altura, o tronco possui de 15 a 20 cm de diâmetro. As folhas são alongadas, grossas e com coloração verde, com um comprimento que pode variar entre 14 a 60 cm e de 5 a 17 cm de largura (JUDD et al., 2002). O fruto (cupuí) possui um formato elipsoide, com um comprimento de 15 cm e 8 cm de diâmetro. Sua polpa é branca e levemente amarelada e sem odor (CUATRECASAS, 1964). Addison & Tavares (1951), relatam que esta espécie possui uma afinidade genética com outras espécies do gênero *Theobroma*, principalmente com *T. grandiflorum* e *T. obovatum*, permitindo a obtenção de híbridos.

Martini & Tavares (2005) considera *T. subincanum* uma das espécies menos estudadas do gênero. Este fato é visível em relação a estudos químicos da espécie, poucos são os estudos que relatam o perfil químico dos extratos de diferentes partes do fruto e até mesmo da árvore. O principal trabalho, é acerca da composição de lipídios das sementes de *T. subincanum* é de Bruni (2000), onde a fração lipídica das sementes de *T. subincanum* é comparada a fração lipídica de *T. cacao*. Foram detectados os seguintes substâncias: esqualeno (**22**), cicloartenol (**23**), 24-metileno cicloartenol (**24**), D5-avenasterol (**25**), campesterol (**26**), além de ácidos graxos como: ácido palmítico (**27**), ácido esteárico (**28**), ácido oleico (**29**), ácido eicosanoico (**30**) (figura 4).

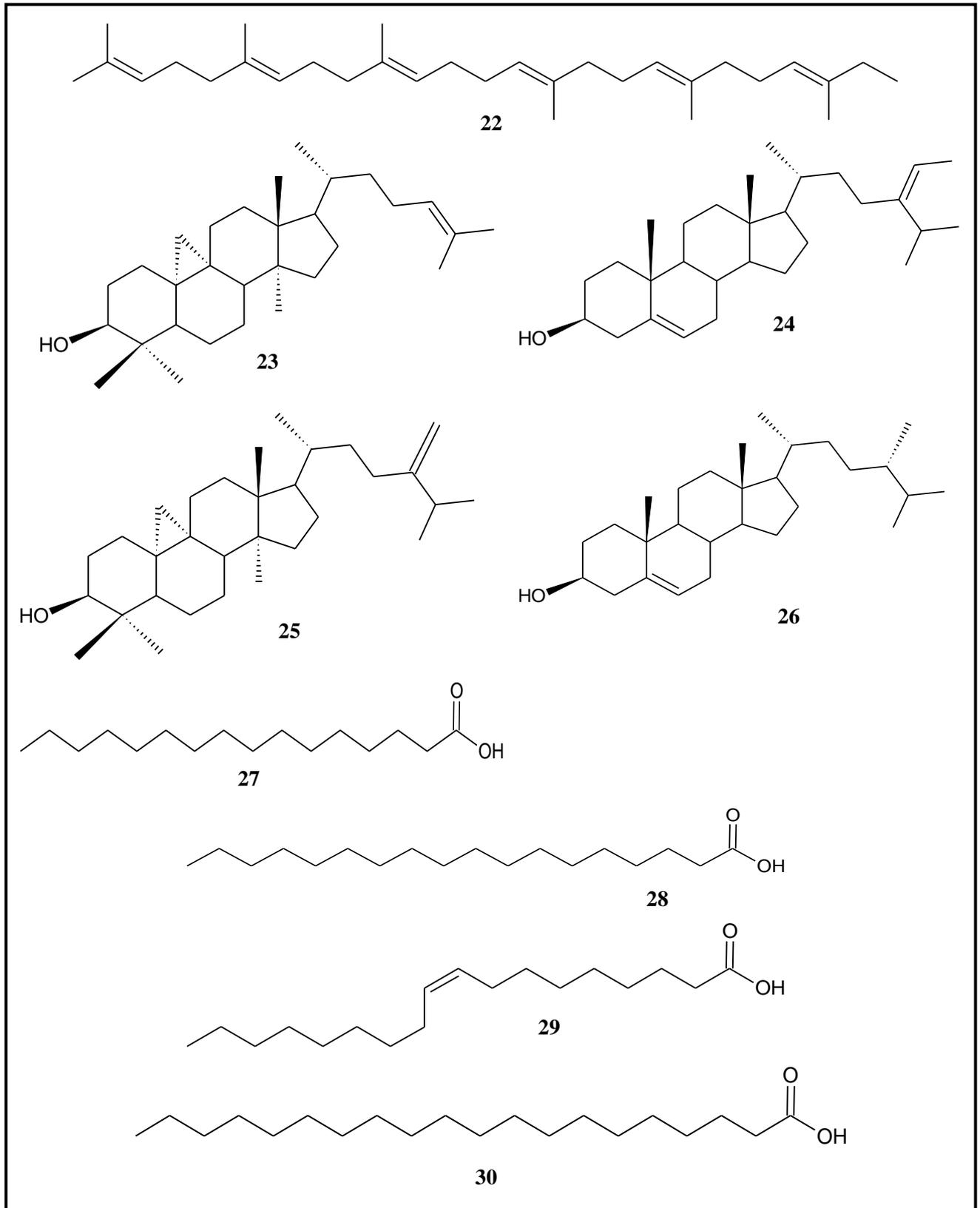


Figura 4. Terpenóides e esteroides detectados em *T. subincanum*

As metilxantinas teacrina (HAMMERSTONE et al., 1994) e teobromina (AQUIJE, 2014) foram detectadas nas sementes de cupuí. Apesar de não haver relatos de detecção ou isolamento de fenólicos na espécie, SOTERO e colaboradores (2012), relataram atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH para as cascas e raízes da árvore. Este trabalho revela um potencial da espécie na busca de compostos fenólicos responsáveis por tal atividade.

3.2 Flavonoides

A classe dos flavonoides são metabólitos secundários considerados uma das mais numerosas e são encontrados amplamente em frutas, folhas, chás e vinhos. Atuam como pigmentos naturais, e protegem as plantas contra agentes oxidantes, insetos, fungos, vírus e bactérias, além disso, atraem animais para polinização (LOPES et al., 2017; ZUANAZZI & MONTANA, 2007). Os flavonoides são substâncias de baixo peso molecular que apresentam um esqueleto comum (figura 5), com quinze carbonos formado por duas fenilas ligadas a um anel pirano.

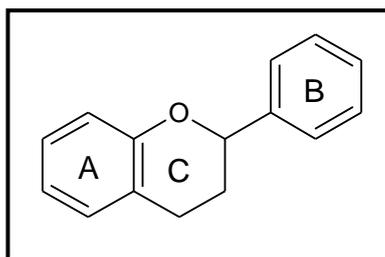


Figura 5. Esqueleto básico dos flavonoides

Os flavonoides são biossintetizados por uma rota mista. A formação do anel B (C_6C_3) se dá pela rota do chiquimato que origina o ácido cafeico, ácido felúrico e sináptico. O anel A é formado pela via do acetato/malonato que dá origem aos poliketóides que quando são condensados com o ácido cinâmico ou derivados, originam as chalconas precursoras das diferentes classes dos flavonoides (DEWICK, 2002).

As diferentes formas de substituição no anel C (figura 5), são responsáveis pela classificação dos flavonoides. As substituições de oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação ou sulfonação nos anéis A e B, formam diferentes substâncias em cada classe, totalizando mais de quatro mil compostos. As principais classes são: antocianinas, flavanas, flavano-3-ol, flavonóis, isoflavonóis (ANGELO & JORGE, 2007).

A classe dos flavonóis são os flavonoides mais abundantes e amplamente distribuídos na natureza. Um exemplo é o campeferol que apresenta várias atividades farmacológicas, como: atividade antioxidante, anticancerígena, cardioprotetora, antialérgica e antidiabética (PARK et al., 2012). A quercetina é outro exemplo de flavonol, caracterizada por inúmeras atividades biológicas associadas a presença dos grupos hidroxilas na sua estrutura química (SUZUKI & HARA, 2009).

Os flavano-3-óis inclui duas subclasses, os monômeros representados pelas catequinas, e polímeros representados pelas proantocianidinas. A epigalocatequina-3-galato (EGCG) é um exemplo de uma catequina de maior abundância no chá verde (*Camellia sinensis*) representando cerca de 50 % das catequinas encontradas no chá. Na literatura já foram relatadas várias atividades farmacológicas, contra a doença de Parkinson, antioxidante e contra o Mal de Alzheimer, atividade anti-obesidade e anticâncer (NICOLETTI et al., 2019; WANG et al., 2011).

As flavonas são encontradas em menor porcentagem em frutas e legumes, quando comparadas com os flavonóis. A luteolina é uma flavona glicosídica já relatada em plantas e vegetais, apresentando atividade antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, antialérgica (IMRAN et al., 2019). Antocianinas são uma classe importante pois representa os pigmentos responsável pelas cores das frutas, flores e folhas. Já foram relatadas atividade antioxidante, antibacteriana e anticâncer para diversas antocianinas (ATNIP et al., 2019; WU et al., 2011).

3.2 Técnicas cromatográficas e espectrométrica utilizadas para comparação de perfis químicos de espécies vegetais

3.3.1 Cromatografia

O termo cromatografia é derivado das palavras *chrom* e *graphie* que significa respectivamente cor e escrita. A cromatografia é definida como um método físico-químico de separação de misturas, fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma amostra, entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária que são imiscíveis. A versatilidade e a ampla aplicação das técnicas cromatográficas se dá pela variedade de combinações possíveis entre as fases móveis e estacionárias (DEGANI et al., 1998).

As técnicas cromatográficas podem ser utilizadas para a identificação de compostos utilizando padrões como referências e isolamento de compostos. Diversos são os tipos de técnicas cromatográficas, que podem ser observadas na figura 6.

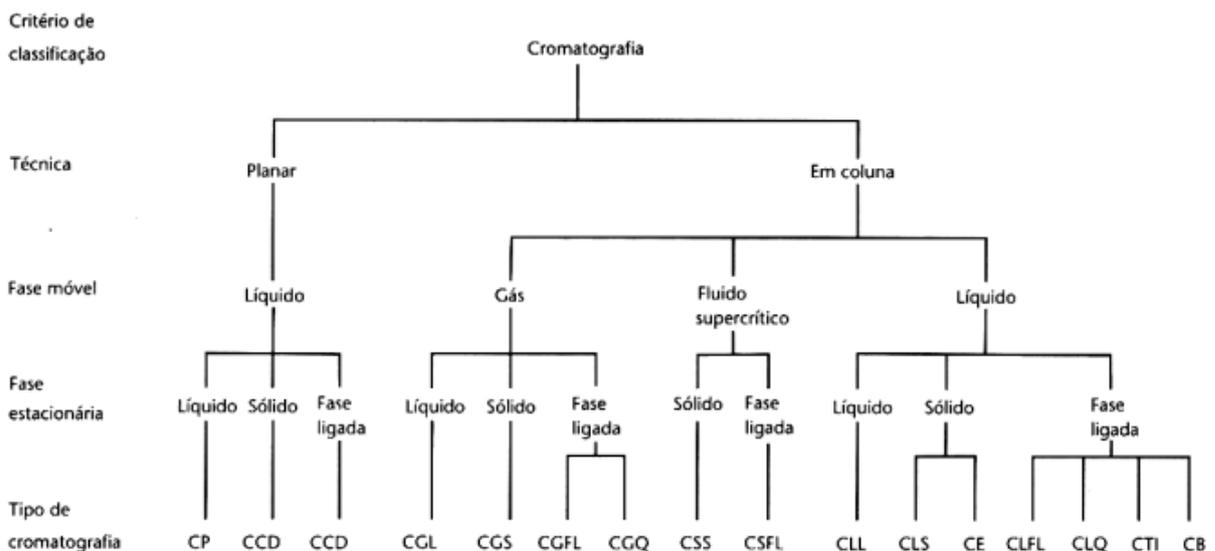


Figura 6. Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia.

Fonte: COLLINS, 2006

As diversas técnicas cromatográficas podem ser classificadas, com diferentes critérios, como: forma física do sistema, fase móvel, fase estacionária, porém o critério mais comum é o mecanismo de separação relacionado aos diferentes tipos de fases utilizadas. Em relação a

forma física a cromatografia pode ser subdividida em coluna e planar. Quanto a fase móvel pode ser subdividida em: gasosa, líquida e supercrítica. Em se tratar de fase estacionária, são três tipos, sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. A classificação por mecanismo de separação é da seguinte forma: adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou mistura dos mecanismos (COLLINS et al., 1997; DEGANI et al., 1998).

3.3.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)

A CCD e a CCDAE são técnicas cromatográficas que se fundamentam no fenômeno de adsorção líquido-sólido. A separação se dá pelo processo de migração diferencial dos compostos, sobre uma camada delgada de um adsorvente retido em uma superfície plana (DEGANI et al., 1998). Essas técnicas possuem uma grande utilização, pois são utilizadas para avaliar a polaridade de extratos, avaliar a purificação de uma substância e como uma ferramenta para comparar análises de outras técnicas cromatográficas (COLLINS et al., 1997).

A CCD pode ser utilizada tanto em escala analítica para análise preliminar de fracionamentos, em análises de comparações com padrões para caracterização química, monitoramento de reações orgânicas, quanto em escala preparativa para o isolamento de substâncias, onde a escala depende da quantidade de amostra e da espessura da fase estacionária. Estas aplicações também são atribuídas a CCDAE (COLLINS et al., 1997).

A fase estacionária nestas técnicas é sólida, sendo a sílica gel a fase móvel mais utilizada, seguida pela alumina, terra diatomácea e pela celulose. A utilização de fases estacionárias modificadas pode mudar o processo de separação da técnica, podendo ocorrer os fenômenos de partição ou troca iônica, o que permite a separação de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas. A fase móvel é líquida, que pode ser constituída de misturas de solventes orgânicos, ácidos e bases, estas misturas irão variar de acordo com a natureza da amostra a ser analisada (DEGANI et al., 1998).

Apesar de várias aplicações em comum as técnicas CCD e CCDAE possuem diferenças. As principais diferenças envolvem a fase estacionária, modo de aplicação e eluição. A placa cromatográfica da CCDAE possui como fase estacionária a sílica com partículas de 5 μm que são menores que as partículas da sílica utilizada na CCD (20 μm), o que possibilita a obtenção de separações mais rápidas e eficientes tendo assim uma maior resolução nos cromatogramas, além disso aplicação de menor quantidade de amostra e um limite de detecção mais baixo. A aplicação e eluição na CCDAE são realizadas de modo automatizado, tendo assim um controle no volume de aplicação de amostra e um equilíbrio melhor na eluição (COLLINS et al., 1997).

3.3.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

É um tipo de cromatografia líquida que utiliza suportes com partículas de diminutas granulometrias, sendo estas responsáveis pela alta eficiência, pelas quais se faz necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel (DEGANI *et al.*, 1996). O mecanismo de separação em CLAE pode ocorrer por adsorção, partição ou ambos. A fase estacionária mais utilizada é sílica, porém esta é utilizada com modificadores o que possibilita um leque de aplicações, dependendo a modificação na fase móvel, realiza-se a técnica tanto no modo normal, quanto no modo reverso. Na fase normal a fase estacionária é polar e a fase móvel é menos polar, já na fase reversa a fase estacionária é mais apolar e sua fase estacionária polar, sendo está a forma mais utilizada (COLLINS et al., 1997; DEGANI et al., 1998).

A fase estacionária em fase reversa mais utilizada é o suporte C18 (octadecil-sílica), com partículas de 5 a 2 μm . Neste caso utiliza-se como fase móvel mistura de solventes de média e alta polaridade (acetonitrila, metanol ou água acidificada). As colunas nas quais as estacionárias se encontram são de aço inoxidável com diâmetro interno de 0,45 cm para separações no modo analítico com objetivo de quantificar e caracterizar substâncias e amostras,

e diâmetro interno de 2,2 cm para análises no modo preparativo com o objetivo de realizar o isolamento de substâncias.

A fase móvel na CLAE deve ser um solvente de alta pureza, ou seja, solventes de grau cromatográfico. A amostra a ser analisada deve ser solúvel na fase móvel e não sofra decomposição na mesma, para que esta possa ser eluída devidamente na coluna sem ocorrer precipitação durante a eluição ou no detector. Além disso, a fase móvel deve apresentar baixa viscosidade, pois a viscosidade interfere no efeito de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel (CIOLA, 2000).

A eluição pode ser realizada em modo isocrático, onde a condição inicial da fase móvel permanece constante até o final da análise, e em modo gradiente, onde a composição da fase móvel é modificada no decorrer da análise. As utilizações dessas condições irão depender da amostra ser analisada (SKOOG et al., 2009).

Essa técnica pode ser acoplada a diferentes detectores, como ultravioleta (UV), Arranjo de Diodos (DAD), Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) entre outros. O detector mais utilizado é o DAD, consiste em uma série de fotodiodos posicionados lado a lado num cristal de silício, em que cada comprimento de onda é difratado e atinge um ponto do detector. O detector DAD permite a obtenção da absorvância da amostra em uma faixa de comprimentos de ondas pré-selecionados, fazendo uma varredura abrangendo o ultravioleta e o visível. Com esta ferramenta é possível determinar a região na qual será realizada a análise (SKOOG et al., 2009).

As principais vantagens da técnica são menor tempo de análise, alta resolução, sensibilidade, versatilidade e automatização. Suas limitações estão no alto custo dos equipamentos, alto custo de operação relacionado às colunas e fases estacionárias, e a necessidade de experiência do operador (COLLINS et al., 1997). Esta técnica tem sido amplamente empregada para a análise de metilxantinas em espécies do gênero *Theobroma*,

principalmente na detecção de cafeína em *T. cacao* e na comparação do perfil químico entre as espécies do gênero (CAIN et al., 2019; D'SOUZA et al., 2017; PEREIRA-CARO et al., 2013; PÉREZ-MORA et al., 2018; SOTELO et al., 2015).

3.3.1.3 Espectrometria de Massa (EM)

A espectrometria de massas é uma técnica espectrométrica de alta sensibilidade, utilizada para determinação de estruturas orgânicas e para medida de isótopos. A principal utilidade da EM no estudo de metabólitos secundários, é a medida da razão massa carga a partir da formação de íons de uma molécula ou dos fragmentos de moléculas (HARRIS & LUCY, 2012).

Um equipamento de espectrometria de massas é composto geralmente por: uma fonte de íons, um analisador de massas onde ocorre a seleção de íons, um detector de íon e um processador de sinais que é o computador com o software específico que realiza os cálculos para se obter por fim o espectro de massas. A amostra é injetada na fonte de íon, onde está é convertida em íons por meio de uma fonte de ionização, os íons positivos ou negativos formados são acelerados por um campo elétrico em direção ao analisador de massa. Posteriormente os íons passam pelo detector, onde são transformados em sinais elétricos que são processados e armazenados no computador (HARRIS & LUCY, 2012).

As fontes de ionização mais utilizadas para a análise de substâncias orgânicas são: ionização por elétrons (IE), ionização química (IQ), bombardeamento rápido de átomos (FAB), ionização por dessorção da matriz assistida por laser (MALDI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por electrospray (ESI) (HARRIS & LUCY, 2012).

A ionização por *electrospray* é a mais utilizada em produtos naturais, principalmente para detecção de substâncias fenólicas, nessa fonte ocorre a formação de um feixe eletrostático, onde ocorre a transferência de íons existentes em uma solução para a fase gasosa. No decorrer desse processo, pequenas gotas carregadas são formadas na forma de cone (Cone de Taylor), e

são fragmentadas com a aplicação de uma diferença de potencial (ddp) entre um capilar e um contra eletrodo, sob pressão atmosférica, com isso formam os íons de interesse. Em suma este processo pode ser dividido em três partes: nebulização, liberação de íons e o transporte de íon da região de pressão atmosférica da fonte para a região de alto vácuo do analisador (HAM, 2008).

O último estágio de um experimento em espectrometria de massas é o analisador de massas, onde a massa molecular dos íons é avaliada. Os tipos mais comuns são o TOF (tempo de voo), quadrupolo e o *ion trap*. Outro tipo de analisador que está sendo explorado nos últimos 4 anos é o *orbitrap* (BARBOSA et al., 2012; MAKAROV & SCIGELOVA, 2010). Nos analisadores TOF, os íons formados são acelerados através de um potencial entre dois eletrodos que em seguida atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional à sua massa. Ao ser detectado o íon, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é derivado para o cálculo no m/z (BARBOSA et al., 2012).

O analisador do tipo *ion trap* (IT) ou armadilha de íons funciona como um filtro que aprisiona os íons de interesse em um campo elétrico tridimensional, que são gradualmente liberados em ordem de m/z crescente. O *orbitrap* é um tipo de analisador IT, onde os íons oscilam ao longo e ao redor de um eletrodo em forma de espiral. A frequência dessa oscilação é proporcional à raiz quadrada da razão m/z e pode ser determinada com alta precisão (BARBOSA et al., 2012). Normalmente o analisador *orbitrap* é utilizado para aplicações em proteômica, porém já foram relatadas várias aplicações em análise de moléculas pequenas, análise de metaboloma ou derreplicação de produtos naturais, e extratos complexos de plantas que utilizaram o *orbitrap* acoplado a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência e obtiveram alta resolução em seus resultados (ALVAREZ-RIVERA et al., 2019).

3.4 Quimiometria

A quimiometria é uma ciência descrita pela interação de métodos matemáticos estatísticos num processo de medida química, tendo como objetivo analisar dados multivariados para se extrair o máximo de informações químicas relevantes a partir dos dados obtidos (BROWN, 2017; GRANATO et al., 2018). A escolha de um método quimiométrico está ligada a dimensionalidade dos dados, para isso é necessário classificá-la em ordens, como: ordem zero (dados univariados), primeira ordem (dados multivariados), segunda ordem (obtem-se uma matriz experimental para cada amostra) (BONA et al., 2018).

Ao utilizar dados de natureza multivariada, os métodos estatísticos podem ser classificados em, métodos de calibração (regressão por mínimos quadrados discriminante - PLSR), classificação (mínimos quadrados parciais com análise discriminante -PLS-DA) e exploração (análise por componentes principais-PCA) (BONA et al., 2018; GRANATO et al., 2018).

A análise de componentes principais (PCA) é uma análise multivariada empregada para transformar as coordenadas das amostras em dados mais convenientes para a análise de dados. O método permite identificar padrões em diferentes dados e destacar as diferenças e semelhanças entre as amostras reduzindo a dimensionalidade sem perder informações (DA SILVA SAUTHIER et al., 2019). Em espécies do gênero *Theobroma*, a PCA já foi aplicada, como por exemplo, análise do teor em massa das cascas das sementes de cacau em produtos de cacau (CAIN et al., 2019), classificação de variedades de *T. cacao* (BINDEREIF et al., 2019), formulação de um néctar misto de *T. grandiflorum* e Chá verde (NUNES CLÍMACO et al., 2019) e outras aplicações.

3.5 Análise Metabolômica

Metabolômica faz parte de um conjunto de ciências chamado ômicas, que buscam entender o funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. É definida

como, análise de um conjunto de metabólitos de baixa massa molecular (até m/z 1500) presentes ou alterados em um sistema biológico. A literatura apresenta diversas outras denominações para essa ciência, tais como: perfil metabólico, impressão digital metabólica, *footprinting*; com uma certa divergência nas terminologias aplicadas (CANUTO et al., 2018).

O que todas as terminologias apresentam em comum é que a resposta medida a nível molecular é obtida a partir de uma análise integrada da bioquímica em organismos complexos. As análises metabolômica são classificadas em: metabolômica alvo definida como análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados, ou seja, identificados, de uma determinada classe química ou rota biossintética, e metabolômica global conceituada como análise qualitativa do maior número de metabólitos possível, de diferentes classes químicas. Todas abordagens se referem a dados comparativos entre os grupos de amostras (CANUTO et al., 2018; KUEHNBAUM & BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

O trabalho de Mayorga-Gross e colaboradores (2016) utilizou a metaboloma global para avaliar as alterações que ocorrem no processo de fermentação de variedades de cacau, onde foi observado que os flavonóis e açúcares tendem a diminuir durante a fermentação. Um exemplo de metaboloma alvo é o estudo de Lukic e colaboradores (2019) que descreveu o perfil cromatográfico por CLUAE-EM/EM de 173 vinhos, onde detectou 58 substâncias fenólicas, utilizando os fenólicos na análise metabolômica para avaliar os principais diferenciadores das variedades de vinho. Estes utilizaram réplicas de suas amostras e um rigor no preparo destas levando em conta o controle de qualidade que é necessário para uma análise analítica.

A metabolômica apresenta diversas aplicações, tais como: análises clínicas, alimentos e nutrição, esportes, toxicologia forense, análises de organismos patológicos, produtos naturais, entre outras (KLASSEN et al., 2017). Mayorga-Gross e colaboradores (2016) utilizaram a metabolômica global para analisar as principais alterações que ocorrem no processo de fermentação das sementes de cacau, utilizando dados cromatográficos (CLUAE-ESI⁺-Q-TOF-

MS) que foram processados no modelo de PLS-DA. Foi possível detectar as diferenças significativas durante os períodos de fermentação através do aumento ou diminuição da concentração de alguns metabólitos.

4. METODOLOGIA

A metodologia foi organizada de acordo com o fluxograma da figura 7.

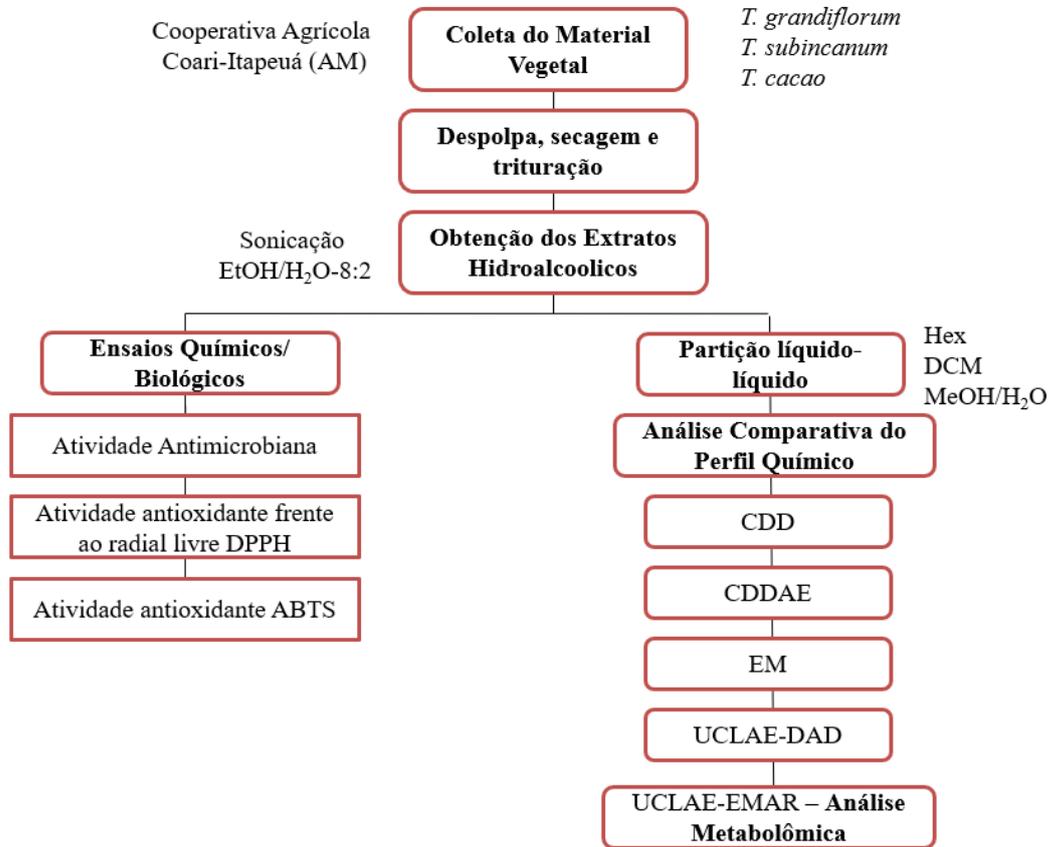


Figura 7. Fluxograma geral da metodologia

4.1 Obtenção de extratos e frações

4.1.1 Coleta do material vegetal

Os frutos de *T. cacao*, *T. grandiflorum* e *T. subincanum* foram cedidos gentilmente pela Cooperativa Agrícola Coari-Itapeuá, localizada no município de Coari no Estado do Amazonas. Todas amostras foram enviadas congeladas. Os frutos foram devidamente higienizados com água corrente, fez-se o processo de despolpa manualmente, separando endocarpo e epicarpo. As sementes das três espécies foram secas em estufa de circulação de ar a 45 °C, após a secagem as cascas das sementes foram retiradas com o auxílio de uma pequena

faca e trituradas em liquidificador de 1,5 L da marca Philips Walita, modelo RI 2101 com 550 W de potência.

4.1.2 Obtenção dos extratos

Os extratos das cascas das sementes das três espécies foram obtidos por maceração a frio exaustiva com EtOH/H₂O na proporção de 8:2, o etanol utilizado foi da marca Química Credie previamente destilado. Todos os extratos foram obtidos em triplicata em pequena escala e posteriormente em maior escala sem réplicas. A proporção massa/solvente foi de 10%, durante 48 h por 5 vezes utilizando o agitador da marca BIOMIXER e modelo TS-2000A VDRL SHAKER. Após a extração o material foi filtrado e o solvente eliminado por evaporador rotatório a pressão reduzida, posteriormente foi pesado, calculado o rendimento e armazenado na geladeira.

4.1.3 Partição líquido-líquido

As partições foram realizadas com o extrato hidroalcoólico das cascas das sementes das três espécies de *Theobroma*. Primeiramente, realizou-se três tipos de partições para se avaliar o comportamento do extrato das sementes de cupuaçu nas partições teste. Em todas partições, o extrato (300 mg) foi solubilizado em 4 mL de MeOH/H₂O (8:2). Na partição 1 o extrato foi particionado com hexano (Hex) e diclorometano (DCM), na partição 2 utilizou-se Hex, clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e na partição 3 utilizou-se Hex e AcOEt.

Após o processo de partição o solvente foi eliminado de cada fração obtida, em evaporador rotatório a pressão reduzida, posteriormente as frações foram pesadas e calculou-se os rendimentos. Analisou-se o perfil cromatográfico e os resultados de EM de cada fração obtida para se escolher a partição mais eficaz.

Após análise dos perfis cromatográficos e de EM das frações realizou-se as partições em maior escala (3g de extrato) com os extratos hidroalcoólico das três espécies de *Theobroma*.

4.2 Perfil Cromatográfico utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos e frações foram submetidos a análise por CCD, utilizando placas cromatográficas de fase normal de gel de sílica (TLC, Sílica gel 60, UV₂₅₄ Aluminium-sheets, Macherey-Nagel, 20 x 20 cm), para avaliar o comportamento cromatográfico. As placas foram previamente limpas com eluição em metanol, em seguida ativadas em estufa a 100 °C durante 1 h. Preparou-se os eluentes de acordo com a natureza da amostra afim de se obter a melhor separação cromatográfica. As placas foram reveladas com: luz ultravioleta (254 e 365 nm), vanilina sulfúrica, NP-PEG, cloreto férrico, anisaldeído e DPPH.

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)

O perfil cromatográfico foi obtido por CCDAE, utilizando placas cromatográficas de fase normal de gel de sílica (CCDAE, Sílica gel 60, F₂₅₄, Aluminium-sheets, Merck, 20x20 cm). As placas foram limpas com metanol e em seguida ativadas em estufa a 100 °C por 1 h. O preparo dos eluentes foram otimizados de acordo com Wagner & Blandt (1996) almejando a melhor separação cromatográfica. Todos os extratos e frações foram comparados com padrões. Os volumes de aplicação foram, 20 µL para os extratos, 10 µL para as frações e 3 µL para os padrões. As placas foram reveladas com: luz ultravioleta (254 e 365 nm), vanilina sulfúrica, anisaldeído, NP-PEG, cloreto férrico, DPPH. A aplicação das amostras foi realizada em modo automatizado no equipamento LINOMAT 5 da marca CAMAG, a revelação em luz ultravioleta foi feita em uma câmara TLC Vizualizer da marca CAMAG, onde foram fotografadas as placas. O software WinCats (versão 1.4.9.2001) foi utilizado para o cálculo do fator de retenção (RF).

4.2.3 Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência Acoplado ao Detector de Arranjo de Diodo (CLUAE-DAD)

A análise cromatográfica dos extratos e frações das três espécies por CLAE-DAD foi realizada em modo analítico (Dionex - Ultimate 3000 automático da Thermo Scientific) com um injetor automático afim obter a comparação do perfil cromatográfico de cada espécie em estudo, assim como dos padrões de flavonoides. As análises foram realizadas em fase reversa, utilizando a coluna Shim-pack H ODS C18-100, 4,6 x 250 mm (Shimadzu). As fases móveis ácido fórmico 0,5% (A) e acetonitrila grau CLAE (B) em diferentes proporções, foram previamente filtradas e degaseificadas. A corrida cromatográfica foi programada com uma vazão de 1 mL/min de acordo com o sistema a seguir: equilíbrio isocrático de 10% durante 5 minutos, gradiente de 10% a 50% (5-25 min), isocrático de 50% (25-30 min) e por fim retornou-se para a condição inicial da corrida (30-40 min). As amostras foram diluídas em metanol grau HPLC, na concentração de 1 mg/ mL, em seguida foram filtradas em uma membrana de 0,45 µm de PTFE w/GMF da marca WHATMAN.

4.2.4 Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas de alta resolução (CLUAE-EMAR/MS²)

Os extratos e frações foram submetidos à análise cromatográfica em CLUAE-EMAR no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD) localizado no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC)-UFRJ. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Synchronis C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) utilizando o cromatógrafo Dionex - Ultimate 3000 com injetor automático (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). As fases móveis foram, ácido fórmico 0,1% e 5 mM de formiato de amônio (solvente A) e metanol (solvente B). A corrida cromatográfica foi programada com uma vazão de 0,4 mL/min de acordo com o sistema a seguir: isocrático 5% (0-0,3 min), gradiente linear de 5% a 10% (0,3-0,5 min), 10% a 25% (0,5-

1 min), 25% a 90% (1-6 min), gradiente linear de 90% a 100% (6-8 min), isocrático de 100% por 1 minuto por fim retornou-se para as condições iniciais da corrida em 2 minutos, totalizando 11 minutos de análise. O volume de injeção foi ajustado para 8 μ L.

O detector utilizado foi o espectrômetro de massas de alta resolução Q Exactive com analisador Orbitrap (Thermo Scientific®), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Os espectros foram adquiridos no modo positivo (100 – 800 m/z) e no modo negativo (100 – 900 m/z) pela aquisição dependentes de dados (DDA, sigla em inglês) para acionar a aquisição dos espectros de EM/EM. As amostras foram diluídas em metanol grau HPLC, na concentração de 1 mg/ mL, em seguida foram filtradas em uma membrana de 0,45 μ m de PTFE w/GMF da marca WHATMAN. Os cromatogramas e espectros obtidos, foram processados no programa Xcalibur versão 3.0. e realizou-se a análise de metaboloma global.

4.3 Caracterização química

4.3.1 Espectrometria de Massas (EM)

As análises dos extratos e frações foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) Central Analítica-UFAM. Utilizou-se o espectrômetro de massas LQC Fleet (Thermo Scientific®), utilizando como fonte de ionização eletrospray (ESI), na faixa de 100-1000 Da. Todas amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau CLAE da marca Tédia), em seguida 20 μ L foram retirados e em um outro frasco avolumados para 1 mL de metanol. Os espectros obtidos foram processados no programa Xcalibur versão 2.0.7. e comparados com os dados da literatura.

4.4 Análise Metabolômica global

Os dados utilizados para a análise metabolômica global, foram extraídos dos cromatogramas obtidos em triplicatas técnicas (cada amostra foi injetada três vezes) na análise por CLUAE-EMAR/MS². Primeiramente realizou-se o tratamento prévio dos cromatogramas

no software Xcalibur versão 3.0, onde o branco foi subtraído de todos os cromatogramas das três espécies em estudo. O branco foi o solvente MeOH grau CLAE, utilizado para solubilizar as frações. Os espectros de *full scan* foram extraídos dos cromatogramas das frações em DCM e metanólicas das espécies de *Theobroma*. Estes espectros foram extraídos e normalizados por norma suprema no software OriginPro® versão 2017. Os dados espectrométricos foram utilizados na análise multivariada, onde cada íon m/z correspondeu a uma variável.

A técnica multivariada de análise componentes principais (PCA) foi realizada por covariância. A técnica multivariada de análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi aplicada pelo método de Ward com distância Euclidiana.

4.5 Ensaios Químicos e Biológicos

4.5.1 Ensaio de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

A atividade antioxidante foi feita com os extratos foi feita quantitativamente segundo Molyneux (2004) com modificações. O ácido gálico foi utilizado como padrão antioxidante e a atividade expressa com valores de concentração eficiente (CE₅₀). Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). Uma alíquota de 30 µL das amostras na concentração de 1 mg/mL foi adicionada em um poço, após diluições sucessivas adicionou-se 270 µL de DPPH (0,8 mmol/L) em cada poço. Após 30 min as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de UV/VIS (Bio-Rad, modelo 3550 UV) em 517 nm. A partir dos dados de leitura de absorbância e regressão linear os valores de CE₅₀ foram obtidos. A análise foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM em Manaus sob supervisão do professor Dr. Emerson Silva Lima.

4.5.2 Ensaio de atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS

A atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS foi feita com os extratos quantitativamente segundo Re (1999) com modificações. O ácido gálico foi utilizado como

padrão de antioxidante e a atividade foi expressa em porcentagem. Os extratos foram solubilizados em DMSO na concentração de 1 mg/mL. Em uma microplaca de 96 poços os adicionou-se 30 μ L dos extratos e padrão (em triplicata) e em seguida adicionou-se 270 μ L de ABTS. As leituras de absorvância das amostras foram realizadas após 15 min em espectrofotômetro de UV/VIS (Bio-Rad, modelo 3550 UV) em 630 nm. A análise foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM em Manaus sob supervisão do professor Dr. Emerson Silva Lima.

4.5.3 *Teste quantitativo de Fenóis Totais*

O método utilizado foi o de Folin-Ciocalteu segundo Singleton & Rossi (1965), com modificações. Alíquotas de 10 μ L dos extratos (1 mg/mL), foram transferidas para uma placa de 96 poços. Em seguida adicionou-se 50 μ L do reagente Folin-Ciocalteu e o material foi incubado por 8 min. Adicionou-se, posteriormente 240 μ L de carbonato de sódio (0,4% de Na_2CO_3) e após 3 min, mediu-se a absorvância em 620 nm no espectrofotômetro de UV/VIS (Bio-Rad, modelo 3550 UV). O teste foi realizado com extratos das três espécies de *Theobroma*, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM em Manaus sob supervisão do professor Dr. Emerson Silva Lima.

4.5.4 *Teste quantitativo e qualitativo de Flavonoides Totais*

A determinação de flavonoides totais nos extratos foi realizada quantitativamente pelo método calorimétrico com Cloreto de Alumínio (CHANG et al., 2002), adaptado para microplacas. Os extratos foram solubilizados em DMSO na concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 30 μ L de cada extrato foi transferida para a placa de 96 poços. Em seguida adicionou-se 90 μ L de etanol em cada poço, 6 μ L de cloreto de alumínio a 10%, 6 μ L de acetato de potássio 1 M e 168 μ L de água destilada. A placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente e por fim realizada a leitura de absorvância no comprimento de onda 405 nm em

espectrofotômetro de UV/VIS (Bio-Rad, modelo 3550 UV). A análise qualitativa foi realizada em placa cromatográfica utilizando-se NP-PEG como o reagente.

4.5.5 Atividade antimicrobiana

Os extratos foram submetidos ao ensaio de atividade antimicrobiana, no Fundação Oswaldo Cruz do Amazonas (FIOCRUZ-AM), com a supervisão da Dra. Patrícia Orlandi Nogueira. As amostras foram testadas frente a 19 bactérias gram-negativas e 3 gram-positivas (tabela 1 e 2).

Tabela 1. Lista das cepas de bactérias gram-positivas

Bactérias Gram-Positivas	Cepas
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	(MRSA)
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC 27851

Tabela. 2 Lista das cepas de bactérias gram-negativas

Bactérias Gram-Negativas	Cepas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606-143
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864-576
<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC)	BUTANTÃ F1845
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	CDC EDL- O42
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	CDC EDL-933-171
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST (ETEC)	ST8
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST (ETEC)	BUTANTÃ LT 2871
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica típica (EPEC)	ATCC E234869
<i>Escherichia coli</i> -INV-enteroinvasiva (EIEC)	ATCC 1381
<i>Escherichia coli</i> não diarreicogênica	ATCC 10536
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 11601-120
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352-083
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 15290-095
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDC EDL-1284
<i>Pseudomonas putida</i> (oralis)	ATCC 15175-113
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 10708
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756-131
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar (técnica do poço) segundo Grove e Randall (GROVE & RANDALL, 1955), com modificações. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfoxido (DMSO) 10%. Utilizou-se o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (AMH) (HIMEDIA) para a realização dos testes. Como controle positivo foram utilizadas as drogas TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e então foi adicionado às placas uma solução corante de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,01% acrescido de 0,1% de ágar bacteriológico, ocorrendo uma reincubação por 30 minutos. Após a conversão de coloração na sobrecamada foi feita a medição dos halos de inibição com o auxílio de uma régua milimetrada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos extratos em microescala e larga escala das três espécies de *Theobroma*

Inicialmente os extratos hidroalcoolicos foram obtidos das cascas das sementes, das espécies: *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum* em microescala em EtOH/H₂O em triplicata, com a finalidade de obter os respectivos rendimentos e desvios padrões para cada extrato. Todos os extratos foram obtidos de 3 g do material vegetal seco. Os rendimentos e desvios padrões podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3. Rendimentos dos extratos hidroalcoolicos obtidos em triplicata das três espécies de *Theobroma*.

Extratos das Cascas das Sementes	Rendimentos (%)			Média (% ± DP)
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	
<i>T. grandiflorum</i>	27,62	29,74	29,61	29,61 ± 0,01
<i>T. cacao</i>	21,19	25,15	24,17	25,17 ± 0,02
<i>T. subincanum</i>	25,95	24,26	31,05	27,09 ± 0,03

De acordo com a tabela 3 o extrato de maior rendimento médio foi o de *T. grandiflorum*, seguido respectivamente dos extratos de *T. subincanum* e *T. cacao*. O rendimento médio de *T. grandiflorum* foi maior que o relatado no trabalho de dissertação de Lima (2013), que apresentou valor de 21,47% para o método de maceração a frio, a diferença pode estar associada local de coleta dos frutos e a época em que os frutos foram coletados.

No trabalho de Lima (2013) quatro métodos de extração foram testados, com variação no solvente extrator e observou-se que os maiores rendimentos foram para os extratos das cascas das sementes obtidos por Soxhlet (hidroalcoolico), devido maior seletividade do método por conta do uso de temperatura, porém tal uso pode ocasionar a degradação de substâncias. O método de Soxhlet se difere da maceração a frio quanto a temperatura e ao uso do refluxo do sistema para a extração, na maceração utiliza-se apenas a agitação mecânica para melhor extração das substâncias.

Posteriormente, realizou-se a obtenção dos extratos em larga escala, utilizando uma proporção massa/solvente de 10 %.

5.2 Particionamento dos extratos das três espécies de *Theobroma*

5.2.1 Partições teste com o extrato de *T. grandiflorum*

Os três tipos de partições foram testados em microescala com o extrato de *T. grandiflorum*, devido à grande quantidade de extrato obtida. A avaliação da eficácia de cada partição se deu por CCD e espectrometria de massas. As frações foram obtidas pelas metodologias 1, 2 e 3, totalizando 10 frações. Os rendimentos foram calculados e tabulados na tabela 4.

Tabela 4. Rendimentos das frações obtidas das três metodologias de partição com o extrato de *T. grandiflorum*.

Partição 1 Rendimentos (%)	
Frações	Hex 1,88
	DCM 5,10
	MeOH 83,34
Partição 2 Rendimentos (%)	
Frações	Hex 1,33
	AcoET 30,17
	MeOH 61,17
Partição 3 Rendimentos (%)	
Frações	Hex 1,33
	CHCl ₃ 7,93
	AcoET 22,23
	MeOH 58,17

A partir dos rendimentos, pode-se observar que o extrato hidroalcoólico de *T. grandiflorum* possui poucas substâncias lipofílicas, ou seja, substâncias apolares, tendo em

vista que os rendimentos das frações hexânicas foram baixos, em relação às demais frações. A baixa quantidade de substâncias apolares está ligada ao uso de etanol e água na obtenção dos extratos, com a adição de 20% de água no etanol ocorreu o aumento da polaridade do solvente de extração com isso as substâncias apolares apresentaram pouca afinidade na maceração exaustiva.

Na partição 1 o maior rendimento foi o da fração metanólica, já o da fração em DCM foi bem menor, isso significa que há mais substâncias de alta polaridade nos extratos hidroalcoolicos de *T. grandiflorum*. O mesmo pode-se observar na partição 3, na fração em clorofórmio que apresentou também um baixo rendimento, que assim como a fração em DCM, possui média polaridade. De modo geral as frações em AcOEt e MeOH apresentaram os maiores rendimentos, devido a maior quantidade de substâncias de alta polaridade no extrato de *T. grandiflorum*.

Observando os rendimentos, a fração que apresentou uma melhor distribuição ou separação foi a partição 3, realizada com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Posteriormente todas as frações foram submetidas à CCD para se avaliar a separação cromatográfica das mesmas e sugerir a melhor metodologia para dar continuidade aos particionamentos com as outras duas espécies.

As frações das três metodologias foram submetidas à CCD, diversos eluentes foram testados, a fim de se obter a melhor separação das frações na placa cromatográfica, para que fossem comparadas. As placas com os eluentes selecionados podem ser observadas na figura 8.

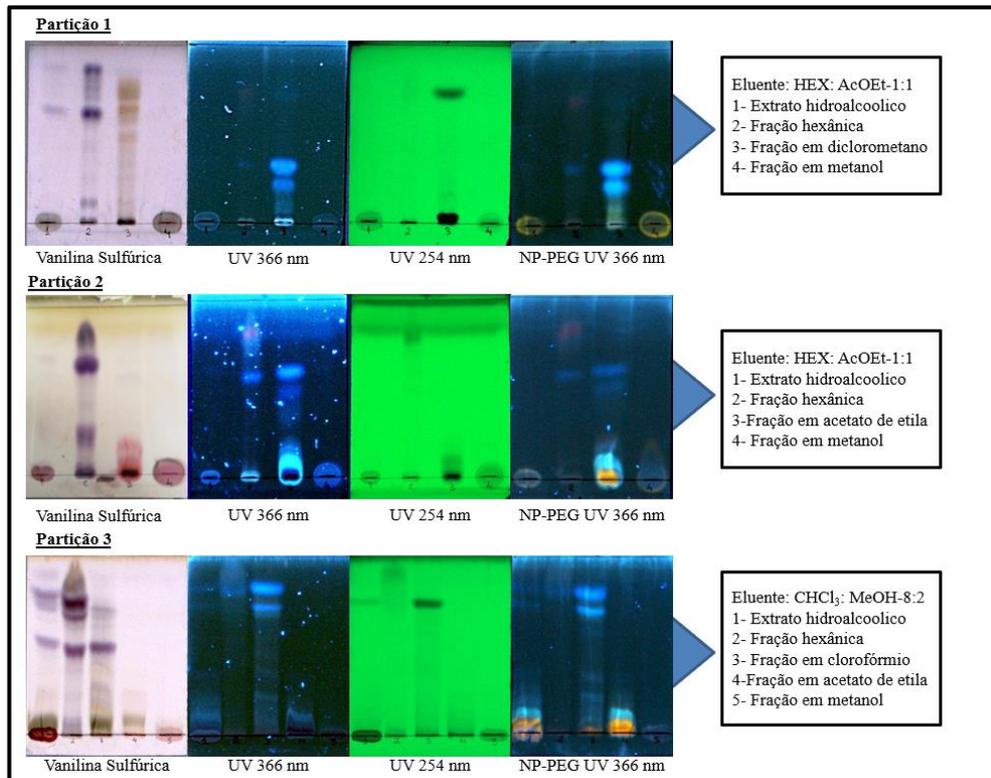


Figura 8. Placas de CCD do extrato de *T. grandiflorum* e frações obtidas das três metodologias utilizadas.

Na figura 8, observa-se uma boa separação das frações, pois as manchas não se repetem em cada fração. Na segunda placa revelada em UV no comprimento de onda 366 nm no terceiro espotes de cada partição, observou-se a presença de manchas brilhantes na cor azul. Na placa revelada com NP-PEG e UV 366 nm as manchas azuis observadas na segunda placa também aparecem com maior nitidez e realce. Tais manchas são características de flavonoides devido a sua coloração, assim como as manchas com coloração amarela fluorescente (WAGNER & BLADT, 1996).

Na placa 4 quatro da partição três, pode-se observar com mais clareza as manchas amarelas características de flavonoides na base nos espotes correspondentes ao extrato bruto, fração em CHCl₃ e na fração em AcOEt. A concentração dessas colorações na base do espote caracteriza a alta polaridade dos possíveis flavonoides presentes no extrato e frações.

As três metodologias apresentaram uma boa separação das frações, porém a partição 3 apresentou frações com um maior número de manchas características de flavonoides, por esse

motivo suas frações foram submetidas a CCDAE, para se avaliar o fato com maior resolução, utilizando um eluente específico para substâncias fenólicas e flavonoides de acordo com a literatura (WAGNER & BLANDT, 1996).

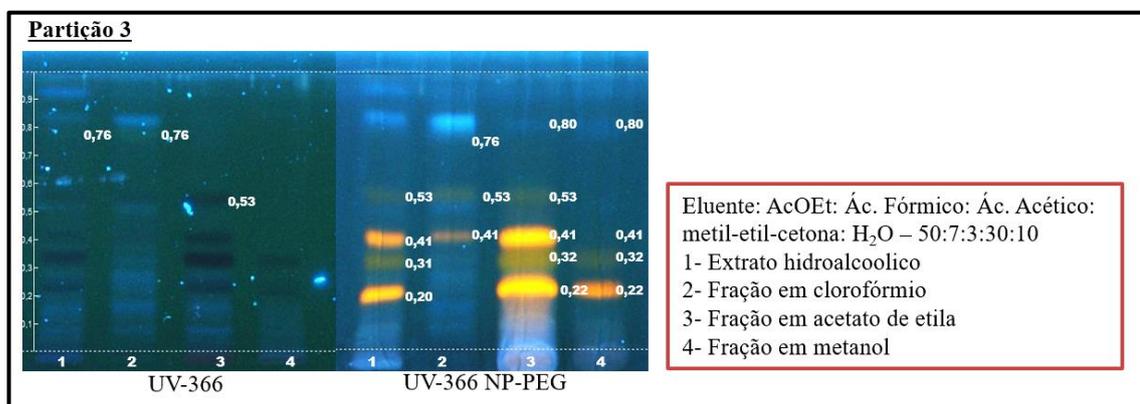


Figura 9. Placas cromatográficas de alta eficiência (CCDAE), das frações da partição 3, com os fatores de retenção (rf) das principais manchas.

As placas cromatográficas da figura 9 apresentaram excelente resolução e separação, com bandas finas e resolvidas, com isso foi possível evidenciar que a separação da partição 3 não foi eficaz. O rf 0,53 se repetiu nas frações em CHCl₃ e na fração em AcOEt, o mesmo ocorreu com o rf 0,41. Os rf's 0,32 e 0,22 se repetiram nas frações em AcOEt e MeOH. A repetição dos rf's indicaram a ineficácia da partição 3.

Evidenciou-se que a partição 1 poderia ser a metodologia de melhor separação, com isso as frações foram submetidas a análise de espectrometria de massas no modo negativo tendo como fonte de ionização eletrospray (ESI). A partir da análise dos principais íons, pode-se concluir que a partição 3 apresentou vários íons iguais, assim como, os rf's observados na placa revelada em NP-PEG (figura 9). O mesmo foi observado na partição 2, íons iguais nos espectros das frações em AcOEt e MeOH. A análise espectrométrica corroborou com a análise cromatográfica para confirmar as características de cada fração, com isso selecionou-se a partição 1. O particionamento realizado com as demais espécies, utilizando a metodologia da partição 1.

5.2.2 Particionamento das espécies *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. cacao* e análise por CCD

Os extratos foram submetidos ao particionamento com Hex, DCM e MeOH, em larga escala utilizando 3g de extrato de cada espécie. As frações foram devidamente secas e pesadas para o cálculo de rendimento (Tabela 5).

Tabela 5. Rendimento das frações obtidas das três espécies de *Theobroma*

Espécies	Rendimentos (%)		
	HEX	DCM	MeOH
<i>T. grandiflorum</i>	1,85	4,90	83,71
<i>T. subincanum</i>	6,58	6,34	85,6
<i>T. cacao</i>	2,4	2,2	89,0

Com base nos dados tabelados, pode-se constatar que as frações metanólicas apresentaram os maiores rendimentos (84%-89%), quando comparados as demais frações. Esse rendimento elevado pode estar relacionando a presença predominante de substâncias de alta polaridade. A espécie *T. cacao* foi a que apresentou maior rendimento na fração metanólica (89%). Na espécie *T. subincanum* constatou-se o maior rendimento da fração em DCM em relação as demais espécies, o que caracteriza a presença de substâncias de média polaridade.

As frações foram analisadas por CCD e selecionou-se o melhor eluente para a separação cromatográfica. O eluente que apresentou maior seletividade em relação à separação de todas as frações foi, CHCl₃:AcOEt na proporção de 9:1. Os extratos foram preparados na concentração de 10 mg /mL e as frações em 5 mg/mL. As amostras diluídas foram aplicadas na forma de banda em placas cromatográficas previamente limpas e ativadas. Para a revelação das placas, utilizaram-se diferentes reveladores, universais e específicos, como NP-PEG para flavonoides (figura 10).

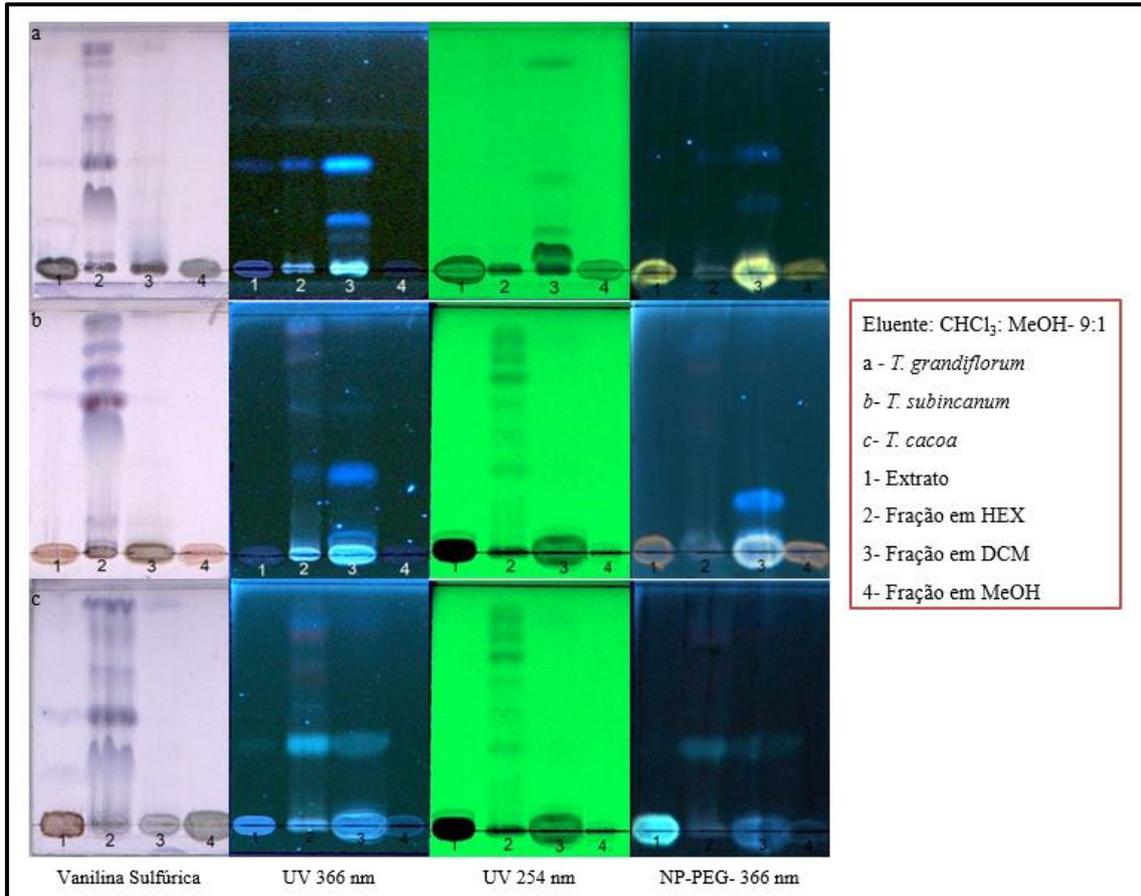


Figura 10. Placas cromatográficas das frações obtidas das três espécies de *Theobroma*

5.3 Caracterização cromatográfica por CCDAE das espécies de *Theobroma*

A caracterização por CCDAE foi iniciada com o desenvolvimento de um método para se aplicar à todas as espécies. O sistema de eluente foi otimizado de acordo com a literatura (WAGNER & BLADT, 1996). Os testes para a obtenção do eluente ideal, foram realizados com os padrões de flavonoides para se obter a melhor eluição, ou seja, obtenção de uma diferença significativa entre os r_f 's de cada padrão. Após vários testes, selecionou-se o seguinte eluente, CHCl₃:Acetona: Ác. Fórmico-4,5:4,65:0,85, em seguida foi otimizado o tamanho o espote para injeção automática. Pode-se observar a seguir na figura 11 as placas com dois tamanhos de espote (0,7 cm e 0,9 cm), tais testes foram realizados com o extrato e frações de *T. grandiflorum*.

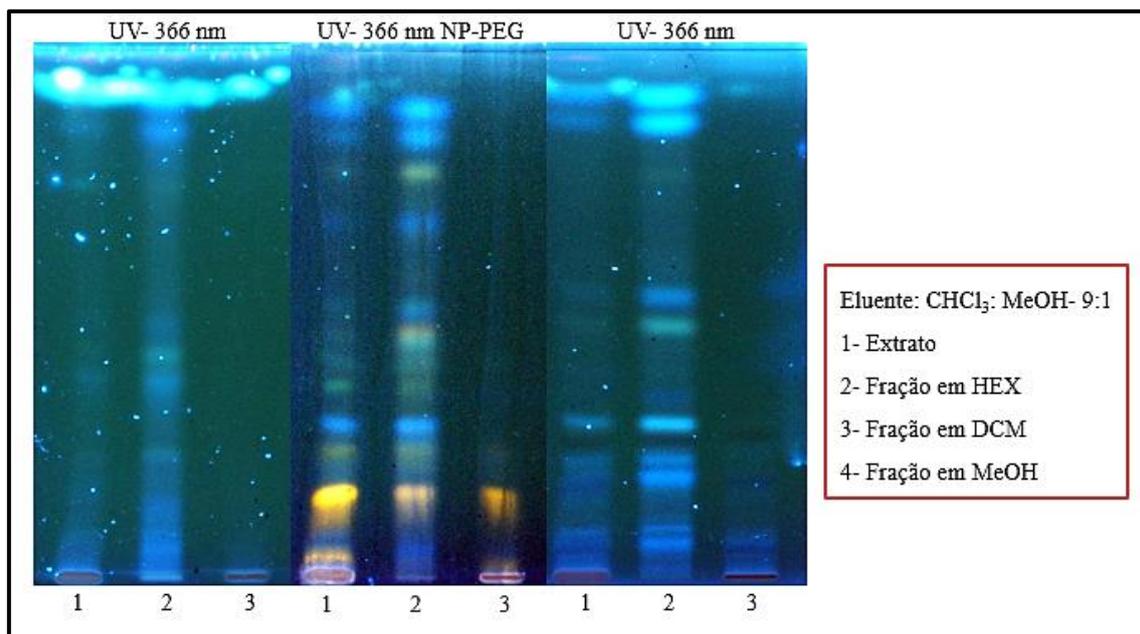


Figura 11. CCDAE teste do extrato e frações de *T. grandiflorum*

A 3ª placa feita com um espote de 0,9 cm apresentou melhor separação, melhor seletividade e resolução. As demais placas foram realizadas nessas condições e comparadas com r_f 's de padrões.

Todas os extratos foram preparados na concentração de 20 mg/mL, frações em 10 mg/mL e os padrões preparados na concentração de 1 mg/mL. O volume de aplicação dos extratos e frações, padrões, foram respectivamente, 10 μ L e 2,5 μ L. As placas foram cortadas com 10 cm de altura e o comprimento variou de acordo com a quantidade de amostras a ser aplicada, com espote de 0,9 cm. As placas foram eluídas e reveladas no UV nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm, vanilina sulfúrica, anisaldeído, NP-PEG e DPPH.

Na figura 12 pode-se observar as placas da espécie *T. grandiflorum* em diferentes reveladores, sendo possível correlacionar cada mancha com os r_f 's dos padrões utilizados, além de comparar os perfis cromatográficos das frações e extrato. Na placa revelada em UV no comprimento de onda 254 nm, poucas manchas foram reveladas. Dos oito padrões utilizados, somente cinco foram revelados nesse comprimento de onda. O r_f 0,65 foi observado no extrato e na fração em DCM, porém este não corresponde à nenhum padrão utilizado.

Pode-se observar que várias manchas com coloração fluorescente foram reveladas no comprimento de onda 366 nm, pois as substâncias foram excitadas pela radiação UV (366 nm) indicando a presença de grupos cromóforos, como ligações duplas conjugadas e/ ou substâncias aromáticas no extrato, fração em DCM e fração metanólica (JORK et al., 1990). O rf 0,76 correspondente ao padrão de quercetina dihidratada, foi observado na fração em DCM, podendo sugerir a presença da quercetina na fração. No extrato, esperava-se observar o rf 0,76, porém não foi observado devido a diferença de concentração da substância no extrato, tendo em vista que a fração apresenta menor quantidade de metabólitos em relação ao extrato.

A presença de flavonoides no extrato e frações de *T. grandiflorum*, foi evidenciada na placa revelada em NP-PEG (366 nm), onde foi possível observar várias manchas características de flavonoides devido a coloração amarela ou a fluorescência. Os rf's 0,92; 0,86; 0,76; 0,68; 0,56; 0,48; 0,45; 0,37; 0,28; 0,26; 0,18 apresentaram cor característica de flavonoides, muitos desses não foram observados quando revelados somente em UV (366 nm). Pode-se destacar o rf 0,76 que foi revelado mais uma vez na fração em DCM, com uma coloração amarela que pode corresponder a quercetina dihidratada (cor amarelo escuro), já relatada nas sementes de *T. grandiflorum* (YANG et al., 2003).

Os rf's dos padrões campeferol (0,81 cor verde), apigenina (0,81 cor amarela), quercetina glicosídeo (0,24 cor laranja) isoquercetrina (0,24 cor laranja), não foram observados nos extratos e nem nas frações analisadas. Os padrões epicatequina, epigallocatequina e catequina não revelaram em UV e NP-PEG, por isso não é possível sugerir a presença deles no extrato e frações de *T. grandiflorum*, porém essas substâncias já foram relatadas no gênero *Theobroma*, estas podem ser detectadas com amostras mais concentradas ou com uma técnica mais sensível.

Os reveladores vanilina sulfúrica e anisaldeído foram utilizados como reveladores universais, de acordo com a literatura a vanilina sulfúrica pode ser utilizada para indicar a

presença de terpenos e substâncias aromáticas (REICH & SCHIBLI, 2007). Enquanto que, segundo Pedan (2017) o revelador anisaldeído pode ser utilizado para detectar flavonoides da classe flavan-3-ol, além de terpenos.

O rf 0,41 correspondente a epigalocatequina foi observado no extrato e na fração em DCM na placa revelada em anisaldeído com uma coloração cor de rosa. Devido a coloração não é possível sugerir a presença da epigalocatequina na fração em DCM, pois a cor característica do padrão é amarela como se observa na placa.

O extrato e as frações apresentaram substâncias com atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH, pois na placa revelada com solução de DPPH, observou-se manchas amarelas características de substâncias com capacidade sequestrante do radical livre DPPH. No extrato devido a elevada concentração das substâncias com atividade antioxidante formou-se um rastro não sendo possível indicar todos os rf's. O rf 0,41 foi observado novamente e apresentou atividade antioxidante.

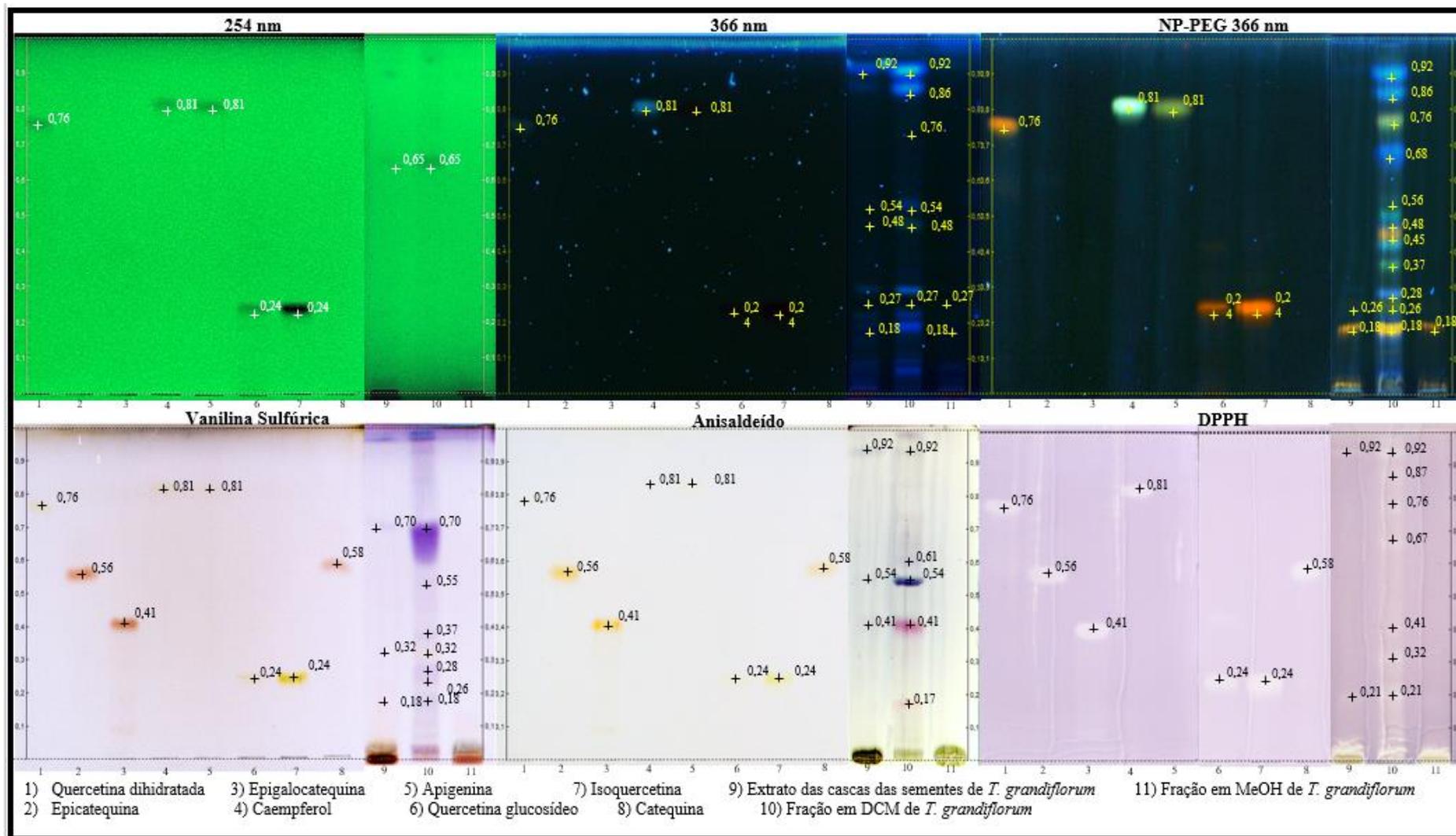


Figura 12. Placas cromatográficas de Alta eficiência de extrato e frações de *T. grandiflorum* e padrões de flavonoides

Destaca-se o rf 0,92, observado no extrato e fração em DCM, assim como o rf 0,76, observado na fração em DCM, que apresentaram atividade antioxidante e podem corresponder a flavonoide devido, sua coloração quando revelados com NP-PEG. A fração em metanol apresentou atividade antioxidante, porém as substâncias são de alta polaridade ficando estas concentradas na base da placa cromatográfica.

A espécie *T. subincanum* foi submetida análise CCDAE. Na figura 13 pode-se observar as placas cromatográficas nos diferentes reveladores utilizados e os respectivos rf's. A placa revelada em UV no comprimento de onda 254 nm, apresentou várias manchas, o contrário da placa de *T. grandiflorum*. Baseando-se nos rf's dos padrões utilizados, somente o rf 0,76 correspondente a quercetina dihidratada foi observado na fração em DCM de *T. subincanum*.

O rf 0,81 que pode corresponder aos flavonoides, campeferol ou apigenina, foi observado no extrato e na fração em DCM de *T. subincanum*, na placa revelada em UV no comprimento de onda 366 nm. O mesmo rf encontra-se na placa revelada com NP-PEG, um revelador específico para flavonoides, com uma coloração azul fluorescente que pode corresponder a um flavonoide diferente ou algum derivado de apigenina ou caempferol.

O extrato, fração em DCM e fração metanólica de *T. subincanum* apresentou um perfil cromatográfico rico em flavonoides de acordo com a placa revelada em NP-PEG em 366 nm. Os rf's 0,81; 0,77; 0,72; 0,62 e 0,58 podem ser os flavonoides de menor polaridade. Os rf's que podem corresponder a flavonoides de média polaridade são: 0,49; 0,39 e 0,32. Pode-se destacar o rf 0,32 que se repete nas três amostras analisadas de *T. subincanum*. Na região próxima da base da placa observa-se as substâncias mais polares que podem corresponder até mesmo a flavonoides glicosilados caracterizados por apresentarem alta polaridade.

As placas reveladas em vanilina sulfúrica e anisaldeído, não apresentaram muitas manchas reveladas, porém o rf 0,58 foi observado na fração em DCM, que pode corresponder

ao flavonoide catequina. O extrato de *T. subincanum* e suas frações em apresentaram atividade antioxidante na placa revelada com solução de DPPH. No extrato os rf's 0,76; 0,36 e 0,13 apresentaram cor amarela que é característica de substâncias com atividade antioxidante, já na fração em DCM os rf's 0,97; 0,94; 0,89; 0,76; 0,55 e 0,36 apresentaram atividade antioxidante. Na fração metanólica somente o rf 0,36 é possível observar uma mancha amarela, porém na base há uma grande concentração de substâncias mais polares devido a coloração amarela o que evidencia a atividade antioxidante.

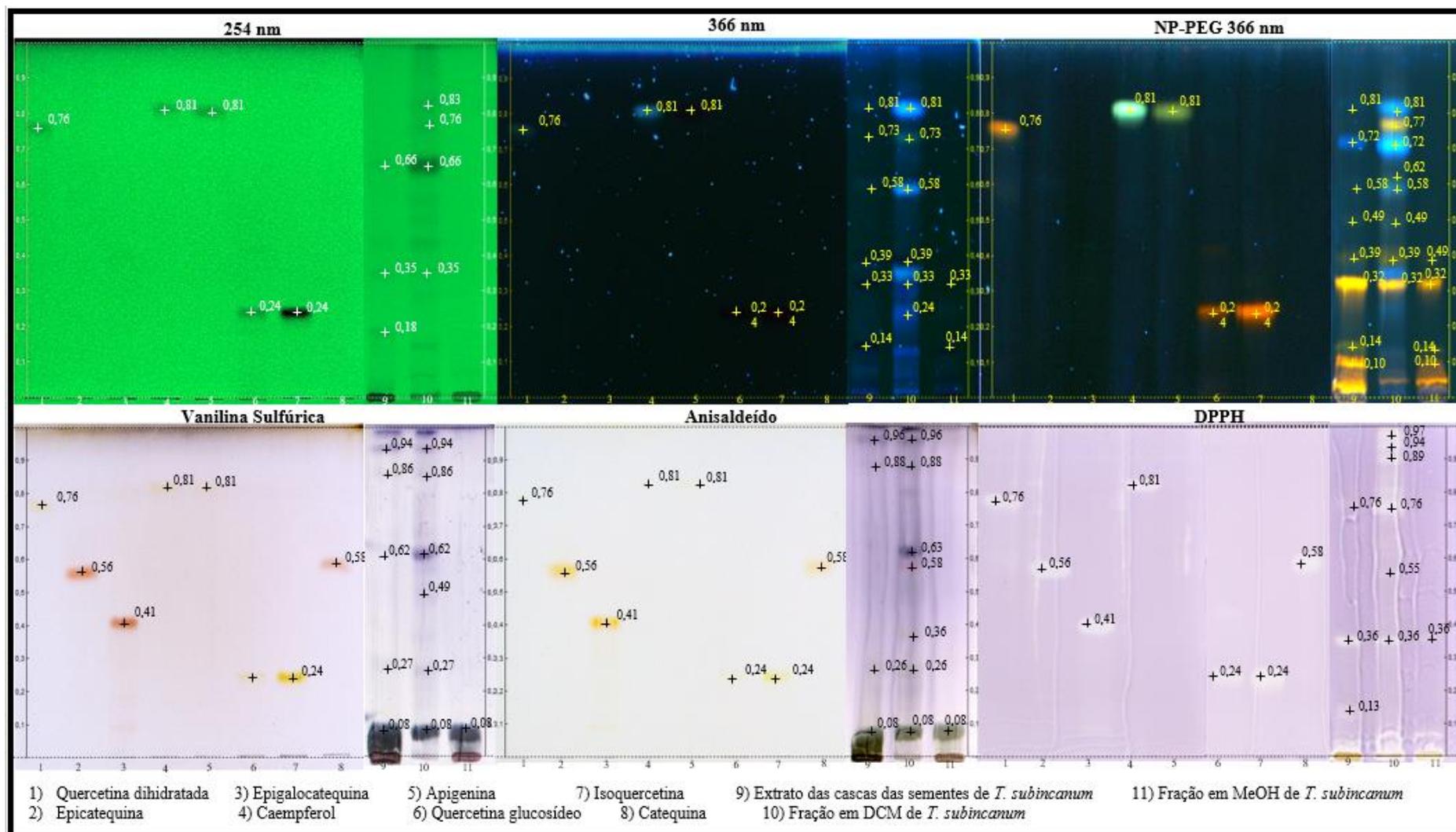


Figura 13. Placas cromatográficas de Alta eficiência de extrato e frações de *T. subincanum* e padrões de flavonoides

O extrato e frações em DCM e metanólica de *T. cacao*, foram também submetidas a análise CCDAE. Na figura 14 pode-se observar as placas cromatográficas com os padrões de flavonoides e extrato e frações de *Theobroma cacao*. No extrato e na fração em DCM observou-se somente duas manchas nos seguintes *rf*'s: 0,56 e 0,71 na placa revelada em UV-254 nm que ao ser comparada a placa de *T. subincanum*, verifica-se diferença no perfil cromatográfico entre as duas espécies, assim como a capacidade das substâncias absorverem energia no comprimento de onda 254 nm.

No comprimento de onda 366 nm foi possível observar um maior número de manchas, sendo possível compará-las aos *rf*'s dos padrões utilizados. O *rf* 0,81 observado na fração em DCM pode estar associado ao caempferol ou a apigenina, porém ao observar a cor do padrão pode-se sugerir a presença do caempferol na fração em DCM. Derivados glicosilados de caempferol já foram relatados nas sementes de *T. cacao*, como caempferol-3-*O*-hexosídeo e caempferol-3-*O*-retinosídeo (D'SOUZA et al., 2017). Observou-se que alguns *rf*'s como o 0,74; 0,48 do extrato foram observados na fração em DCM também, o que já era esperado uma vez que a fração foi obtida do extrato.

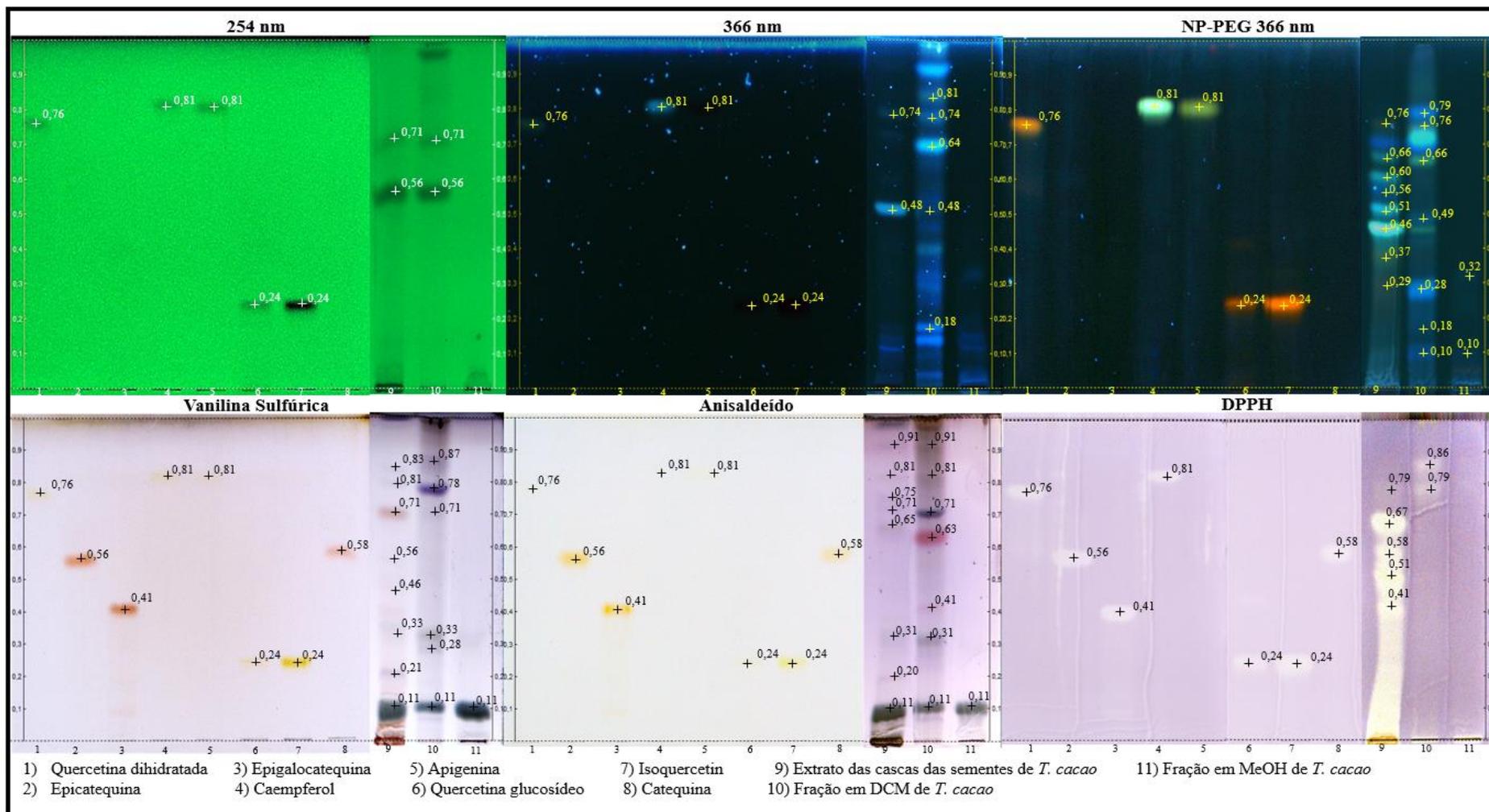


Figura 14. Placas cromatográficas de Alta eficiência de extrato e frações de *T. cacao* e padrões de flavonoides

A presença de flavonoides no extrato e frações de *T. subincanum* foi confirmada por meio da placa revelada em NP-PEG-366 nm, onde foi possível observar substâncias com manchas amarelas e fluorescentes nos rf's 0,76 ao 0,49, além dos rf's 0,37 e 0,29 no extrato etanólico de *T. cacao*. Na fração em DCM destacaram-se os rf's 0,79; 0,76; 0,66; 0,49; 0,28; 0,18 e 0,10, devido suas colorações características de flavonoides. O rf 0,76 pode estar associado ao flavonoide quercetina dihidratada, tendo em vista que o padrão apresentou o mesmo rf. No trabalho de Oracz e colaboradores (2015) cerca de 10 flavonoides foram detectados por CLAE-EM/MS, incluindo a quercetina, porém, está ainda não tinha sido detectada nas cascas das sementes.

Na placa revelada em vanilina sulfúrica, não foi possível relacionar nenhum padrão com os rf's observados, porém na placa revelada em anisaldeído, dois padrões foram correlacionados. Pode-se observar o rf 0,81 no extrato e na fração em DCM que pode corresponder ao caempferol ou a apigenina. O rf 0,41 observado somente na fração em DCM pode ser relacionado ao padrão de epigallocatequina, porém a coloração da mancha não corresponde a do padrão, que pode estar relacionada a alguma coeluição ou até mesmo não corresponder mesma substância.

O extrato etanólico de *T. cacao* apresentou várias manchas amarelas na placa revelada em DPPH, indicando a presença de substâncias com a capacidade sequestrante do radical DPPH. Pode-se destacar o rf 0,58 que pode corresponder ao flavonoide catequina e o rf 0,41 que pode corresponder ao caempferol. Na fração em DCM não foi possível correlacionar os rf's aos padrões de flavonoides utilizados. Na fração metanólica observou-se que as substâncias com atividade antioxidante se concentraram na base da placa, devido a elevada polaridade das substâncias.

No trabalho de Pedan e colaboradores (2017) foram identificadas substâncias das seguintes classes de metabólitos em extratos de diferentes amostras de semente de *T. cacao*:

alcaloides e flavonoides dos tipos, antocianinas, protoantocianidinas e favan-3-ol. Para identificação das substâncias utilizou-se o CCDAE-UV e CCDAE-EM, onde foi possível sugerir as massas característica de cada substâncias. No presente trabalho foi possível sugerir a presença de catequina, quercetina no extrato de *T. cacao*, assim como foi relatado no trabalho de Pedan e colaboradores (2017).

Ao comparar as placas reveladas em NP-PEG das três espécies, notou-se que alguns rf's se repetiram em duas das espécies ou nas três espécies. O rf 0,76 foi observado nas três espécies, já o rf 0,49 foi observado somente em *T. cacao* e *T. subincanum*. O rf 0,32 foi observado somente na fração metanólica de *T. cacao* e em *T. subincanum* foi observado no extrato e nas duas frações.

Alguns rf's como: 0,76; 0,73; 0,67; 0,63; 0,49; 0,48; 0,32; 0,18, foram comuns as espécies nas placas reveladas nos demais reveladores, que indica uma certa similaridade entre as espécies. Uma forma de comprovar a semelhança é realizando a análise em espectrometria de massas, mas também a CLAE-DAD e CLAE-MS, com uma maior precisão nos resultados.

5.4 Caracterização espectrométrica das espécies de *Theobroma*

A análise espectrométrica foi realizada com os extratos e frações das três espécies de *Theobroma*, a fim de comparar o perfil químico das três espécies e detectar flavonoides presentes nas espécies tendo como base dados da literatura. As amostras foram ionizadas pela fonte ESI no modo negativo, devido a maior estabilidade dos metabólitos pela perda de um próton.

As frações em DCM e metanólica analisadas, foram obtidas das partições realizadas com Hex, DCM e MeOH com as três espécies do gênero *Theobroma*. Após análise de EM-ESI, os íons observados nos espectros obtidos foram tabulados com suas respectivas intensidades relativas e os dados das substâncias já relatadas em *Theobroma*.

Na tabela 6, podem ser observados os dados espectrométricos do extrato etanólico e frações de *T. grandiflorum*, com os valores de razão massa carga (m/z), intensidade (%), o nome das sugestões de substâncias relacionadas a cada íon detectado, assim como a referência bibliográfica de cada substância sugerida.

O íon de maior intensidade no extrato etanólico foi o de m/z 477 (100%) característicos de uma das seguintes substâncias, hipoleatina 8-*O*- β -*D*-glucoronídeo identificada nas sementes de cupuaçu (PUGLIESE et al., 2013) ou quercetina 3-*O*- β -*D*-glucoronídeo isolada do extrato metanólico das sementes de cupuaçu (YANG et al., 2003).

A fração em DCM apresentou um perfil espectrométrico mais simples, devido a pequena quantidade de íons. A maior intensidade de íon foi atribuída ao de m/z 329 (74%) característico do ácido vanílico glucosídeo que foi detectado nas sementes de *T. cacao* e não apresenta até então relato em *T. grandiflorum* (D'SOUZA et al., 2017). Na fração metanólica foram observados um maior número de íons, sendo o mais intenso deles o de m/z 191 (81%) característico do ácido quínico já detectado nas sementes de *T. cacao* (D'SOUZA et al., 2017)

Tabela 6. Dados dos principais íons detectados no extrato e frações de *T. grandiflorum* e sugestões de substâncias de acordo com a literatura

Espécies	Amostra	Intensidade (%)	m/z (M-H)	Possíveis Substâncias	Referência
<i>T. grandiflorum</i>	Extrato	22,16	179,26	Ácido cafeico	JALAL, 1977
		61,44	191,26	Ácido quínico	D'SOUZA et al., 2017
		51,76	278,45	Ácido p-coumaroil aspartato (+)-N-[4'-Hidroxi (E)-cinamoil]-L-aspartico	D'SOUZA et al., 2017 STARK, 2005
		74,23	285,28	Campeferol Luteolina Isoscutelareína	YANG et al., 2003 SÁNCHEZ- RABANEDA et al., 2003 BARROS et al., 2016
		28,91	353,22	Ácido clorogênico Ácido 4-O-Cafeoilquinico	D'SOUZA et al., 2017 SÁNCHEZ- RABANEDA et al., 2003
		22,3	358,28	(-)-N-[3',4'-dihidroxi-(E)-cinamoil]-3-hidroxi-L-tirosina	STARK, 2005
		59,24	393,22	hexanil xilopiranosil glucopiranosídeo	CÁDIZ-GURREA et al., 2014
		48,72	461,25	isoscuteleareína 8-O-β-D-glucoronídeo Crisoeriol-7-O-glicosídeo	YANG et al., 2003 PUGLIESE et al., 2013
		100	477,28	Hipolaetina 8-O-β-D-glucoronídeo Quercetina 3-O-β-D-glucoronídeo	YANG et al., 2003 PUGLIESE et al., 2013
		32,82	491,25	Quercetina 3-O-β-D-glucoronídeo 6''-metil éster Hipolaetina 3'-metil éter 8-O-β-D glucoronídeo	YANG et al., 2003 PUGLIESE et al., 2013
		74,54	541,29	Isoscutelareína-8-O-D- glucoronídeo 3''-O-sulfato	PUGLIESE et al., 2013
		41,35	571,3	Hipolaetina 3'-metil éter 8-O-β-D glucoronídeo 3''-sulfato	PUGLIESE et al., 2013

Fração em DCM	25,51	227,42	Prolilhidroxiprolina N-acetilalanilprolina	D'SOUZA et al., 2017
	28,99	315,45	Hipolaetina 3'-metil éter Isorhamnetina	SÁNCHEZ- RABANEDA et al., 2003 BARROS et al., 2016
	74,24	329,52	Ácido vanílico glucosídeo	D'SOUZA et al., 2017
	31,53	461,39	Isoscutelareina 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucuronídeo Crisoeriol-7- <i>O</i> -glucosídeo	YANG et al., 2003
	27,73	633,22	Epicatequina-(2b/5,4b/6) -epicatequina Epicatequina-(2b/7,4b/6) -epicatequina	PORTER et al., 1991
	38,06	179	Ácido cafeico	JALAL, 1977
	81,93	191,23	Ácido isocítrico	D'SOUZA et al., 2017
	32,08	278,34	Ácido p-Coumaroil aspartato (+)-N-[4'-Hidroxi (E)-cinamoil]- <i>L</i> -aspartico	D'SOUZA et al., 2017 STARK, 2005
Fração em MeOH	35,59	285,31	Caempferol Luteolina Isoscutelareina	YANG et al., 2003 SÁNCHEZ- RABANEDA et al., 2003 BARROS et al., 2016
	10,5	294,36	Ácido (-)-N-[3',4'-dihidroxi-(E)-cinamoil]- <i>D</i> - aspartico N-cafeoil- <i>L</i> -aspartato	STARK, 2005
	30,34	353,24	Ácido clorogênico Ácido 4- <i>O</i> -Cafeoilquinico	D'SOUZA et al., 2017 SÁNCHEZ- RABANEDA et al., 2003
	11,05	359,23	Ácido dimetoxigálico glucopiranosídeo	CÁDIZ-GURREA et al., 2014

41,31	393,16	Hexenil xilopiranosil glucopiranosídeo	CÁDIZ-GURREA et al., 2014
27,49	339,54	Ácido vanílico glucosídeo	D'SOUZA et al., 2017
31,53	461,39	Isoscutelareína 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoronídeo Crisoeriol-7- <i>O</i> -glicosídeo	YANG et al., 2003
64,88	477,25	Hipolaetina 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoronídeo Quercetina 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoronídeo	YANG et al., 2003 PUGLIESE et al., 2013
16,87	491,26	Quercetina 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoronídeo 6''-metil éster Hipolaetina 3'-metil éter 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> glucoronídeo	YANG et al., 2003 PUGLIESE et al., 2013
51,69	541,27	Isoscutelareína-8- <i>O</i> - <i>D</i> - glucoronídeo 3''- <i>O</i> -sulfato (Teograndina 1)	PORTER et al., 1991
12,06	557,4	Hipolaetina 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> glucoronídeo 3''-sulfato	BARROS et al., 2016
20,67	571,24	Hipolaetina 3'-metil éter 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> glucoronídeo 3''- sulfato	PUGLIESE et al., 2013

O extrato e frações de *T. subincanum* foram submetidos a análise de EM-ESI, em seguida os dados obtidos foram tabulados (tabela 7) para melhor análise dos mesmos em relação aos dados da literatura. Analisando os dados obtidos, observou-se que o íon mais intenso no extrato etanólico foi o de m/z 179 que pode corresponder ao ácido cafeico já relatado nas sementes de *T. cacao* (JALAL, 1977).

A fração em DCM apresentou poucos íons, assim como foi observado na fração em DCM de *T. grandiflorum*. O íon de maior intensidade relativa foi o mesmo encontrado em *T. grandiflorum*, o de m/z 329 (62%) possivelmente corresponde ao ácido vanílico glicosídeo que é um ácido fenólico glicosilado (D'SOUZA et al., 2017). A fração metanólica apresentou o íon de m/z 269 (45%), como o de maior intensidade, característico do flavonoide apigenina.

A apigenina já foi relatada nas sementes de *T. cacao* no trabalho de Sánchez-Rabaneda e colaboradores (2003), junto com outros flavonoides glicosilados utilizando a técnica de CLAE-EM/MS/MS. Destaca-se que todos os íons citados são característicos de substâncias já detectas nas sementes de *T. cacao*, porém não há relatos das mesmas nas sementes de *T. subincanum*, levando ao relato de substâncias inéditas na espécie.

Tabela 7. Dados dos principais íons detectados no extrato e frações de *T. subincanum* e sugestões de substâncias de acordo com a literatura

Espécies	Amostra	Intensidade (%)	m/z (M-H)	Possíveis Substâncias	Referência
<i>T. subincanum</i>	Extrato	100	179,26	Ácido cafeico	JALAL, 1977
		44,3	191,26	Ácido quínico	D'SOUZA et al., 2017
		49,94	353,34	Ácido clorogênico Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquinico	D'SOUZA et al., 2017 SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003
		15,89	354,2	Clovamida	BARROS et al., 2016
		17,38	457,18	(-)-epigallocatequina	ELWERS et al., 2009
		18,05	461,37	Isoscutelareina 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoronídeo Crisoeriol-7- <i>O</i> -glicosídeo	YANG et al., 2003
		21,25	541,21	Isoscutelareina-8- <i>O</i> - <i>D</i> - glucoronídeo 3''- <i>O</i> -sulfato (Teograndina 1)	PORTER et al., 1991
		12,44	577,24	Leucocianidina 1	RAMIRO-PUIG, 2009
	Fração em DCM	15,49	179,24	Ácido cafeico	JALAL, 1977
		36,65	227,42	Prolilhidroxiprolina N-acetilalanilprolina	D'SOUZA et al., 2017
		31,66	269,31	Apigenina	SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003
		25,35	315,62	Hipoleatina 3'-metil éter	BARROS et al., 2016
		25,18	326,48	(-) -N-[4'-Hidroxi-(<i>E</i>)-cinamoil]-L-tirosina Dideoxiclovamida	STARK, 2005 ARLORIO et al., 2008

	62,53	329	Ácido vinílico glucosídeo	D'SOUZA et al., 2017
	27,19	341,14	Sucrose	D'SOUZA et al., 2017
	32,93	353,39	Ácido clorogênico Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquinico	D'SOUZA et al., 2017
	29,85	461,26	Isoscutelareina 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucuronídeo Crisoeriol-7- <i>O</i> -glicosídeo	YANG et al., 2003 PUGLIESE et al., 2013
	42,95	179	Ácido cafeico	JALAL, 1977
	16,1	191,23	Ácido quínico	D'SOUZA et al., 2017
	31,44	227,41	Prolilhidroxiprolina N-acetilalanilprolina	D'SOUZA et al., 2017
	45,81	269,29	Apigenina	SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003
	18,59	326,41	<i>p</i> -Coumaroil tirosina	D'SOUZA et al., 2017
Fração em MeOH	39,29	353,24	Ácido clorogênico Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquinico	D'SOUZA et al., 2017 SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003
	20,15	393,16	Hexenil xilopiranosil glucopiranosídeo	CÁDIZ-GURREA et al., 2014
	14,87	431,13	Apigenina 8- <i>C</i> -hexosídeo	PUGLIESE et al., 2013
	16,49	461,29	Isoscutelareina 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoronídeo	PUGLIESE et al., 2013
	25,22	477,3	Hipolaetina 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoronídeo	PUGLIESE et al., 2013
	38,85	541,27	Isoscutelareina-8- <i>O</i> - <i>D</i> - glucoronídeo 3''- <i>O</i> -sulfato (Teograndina 1)	YANG et al., 2003

Assim como para as demais espécies, o extrato e frações de *T. cacao* foram submetidos a análise de EM-ESI. Na tabela 8 observa-se o íon de m/z 179 com uma intensidade de 100 %, é o íon mais intenso no extrato de *T. cacao*. O íon é característico do ácido cafeico já relatado nas sementes de *T. cacao* (JALAL, 1977). Na tabela 10, o mesmo íon foi mais intenso no extrato de *T. subincanum* indicando uma possível semelhança no perfil químico das duas espécies.

A fração em DCM de *T. cacao* apresentou como íon mais intenso, o mesmo observado na fração em DCM de *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. Na fração metanólica o íon de m/z 191 é o de maior intensidade atribuído ao ácido quínico já detectado nas sementes de *T. cacao* (D'SOUZA et al., 2017) e observado anteriormente na fração metanólica de *T. grandiflorum*.

Ao analisar os íons mais intensos já foi possível observar semelhanças entre as espécies, o que indica uma grande similaridade no perfil espectrométrico dos extratos e frações das espécies de *Theobroma*. Ao comparar os dados tabulados dos extratos das espécies *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. cacao* foram detectados três íons semelhantes de m/z: 179, 191 e 353. O íon de m/z 353 característico do ácido clorogênico, já relatado primeiramente por Jalal e colaboradores (1977) nas sementes, folhas, raízes e caules de *T. cacao*, relatado recentemente por D'Souza (2017) nas sementes de *T. cacao*.

Os íons de m/z 461 e 541 foram comuns ao extrato das espécies *T. cacao* e *T. grandiflorum*. Esses íons são característicos, dos flavonoides isoscutelareína-8-O- β -D-glucoronídeo (YANG et al., 2003) ou crisoeriol-7-O-glicosídeo (PUGLIESE et al., 2013), isoscutelareína-8-O-D-glucoronídeo 3''-O-sulfato (PORTER et al., 1991). A isoscutelareína-8-O- β -D-glucoronídeo já foi detectada nas sementes *T. grandiflorum*, já os outros flavonoides foram detectados nas sementes *T. cacao*.

O íon de m/z 477 foi o que se repetiu nas espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, correspondente a hipoleatina 8-O- β -D-glucoronídeo (PUGLIESE et al., 2013) ou quercetina 3-O- β -D-glucoronídeo (YANG et al., 2003). Nesse caso só é possível definir realizando a

fragmentação do íon, para se propor um mecanismo de fragmentação que comprove a presença de determinada substância.

A semelhança entre as três espécies de estudo foi evidenciada pela semelhança dos íons que estas apresentaram. As frações em DCM apresentaram três íons iguais de m/z 179, 191 e 353. Alguns íons se repetiram em duas das espécies (*T. cacao* e *T. grandiflorum*), como os íons de m/z 461 e 541 que já foram observados nos extratos das duas espécies. Na fração metanólica também foi possível observar íons semelhantes, como de m/z 353 e 393 constantes nas três espécies de *Theobroma*.

Tabela 8. Dados dos principais íons detectados no extrato e frações de *T. cacao* e sugestões de substâncias de acordo com a literatura

Espécies	Amostra	Intensidade (%)	m/z (M-H)	Possíveis Substâncias	Referência
<i>T. cacao</i>	Extrato	100	179,26	Ácido cafeico	JALAL, 1977
		33,67	191,26	Ácido quínico	D'SOUZA et al., 2017
		13,97	269,33	Apigenina	SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003
		10,09	341	Sacarose	D'SOUZA et al., 2017
		31,76	353,24	Ácido clorogênico Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquinico	D'SOUZA et al., 2017 SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003
		83,27	359,26	Ácido dimetoxigálico glucopiranosídeo	D'SOUZA et al., 2017
		42,17	393,15	Hexenil xilopiranosil- glucopiranosídeo	CÁDIZ-GURREA et al., 2014
		9,18	433,06	Quercetina 3- <i>O</i> -pentosídeo	PUGLIESE et al., 2013
	Fração em DCM	15,49	179,24	Ácido cafeico	JALAL, 1977
		33,38	315,62	Hipolaetina 3'-metil éter	BARROS et al., 2016
		100	329	Ácido vanílico glucosídeo	D'SOUZA et al., 2017
		13,85	341,14	Sucrose	D'SOUZA et al., 2017
		29,42	393,29	Hexenil xilopiranosil glucopiranosídeo	CÁDIZ-GURREA et al., 2014
		16,13	179	Ácido cafeico	JALAL, 1977
	Fração em MeOH	81,93	191,23	Ácido isocítrico	D'SOUZA et al., 2017
		11,48	269,29	Apigenina	SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003
62,56		353,24	Ácido clorogênico Ácido 4- <i>O</i> -Cafeoilquinico	D'SOUZA et al., 2017 SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003	
16,38		354,28	Clovamida	BARROS et al., 2016	

10,62	359,23	Ácido dimetoxigalico glucopiranosídeo	CÁDIZ-GURREA et al., 2014
20,15	393,16	Hexenil xilopiranosil glucopiranosídeo	CÁDIZ-GURREA et al., 2014
4,9	491,24	Quercetina 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoronídeo 6''-metil éster Hipolaetina 3'-metil éter 8- <i>O</i> - β - <i>D</i> glucoronídeo	YANG et al., 2003 PUGLIESE et al., 2013
11,7	575,23	Dihidrodiepicatequina A	TAEYE et al., 2014

5.4.1 Proposta de fragmentação dos principais íons detectados nas espécies de *Theobroma*

Os principais íons obtidos a partir dos dados espectrométricos, foram selecionados para a fragmentação. Com o objetivo de confirmar as estruturas correspondentes a cada íon, baseando-se em dados da literatura. O critério utilizado para a seleção dos íons foi, a presença dos íons em mais de uma espécie e os íons mais intensos de cada espécie.

Os íons selecionados para a espécie *T. grandiflorum* foram os seguintes: 179, 191, 278, 353, 393, 461, 477, 491, 541 e 571 para o extrato etanólico; 315, 329, 461 para a fração em DCM; 179, 191, 278, 285, 353, 393, 461, 477, 491, 541, 577 para a fração metanólica. Dentre os íons selecionados, alguns não fragmentaram, como 278, 393, 491 e 571 para o extrato etanólico, para a fração em DCM somente o íon 315 não fragmentou já para a fração metanólica os íons 278, 285, 393, 461 não fragmentaram. Na tabela 9, pode-se observar a fragmentação dos íons em cada amostra de *T. grandiflorum*.

Tabela 9. Dados espectrométricos da fragmentação (ms^2) dos principais íons de *T. grandiflorum*

Amostras	Íon [M-H]	Fragmentação (ms^2)
Extrato hidroalcoólico	179	135
	191	111
	353	145
	461	285
	477	301
	541	255
Fração em DCM	329	220
	461	285
Fração em MeOH	179	135
	191	111
	353	111
	477	301
	491	311
	541	255
	557	477

O íon de m/z 179 característico do ácido cafeico, foi observado no extrato e na fração metanólica. Os fragmentos do íon podem ser observados na figura 15, com as respectivas

perdas. O fragmento 135 corresponde a perda de CO_2 , sendo este o íon base, ou seja, o mais estável. Outro fragmento de menor intensidade foi observado, 178 que corresponde a perda de um hidrogênio (ZHOU et al., 2014). O íon 179 também foi observado e fragmentado no extrato e fração em metanol (tabela 11). O ácido cafeico é caracterizado como um ácido fenólico já relatado nas sementes e caule de *T. grandiflorum*. Alson e colaboradores (2018) relataram atividade antimalárica do ácido cafeico que apresentou um CI_{50} de 80,5 frente ao *Plasmodium falciparum*.

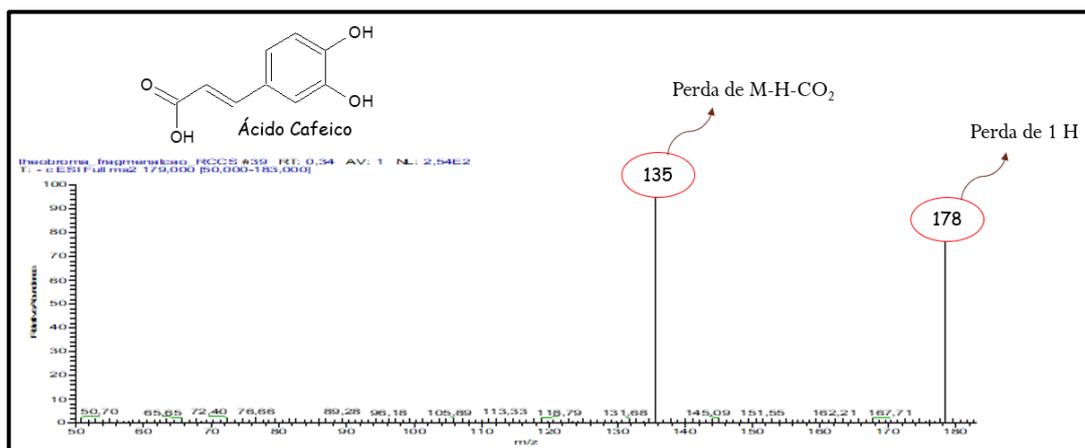


Figura 15. Espectro de fragmentação do íon 179 (ms^2)

Os íons 191 e 353 são correspondentes, ao ácido isocítrico e ao ácido clorogênico (CÁDIZ-GURREA et al., 2014; JALAL, 1977). As duas substâncias já foram relatadas no gênero *Theobroma*. Ao observar os fragmentos obtidos, observou-se que no extrato etanólico o íon 353 não apresentou o fragmento esperado de 191 ou 111, porém na fração o fragmento já correspondeu ao esperado (figura 16).

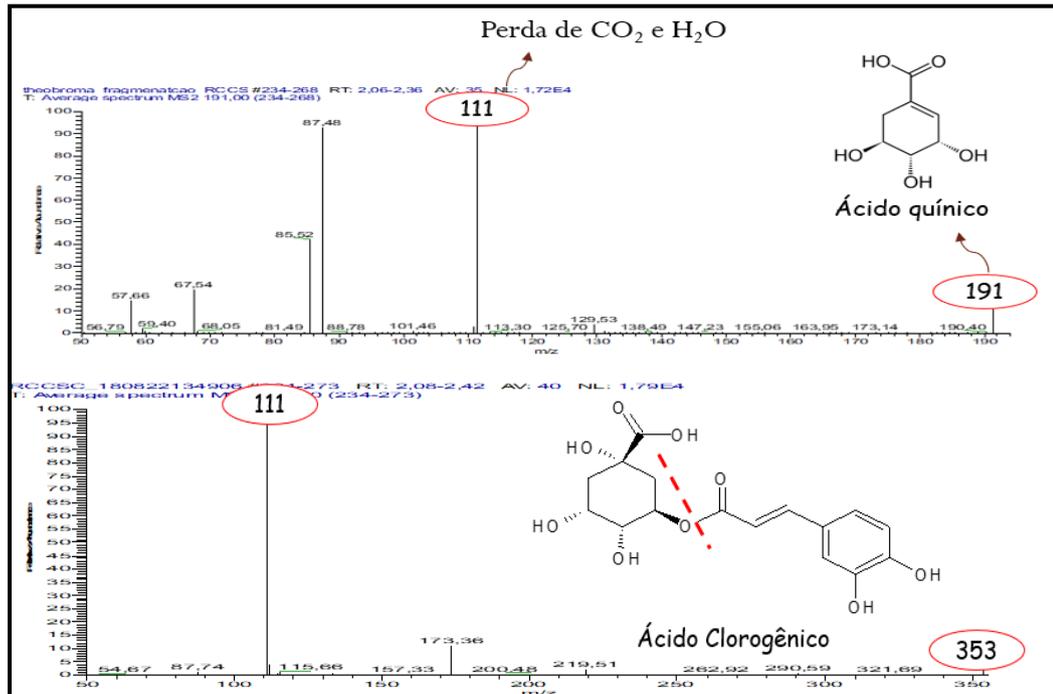


Figura 16. Espectro da fragmentação do íon 191 e 353 (ms^{-2})

Pode-se sugerir que o íon 191 pode ser um fragmento do ácido clorogênico que foi formado logo na análise de EM-full-scan, sendo esse fragmento indicativo da perda de 162 daltons correspondentes ao ácido quínico (SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003). O fragmento 111 pode ser característico da perda de CO_2 e H_2O (BYLUND et al., 2007; MASIKE et al., 2017). Os íons 191 e 353 também foram fragmentados em *T. subincanum* e *T. cacao* (Tabela 12 e 13).

O flavonoide isoscutelareína 3-*O*- β -*D*-glucuronídeo correspondente ao íon 461 que foi fragmentado produzindo o fragmento 285 característico da perda da unidade de açúcar presente na molécula de acordo com o espectro da figura 17. O mesmo íon foi também fragmentado no extrato e fração metanólica de *T. subincanum* (Tabela 12). O íon 477 correspondente ao flavonoide hipolaetina-8-*O*- β -*D*-glucuronídeo, foi relatado nas sementes de cupuaçu. O fragmento observado para o íon 477 foi o 301, característico da perda de açúcar. Na espécie *T. subincanum* o íon 477 também foi observado e fragmentado, podendo confirmar a presença da

hipoleatina 8-*O*- β -D-glucoronídeo nas sementes de *T. grandiflorum* e *T. subincanum* (PUGLIESE et al., 2013).

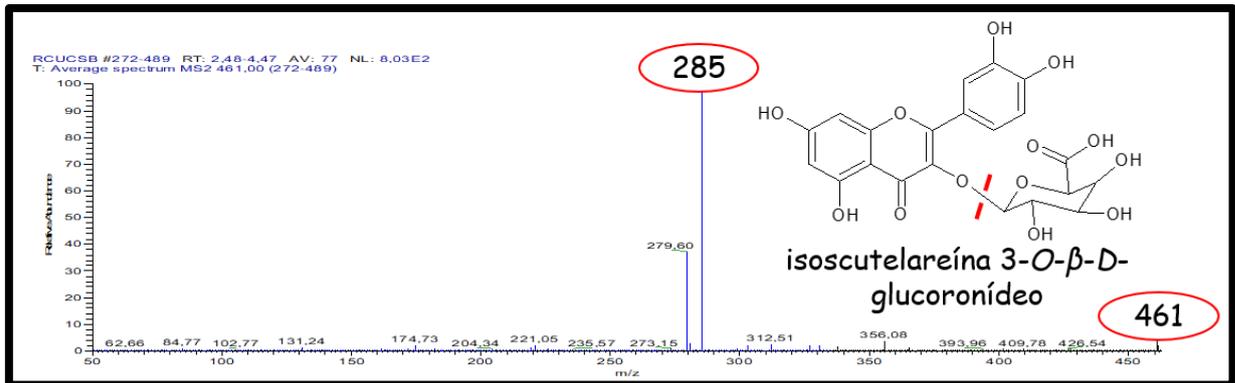


Figura 17. Espectro da fragmentação do íon 461 (ms^2)

O íon 491 pode ser característico ao flavonoide hipolaetina 3''-metil éter 8-*O*- β -D-glucoronídeo), porém ao observar os fragmentos obtidos o íon base não correspondeu com o relatado na literatura, pode-se afirmar que o íon não pode ser identificado por ausência de dados na literatura em relação aos fragmentos formados (PUGLIESE et al., 2013).

O íon 557 apresentou como íon base m/z 477 característico da perda de um grupo $\text{SO}_3\text{-H}$, além de apresentar um fragmento m/z 301 correspondente a perda de uma unidade de açúcar (figura 18). Tais características são atribuídas ao flavonoide hipolaetina 8-*O*- β -D-glucoronídeo 3''-sulfato (**36**) (PUGLIESE, 2013). Na fração metanólica de *T. subincanum* também apresentou o íon 577 (tabela 12), o que confirma a semelhança entre as espécies.

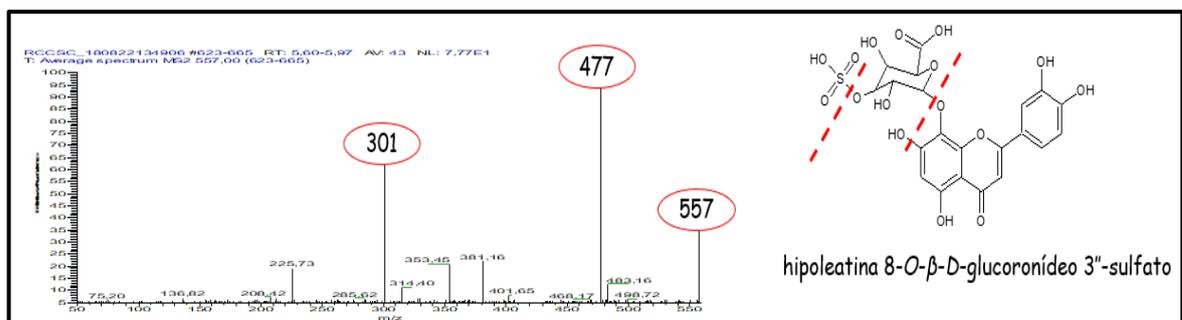


Figura 18. Espectro da fragmentação do íon 557 (ms^2)

Os íons selecionados para a espécie *T. subincanum* foram: 179, 191, 353, 457, 461, 477, 541, 577 para o extrato hidroalcoólico; 227, 269, 315, 326, 329, 461 para a fração em

DCM; 179, 191, 353,393, 431, 461,477, 541 para a fração metanólica. Dentre os íons selecionados, alguns não fragmentaram, como 179 e 577 para o extrato hidroalcoólico, para a fração em DCM os íons 227, 269, 315, 326, 329 não fragmentaram já para a fração metanólica os íons 179, 393, 431, 461 não fragmentaram. Na tabela 10, pode-se observar a fragmentação dos íons em cada amostra de *T. subincanum*.

Tabela 10. Dados espectrométricos da fragmentação (ms^2) dos principais íons de *T. subincanum*

Amostras	Íon [M-H]	Fragmentação (ms^2)
Extrato hidroalcoólico	191	111
	353	111
	461	285
	477	301
	541	255
Fração em DCM	461	285
Fração em MeOH	191	111
	353	111
	477	301
	541	255

Os fragmentos observados na tabela 10 foram relatados na tabela 11, vale ressaltar que as fragmentações foram iguais e foram correlatas aos dados da literatura. Esse fato indica a grande semelhança entre as espécies de *T. subincanum* e *T. grandiflorum*. Na literatura não há relatos de comparação do perfil químico dos flavonoides das duas espécies, mas somente relacionado às metilxantinas. No trabalho de Moita (2016) a semelhança das espécies está na presença da teacrina, onde foi possível isolar a substância das cascas das sementes de *T. subincanum*. As metilxantinas cafeína, teobromina e teofilina são responsáveis pelo sabor e textura das sementes que no caso do cacau, é um parâmetro de controle de qualidade para as sementes (PURA NAIK, 2001).

Os principais íons do extrato e frações da espécie *T. cacao*, selecionados foram: 179, 191, 269, 353, 359, 393 para o extrato; 329, 393 para a fração em DCM; 179, 191, 353, 359, 393 para a fração em MeOH. Alguns íons selecionados não foram fragmentados como, os íons

269, 353, 359,393 para a extrato hidroalcoólico, na fração em DCM apenas o íon 329 fragmentou, já na fração metanólica os íons 359 e 393 não fragmentaram. Os fragmentos obtidos podem ser observados na tabela 13.

Tabela 11. Dados espectrométricos da fragmentação (ms^2) dos principais íons de *T. cacao*

Amostras	Íon [M-H]	Fragmentação (ms^2)
Extrato hidroalcoólico	179	135
	191	111
Fração em DCM	329	211
Fração em MeOH	179	111
	191	111
	353	111

O íon 329 que apresentou o fragmento 211, foi observado relatado também na fração em DCM, porém com um fragmento diferente. Segundo D'Souza (2017) o íon 329 pode corresponder ao ácido vinílico glucosídeo, porém não possui dados de fragmentação, por isso se faz necessário sugerir uma proposta de fragmentação. As moléculas que corresponderam aos íons fragmentados nas amostras das três espécies, podem ser observadas na figura 19.

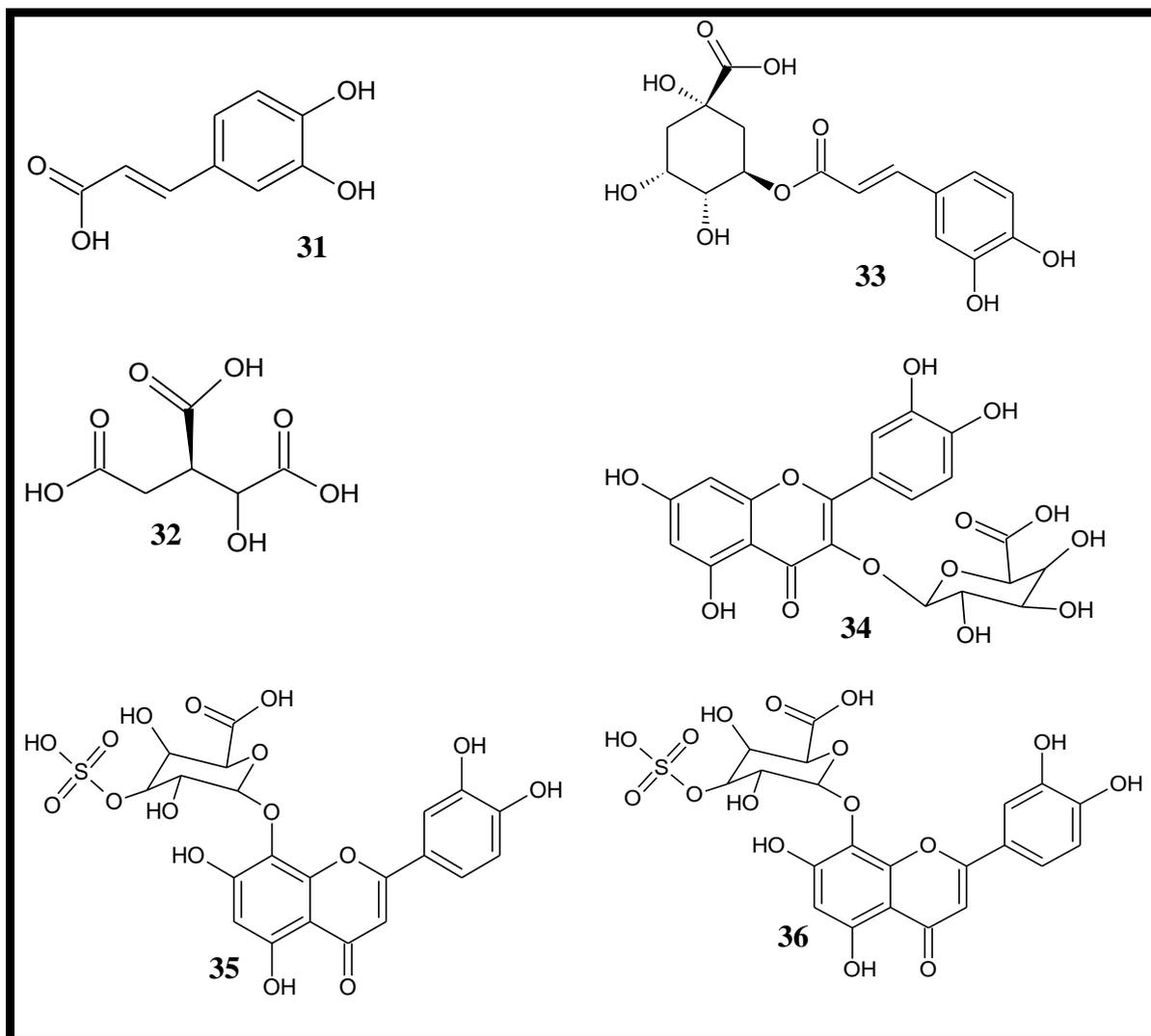


Figura 19. Moléculas correspondentes aos íons fragmentados nas três espécies de *Theobroma*

5.5 Caracterização cromatográfica por CLUAE-DAD das espécies de *Theobroma*

Inicialmente, os extratos e frações foram diluídos em MeOH solvente grau CLAE, na concentração de 1 mg/mL e foram injetados para se dar início ao desenvolvimento do método. Como teste foram utilizadas as frações em DCM e metanol de *T. grandiflorum*. A primeira análise (método 1) realizada através de uma varredura em modo gradiente, nas seguintes condições: fase móvel composta por Ácido fórmico 0,5 % (solvente A) e Metanol (solvente B), o início da corrida se deu com um equilíbrio de 5 min em 15 % de B e posteriormente iniciou-se o gradiente com 5% de B-100% de B em 20 min, em seguida realizou-se uma limpeza no modo isocrático em 100% de B e por fim realizou-se um gradiente em 10 min até a condição

inicial de 5% de B. O volume de injeção foi de 20 μL com uma taxa fluxo utilizado de 1 mL/min, as análises foram monitoradas nos comprimentos de onda 254, 280 e 366 nm (figura 20).

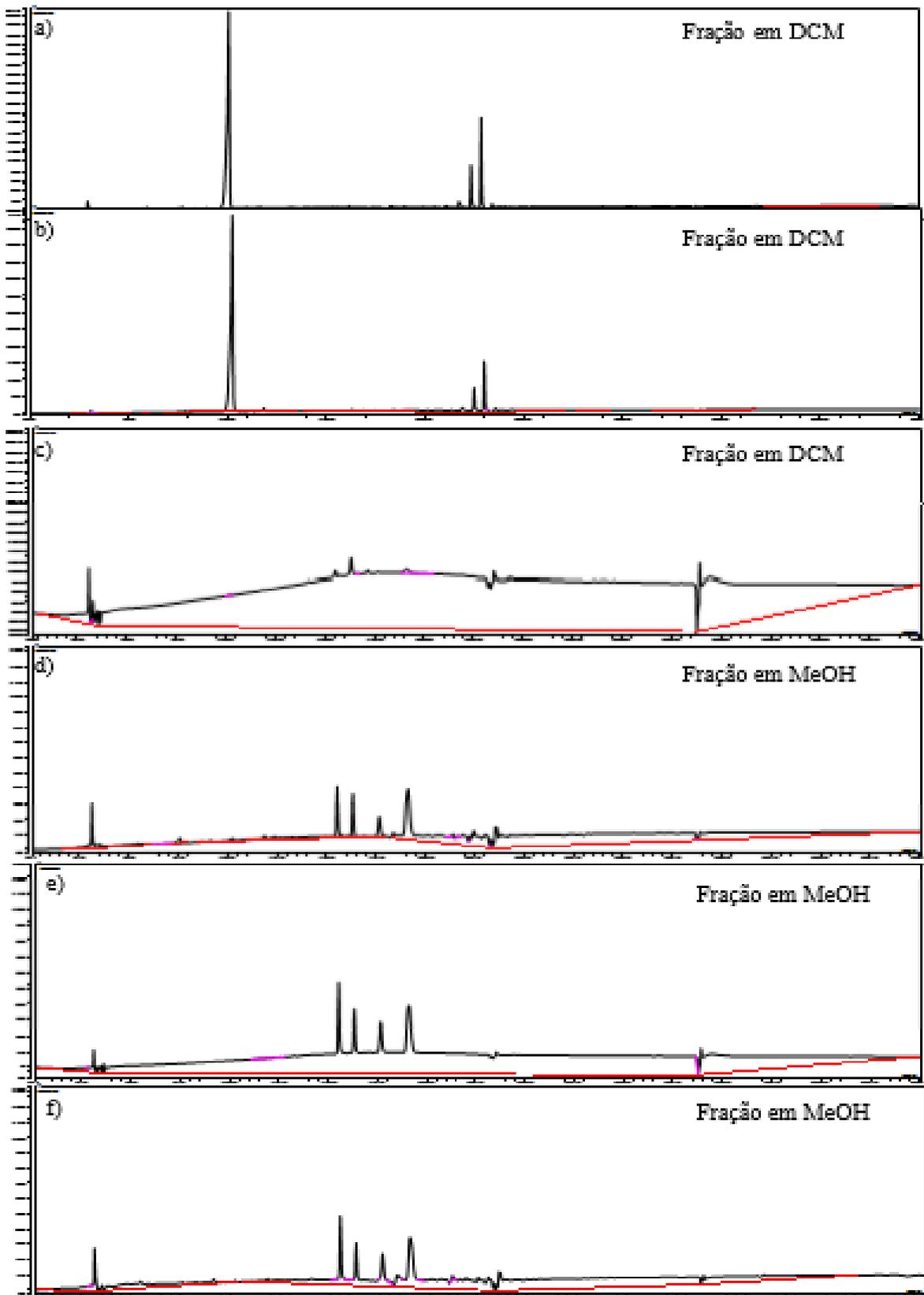


Figura 20. Cromatogramas das frações em DCM e MeOH de *T. grandiflorum*, obtidos do método 1. a) e d) Cromatogramas no comprimento de onda 254 nm; b) e e) Cromatogramas no comprimento de onda 280 nm; c) e f) Cromatogramas no comprimento de onda 366 nm.

Na figura 20 os cromatogramas da fração em DCM apresentaram uma boa absorção nos comprimentos de onda 254 (a, d) e 280 (b, e) nm. No comprimento de onda 366 nm os picos ficaram com baixa intensidade, o que dificulta a caracterização dos picos devido a presença de ruído. A linha de base no cromatograma em 366 nm não apresentou uma boa linearidade quando comparada aos outros dois comprimentos de onda.

Nos cromatogramas da fração em MeOH, observou-se boa absorção nos três comprimentos utilizados para monitorar as análises. Porém, no comprimento de onda 366 nm, assim como na fração em DCM a linha de base não apresentou uma boa linearidade. Os cromatogramas a e b da figura 20 apresentaram uma alta intensidade nos picos, o que indica alta concentração, esse fato pode acarretar a sobreposição dos picos. Tendo em vista essa concentração se faz necessária a otimização do método para que a sobreposição de picos seja descartada.

No método 2 as mesmas condições foram utilizadas, modificando somente o solvente B, para acetonitrila, com o objetivo de comparar os dois métodos para a escolha da melhor condição de análise. Os cromatogramas obtidos no segundo método podem ser observados na figura 21.

Nos cromatogramas a) e b) a intensidade dos picos foram melhores do que no cromatograma c) o mesmo correu nos cromatogramas da fração em DCM (figura 20). A fração em MeOH apresentou ótima absorção nos três comprimentos de onda utilizados. Pode-se observar que a intensidade dos picos dos cromatogramas d), e) e f) foi abaixo de 100 mAU, que pode indicar baixa concentração da fração em metanol.

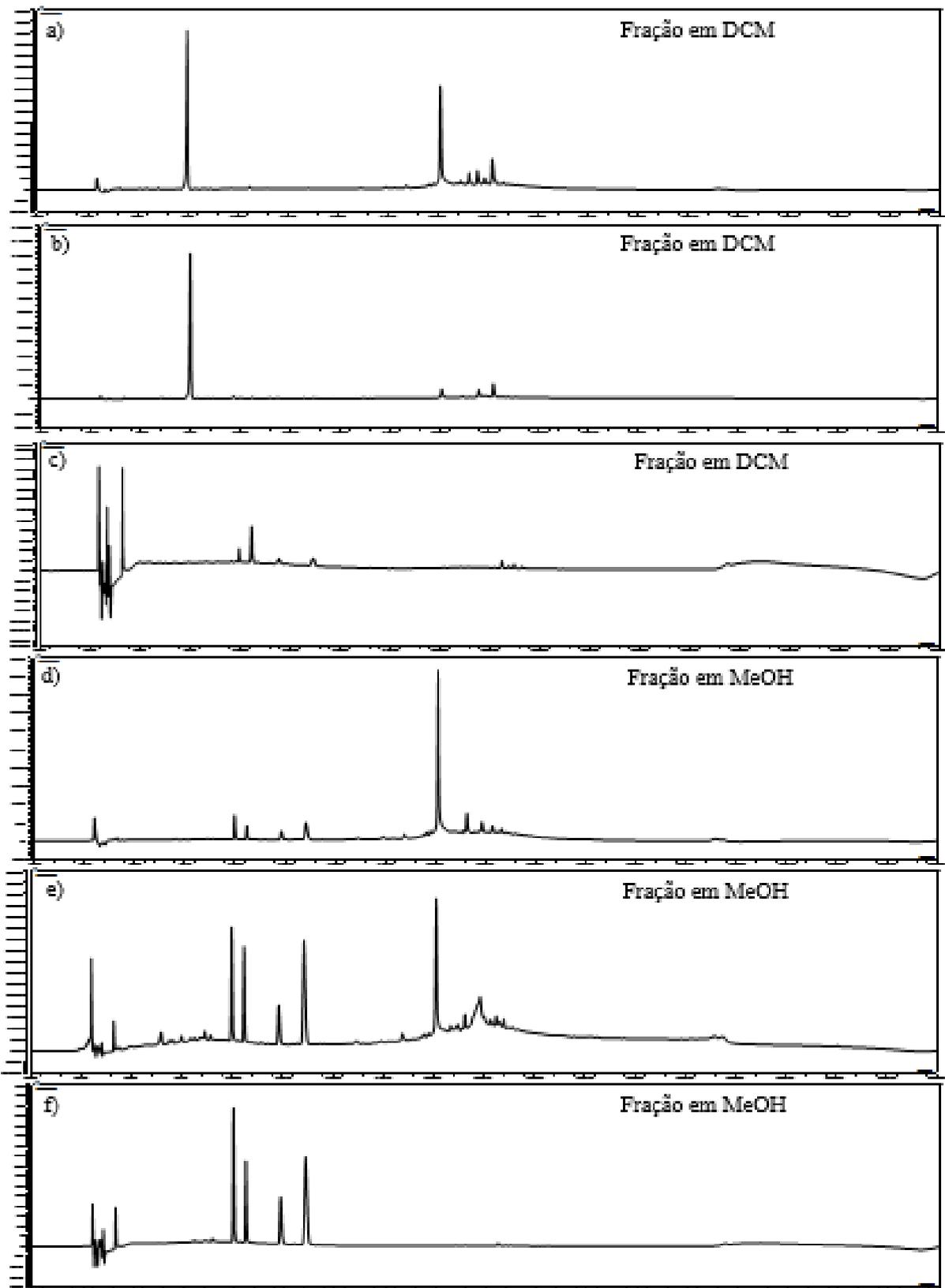


Figura 21. Cromatogramas das frações em DCM e MeOH de *T. grandiflorum*, obtidos do método 2. a) e d) Cromatogramas no comprimento de onda 254 nm; b) e e) Cromatogramas no comprimento de onda 280 nm; c) e f) Cromatogramas no comprimento de onda 366 nm

Ao comparar os cromatogramas das figuras 20 e 21, pode-se observar que o método 2 apresentou uma melhor separação dos picos e foi possível observar outros picos. Os picos de maior intensidade foram levados em conta para avaliar a separação. No método 1 o pico de maior intensidade da fração em DCM nos comprimentos de onda 254 e 280 nm apresentou um tempo de retenção (t_r) de aproximadamente 10 min.

No método 2 o mesmo pico mais intenso se encontrou no t_r de aproximadamente em 7,5 min, indicado que o uso da acetonitrila aumentou a interação da amostra com a fase móvel. Esse fato indica que o método 2 é mais ideal para se utilizar com as demais amostras, pois ao observar o cromatograma é possível otimizar o método para que o gradiente seja reduzido ou até mesmo o tempo de corrida.

O método 2 foi otimizado, após vários testes com variações de gradiente o seguinte método foi obtido: o equilíbrio foi realizado com 10% de B (ACN) durante 5 min, gradiente 10%-50% de B (5-20 min), isocrático em 50% de B (20-25 min) e retornou-se para as condições iniciais (25-35min).

No método escolhido foram analisados 9 padrões, sendo duas metilxantinas (cafeína e teacrina) e sete flavonoides. Os cromatogramas obtidos dos padrões com os seus respectivos tempos de retenção no comprimento de onda 280 nm, podem ser observados na figura 22. A partir dos tempos de retenção foi realizada a comparação entre as espécies e a caracterização de metilxantinas e flavonoides nos extratos e frações das três espécies do gênero *Theobroma*.

O padrão de teacrina foi obtido por meio de isolamento das cascas das sementes de cupuaçu, utilizando uma metodologia específica para extração de metilxantinas, já os padrões de cafeína e flavonoides foram obtidos comercialmente.

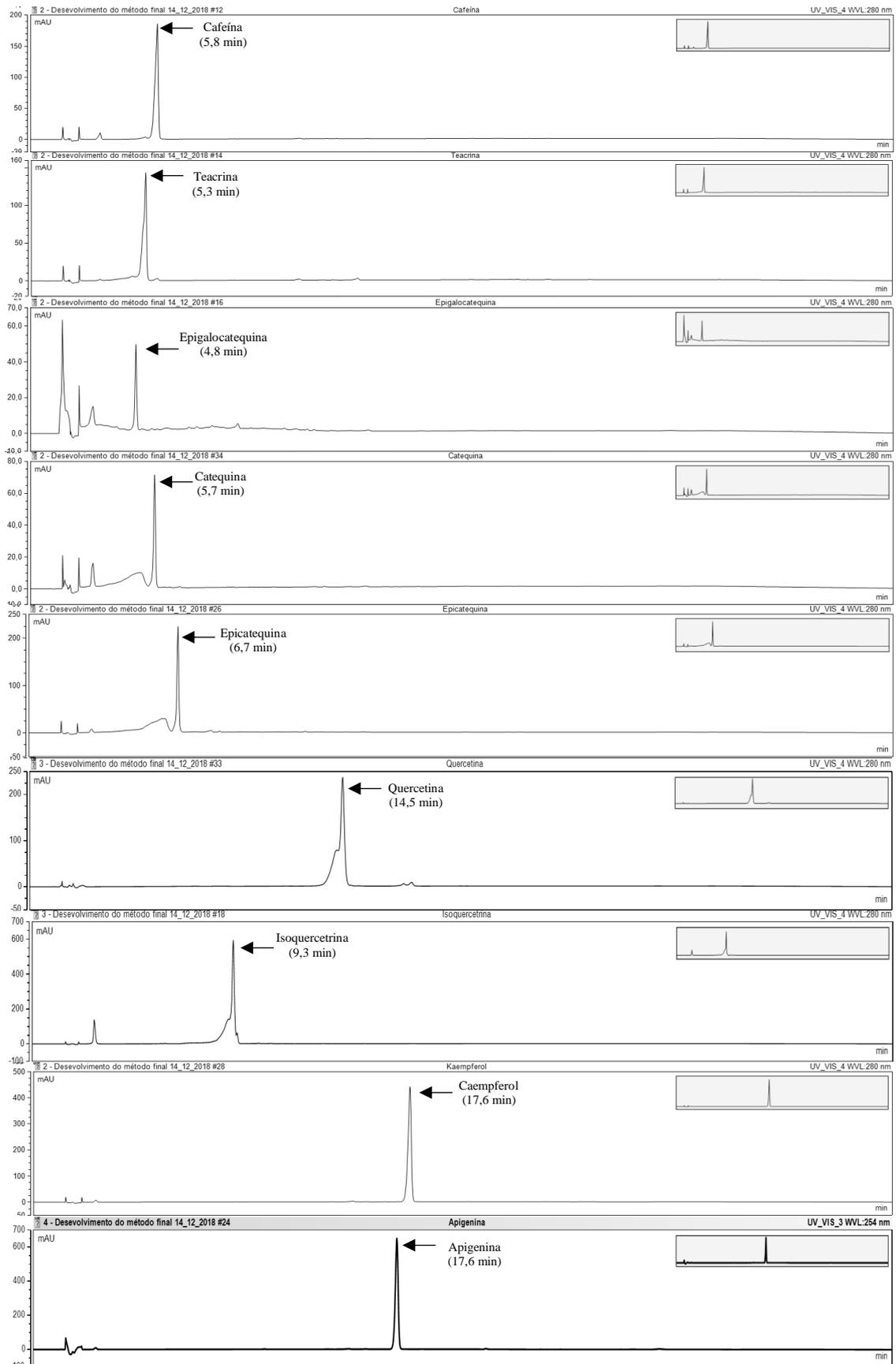


Figura 22. Cromatogramas dos padrões de metilxantinas e flavonoides

Em seguida todos os extratos e frações das espécies *T. cacao*, *T. grandiflorum* e *T. subincanum* foram analisados. Os cromatogramas dos extratos hidroalcoolicos das três podem ser observados estão dispostos na figura 23 em diferentes comprimentos de onda.

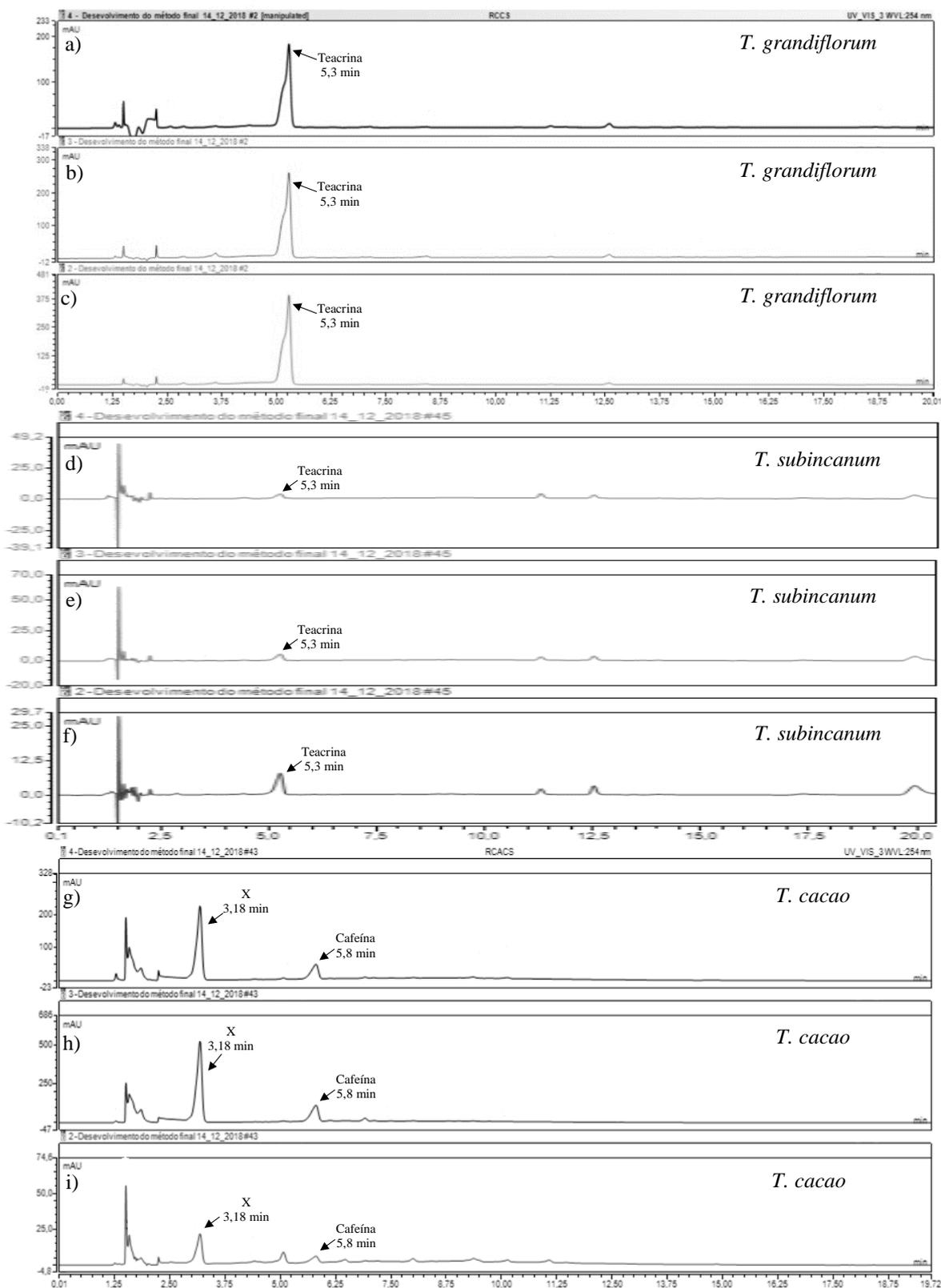


Figura 23. Cromatogramas dos extratos hidroalcoolicos das três espécies de *Theobroma* a), d) e g) Cromatogramas no comprimento de onda 254 nm; b), e) e h) Cromatogramas no comprimento de onda 280 nm; c), f) e i) Cromatogramas no comprimento de onda 300 nm

A similaridade entre as espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum* é observada nos cromatogramas a)-f) apresentados na figura 24. Ambas espécies apresentaram o pico com tempo de retenção 5,3 min que correspondente a teacrina, tendo em vista que o padrão apresentou o mesmo tempo de retenção. Além disso, os dados de espectrometria de massas, a fragmentação do íon m/z 225 e os espectros de U.V. (figura 24) confirmaram a presença da teacrina nos extratos hidroalcoolicos. A teacrina já foi relatada nas cascas das sementes de *T. grandiflorum* nos trabalhos de Vasconcelos (1975), Hammerstone (1994) e Lima (2013), e no endocarpo de *T. subincanum* relatada nos trabalhos de Vasconcelos (1975) e Hammerstone (1994).

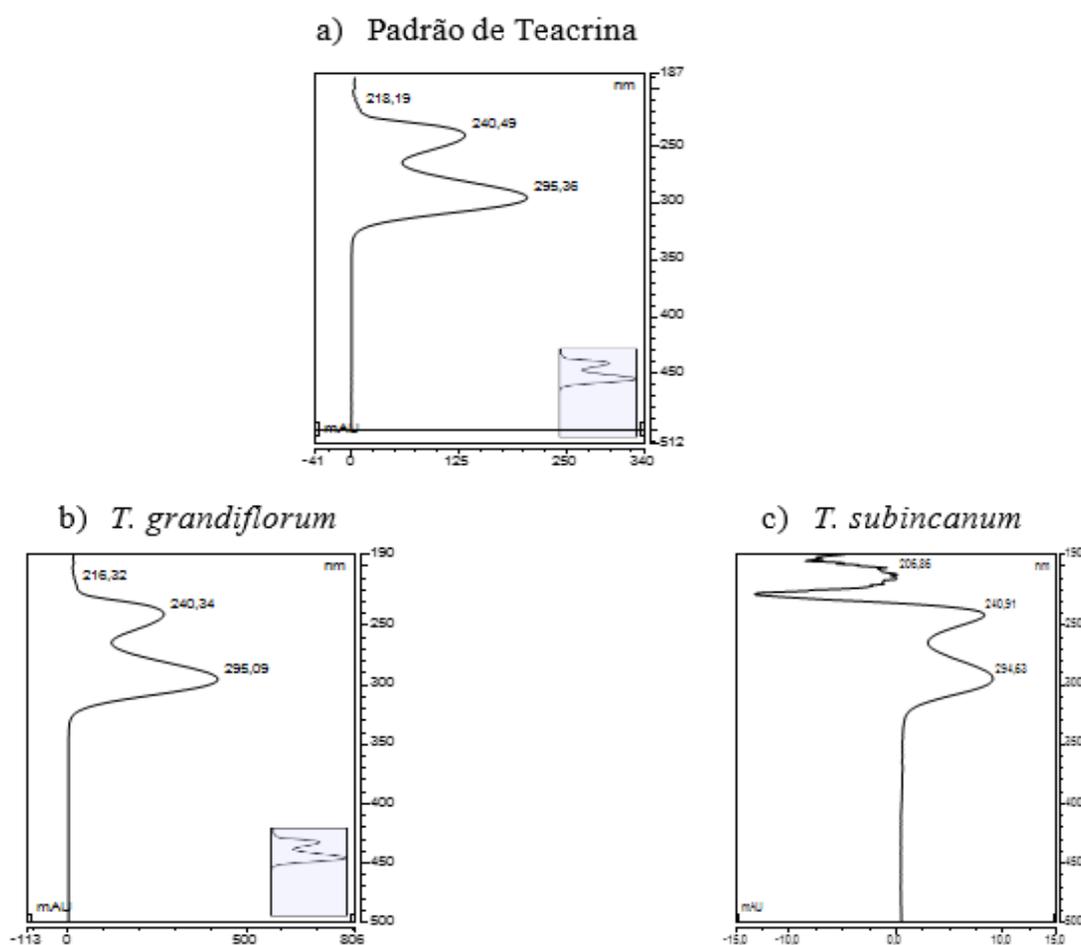
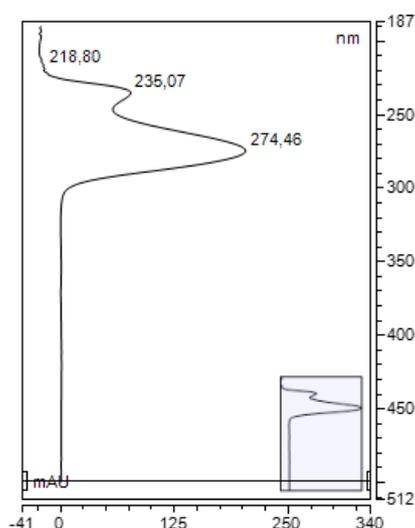


Figure 24. Espectros de Ultravioleta do pico correspondente a teacrina dos extratos hidroalcoolicos das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*

A teacrina (1,3,7,9-tetrametilurato) segundo o trabalho de Vasconcelos (1975) é caracterizada por apresentar uma banda de adsorção principal em cerca de 293 nm e uma banda de adsorção em cerca de 232 nm, característica de uma xantina metilada na posição 9, de acordo com Cavalieri (1954) dados estes observados nos espectros da figura 24.

A principal diferença observada nos cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos das cascas das sementes de *T. cacao* em relação aos demais extratos, é a presença do pico com tempo de retenção 5,8 min que apresenta características correspondentes a cafeína. No espectro de ultravioleta (figura 25), pode-se observar as bandas absorção características da cafeína conforme o padrão analisado.

a) Padrão de Cafeína



b) *T. cacao*

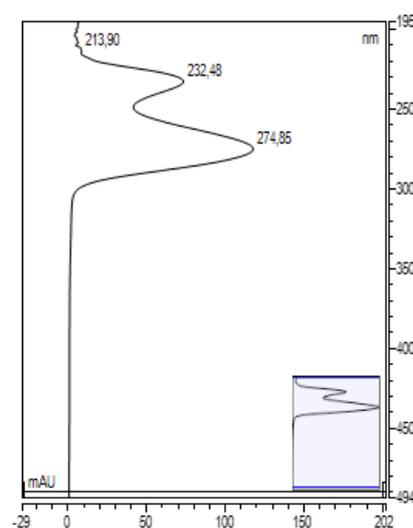


Figure 25. Espectros de Ultravioleta do pico correspondente a cafeína do extrato hidroalcoólico da espécie *T. cacao*

A cafeína já foi detectada nas cascas e sementes do fruto e nas folhas de *T. cacao* em diversos trabalhos (KOYAMA et al., 2003; ORTEGA et al., 2010; PEREIRA-CARO et al., 2013; SOTELO et al., 2015; TOMAS-BARBERÁN et al., 2007). Carrillo e colaboradores (2015) quantificou a cafeína, teobromina e epicatequina, catequina nas sementes de *T. cacao*, através da análise em CLAE-DAD.

Nos cromatogramas de *T. cacao*, pode-se observar o pico X no tempo de retenção 3,18 min em alta intensidade nos comprimentos de onda 254 nm e 280 nm. Não foi possível identificá-lo, mas de acordo com o espectro de ultravioleta (figura 26), pode-se sugerir que o pico corresponde a um derivado de metilxantina, pois apresenta uma banda intensa em 274,32 nm característica da classe.

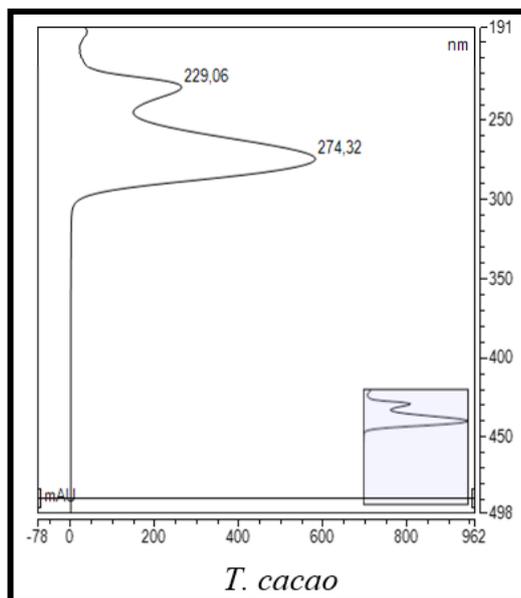


Figure 26. Espectro de Ultravioleta do pico X da espécie *T. cacao*

A figura 27 apresenta os cromatogramas das frações em DCM obtidas por partição líquido-líquido das cascas das sementes das três espécies do gênero *Theobroma*. Assim como nos extratos hidroalcoolicos das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, as frações em DCM também apresentaram um perfil cromatográfico semelhante. O pico correspondente a teacrina se apresentou mais intenso na fração em DCM de *T. subincanum*, pode-se sugerir que a substância pode estar em maior quantidade na fração quando comparada a fração de *T. grandiflorum*.

Os cromatogramas 27.g. a 27.i mostraram a presença da cafeína no tempo de retenção 5,8 min, assim como observado nos extratos, mas também o pico no tempo de retenção 3,17 min, nomeado como pico X que não pode ser identificado.

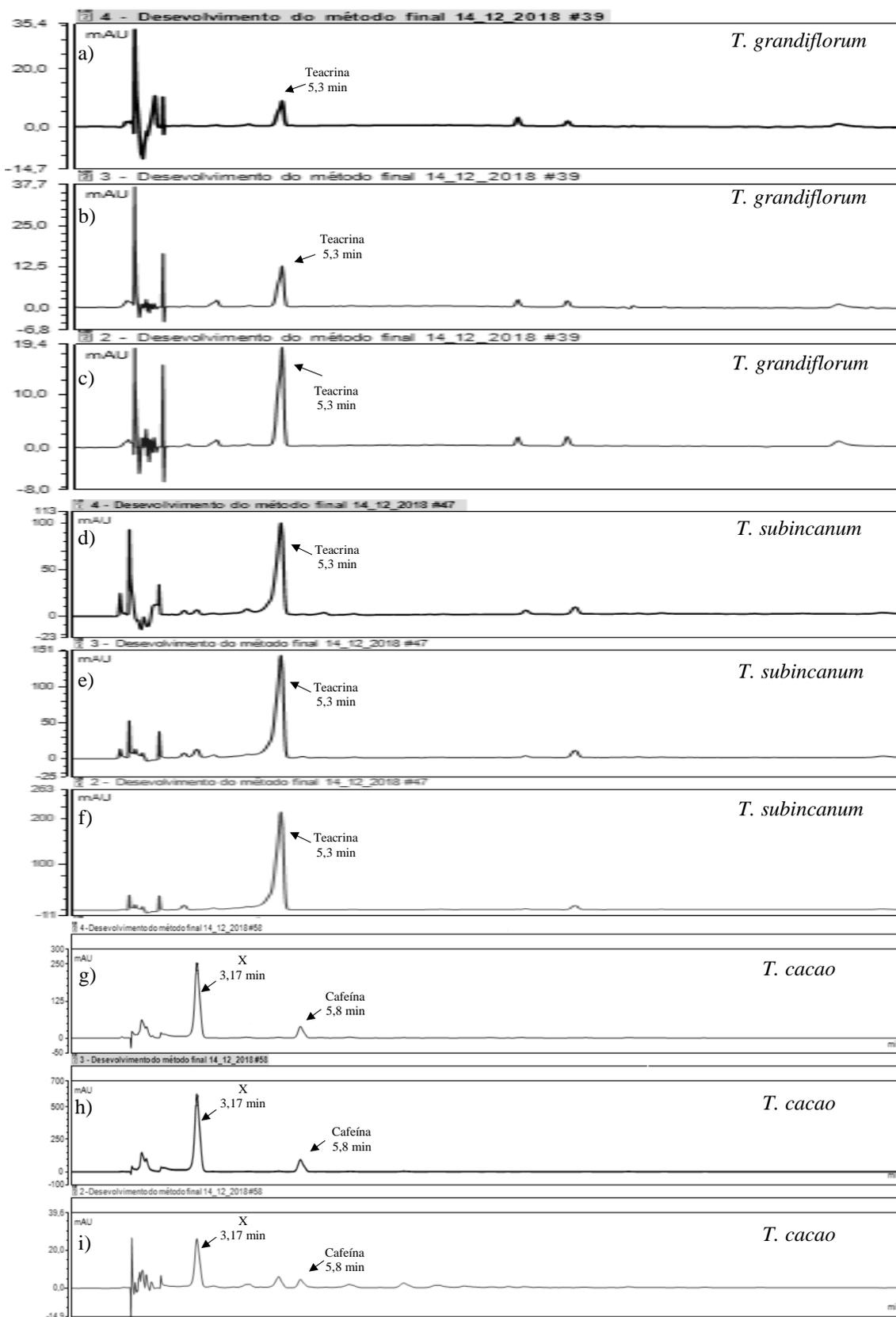


Figura 27. Cromatogramas das frações em DCM das três espécies de *Theobroma* a), d) e g) Cromatogramas no comprimento de onda 254 nm; b), e) e h) Cromatogramas no comprimento de onda 280 nm; c), f) e i) Cromatogramas no comprimento de onda 300 nm

Outros picos em menor intensidade foram detectados, porém não corresponderem a nenhum dos padrões utilizados para a comparação. A técnica mais indicada com maior sensibilidade e informação é a CLAE-EM, pois é possível sugerir a presença da substância em determinada amostra de acordo com os íons e fragmentos obtidos.

Os cromatogramas da fração metanólica podem ser observados na figura 28. As frações metanólicas das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum* apresentaram perfil cromatográfico similar, assim como nas frações em DCM. Poucos picos foram observados, isso pode estar relacionado a falta de substâncias com grupos cromóforos ou a baixa concentração na qual as frações foram injetadas.

Na espécie de *T. cacao*, destacou-se dois picos, com tempos de retenção já identificados na fração em DCM e no extrato. A presença desses íons indica a má separação das frações na partição líquido-líquido, assim como a alta concentração dessas substâncias nas cascas das sementes de *T. cacao*.

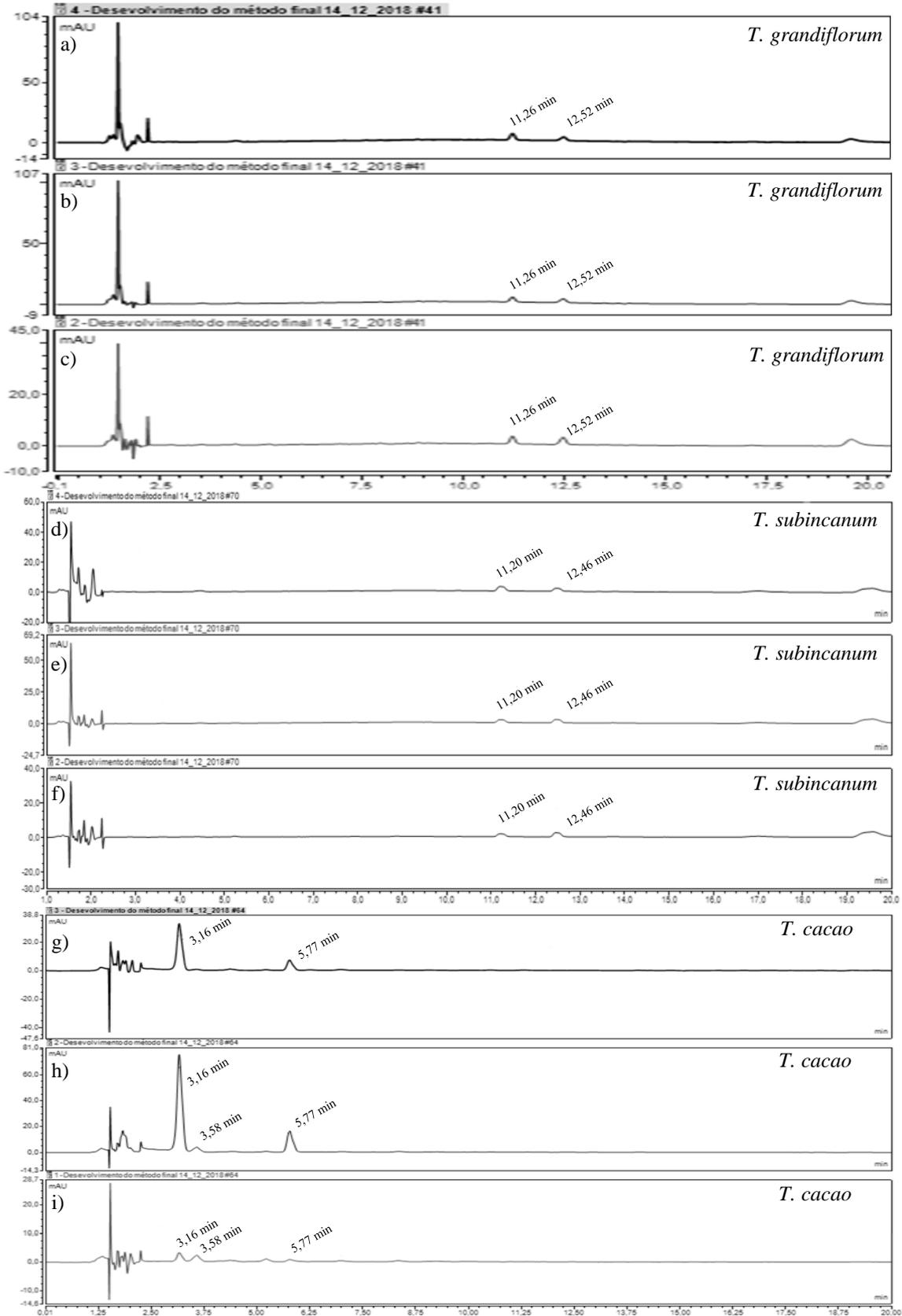


Figure 28. Cromatogramas das frações metanólicas das três espécies de *Theobroma* a), d) e g) Cromatogramas no comprimento de onda 254 nm; b), e) e h) Cromatogramas no comprimento de onda 280 nm; c), f) e i) Cromatogramas no comprimento de onda 300 nm.

5.6 Caracterização cromatográfica por CLUAE-EMAR-MS² das espécies de *Theobroma*

O estudo cromatográfico por CLUAE-EMAR-MS², teve como finalidade detectar as principais metilxantinas e flavonoides das espécies, com isso este foi realizado nos modos de ionização positivo e negativo, utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução. Os dados foram comparados com os padrões analisados e com a literatura, para correlacionar as espécies e observar as substâncias que podem ser comuns ao gênero *Theobroma*.

5.6.1 Análise no modo positivo de frações das cascas das sementes das espécies de *Theobroma*

As frações em DCM e MeOH das cascas das sementes de *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. cacao* foram submetidas a análise cromatográfica por CLAE-ESI-MS²-orbitrap. Em seguida os dados foram extraídos dos cromatogramas e tabulados (tabela 12), indicando o tempo de retenção, substância sugerida, razão massa carga m/z (M-H²), fragmentos e referência.

No modo positivo foi possível identificar quatro alcaloides, de acordo com padrões de fragmentação já relatados na literatura pode-se confirmar a presença deles nas espécies em estudo. O salsolinol (figura 29) foi detectado somente na fração metanólica de *T. grandiflorum*, este é um alcaloide tetrahydroisoquinolínico derivado da dopamina que foi detectado no cacau em pó no trabalho de Melzig (2000), onde é relatada a atividade psicoativa do alcaloide. O primeiro fragmento observado 163, pode corresponder a perda de NH₃. O fragmento 145 pode corresponder a perda de NH₃ e OH. Estes fragmentos foram analisados e comparados com o banco de dados HMDB (The Human Metabolome Database).

A teacrina, uma metilxantina, foi detectada nas cascas das sementes das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, esta já tinha sido observada na análise de CLAE-DAD, com isso, ao analisar os fragmentos, confirmou-se a detecção. O fragmento 210 pode estar relacionado a perda de uma metila, os demais fragmentos foram comparados com o relato de

Tabela 12. Dados dos íons identificados por CLUAE-EMAR-ESI no modo positivo com suas respectivas

Espécie	Fração	RT	Medida m/z	Calculada m/z	Erro (ppm)	Substância	Fórmula Molecular	Fragmentação	Referência
<i>T. grandiflorum</i>	DCM	3,83	225,0980	225,0989	3,99	Teacrina	C ₉ H ₁₂ O ₃ N ₄	168, 183, 210	Lima, 2013
	MeOH	0,47	180,1017	180,1026	4,99	Salsolinol	C ₁₀ H ₁₃ O ₂ N	163, 145, 137, 117	Rasche, 2011
<i>T. subincanum</i>	DCM	2,86	181,0719	181,0727	4,42	Teobromina	C ₇ H ₈ O ₂ N ₄	163,138	Lima, 2013
		3,81	225,0979	225,0989	4,44	Teacrina	C ₉ H ₁₂ O ₃ N ₄	168, 183, 210	
	MeOH	2,88	181,0718	181,0727	4,97	Teobromina	C ₇ H ₈ O ₂ N ₄	163,138	
<i>T. cacao</i>	DCM	2,90	181,0720	181,0727	3,86	Teobromina	C ₈ H ₁₀ O ₂ N ₄	163,138	Lima, 2013
		4,01	195,0876	195,0883	3,59	Cafeína	C ₇ H ₈ O ₂ N ₄	138	Pereira-Caro, 2013
	MeOH	2,83	181,0719	181,0727	4,42	Teobromina	C ₇ H ₈ O ₂ N ₄	163,138	Lima, 2013

Lima (2013). Assim a semelhança entre as espécies foi ainda mais evidenciada com a presença da teacrina.

Na tabela 12 é apresentada a detecção do íon m/z 181 nas espécies *T. subincanum* e *T. cacao*, que pode corresponder à teobromina que até então não foi relatada na espécie *T. subincanum*. Na espécie *T. cacao* a metilxantina já foi detectada nas cascas das sementes, sementes, folhas e cascas do fruto (CÁDIZ-GURREA et al., 2014; PEREIRA-CARO et al., 2013; SOTELO et al., 2015). A teobromina e a teofilina são isômeros constitucionais que se diferem somente pela posição de uma metila. O perfil de fragmentação dos isômeros são diferentes, pois acordo com Pereira-Caro e colaboradores (2013) o fragmento mais intenso da teobromina é o 138, observado na tabela 14, já na teofilina observa-se o íon base 124, sendo está a principal diferença no padrão de fragmentação dos isômeros (LIMA, 2013).

O íon m/z 195, correspondente a cafeína foi detectada somente na fração em DCM de *T. cacao*, resultado que está relacionado a análise de CLAE-DAD onde a cafeína foi detectada inclusivamente na espécie. O íon é o principal diferenciador da espécie *T. cacao* das demais estudadas. No trabalho de Vasconcelos (1975) que apresentou uma comparação entre a composição das sementes de *T. cacao* e *T. grandiflorum* mostrou a existência da cafeína e da teobromina nos extratos de cacau e a ausência nos extratos de cupuaçu.

A teobromina é encontrada nas cascas das sementes do cacau principalmente a após a fermentação (TIMBIE et al., 1978). Estudo na área de nutrição desestimularam o uso das cascas das sementes para o uso em ração animal, devido a presença da teobromina em alta concentração que está relacionada a toxicidade do uso das cascas das sementes (ADAMAFIO, 2013). Na figura 29, estão as estruturas correlacionadas aos íons detectados e fragmentados.

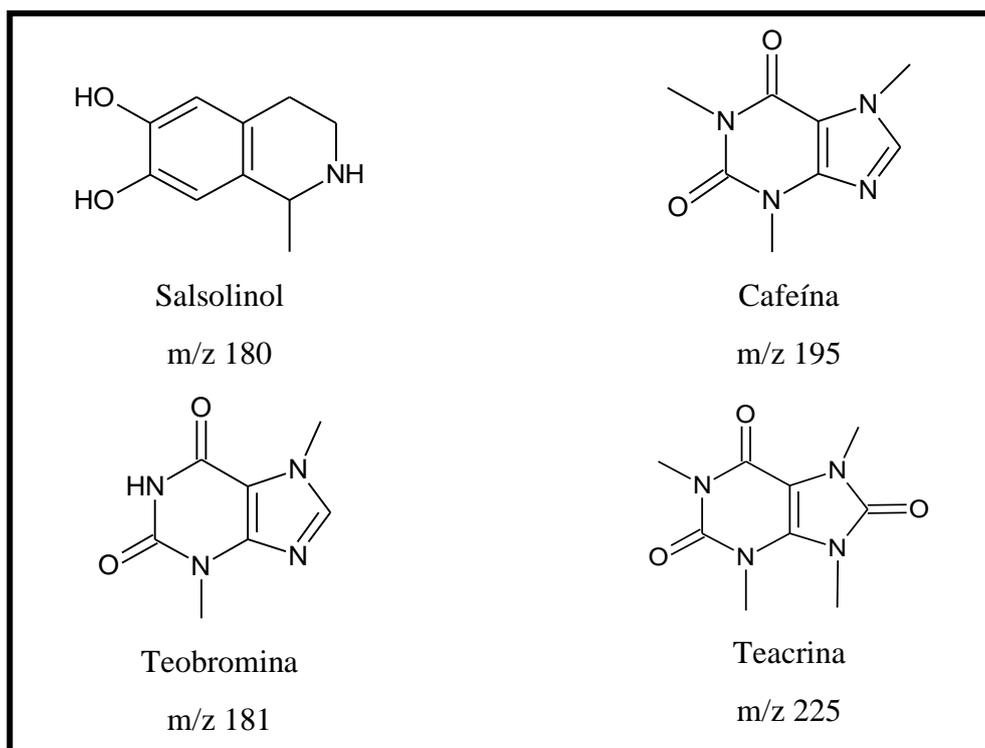


Figura 29. Alcaloides detectados por CLUAE-EMAR-ESI-MS²

5.6.2 Análise no modo negativo de frações das cascas das sementes das espécies de *Theobroma*

Após análise de CLUAE-EM-ESI no modo negativo, os dados cromatográficos e espectrométricos foram extraídos dos cromatogramas das frações em DCM e metanol das três espécies em estudo e posteriormente tabulados (tabela 13). Diferentes ácidos fenólicos e flavonoides foram detectados com o auxílio da fragmentação dos principais íons e comparação com dados da literatura.

Os íons m/z 191 e m/z 179 foram comuns nas espécies, exceto em *T. cacao* onde o m/z 179 não foi observado. Ambos são correspondentes a ácidos fenólicos, ácido isocítrico e ácido cafeico e já relatados nas sementes de *T. cacao*. O íon m/z 191 apresentou o fragmento 111 que é característico da perda de duas moléculas de água e uma carbonila. Já o íon m/z 179, apresentou o fragmento 135 que corresponde a perda de CO₂ (MASIKE et al., 2017).

Nas espécies *T. grandiflorum* e *T. cacao* foi detectado o íon 289, que pode corresponder a catequina ou epicatequina que são isômeros que não apresentam diferença em

seus padrões de fragmentação. A alternativa para a identificação dos isômeros seria os isolamentos das moléculas, para se realizar análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O íon apresentou o fragmento 245 que corresponde a perda de CO₂ (CÁDIZ-GURREA et al., 2014).

O íon 358 foi detectado somente em *T. grandiflorum*, sendo este característico da clovamida, uma amida polifenólica já relatada nas sementes de *T. grandiflorum* e *T. cacao* (BARROS et al., 2016). Os íons resultantes da fragmentação (tabela 13), foram os mesmo relatados anteriormente na literatura (ARLORIO et al., 2008). A vitexina foi identificada em *T. grandiflorum* e pela primeira vez em *T. subincanum*, a identificação foi confirmada pois, os fragmentos obtidos correspondem aos identificados por Pugliese e colaboradores (2013).

Os íons m/z 477, m/z 491, m/z 557 e m/z 329, observados na tabela 13, já foram identificados pela análise de EM-ESI-MS², com isso foi confirmada a presença dessas substâncias nas espécies de *Theobroma*. Os íons m/z 477 e m/z 557 são comuns em *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, o que evidencia a similaridade entre as cascas das sementes das espécies.

Alguns íons que não fragmentaram na análise EM-ESI-MS², foram devidamente fragmentados pela análise por CLUAE-EMAR-MS², com isso foi possível detectar um maior número de substâncias nas espécies estudadas. O íon m/z 461 é um exemplo, este é característico da isoscutelareina 8-O-β-D-glucoronídeo, com um fragmento de 285 que corresponde a perda de uma aglicona, identificada pela primeira vez em *T. subincanum*. O derivado sulfatado da isoscutelareina 8-O-β-D-glucoronídeo também foi detectado nas espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, com o íon de m/z 541 que de acordo com os fragmentos apresentados por Pugliese e colaboradores (2013), as fragmentações foram confirmadas. O fragmento 461, corresponde a perda do sulfato, fragmento 254 que corresponde ao sulfoglucoronídeo onde ocorreu a perda do sulfato e do glucoronídeo e por fim o fragmento 285

correspondente a perda da aglicona. Essa substância coincidiu com a teograndina I já relatada na literatura (PUGLIESE et al., 2013; YANG et al., 2003).

Outra substância inédita em *T. subincanum* foi detectada, um derivado de hipoleatina, com o íon m/z 571 que foi relatada pela primeira vez em *T. grandiflorum* por Pugliese e colaboradores (2013). Os fragmentos apresentados na tabela 13, corresponderam respectivamente, a perda do sulfato, sulfato e o glucoronídeo e a perda da aglicona.

Tabela 13. Dados dos íons identificados por CLUAE-EMAR-ESI no modo negativo, com suas respectivas

Espécie	Fração	RT	Medida m/z	Calculado m/z	Erro (ppm)	Substância	Fórmula Molecular	Fragmentação	Referência
<i>T. grandiflorum</i>	DCM	0,46	191,0170	191,0190	10,47	Ácido isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	111, 87, 85	D'Souza, 2017
		4,40	358,0929	358,0925	1,12	Clovamida	C ₁₈ H ₁₇ O ₆ N	222,178 e 161	Barros, 2016
		5,57	477,0698	477,0675	4,82	Hipoleatina-8-O-β-D-glucoronídeo	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	301	Pugliese, 2013
		5,78	557,0242	557,0243	0,18	Hipoleatina-8-O-β-D-glucoronídeo 3''-O-sulfato	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₆ S	477,301 e 254	Pugliese, 2013
		5,86	461,0724	461,0725	0,22	Isoscutelareina 8-O-β-D-glucoronídeo	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₈	285	Pugliese, 2013
		6,14	541,0245	541,0294	9,06	Isoscutelareina 8-O-β-D-glucoronídeo 3''-O-sulfato	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₅ S	461, 285 e 254	Pugliese, 2013
	MeOH	0,64	191,0186	191,0190	2,09	Ácido isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	111, 87, 85	D'Souza, 2017
		2,52	179,0342	179,0343	0,56	Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	134	Wang, 2004
		5,9	491,0832	491,0831	0,20	Hipoleatina 3''-metil éter 8-O-β-D-glucoronídeo	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	315 e 301	Barros, 2016
		6,14	571,0399	571,0399	-	Hipoleatina 3'-metil éter 8-O-β-D-glucoronídeo 3''-O-sulfato	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₆ S	490, 315, 245	Pugliese, 2013
<i>T. subincanum</i>	DCM	0,44	191,0193	191,0190	1,57	Ácido isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	111, 87, 85	D'Souza, 2017
		2,81	179,0340	179,0343	1,67	Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	178, 134	Wang, 2004
		5,57	477,0675	477,0675	-	Hipoleatina-8-O-β-D-glucoronídeo	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	301	Pugliese, 2013

	5,68	461,0757	461,0725	6,94	Isoscutelareina 8-O- β -D-glucoronídeo	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₈	285	Pugliese, 2013	
	5,77	557,0246	557,0243	0,54	Hipoleatina-8-O- β -D-glucoronídeo 3''-O-sulfato	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₆ S	477,301 e 254	Pugliese, 2013	
	6,14	541,0292	541,0294	0,37	Isoscutelareina 8-O- β -D-glucoronídeo 3''-O-sulfato	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₅ S	461, 285 e 254	Pugliese, 2013	
	7,10	329,0876	329,0878	0,62	Ácido vanílico glucosídeo	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	-	D'Souza, 2017	
MeOH	0,44	191,0189	191,0190	0,52	Ácido isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	111, 87, 85	D'Souza, 2017	
	2,37	179,0346	179,0343	1,67	Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	134	Wang, 2004	
	5,10	431,0984	431,0977	1,62	Vitexina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	341 e 311	Pugliese, 2013	
	0,56	191,0185	191,0190	2,62	Ácido isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	111, 87, 85	D'Souza, 2017	
T. cacao	4,03	305,0697	305,0701	1,31	Ácido hidroxijasmônico sulfatado	C ₁₂ H ₁₈ O ₇ S	225	Patras, 2014	
	DCM	4,19	289,0716	289,0711	1,73	(Epi)catequina	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	245	Cádiz-Gurrea, 2014
	4,38	451,1010	451,1031	4,65	Cinchonaina I	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	341 e 217	Cádiz-Gurrea, 2014	
	4,42	353,0875	353,0871	1,13	Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191	Tauchen, 2016	
	6,15	301,0350	301,0347	0,99	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	179 e 151	Oracz, 2015	
	0,56	191,0186	191,0190	2,09	Ácido isocítrico	C ₆ H ₈ O ₇	111, 87, 85	D'Souza, 2017	
	MeOH	4,03	305,0699	305,0701	0,65	Ácido hidroxijasmônico sulfatado	C ₁₂ H ₁₈ O ₇ S	225	Patras, 2014
5,26	463,0874	463,0875	0,21	Isoquercetrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	300	Sánchez-Rabareda, 2003		

A espécie *T. cacao* apresentou poucos íons em comum com as demais espécies, caracterizando a sua diferente composição química, onde foi observado íons detectados exclusivamente na espécie já relatados na literatura previamente. O íon m/z 305 que corresponde ao ácido hidroxijasmônico sulfatado. Na estrutura e fragmentação houve uma perda de uma molécula de SO_3 gerando um pico base de m/z 225. Os derivados do ácido jasmônico são responsáveis por regular a resposta das plantas aos estresses abióticos e bióticos, no caso da espécie *T. cacao* o estresse combatido pode estar relacionado a fermentação por esse motivo esse derivado se faz presente nas cascas das sementes (PATRAS et al., 2014).

A cinchonina I uma flavalignana, foi detectada na espécie *T. cacao* com o íon 451 que apresentou a fragmentação correspondente a relatada por Cádiz-Gurrea (2014), confirmando a estrutura da substância. Os íons de m/z 353, m/z 301 e m/z 463, foram detectados somente em *T. cacao*, os dados de fragmentação obtidos foram comparados aos relatos da literatura e a presença destes foi confirmada.

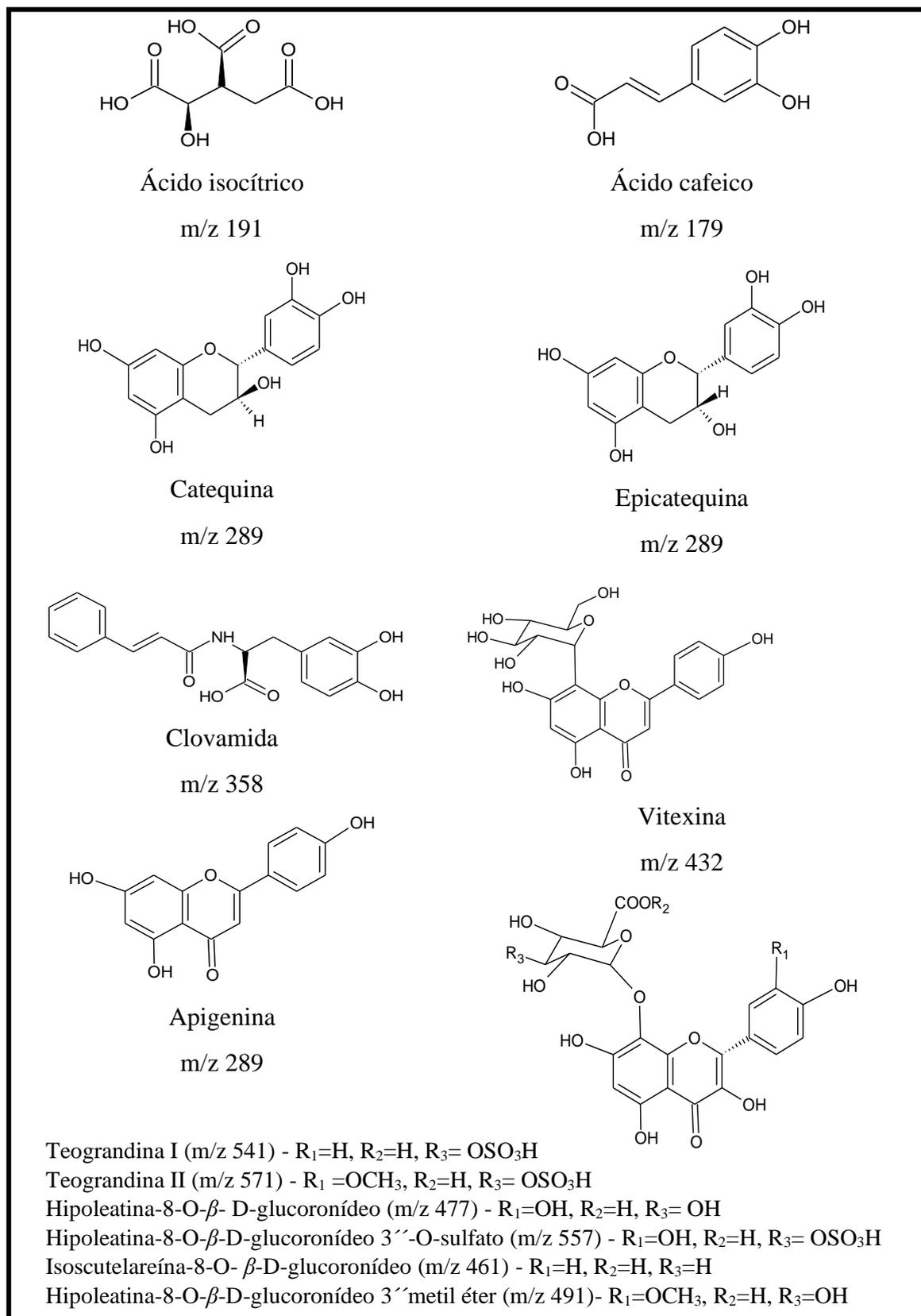


Figura 30. Ácidos fenólicos e flavonoides detectados por CLUAE-EMAR-ESI-MS²

5.7 Análise Metabolômica Global dos dados espectrométricos de CLUAE-EMAR-MS²

5.7.1 Frações em DCM no modo positivo

A análise metabolômica dos perfis espectrométricos dos resultados de *full scan* (100-800 m/z) das frações em DCM no modo positivo, permitiu 3 agrupamentos nas análises de HCA e PCA. Nos 3 grupos as espécies se relacionaram de forma diferente. A partir da análise de HCA na figura 31 de dendograma, observou-se a similaridade entre as espécies *T. subincanum* (RCUCSB+1, RCUCSB+2, RCUCSB+3) e *T. grandiflorum* (RCCSB+1, RCCSB+2, RCCSCB+3). Além disso, foi possível observar que a réplica 1 de cupuí (RCUCSB+1) foi agrupada as de cupuaçu, apresentando uma certa diferença em relação as réplicas da espécie *T. grandiflorum*.

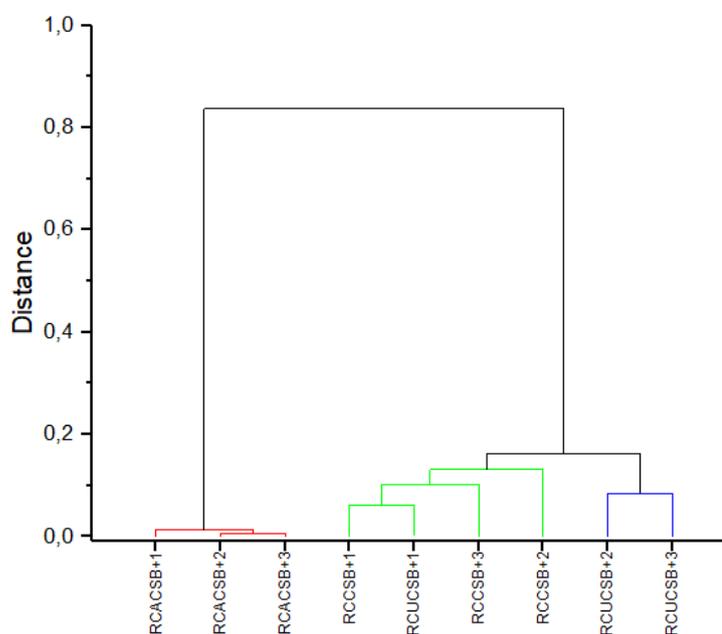


Figura 31. HCA dos dados espectrométricos das frações em DCM no modo positivo das três espécies do gênero *Theobroma*

A componente principal 1 concentrou os íons majoritários de cada espécie estudada. O íon m/z 181 correspondente a teobromina, que foi previamente identificado nas espécies, é o majoritário na espécie *T. cacao* (RCACSB+1, RCACSB+2, RCACSB+3) este é responsável

pelo deslocamento das réplicas da espécie para a direita do gráfico em 3 dimensões da análise de PCA (Figura 32).

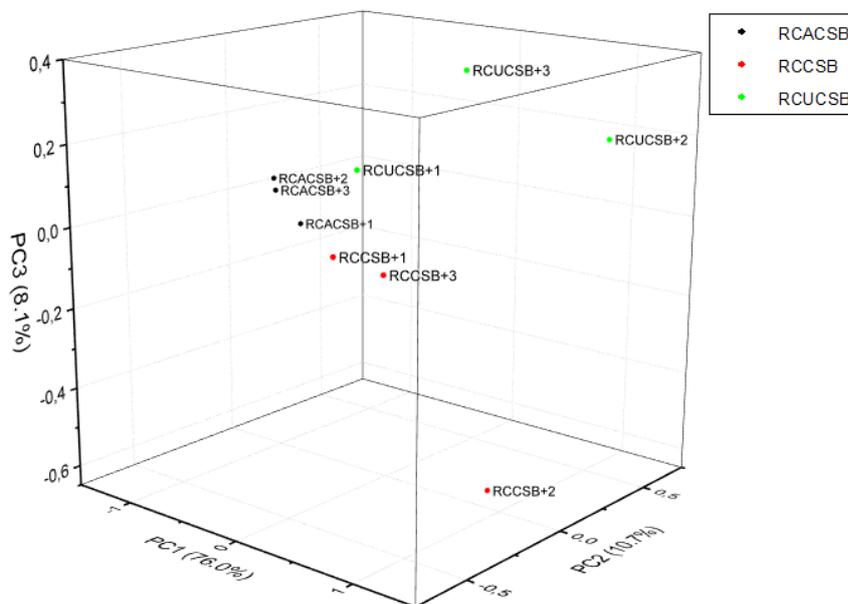


Figura 32. Gráfico de PCA com as componentes principais 1, 2 e 3 (PC1, PC2 e PC3), com os dados espectrométricos no modo positivo frações em DCM das três espécies de *Theobroma*

O deslocamento das réplicas de *T. cacao* também foi observado na figura 33 com as componentes principais, PC1 e PC2. As espécies cupuaçu e cupuí são deslocadas para a esquerda do gráfico devido à presença majoritária do íon m/z 225, correspondente a teacrina, que por sua vez é quase inexistente em cacau. O íon m/z 225 é o íon que indica a mais forte similaridade entre *T. subincanum* e *T. grandiflorum*. Além do íon m/z 225, outros íons podem ser destacados quanto à similaridade entre as espécies, como: m/z 118, m/z 274 e m/z 239.

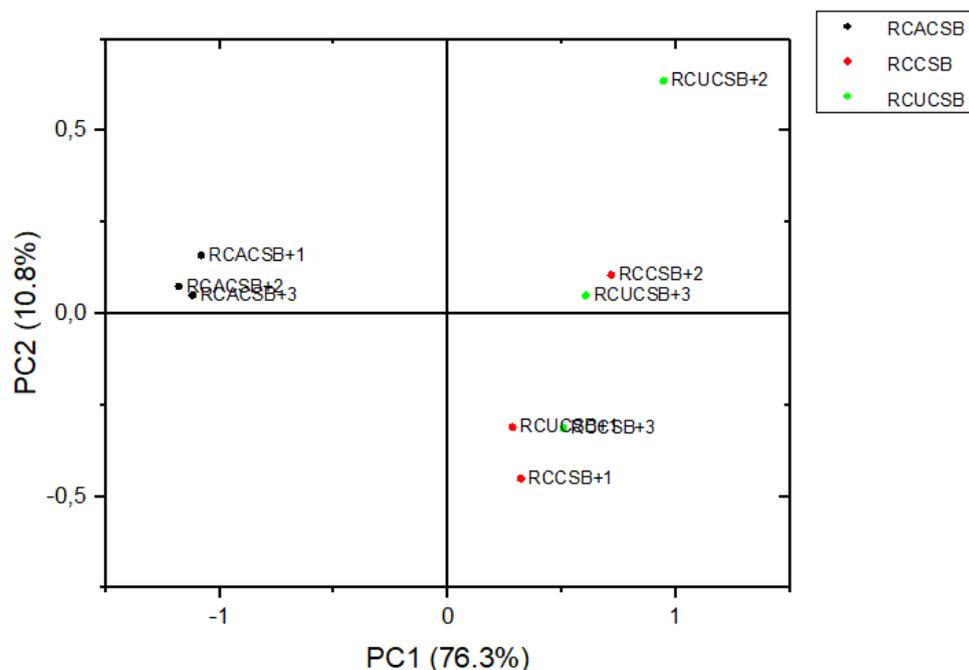


Figura 33. Gráfico de PCA com as componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2), com os dados espectrométricos no modo positivo frações em DCM das três espécies de *Theobroma*

A espécie *T. cacao* apresentou elevados teores reativos dos íons m/z 181 correspondente a teobromina e m/z 195 característico da cafeína, sendo estes os possíveis marcadores químicos das cascas das sementes de cacau (PEREIRA-CARO et al., 2013). Como possível marcador das cascas das sementes de *T. subincanum* e *T. grandiflorum*, pode-se destacar a teacrina (m/z 225), já isolada no trabalho de Moita (2016) das espécies utilizando uma metodologia específica para extração de metilxantinas.

O agrupamento da réplica 1 de *T. subincanum* às réplicas de *T. grandiflorum*, observado no HCA, está associado a similar concentração de alguns íons comuns a espécie de *T. grandiflorum* e a réplica 1 de *T. subincanum*. Os íons, m/z 104, m/z 118, m/z 128, m/z 151, m/z 197 são os responsáveis por esse agrupamento, a maioria dos íons podem ser observado na composição principal 2 (PC2) de acordo com seus teores relativos observados na tabela 14.

Tabela 14. Composição dos componentes principais das análises de PCA e HCA das frações em DCM no modo positivo

Componente Principal	m/z	Intensidade Normalizada								
		<i>T. cacao</i> (RCACSB)			<i>T. grandiflorum</i> (RCCSB)			<i>T. subincanum</i> (RCUCSB)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
PC1	181	1	1	1	0,0227	0,1737	0,0267	0,1333	0,0439	0,0165
	195	0,3494	0,3195	0,3324	0,0399	0,1255	0,0402	0,0554	0,0652	0,0328
	225	0,0366	0,0067	0,0724	1	1	1	1	1	1
	230	0,0523	0,0280	0,0264	0,1154	0,3065	0,2116	0,1150	0,3633	0,1942
	274	0,1579	0,0961	0,1373	0,5920	0,8097	0,5227	0,4416	0,6970	0,4669
	275	0,0815	0,0371	0,0471	0,1810	0,4508	0,2727	0,1221	0,3684	0,1612
PC2	128	0,0355	0,0041	0,0056	0,0241	0,1673	0,0281	0,0205	0,1451	0,0208
	144	0,0067	0,0029	0,0103	0,0665	0,0702	0,0679	0,0274	0,0267	0,0167
	151	0,0112	0,0026	0,004	0,0162	0,0518	0,0142	0,0143	0,6046	0,1156
	181	1	1	1	0,0227	0,1737	0,0267	0,1333	0,0439	0,0165
	183	0,0167	0,0105	0,0093	0,0153	0,0484	0,0227	0,0182	0,4275	0,3347
	197	0,0141	0,0095	0,0071	0,0127	0,0338	0,0128	0,0153	0,1746	0,1061
	225	0,0366	0,0067	0,0724	1	1	1	1	1	1
	247	0,0065	0,0025	0,0060	0,0553	0,1418	0,1619	0,0262	0,0425	0,0295
	279	0,0460	0,0157	0,0187	0,0686	0,1992	0,0717	0,1131	0,3055	0,1873
	284	0,0321	0,0116	0,0204	0,0764	0,1430	0,0723	0,1317	0,3440	0,2672
	480	0,0025	0,0019	0,0017	0,0846	0,1750	0,2187	0,0535	0,0960	0,1019
499	0,0014	0,0017	0,00	0,1001	0,0105	0,0218	0,0045	0,0103	0,0091	
PC3	104	0,0392	0,04104	0,03344	0,03203	0,05682	0,0626	0,0694	0,1335	0,1354
	118	0,1062	0,0114	0,0107	0,0353	0,4483	0,0385	0,0397	0,0945	0,0387
	151	0,0112	0,0026	0,004	0,0162	0,0518	0,0142	0,0143	0,6046	0,1156
	163	0,0523	0,0127	0,0100	0,0208	0,2082	0,0290	0,02114	0,0500	0,0191
	181	1	1	1	0,0227	0,1737	0,0267	0,1333	0,0439	0,0165
	183	0,0167	0,0105	0,0093	0,0153	0,0484	0,0227	0,0182	0,4275	0,3347
	203	0,04574	0,03481	0,0386	0,09846	0,18519	0,19034	0,32487	0,27599	0,2686
	217	0,0234	0,0034	0,0052	0,0358	0,1622	0,0976	0,0183	0,1002	0,0178
	239	0,0446	0,0050	0,0076	0,0317	0,2069	0,0315	0,0281	0,1990	0,0274
	274	0,1579	0,0961	0,1373	0,5920	0,8097	0,5227	0,4416	0,6970	0,4669
	275	0,0815	0,0371	0,0471	0,1810	0,4508	0,2727	0,1221	0,3684	0,1612
	284	0,0321	0,0116	0,0204	0,0764	0,1430	0,0723	0,1317	0,3440	0,2672
	470	0,0062	0,0015	0	0,0056	0	0,0094	0,0168	0,0250	0,0202
	520	0,0075	0,0065	0,0045	0,0184	0,0547	0,0574	0,0881	0,1874	0,1956

Pode-se destacar o íon m/z 151 apresenta maior influência no agrupamento, pois no gráfico de loadings da componente principal 2 apresenta uma elevada intensidade proporcional a influência do íon m/z 225 (teacrina) que é majoritário nas espécies de cupuí e cupuaçu. O íon m/z 118 realiza também, grande influência no agrupamento da réplica 1 de cupuí com as réplicas de *T. grandiflorum*, pois no gráfico de loadings da componente principal 3 (PC3) apresenta intensidade.

As principais diferenças entre as espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum* estão no agrupamento da componente principal 3, devido a diferença dos teores relativos de alguns íons

presentes nesse grupo, observados na tabela 14. Pode-se destacar os íons m/z 203, m/z 274 e m/z 470. Outros íons poderiam ser associados a diferenciação, porém apresentaram coeficientes de variação entre as réplicas acima de 30%, não sendo estatisticamente possível considerá-los na análise.

5.7.2 Frações metanólicas no modo positivo

Na análise metabolômica dos perfis espectrométricos de *full scan* (100-800 m/z) das frações em MeOH no modo positivo, contatou-se 3 agrupamentos nas análises de HCA e PCA. A partir da análise de HCA na figura 34 apresenta um gráfico de dendograma, onde foi possível observar a similaridade entre as espécies *T. grandiflorum* (RCCSC+1, RCCSC+2, RCCSC+3) e *T. subincanum* (RCUCSC+1, RCUCS+2, RCUCSC+3). Além disso, foi possível observar que a réplica 1 de *T. subincanum* foi a que apresentou maior variabilidade em relação as outras réplicas das espécies.

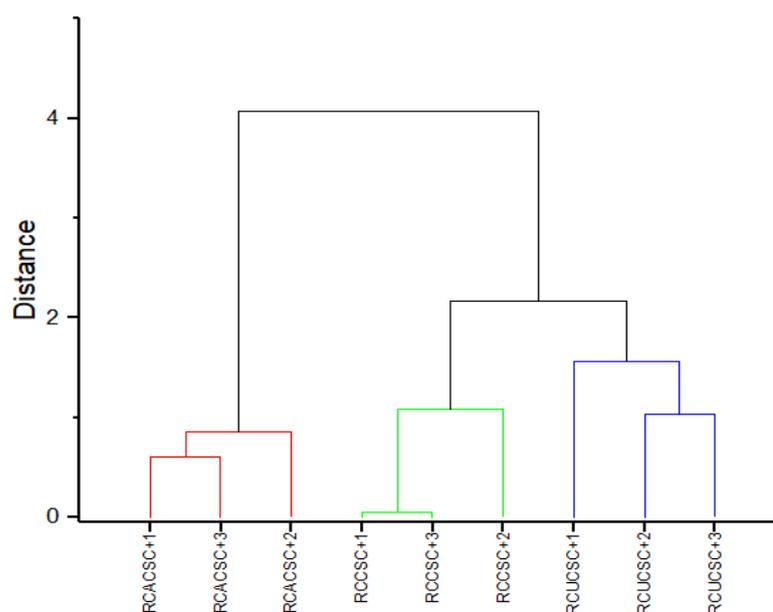


Figura 34. HCA dos dados espectrométricos das frações em MeOH no modo positivo das três espécies do gênero *Theobroma*

Os íons majoritários e de maior influência sobre os agrupamentos, são encontrados na componente principal 1. O íon m/z 149 é o majoritário nas cascas das sementes de *T. cacao*

(RCACSC+1, RCACSC +2, RCACSC+3) na fração metanólica, este está presente também em cupuaçu e cupuí em baixa concentração. O deslocamento das réplicas de cacau para a direita do gráfico de PCA (figura 35) é ocasionado pela presença do íon m/z 149, o mesmo pode ser observado no gráfico da figura 36 com as componentes principais 1 e 3. O íon $m/$ 274 é o majoritário nas espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, sendo este o responsável pelo deslocamento a esquerda das réplicas das espécies nos gráficos das figuras 35 e 36.

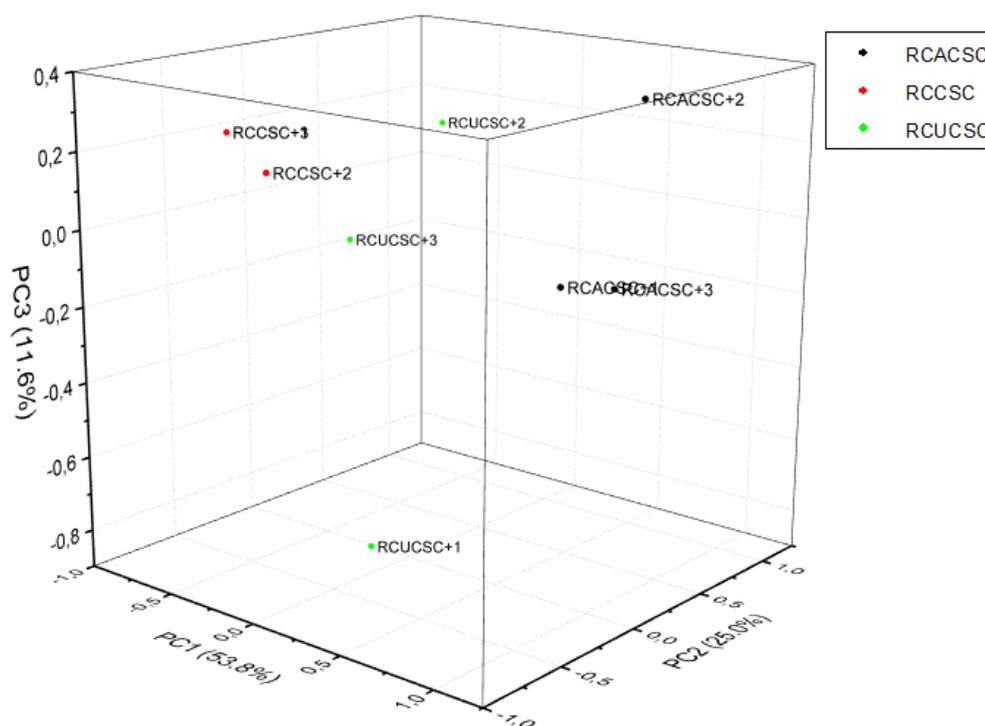


Figura 35. Gráfico de PCA com as componentes principais 1, 2 e 3 (PC1, PC2 e PC3), com os dados espectrométricos no podo positivo frações metanólica das três espécies de *Theobroma*

No gráfico de PCA (figura 36) pode-se observar principalmente a similaridade entre as espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, além disso observa-se o distanciamento pronunciado da réplica 1 de *T. subincanum*, assim como um pequeno distanciamento da réplica 2 de *T. cacao* das demais. A variabilidade das réplicas está associada a presença de íons que apresentaram seu coeficiente de variação elevados, o que indica uma diferença nos teores relativos dos íons nas réplicas da mesma espécie.

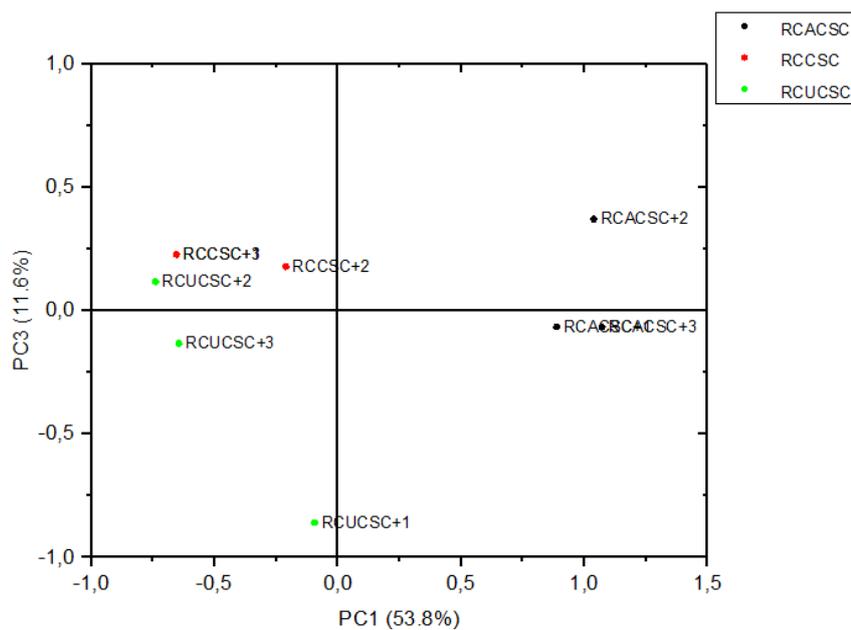


Figura 36. Gráfico de PCA com as componentes principais 1 e 3 (PC1 e PC3), com os dados espectrométricos no modo positivo frações metanólica das três espécies de *Theobroma*

Os teores relativos dos íons das componentes principais encontram-se na tabela 15. Os íons que podem ser destacados como responsáveis pelo deslocamento da réplica 1 de cupuí são: m/z 118, m/z 221, m/z 225 (teacrina), m/z 234, m/z 280, m/z 342. O deslocamento da réplica 2 de *T. cacao* pode estar associado aos seguintes íons: m/z 203, m/z 234, m/z 266, m/z 342.

Tabela 15. Composição dos componentes principais das análises de PCA e HCA das frações em MeOH no modo positivo

Componente Principal	m/z	Intensidade Normalizada								
		<i>T. cacao</i> (RCACSB)			<i>T. grandiflorum</i> (RCCSB)			<i>T. subincanum</i> (RCUCSB)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
PC1	118	0,0631	0,0393	0,0560	0,1174	0,1014	0,1165	0,1893	0,5772	0,4097
	149	1	0,8786	1	0,2834	0,7413	0,2834	0,2188	0,2190	0,1707
	230	0,1041	0,0853	0,1157	0,5448	0,6299	0,5448	0,2562	0,2138	0,3333
	234	0,0067	0,0176	0,0079	0,2226	0,1411	0,2226	0,0296	0,2753	0,1756
	266	0,0281	0,0915	0,0382	0,3696	0,2353	0,3696	0,1234	0,9733	0,6203
	274	0,4774	0,3027	0,6343	1	1	1	1	0,3158	1
	307	0,3848	0,4498	0,6249	0,0563	0,1095	0,0563	0,0550	0,1130	0,0601
	342	0,0488	0,1246	0,0581	0,3835	0,2516	0,3835	0,1595	1	0,665
PC2	118	0,0631	0,0393	0,0560	0,1174	0,1014	0,1165	0,1893	0,5772	0,4097
	203	0,2150	0,1197	0,3810	0,1341	0,1203	0,1341	0,6196	0,4706	0,3393
	221	0,0281	0,0133	0,0177	0,2061	0,2134	0,2061	0,039	0,0211	0,0682
	230	0,1041	0,0853	0,1157	0,5448	0,6299	0,5448	0,2562	0,2138	0,3333
	266	0,0281	0,0915	0,0382	0,3696	0,2353	0,3696	0,1234	0,9733	0,6203
	274	0,4774	0,3027	0,6343	1	1	1	1	0,3158	1
	275	0,1477	0,0875	0,1550	0,4186	0,5040	0,4186	0,2412	0,0944	0,1922
	294	0,0377	0,0582	0,0567	0,3586	0,2610	0,3586	0,0239	0,0924	0,0589
	342	0,0488	0,1246	0,0581	0,3835	0,2516	0,3835	0,1595	1	0,665
365	0,0791	0,0654	0,1063	0,0631	0,0673	0,0631	0,3122	0,3886	0,2694	
PC3	149	1	0,8786	1	0,2834	0,7413	0,2834	0,2188	0,2190	0,1707
	203	0,2150	0,1197	0,3810	0,1341	0,1203	0,1341	0,6196	0,4706	0,3393
	225	0,2903	0,0343	0,3620	0,0915	0,1636	0,0912	0,4975	0,13031	0,1053
	266	0,0281	0,0915	0,0382	0,3696	0,2353	0,3696	0,1234	0,9733	0,6203
	274	0,4774	0,3027	0,6343	1	1	1	1	0,3158	1
	280	0,0538	0,0486	0,0533	0,3202	0,2332	0,3202	0,0643	0,1877	0,1239
	294	0,0377	0,0582	0,0567	0,3586	0,2610	0,3586	0,0239	0,0924	0,0589
	342	0,0488	0,1246	0,0581	0,3835	0,2516	0,3835	0,1595	1	0,665
	365	0,0791	0,0654	0,1063	0,0631	0,0673	0,0631	0,3122	0,3886	0,2694

A diferenciação que há entre *T. subincanum* e *T. cacao* pode ser observada na componente principal 2, de acordo com a diferença de concentração dos seguintes íons: m/z 203, m/z 230, m/z 294, m/z 365 que podem ser observados na tabela 15. Além disso a singularidades de cada pode ser observada no gráfico com as componentes principais 1 e 2 (figura 37), onde cada espécie está em uma posição diferenciada no gráfico de duas dimensões.

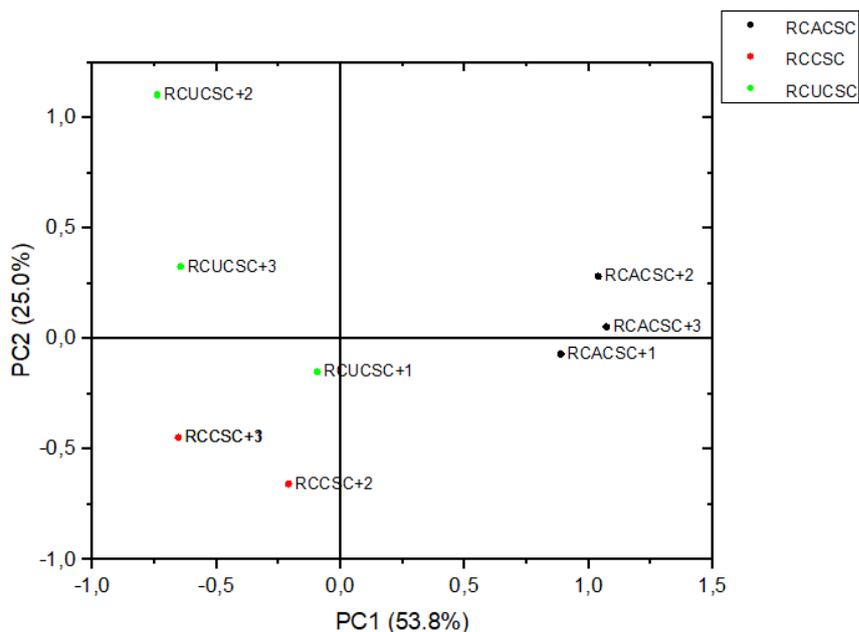


Figura 37. Gráfico de PCA com as componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2), com os dados espectrométricos no modo positivo frações metanólicas das três espécies de *Theobroma*

5.7.3 Frações DCM no modo negativo

Assim como as análises metabômica dos perfis espectrométricos no modo positivo, a análise das frações em DCM no modo negativo também permitiu a formação de 3 grupos nas análises de HCA e PCA. A análise de HCA, apresentada na figura 38, evidenciou a maior similaridade entre as espécies *T. grandiflorum* (RCCSB-1, RCCSB-2, RCCSB-3) e *T. subincanum* (RCUCSB-1, RCUCSB-2, RCUCSB-3) corroborando com os dados obtidos previamente nas análises do modo positivo, mas também nas análises utilizando as técnicas: CCDAE, EM-ESI-MS², CLUAE-DAD, CLUAE-EMAR. Além disso, foi possível observar a variabilidade de uma das réplicas de cacau.

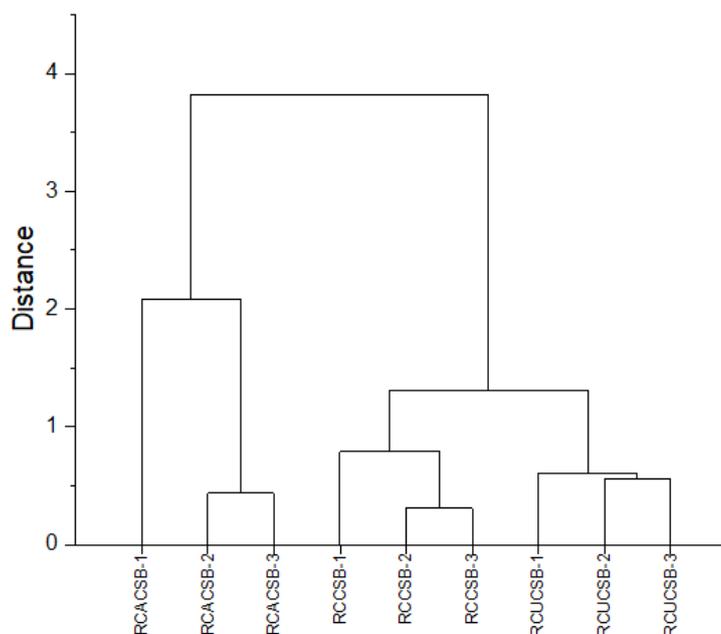


Figura 38. HCA dos dados espectrométricos das frações em DCM no modo negativo das três espécies do gênero *Theobroma*

A variabilidade de uma das réplicas de *T. cacao* (RCACSB-1, RCACSB-2, RCACSB-3), está associada ao fato de que grande parte do perfil químico das amostras são constituintes minoritários. A detecção das substâncias minoritárias se dá próximo ao limite instrumental do equipamento, resultando em sinais próximos ou similares a região de sinal/ruído, ocasionando maior variabilidade nos sinais registrados.

A similaridade entre o *T. grandiflorum* e *T. subincanum* pode ser avaliada através dos gráficos de loadings e scores na análise de PCA, onde foi visto que a formação dos agrupamentos esta majoritariamente relacionada ao íons apresentados a seguir: m/z 111, m/z 191 (ácido isocítrico), m/z 289 (catequina ou epicatequina), m/z 301 (quercetina), m/z 305 (sulfato de ácido 12-hidroxijasmônico), m/z 353 (ácido clorogênico), m/z 367. Estes íons podem ser observados na tabela 16.

Tabela 16. Composição dos componentes principais das análises de PCA e HCA, das frações em DCM no modo negativo

Componente Principal	m/z	Intensidade Normalizada								
		<i>T. cacao</i> (RCACSB)			<i>T. grandiflorum</i> (RCCSB)			<i>T. subincanum</i> (RCUCSB)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
PC1	111	-	-	-	0,2444	0,2607	0,2687	0,2157	0,2054	0,20689
	191	0	0,6159	0,6259	1	1	1	1	1	1
	289	0,3546	0,4138	0,4266	0,0092	0,0083	0,0099	0,0132	0,0143	0,0096
	305	0,8110	1,0000	1,0000	0,0147	0,0208	0,0253	0,0132	0,0257	0,0125
	353	0,0423	0,0418	0,0447	0,3146	0,3297	0,2889	0,3184	0,3053	0,2963
	367	0,3945	0,3057	0,3402	0,0421	0,0230	0,0264	0,1945	0,1322	0,1199
PC2	191	0	0,6159	0,6259	1	1	1	1	1	1
	218	0,0112	0,0000	0,0085	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	263	0,0073	0,0051	0,0059	0,1885	0,2691	0,2929	0,0102	0,0090	0,0076
	289	0,3546	0,4138	0,4266	0,0092	0,0083	0,0099	0,0132	0,0143	0,0096
	295	0,0298	0,0226	0,0251	0,0704	0,0520	0,0637	0,3945	0,3324	0,2568
	297	0,0841	0,0207	0,0460	0,0221	0,0197	0,0280	0,2177	0,1892	0,1765
	301	0,2259	0,2826	0,3065	0,0359	0,0381	0,0461	0,0382	0,0341	0,0321
	305	0,8110	1,0000	1,0000	0,0147	0,0208	0,0253	0,0132	0,0257	0,0125
	329	0,0484	0,0523	0,0547	0,0000	0,0133	0,0133	0,2295	0,1796	0,1824
367	0,3945	0,3057	0,3402	0,0421	0,0230	0,0264	0,1945	0,1322	0,1199	
PC3	218	0,0112	0,0000	0,0085	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	263	0,0073	0,0051	0,0059	0,1885	0,2691	0,2929	0,0102	0,0090	0,0076
	265	0,0000	0,0211	0,0354	0,0336	0,0327	0,0365	0,1586	0,1407	0,1381
	295	0,0298	0,0226	0,0251	0,0704	0,0520	0,0637	0,3945	0,3324	0,2568
	297	0,0841	0,0207	0,0460	0,0221	0,0197	0,0280	0,2177	0,1892	0,1765
	313	0,0624	0,0602	0,0633	0,0196	0,0168	0,0168	0,1539	0,1304	0,1295
	321	0,0388	0,0376	0,0401	0,0376	0,0220	0,0256	0,2077	0,1526	0,1218
	329	0,0484	0,0523	0,0547	0,0000	0,0133	0,0133	0,2295	0,1796	0,1824
	367	0,3945	0,3057	0,3402	0,0421	0,0230	0,0264	0,1945	0,1322	0,1199

A componente principal 1 (PC1) está fortemente relacionada aos constituintes majoritários das três espécies estudadas, onde o íon 305 ocasiona o deslocamento das réplicas de *T. cacao* para o lado direito (figura 39), estando em alta concentração no *T. cacao* e baixa nas demais espécies. Por outro lado, as réplicas de *T. subincanum* e *T. grandiflorum* se deslocam a esquerda devido ao íon 191, que se apresenta em alta concentração e quase inexistente em *T. cacao*. Entre os pontos de semelhança entre o cupuí e cupuaçu pode se destacar os teores relativos do m/z 111, m/z 289 (catequina ou epicatequina), m/z 305 (sulfato de ácido 12-hidroxijasmônico) e o m/z 353 (ácido clorogênico).

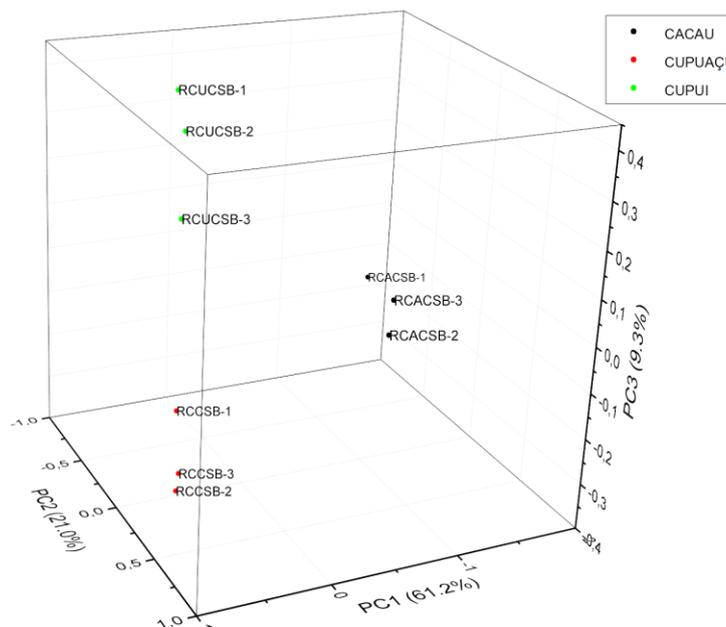


Figura 39. Gráfico de PCA com as componentes principais 1, 2 e 3 (PC1, PC2 e PC3), com os dados espectrométricos no modo negativo das frações em DCM das três espécies de *Theobroma*

A diferenciação entre *T. subincanum* e *T. grandiflorum* pode ser observada principalmente no agrupamento da componente principal 3 (PC3) devido a diferença na concentração relativa dos íons presentes nesse grupo que podem ser observados na tabela 18. Como possível marcador para o *T. cacao*, a análise de PCA também evidenciou o sinal m/z 218, o qual aparece exclusivamente nessa espécie

5.7.4 Frações metanólicas no modo negativo

A análise metabolômica dos perfis espectrométricos do *full scan* (m/z 100-600) das frações em metanol das cascas das sementes do *T. subincanum*, *T. grandiflorum* e *T. cacao*, permitiu a formação de 3 agrupamentos nas análises de HCA e PCA. A análise de HCA evidenciou maior similaridade entre as espécies *T. subincanum* e *T. grandiflorum*, além disso foi possível observar uma pequena variabilidade de uma réplica em cada espécie (figura 40).

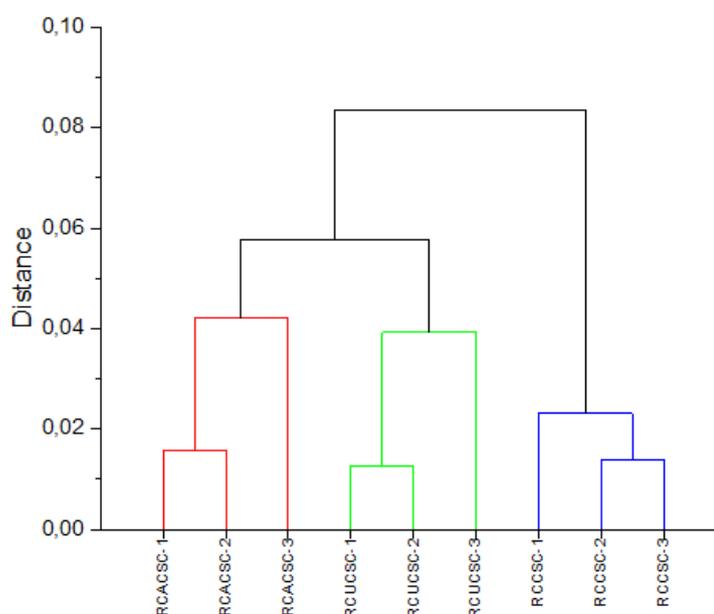


Figure 40. HCA dos dados espectrométricos das frações metanólicas no modo negativo das três espécies do gênero *Theobroma*

A pequena variabilidade observada das réplicas nas frações em DCM no modo negativo, também foi observada nas réplicas das frações metanólicas que está associada a grande quantidade de substâncias minoritárias presentes no perfil químico das espécies. Normalmente tais substâncias são detectadas próximas ao limite instrumental do equipamento, com isso alguns sinais podem ser confundidos com ruídos ocasionando assim uma variabilidade nos sinais registrados em cada réplica.

A similaridade entre as espécies *T. subincanum* e *T. cacao* pôde ser observada claramente, por meio dos gráficos de loadings e scores na análise de PCA (figura 41.a), assim como no gráfico de PCA de duas dimensões (figura 41.b), no qual as réplicas de onde os agrupamentos das réplicas se encontram do mesmo lado no gráfico. O agrupamento e similaridade foi influenciada principalmente pelos seguintes íons: m/z 111, m/z 329 (ácido vanílico glucosídeo), m/z 353 (ácido clorogênico) e m/z 379, onde estes podem ser observados na tabela 17.

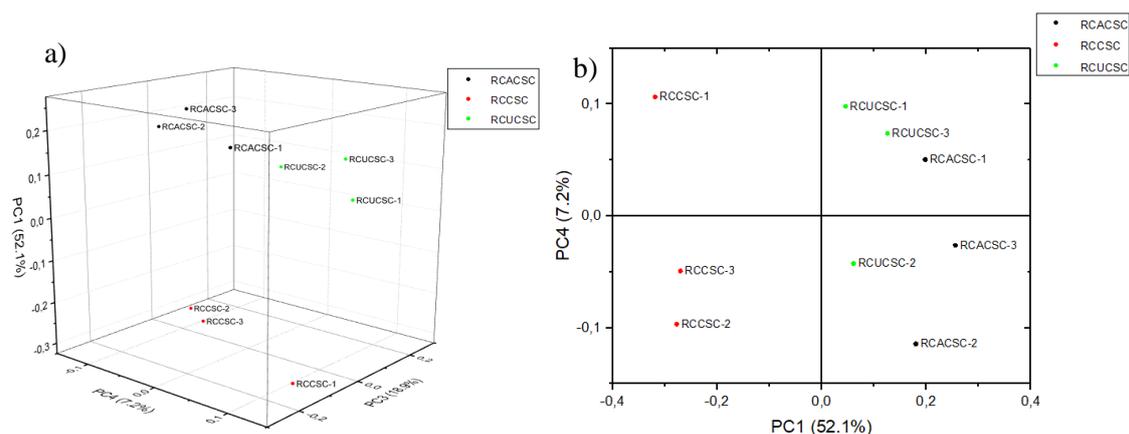


Figure 41. a) Gráfico de PCA com as componentes principais 1, 2 e 3 (PC1, PC4 e PC3) b) Gráfico de PCA com as componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2)

A dissimilaridade entre as espécies pode ser observada principalmente na componente principal 3 (PC3), pois alguns íons apresentaram uma concentração relativa diferente (tabela 19). Em *T. subincanum* os íons responsáveis pela sua diferenciação em relação as demais espécies são: m/z 189, m/z 341 (sacarose), m/z 541 (isoscutelareina 8-O-β-D-glucuronídeo 3''-O-sulfato).

Na componente principal 4 (PC4) destacou-se o agrupamento relacionado as similaridades de *T. subincanum* e *T. grandiflorum*, destacando-se os íons: m/z 315, 329 (ácido vanílico glucosídeo) e m/z 355. Além disso vale ressaltar, que em todas componentes principais (PC1, PC3 e PC4) alguns íons apresentaram coeficiente de variação elevados (>30%) entre as réplicas, por esse motivo foram desconsiderados na amostra na qual foram detectados.

Tabela 17. Composição dos componentes principais das análises de PCA e HCA, das frações em MeOH no modo negativo

Componente Principal	m/z	Intensidade Normalizada								
		<i>T. cacao</i> (RCACSB)			<i>T. grandiflorum</i> (RCCSB)			<i>T. subincanum</i> (RCUCSB)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
PC1	111	0,1720	0,1728	0,1710	0,2017	0,2068	0,2076	0,1696	0,1693	0,1682
	147	0,0502	0,0440	0,3210	0,0327	0,0320	0,2120	0,0530	0,0285	0,2867
	195	0,0931	0,0750	0,0837	0,1711	0,1309	0,1525	0,0813	0,0420	0,0653
	315	0,0980	0,0848	0,0874	0,0036	0,0037	0,0040	0,0032	0,0023	0,0034
	329	0,2474	0,2223	0,2274	0,0027	0,0021	0,0028	0,0033	0,0020	0,0034
	353	0,3497	0,3273	0,3321	0,7355	0,6808	0,7268	0,3754	0,3201	0,3326
	367	0,3945	0,3057	0,3402	0,0421	0,0230	0,0264	0,1945	0,1322	0,1199
	379	0,1687	0,1485	0,1562	0,0686	0,0571	0,0599	0,1371	0,0984	0,1217
PC3	116	0,2135	0,0549	0,0985	0,2536	0,0428	0,0548	0,1439	0,0377	0,0705
	133	0,1190	0,0755	0,0802	0,0785	0,0442	0,0460	0,0508	0,0199	0,0311
	189	0,0109	0,0074	0,0128	0,0128	0,0101	0,0133	0,0589	0,0509	0,0573
	195	0,0931	0,0750	0,0837	0,1711	0,1309	0,1525	0,0813	0,0420	0,0653
	315	0,0980	0,0848	0,0874	0,0036	0,0037	0,0040	0,0032	0,0023	0,0034
	321	0,0685	0,0512	0,0566	0,0207	0,0141	0,0180	0,0120	0,0059	0,0102
	329	0,2474	0,2223	0,2274	0,0027	0,0021	0,0028	0,0033	0,0020	0,0034
	341	0,0143	0,0114	0,0154	0,0070	0,0060	0,0087	0,0614	0,0376	0,0508
	353	0,3497	0,3273	0,3321	0,7355	0,6808	0,7268	0,3754	0,3201	0,3326
	355	0,0179	0,0168	0,0133	0,0387	0,0331	0,0707	0,0481	0,0428	0,1596
541	0,0218	0,0168	0,0190	0,0211	0,0211	0,0213	0,0759	0,0696	0,0787	
PC4	116	0,2135	0,0549	0,0985	0,2536	0,0428	0,0548	0,1439	0,0377	0,0705
	315	0,0980	0,0848	0,0874	0,0036	0,0037	0,0040	0,0032	0,0023	0,0034
	329	0,2474	0,2223	0,2274	0,0027	0,0021	0,0028	0,0033	0,0020	0,0034
	355	0,0179	0,0168	0,0133	0,0387	0,0331	0,0707	0,0481	0,0428	0,1596
	367	0,3945	0,3057	0,3402	0,0421	0,0230	0,0264	0,1945	0,1322	0,1199

5.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.8.1 Atividade Antioxidante Frente ao Radical livre DPPH e ABTS

Os extratos e frações de *T. grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. cacao* foram submetidos a avaliação da atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH e ABTS. Os extratos de *T. grandiflorum*, *T. subincanum* apresentaram atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e ABTS, o extrato de *T. cacao* não apresentou atividade antioxidante, pois não apresentou a porcentagem mínima de inibição frente aos dois radicais testados na concentração de 100µg/mL.

Todas as frações metanólicas apresentaram atividade antioxidante, sendo que as frações de *T. grandiflorum*, *T. subincanum* apresentaram atividade antioxidante frente aos dois radicais livres testados. A fração em MeOH de *T. subincanum* apresentou atividade somente

frente ao radical ABTS. Posteriormente, as amostras que apresentaram atividade foram submetidas ao cálculo de CI_{50} , a fim de saber a concentração inibitória para 50%. Os dados obtidos foram tabulados na tabela 18.

Tabela 18. Atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS, nd: atividade não detectada.

Amostra		DDPH ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$)	ABTS ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$)
<i>T. grandiflorum</i>	Extrato Hidroalcoólico	44,50 \pm 3,35	72,17 \pm 0,76
	Fração em DCM	Nd	nd
	Fração em MeOH	66,10 \pm 2,97	49,33 \pm 3,24
<i>T. subincanum</i>	Extrato Hidroalcoólico	61,22 \pm 1,67	nd
	Fração em DCM	Nd	nd
	Fração em MeOH	64,50 \pm 4,51	49,50 \pm 3,24
<i>T. cacao</i>	Extrato Hidroalcoólico	Nd	nd
	Fração em DCM	Nd	nd
	Fração em MeOH	Nd	nd
Padrão	Ácido Gálico	3,40 \pm 0,10	2,3 \pm 0,6

Yang (2003) relatou a atividade antioxidante nas sementes de *T. grandiflorum*, sendo esta atividade relacionada a presença de polifenóis nos extratos. A atividade antioxidante foi relatada no presente trabalho com um CI_{50} de 44,50 frente ao radical livre DPPH e em relação ao radical ABTS o CI_{50} foi maior, esse fato pode ser explicado pela diferente interação dos radicais com a amostra. A fração em metanol apresentou um IC_{50} maior do que o extrato frente ao DPPH, o que indica uma menor atividade da fração metanólica, isso pode ser explicado pelo sinergismo das substâncias presentes no extrato, tendo em vista que a fração a fração metanólica não apresenta todas as substâncias presentes no extrato hidroalcoólico.

Os flavonoides isoscutelareína-8-*O*-*D*- glucoronídeo, hipoleatina-8-*O*- β -*D*- glucoronídeo, hipoleatina-8-*O*- β -*D*- glucoronídeo 3''-*O*-sulfato foram relatadas por Yang (2003) e Pugliese (2013) como substâncias com atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH. Estas substâncias foram relatadas por análise de EM e confirmadas por fragmentação

no extrato hidroalcoólico e na fração em MeOH de *T. grandiflorum*. Contudo, pode-se atribuir a atividade relatada (tabela 18) a presença dos flavonoides glicosilados.

Na espécie *T. subincanum* observou-se que a atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH do extrato e da fração metanólica apresentaram IC₅₀ próximos, indicando que as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante estão em sua maioria na fração metanólica. Na literatura não há relatos de avaliação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e ABTS da espécie, podendo assim destacar esse resultado como inédito. A atividade antioxidante relatada foi das raízes, folhas e cascas no trabalho de Sotero (2012) que avaliou a atividade antioxidante de dez espécies da família *Sterculiaceae*. De acordo com os resultados obtidos por EM observou-se uma grande semelhança nos íons detectados que foram associados a flavonoides que apresentam atividade antioxidante Yang (2003), com isso pode-se sugerir a atividade observada aos flavonoides relatados a partir dos resultados de EM e da fragmentação.

A espécie *T. cacao* não apresentou atividade antioxidante frente a nenhum dos radicais testados, porém na literatura já foram relatadas atividade antioxidante frente a diversos radicais como: DPPH, TEAC, ABTS, FRAP e ORAC (ARLORIO et al., 2008; CÁDIZ-GURREA et al., 2014; PEDAN; FISCHER; ROHN, 2016). O resultado antagonista obtido, pode ser justificado por vários fatores, como: algum erro sistemático presente nos experimentos realizados, metodologia utilizada para obtenção do extrato e frações, diferença dos indivíduos utilizados para realizar o trabalho em relação ao local de coleta e a variação da espécie.

5.8.2 Teste quantitativo de Fenóis Totais

Os extratos hidroalcoólicos e frações das três espécies de *Theobroma* foram submetidos ao teste de fenóis totais, tendo como padrão o ácido gálico. Os dados obtidos foram tabulados na tabela 19.

Tabela 19. Teste de fenóis totais dos extratos e frações das três espécies de *Theobroma*

Amostra		Fenóis Totais (% ± DP)
<i>T. grandiflorum</i>	Extrato Hidroalcoólico	27,48 ± 0,19
	Fração em DCM	1,40 ± 1,01
	Fração em MeOH	16,17 ± 0,47
<i>T. subincanum</i>	Extrato Hidroalcoólico	46,65 ± 0,42
	Fração em DCM	2,75 ± 0,39
	Fração em MeOH	6,53 ± 0,75
<i>T. cacao</i>	Extrato Hidroalcoólico	1,12 ± 0,43
	Fração em DCM	1,19 ± 0,17
	Fração em MeOH	2,26 ± 1,18

Os extratos de *T. grandiflorum* e *T. subincanum* apresentaram as maiores porcentagens de fenóis totais, já espécie *T. cacao* apresentou porcentagens baixíssimas. Os resultados relatados podem ser relacionados a atividade antioxidante, pois as amostras com maior porcentagem de fenóis apresentaram também melhor atividade antioxidante, assim como as que não apresentaram atividade antioxidante a porcentagem de fenóis observada foi baixíssima.

A porcentagem de fenólicos totais relatada no extrato das cascas das sementes de *T. grandiflorum* foi correspondente aos resultados apresentados por Tauchen (2016) que relatou uma grande concentração de fenóis nas folhas ($400,6 \pm 25,9 \mu\text{g EGA/mg}$) e nas cascas das sementes ($163,0 \pm 8,1 \mu\text{g EGA/mg}$). Na espécie *T. subincanum* observou-se uma maior porcentagem de fenóis totais, este dado até então não foi descrito na literatura o que potencializa os estudos com a espécie.

Na literatura já foram relatadas porcentagens de 6 a 8% de substâncias fenólicas em sementes de *T. cacao*, além de concentrações de $77,31 \pm 2,25 \text{ mg EC/g}$ de substâncias fenólicas (2017). A porcentagens observada na tabela 19, não corresponde aos dados da literatura.

5.8.3 Atividade antimicrobiana dos extratos de *Theobroma*

Os extratos hidroalcoolicos das três espécies de *Theobroma* foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana. Somente o extrato de *T. cacao* apresentou pequena atividade na concentração de 5 mg/mL frente a três bactérias *H. alvei*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*. Esta atividade ainda não tinha sido relatada na espécie e no gênero *Theobroma*. Só há relatos de atividade antimicrobiana em outras espécies da família *Sterculiaceae*, como a espécie *Dombeya cymosa* que apresenta atividade contra as bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae* e a espécie *Hermannia depressa* possui atividade antimicrobiana frente ao *Bacillus subtilis* (AL MUQARRABUN & AHMAT, 2015).

6. CONCLUSÃO

A espécie *T. grandiflorum* apresentou o maior rendimento de 29,61 % \pm 0,01 do extrato hidroalcoólico, quando comparado as demais espécies *T. cacao* e *T. subincanum*.

A análise por CCDAE foi fundamental para sugerir a presença de alguns flavonoides no extrato e frações das três espécies de *Theobroma*. Na fração em DCM de *T. grandiflorum* foi possível sugerir a presença de quercetina com o rf de 0,76. O rf correspondente a epigallocatequina foi observado no extrato hidroalcoólico e na fração em DCM. Na espécie *T. subincanum* foi sugerida a presença da quercetina assim como em *T. grandiflorum* e o flavonoide catequina. Na fração em DCM de *T. cacao* foi sugerida a presença de caempferol ao se comparar o rf e coloração do padrão, assim como a quercetina.

Todos os extratos e frações das espécies em estudo apresentaram atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH qualitativa realizada na análise por CCDAE. A semelhança entre as espécies foi evidenciada pela presença de rf's semelhantes, como: 0,76; 0,73; 0,67; 0,63; 0,49; 0,48; 0,32 e 0,18 na placa de CCDAE.

As espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum* foram as que apresentaram maior semelhança em relação ao perfil espectrométrico. Os seguintes flavonoides em comum foram detectados: isoscuteleareína-8-*O*- β -*D*-glucoronídeo, hipoleatina-8- *O*- β -*D*-glucoronídeo, hipoleatina 3''-metil éter 8-*O*- β -*D*-glucoronídeo e hipoleatina-8- *O*- β -*D*- glucoronídeo 3''-*O*-sulfato. Destaca-se o ineditismo da detecção dos flavonoides em *T. subincanum*, pois até então não há relatos da descrição de substâncias flavonoídicas na espécie.

As técnicas de CLAE-DAD e CLUE-ESI-MS²-orbitrap permitiram a detecção e a confirmação da presença da teacrina, nas frações em DCM das cascas das sementes das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. A cafeína também foi detectada, mas exclusivamente em *T. cacao*.

Na espécie *T. subincanum* foram detectados 8 substâncias inéditas na espécie, sendo estas, o ácido cafeico, ácido isocítrico, ácido vanílico glucosídeo, vitexina (apigenina-8-C-hexosídeo), hipoleatina-8-O- *O*- β -D-glucoronídeo, hipoleatina-8- *O*- β -D- glucoronídeo 3''-*O*-sulfato, isoscutelareína-8-*O*- β -D-glucoronídeo, teograndina I. Estas substâncias foram confirmadas por meio da técnica de CLUE-ESI-MS²-orbitrap.

A análise metabolômica permitiu observar a similaridade entre as espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum* e a diferenciação da espécie *T. cacao*. Na fração em DCM no modo positivo, o íon m/z 225 correspondente a teacrina foi o que mais influenciou no agrupamento das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. Na fração em MeOH no modo positivo foi possível destacar o íon m/z 149 como majoritário nas cascas das sementes de *T. cacao* e nas espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum* o íon majoritário foi o de m/z 274. Os íons não foram identificados, pois não há relatos na literatura.

Nas frações das cascas das sementes em DCM, o íon m/z 305, correspondente ao sulfato de ácido 12-hidroxijasmônico, foi o majoritário em *T. cacao*, já nas espécies *T. subincanum* e *T. grandiflorum* o íon majoritário foi o m/z 191. Pode-se sugerir a presença de um possível marcador de *T. cacao*, o íon m/z 218 que não foi identificado.

O extrato hidroalcoólico de *T. grandiflorum* foi o mais ativo frente ao radical livre DPPH e ABTS. A espécie *T. cacao* não apresentou atividade antioxidante frente a nenhum dos radicais testados, o que se contradiz com relatos da literatura. Os resultados de fenólicos totais foram correlacionados a atividade antioxidante, pois os extratos de maior porcentagem de substâncias fenólicas foram os das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*.

Os resultados obtidos nas de diferentes técnicas cromatográficas e detectores, foram complementares para evidenciar a semelhança do perfil químico das cascas das sementes das espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum* e *T. cacao*, sendo um trabalho inédito de comparação

das cascas das sementes, um resíduo de indústrias de alimentos, envolvendo diferentes técnicas cromatográficas.

Pode-se destacar a grande importância do presente trabalho, pois foi possível detectar diferentes flavonoides em *T. subincanum* não descritos na literatura, além de evidenciar a similaridade entre às espécies *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. Esses resultados agregam valor as cascas das sementes dos frutos pois este resíduo pode ser utilizado futuramente em cosméticos com potencial antioxidante ou medicamentos, poupando o descarte desordenado do resíduo pelas indústrias de polpa.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMAFIO, A. D. Toxicidade de teobromina e remediação de subprodutos do cacau: uma visão geral. *Journal of Biological Sciences*, v. 13, n. 7, p. 570–576, 2013.

ADDISON, G. O.; TAVARES, R. M. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia. *Boletim Técnico*, n. 25, p. 1–20, 1951.

AFOAKWA, E. O. Cocoa Cultivation, Bean Composition and Chocolate Flavour Precursor Formation and Character. In: AFOAKWA, E. O. (Ed.) *Chocolate Science and Technology*. Wiley Online Library, p. 12–34, 2010.

AL MUQARRABUN, L. M. R.; AHMAT, N. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of family *Sterculiaceae*: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 92, p. 514–530, 2015.

ALSON, S. G.; JASEN, O.; CIECKIEWICZ, E.; RAKOTOARIMANANA, H.; RAFATRO, H.; DEGOTTE, G.; FRANCOTTE, P.; FREDERICH, M. In-vitro and in-vivo antimalarial activity of caffeic acid and some of its derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 70, n. 10, p. 1349–1356, 2018.

ALVAREZ-RIVERA, G.; BALLESTEROS-VIVAS, D.; PARADA-ALFONSO, F.; IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 112, p. 87–101, 2019.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

AQUIJE, G. A. E. Aislamiento y elucidación estructural de teobromina de semillas de *Theobroma subincanum* Mart. (Cacao del Varillal), por métodos fisicoquímicos y espectrométricos. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Farmacêutica). Iquitos: Universidad Nacional de La Amazonía Peruana, 2014.

ARLORIO, M.; LOCATELLI, M.; TRAVAGLIA, F.; COISSON, J. D.; DEL GROSSO, E.; MINASSI, A.; APPENDINO, G.; MARTELLI, A. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, v. 106, n. 3, p. 967–975, 2008.

ATNIP, A.; GIUSTI, M. M.; SIGURDSON, G. T.; FAILLA, M. L.;

CHITCHUMRROONCHOKCHAI, C.; BOMSER, J. A. The NCI-N87 Cell Line as a Gastric Epithelial Model to Study Cellular Uptake, Trans-Epithelial Transport, and Gastric Anti-Inflammatory Properties of Anthocyanins. *Nutrition and Cancer*, p. 1–10, 2019.

BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A. B. T.; TAJARA, E. H. Proteomics: Methodologies and applications to the study of human diseases. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.

BARROS, H. R. DE M.; GARCÍA-VILLALBA, R.; TOMÁS-BASBERÁN, F. A.; GENOVESE, M. I. Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. *Journal of Functional Foods*, v. 22, p. 477–489, 2016.

BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; QUEIROZ, M. J. R. P.; SANTOS-BUELGA, C.; SANTOS, E. A.; REGIS, W. C. B.; FERREIRA, I. C. F. R. The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 318–322, 2015.

BASTOS, I. S. Avaliação da atividade antimicrobiana, antifúngica e antimalárico de extratos, frações e compostos obtidos de plantas da região amazônia. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia). Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2015.

BECKETT, S. T. *Industrial Chocolate Manufacture and Uses*. 4. ed. York: Wiley-Blackwell, 2009.

BECKETT, S. T. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 3 th ed. John Wiley & Sons, 2011.

BECKETT, S. T. *The Science of Chocolate*. 3 th ed. Royal Society of Chemistry, 2019.

BERTO, A.; RIBEIRO, A. B.; SOUZA, N. E.; FERANDES, E.; CHISTÉ, R. C. Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit *Quararibea cordata* against ROS and RNS. *Food Research International*, v. 77, n. 2, p. 236–243, 2015.

BINDEREIF, S. G.; BRAUER, F.; SCHUBERT, J. M.; SCHWARZINGER, S.; GEBAUER, G. Complementary use of ¹H NMR and multi-element IRMS in association with chemometrics enables effective origin analysis of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, v. 299, n. July, p. 125105, 2019.

BONA, E.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. *Chemometrics Applied to Food Control*. Elsevier Inc., v. 16, 2018.

BRITO, B. DE N. DO C.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. DE S.; GLORIA, M.B.A.; LOPES, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, v. 228, p. 484–490, 2017.

BROWN, S. The chemometrics revolution re-examined. *Journal of Chemometrics*, v. 31, n. 1, p. 1–23, 2017.

BRUNETTO, M. DEL R.; GUTIÉRRES, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A.; GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, v. 100, n. 2, p. 459–467, 2007.

BRUNI, R.; BIANCHINI, E.; BETTARELLO, L.; SACCHETTI, G. Lipid composition of wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* Mart. seeds and comparison with two varieties of *Theobroma cacao* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 691–694, 2000.

BYLUND, D.; NORSTROM, S. H.; ESSÉN, S. A.; LUNDSTROM, U.S. Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1176, n. 1–2, p. 89–93, 2007.

BYNG, J. W.; CHASE, M. W.; CHRISTENHUSZ, M. J. M.; FAY, M. F.; JUDD, W. S.; MABBERLEY, D. J.; SENNIKOV, A. N.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.

CÁDIZ-GURREA, M. L.; LOZANO-SANCHEZ, J.; CONTRERAS-GÁMEZ, M.; LEGEAI-MALLET, L.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; SEGURA-CARRETERO, A. Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. *Journal of Functional Foods*, v. 10, p. 485–498, 2014.

CAIN, N.; ALKA, O.; SEGELKE, T.; VON WUTHENAU, K.; KOHLBACHER, O.; FISCHER, M. Food fingerprinting: Mass spectrometric determination of the cocoa shell content (*Theobroma cacao* L.) in cocoa products by HPLC-QTOF-MS. *Food Chemistry*, v. 298, n. April, p. 125013, 2019.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L. FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolomics: Definitions, state-of-the-art and representative applications. *Quimica Nova*, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, n. 4, p. 1196–1205, 2010.

CARRILLO, L. C.; LONDOÑO-LONDOÑO, J.; GIL, A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, v. 60, p. 273–280, 2015.

CAVALIERI, L. F.; FOX, J. J.; STONE, A.; CHANG, N. On the Nature of Xanthine and Substituted Xanthines in Solution. *Journal of the American Chemical Society*, v. 76, n. 4, p. 1119–1122, 1954.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Evidence of multi-step regulation of HSP72 expression in experimental sepsis. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

CIOLA, R. Fundamentos de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho. 1. ed. São Paulo: Editora Edgar Blucher Ltda, 2000.

COLLINS, H. C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 7. ed. São Paulo: Editora da Unicamp, 1997.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIME, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2047–2053, 2011.

CRUZ, F. R.; ESTEVES, G. L. Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. In: MARTINS, S. E. et al. (Eds.). *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo*. 6. ed. São Paulo: Instituto de Botânica, 2009. v. 6p. 257–284.

CUATRECASAS, J. Cacao and its Allies A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *National Herbarium*, v. 35, n. 6, p. 379–607, 1964.

CUCAITA, N. A.; HERNÁNDEZ, M. S.; GUTIÉRREZ, R. H. Comparison between chocolate and an analog product made from Copoazú (*Theobroma grandiflorum*). *Acta Horticulturae*, v.

1047, p. 231–236, 2014.

D'SOUZA, R. N.; GRIMBS, S.; BEHREND, B.; BERNAERT, H.; ULLRICH, M. S.; KUHNERT, N. Origin-based polyphenolic fingerprinting of *Theobroma cacao* in unfermented and fermented beans. *Food Research International*, v. 99, p. 550–559, 2017.

DA SILVA SAUTHIER, M. C.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, B. R. S.; SILVA, E. F. R.; CALDAS, J. C.; MINHO, L. A. C.; SANTOS, A. M. P.; SANTOS, W. N. L. Screening of *Mangifera indica* L. functional content using PCA and neural networks (ANN). *Food Chemistry*, v. 273, n. January, p. 115–123, 2019.

DE TAEYE, C.; CIBAKA, M. K.; JERKOVIC, V.; COLLIN, S. Degradation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 in aqueous and lipidic model systems. First evidence of “chemical” flavan-3-ol oligomers in processed cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 36, p. 9002–9016, 2014.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n. 7, p. 21–25, 1998.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products*. 2. ed. England: John Wiley & Sons, 2002.

ELEVINA, P.; MÉNDEZ, A.; LÉON, M.; HERNÁNDEZ, G.; SÍVOLI, L. Composition and the Nutritional and Functional Properties of Cocoa By-Products (Pods and Husks) for their use in the Food Industry. In: SIRA, E. P. (Ed.). *Chocolate: Cocoa Byproducts Technology, Rheology, Styling and Nutrition*. 1. ed. Caracas: Nova Science Publishers, p. 259, 2015.

ELWERS, S.; ZAMBRANO, A.; ROHSIUS, C.; LIEBEREI, R. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*, v. 229, n. 6, p. 937–948, 2009.

GENOVESE, M. I.; BARROS, H. R. DE M. *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: Bioactive Compounds and Associated Health Benefits. In: MÉRILLON, J. M.; RAMAEUAT, K. G. (Eds.) *Bioactive Molecules in Food*. Springer, Cham, p. 1–22, 2017.

GENOVESE, M. I.; LANNES, S. C. DA S. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 4, p. 810–814, 2009.

GONDIM, T. M. D. S.; THOMAZINI, M. J.; CAVALCANTE, M. DE J. B.; SOUZA, J. M. L. Aspectos da produção de cupuaçu. *Embrapa Acre*, v. 67, p. 43, 2001.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science and Technology*, v. 72, n. 2018, p. 83–90, 2018.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. In: *A laboratory Manual*. New York: Medicinal Encyclopedia Inc., 1955. p. 192–193.

GURNEY, K. A.; EVANS, L. V.; ROBINSON, D. S. Extraction of purine alkaloids from cocoa tissues and determination by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, v. 2, n. 1, p. 15–19, 1991.

HAM, B. M. *Even Electron Mass Spectrometry with Biomolecule Applications*. New Jersey – USA: Wiley Online Library, 2008.

HAMMERSTONE, J. F.; LAZARUS, S. A.; MITCHELL, A. E.; RUCKER, R.; SCHMITZ, H. H. Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma*). *Lipids*, v. 47, p. 490–496, 1999.

HAMMERSTONE, J. F.; ROMANCZYK, L. J.; AITKEN, W. M. Purine Alkaloid Distribution Within *Theobroma* and *Herrania*. *Phytochemistry*, v. 35, n. 5, p. 1237–1240, 1994.

HARRIS, D. C.; LUCY, C. A. Espectrometria de Massas. In: *Análise Química Quantativa*. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2012. p. 539–574.

HATANO, T.; MIYATAKE, H.; NATSUMO, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry*, v. 59, n. 7, p. 749–758, 2002.

IMRAN, M.; RAUF, A.; ABU-IZENEID, T.; NADEEM, M.; SHARIATI, M. A.; KHAN, I. A.; IMRAN, A.; ORHAN, I. E.; RIZWAN, M.; ATIF, M.; GONDAL, T. A.; MUBARAK, M. S. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 112, n. 1, p. 1–10, 2019.

JALAL, A. F. Polyphenols of Mature Plant , Seedling and Tissue. *Cultures*, v. 16, p. 1377–1380, 1977.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. *Thin-Layer Chromatography*. Germany: VCH Verlagsgesellschaft mbH, v. 1a, 1990.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A. STEVENSE, P. F.; DONOGHUE, M. J.

Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

KALAIVANI, S. S.; VIDHYADEVI, A.; MURUGESAN, A.; BASKARALINGAM, P.; ANURADHA, C.D.; RAVIKUMAR, L.; SIVANESAN, S. Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of Ni(II) ion from an aqueous solution using activated carbon prepared from *Theobroma cacao* (cocoa) shell. *Desalination and Water Treatment*, v. 54, n. 6, p. 1629–1641, 2015.

KATZ, D. L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 10, p. 2779–2811, 2011.

KLASSEN, A.; FACCIO, A.; CANUTO, G.; CRUZ, P. L. R.; RIBEIRO, H. C.; TAVARES, M. F. M.; SUSSULINI, A. Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. In: SUSSULINI, A. (Ed.) *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*. 1. ed. Springer, Cham, p. 3–17, 2017.

KOYAMA, Y.; TOMODA, Y.; KATO, M.; ASHIHARA, H. Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, n. 11–12, p. 977–984, 2003.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. Novos avanços na ciência da separação para a metabóloma: resolvendo a diversidade química em uma era pós-genômica. *Chemical Reviews*, v. 113, n. 4, p. 2437–2468, 2013.

LECUMBERRI, E.; MATEOS, R.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; RUPÉREZ, P.; GOYA, L.; BRAVO, L. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, v. 104, p. 948–954, 2007.

LIMA, M. C. F. Caracterização de Substâncias Fenólicas e Alcaloides de resíduos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum). Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química). Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2013.

LOPES, R. M.; TOLEDO DE OLIVEIRA, T.; NAGEM, T. J. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, p. 18–22, 2017.

MAKAROV, A.; SCIGELOVA, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 25, p. 3938–3945, 2010.

MANCINI, G.; PAPIRIO, S.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. Effect of N -methylnmorpholine-N -oxide Pretreatment on Biogas Production from Rice Straw, Cocoa Shell, and Hazelnut Skin . *Environmental Engineering Science*, v. 33, n. 11, p. 843–850, 2016.

MARKETSTANDMARKETS. Global Chocolate, Cocoa Beans, Lecithin, Sugar and Vanilla Market. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/global-chocolate-market-164.html>>. Acesso em: 27 jul. 2019.

MARTÍNEZ-PINILLA, E.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; FRANCO, R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology*, v. 6, n. FEB, p. 1–5, 2015.

MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M. A.; FIGUEROA, J. G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, v. 49, n. 1, p. 39–45, 2012.

MARTINI, M. H.; TAVARES, D. DE Q. Seed reserves from seven species of the genus *Theobroma*: a review. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 64, n. 1, p. 10–19, 2005.

MASIKE, K.; MHLONGO, M. I.; MUDAU, S. P.; NOBELA, O.; NCUBE, F. N.; TUGIZIMANA, F.; GEORGE, M. J.; MADALA, N. E. Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. *Chemistry Central Journal*, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2017.

MAYORGA-GROSS, A. L.; QUIRÓS-GUERRERO, L.M.; FOURNY, G.; VAILLANT, F. An untargeted metabolomic assessment of cocoa beans during fermentation. *Food Research International*, v. 89, p. 901–909, 2016.

MELZIG, M. F.; PUTSCHER, I.; HENKLEIN, P.; HABER, H. In vitro pharmacological activity of the tetrahydroisoquinoline salsolinol present in products from *Theobroma cacao* L. like cocoa and chocolate. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, n. 1–2, p. 153–159, 2000.

MOITA, I. S. Comparação da Composição Química de Metilxantinas de Resíduos de Espécies de *Theobroma*. Monografia (Trabaho de conclusão de curso de Química). Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2016.

MOLYNEUX P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 26, n. May, p. 211–219, 2004.

MOTAMAYOR, J. C.; LACHENAUD, P.; MOTA, J. W. DE S.; LOOR, R.; KUHN, D. N.; BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). PLoS ONE, v. 3, n. 10, p. 1–8, 2008.

NAKAYAMA, L. H. I.; SOARES, M. K. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). Scientia Agricola, v. 53, n. 1, p. 73, 1996.

NAZARÉ, R. F. R. DE; BARBOSA, W. C.; VIÉGAS, R. M. F. Processamento de sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate. Embrapa-Cpatu, v. 108, n. 108, p. 38, 1990.

NICOLETTI, C. F.; DELFINO, H.; PINHEL, M.; NORONHA, N. Y.; PINHANELLI, V. C.; QUINHONEIRO, D. C. G.; OLIVEIRA, B. A. P.; MARCHINI, J. S.; NONINO, C. B. Impact of green tea epigallocatechin-3-gallate on HIF1- α and mTORC2 expression in obese women: anti-cancer and anti-obesity effects? Nutricion hospitalaria, v. 36, n. 2, p. 315–320, 2019.

NSOR-ATINDANA, J.; ZHONG, F.; KEBITSAMANG JOSEPH MOTHIBE. In vitro hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells. Food & Function, v. 3, n. 10, p. 1044–1050, 2012.

NTIAMOAH, A.; AFRANE, G. Environmental impacts of cocoa production and processing in Ghana: life cycle assessment approach. Journal of Cleaner Production, v. 16, n. 16, p. 1735–1740, 2008.

CLÍMACO, G. N.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. DE O.; PEREIRA, A. L. F. Mixed Nectar of Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and Green Tea and the Effect of Preservatives and Storage on Nutritional and Sensorial Characteristics. Journal of Food and Nutrition Research, v. 7, n. 5, p. 361–369, 2019.

NYFFELER, R.; BAYER, C.; ALVERSON, W. S.; YEN, A.; WHITLOCK, B. A.; CHASE, M. W.; BAUM, D. A. Phylogenetic analysis of the Malvadendrina clade (*Malvaceae* s.l.) based on plastid DNA sequences. Organisms Diversity and Evolution, v. 5, n. 2, p. 109–123, 2005.

OKIYAMA, D. C. G.; NAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. Trends in Food Science and Technology, v. 63, p. 103–112, 2017.

ORACZ, J.; NEBESNY, E.; ŻYŻELEWICZ, D. Changes in the flavan-3-ols, anthocyanins, and flavanols composition of cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups affected by

- roasting conditions. *European Food Research and Technology*, v. 241, n. 5, p. 663–681, 2015.
- ORTEGA, N.; ROMERO, M. P.; MACIÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J. R.; MOTILVA, M. J. Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, n. 3, p. 298–305, 2010.
- PARK, M. Y.; JI, G. E.; SUNG, M. K. Dietary Kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 57, n. 2, p. 355–363, 2012.
- PATRAS, M. A.; MILEV, B.; VRANCKEN, G.; KUHNERT, N. Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC-MSn. *Food Research International*, v. 63, p. 353–359, 2014.
- PEDAN, V.; WEBER, C.; DO, T.; FISCHER, N.; REICH, E.; ROHN, S. HPTLC fingerprint profile analysis of cocoa proanthocyanidins depending on origin and genotype. *Food Chemistry*, v. 267, n. September 2017, p. 277–287, 2017.
- PEDAN, V.; FISCHER, N.; ROHN, S. An online NP-HPLC-DPPH method for the determination of the antioxidant activity of condensed polyphenols in cocoa. *Food Research International*, v. 89, p. 890–900, 2016.
- PEREIRA-CARO, G.; BORGES, G.; NAGAI, C.; JACKSON, M. C.; YOKOTA, T.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Profiles of phenolic compounds and purine alkaloids during the development of seeds of *Theobroma cacao* cv. Trinitario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 2, p. 427–434, 2013.
- PÉREZ-MORA, W.; JORRIN-NOVO, J. V.; MELGAREJO, L. M. Substantial equivalence analysis in fruits from three *Theobroma* species through chemical composition and protein profiling. *Food Chemistry*, v. 240, p. 496–504, 2018.
- POHLAN, H. A. J.; PÉREZ, V. D. Soils, Plant Growth and Crop Production. In: VERHEYE, W. H. (Ed.) *Encyclopedia of life support systems*. United Kingdom: Eolss Publishers, 2010.
- PORTER, L. J.; MA, Z.; CHAN, B. G. Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*, v. 30, n. 5, p. 1657–1663, 1991.
- PUGLIESE, A. G.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; TRUCHADO, P.; GENOVESE, M. I. 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.

PURA NAIK, J. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 8, p. 3579–3583, 2001.

QUELAL-VÁSCONEZ, M. A.; LEMA-GARCIA, M. J.; PÉREZ-ESTEVE, E.; ARNAU-BONACHERA, A.; BARAT, J. M.; TALENS, P. Fast detection of cocoa shell in cocoa powders by near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Food Control*, v. 99, p. 68–72, 2019.

QUESNEL, V. C. Fractionation and properties of the polymeric leucocyanidin of the seeds of *Theobroma cacao*. *Phytochemistry*, v. 7, n. 9, p. 1583–1592, 1968.

QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. *Food Chemistry*, v. 104, n. 3, p. 1123–1126, 2007.

RAMIRO-PUIG, E.; CASTELL, M. Cocoa: Antioxidant and immunomodulator. *British Journal of Nutrition*, v. 101, n. 7, p. 931–940, 2009.

RASCHE, F.; SVATO, A.; MADDULA, R. K.; BOTTCHEER, C.; BOCKER, S. Computing Fragmentation Trees from Tandem Mass Spectrometry Data - Analytical Chemistry (ACS Publications). *Analytical chemistry*, p. 1–22, 2011.

RATES, S. M. K. Metilxantinas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Florianópolis: Artmed, 2007. p. 502.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n. 98, p. 1–7, 1999.

REICH, E.; SCHIBLI, A. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. 1. ed. New York: Thieme, 2007.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: Araça-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *European Food Research and Technology*, v. 218, n. 4, p. 380–384, 2004.

- RONDÓN, J. B.; CAMPOS, L. J. C. Revisión Taxonómica del género *Theobroma* (*Sterculiaceae*). *Acta Botánica Venezuelica*, v. 28, n. 1, p. 113–133, 2005.
- RUSCONI, M.; CONTI, A. *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods : A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, v. 61, p. 5–13, 2010.
- SALGADO, J. M.; RODRIGUES, B. S.; DONADO-PESTANA, C. M.; DIAS, C. T. S.; MORZELLE, M. C. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) Peel as Potential Source of Dietary Fiber and Phytochemicals in Whole-Bread Preparations. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 66, n. 4, p. 384–390, 2011.
- SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; JÁUREGUI, O.; CASALS, I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, v. 38, n. 1, p. 35–42, 2003.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.; JR, J. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdc-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.
- SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J. *Princípios de Análise Instrumental*. 6. ed. Bookman, 2009.
- SOTELO, A.; ALVAREZ, R. G. Chemical Composition of Wild *Theobroma* Species and Their Comparison to the Cacao Bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, n. 11, p. 1940–1943, 1991.
- SOTELO, L.; ALVIS, A.; ARRÁZOLA, G. Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de ciencias hortícolas*, v. 9, n. 1, p. 124–134, 2015.
- SOTERO, V.; MEJIA, K.; REBATA, C.; MERINO-ZEGARRA, C. Advances in the evaluation of antioxidant activity of ten species of the family *Sterculiaceae*. *Ciencia Amazónia*, v. 2, n. 2, p. 108–115, 2012.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática : guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. São Paulo: Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STARK, T.; HOFMANN, T. Isolation, structure determination, synthesis, and sensory activity of N-phenylpropenoyl-L-amino acids from cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 13, p. 5419–5428, 2005.

SUZUKI, T.; HARA, H. Quercetin Enhances Intestinal Barrier Function through the Assembly of Zonula Occludens-2, Occludin, and Claudin-1 and the Expression of Claudin-4 in Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, v. 139, n. 5, p. 965–974, 2009.

TAIA, W. General View of Malvaceae Juss. S.L. and Taxonomic Revision of Genus *Abutilon* Mill. in Saudi Arabia. *Journal of King Abdulaziz University-Science*, v. 21, n. 2, p. 349–363, 2009.

TAUCHEN, J.; BORTL, L.; HUML, L.; MIKSATKOVA, P.; DOSKOCIL, I.; MARSIK, P.; VILLEGAS, P. P. P.; FLORES, Y. B.; DAMME, P. V.; LOJKA, B.; HAVLIK, J.; LAPCIK, O.; KOLOSKA, L. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the peruvian amazon. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 26, n. 6, p. 728–737, 2016.

THORNE, R. Synopsis of a Putatively Phylogenetic Classification of the Flowering Plants. *Aliso*, v. 6, n. 4, p. 57–66, 1968.

TIMBIE, D. J.; SECHRIST, L.; KEENEY, P. G. Application of High-Pressure Liquid Chromatography To the Study of Variables Affecting Theobromine and Caffeine Concentrations in Cocoa Beans. *Journal of Food Science*, v. 43, n. 2, p. 560–565, 1978.

TOMAS-BARBERÁN, F. A. et al. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 10, p. 3926–3935, 2007.

VALADEZ-CARMONA, L.; PLAZOLA-JACINTO, C. P.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, M.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, M. D.; VILLARREAL, F.; NECOECHEA-MONDRAGÓN, H.; ORTIZ-MORENO, A.; CEBALLOS-REYER, G. Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 41, p. 378–386, 2017.

VALENTINA, C.; YANES, I.; MELO, A. A.; RIBEIRO, P. R. E.; MELO, A. C. G. R.; TAKAHASHI, J. A.; FERRAZ, V. P.; MOZOMBITE, D. M. S.; SANTOS, R. C. Inhibition of

Acetylcholinesterase and Fatty Acid Composition in *Theobroma grandiflorum* Seeds. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, v. 9, n. 3, 2017.

VASCONCELOS, M. N. L.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S.; GOTTLIEB, O. R. Estudo químico das sementes do Cupuaçu. *Acta Amazonica*, v. 5, n. 3, p. 293–295, 1975.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2. ed. Springer US, 1996.

WANG, Y. H.; GE, B.; YANG, X. L.; ZHAI, J.; YANG, L.N.; WANG, X. X.; LIU, X.; SHI, J. C.; WU, Y. J. Proanthocyanidins from grape seeds modulates the nuclear factor-kappa B signal transduction pathways in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis. *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 10, p. 1620–1627, 2011.

WEISBURGER, J. H. Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine*, v. 226, n. 10, p. 891–897, 2001.

WILKIE, P.; CLARK, A.; PENNINGTON, R. T.; CHEEK, M.; BAYER, C.; WILCOCK, C. C. Phylogenetic Relationships within the Subfamily *Sterculioideae* (*Malvaceae*/*Sterculiaceae*-*Sterculieae*) Using the Chloroplast Gene *ndhF*. *Systematic Botany*, v. 31, n. 1, p. 160–170, 2006.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, v. 33, n. 6, p. 423–447, 2000.

WU, L. H.; XU, Z. L.; DONG, D.; HE, S. A.; YU, H. Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS-induced IBD model of mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2011, p. 1–9, 2011.

YAMAGUCHI, K. K. DE L.; MOITA, I. S.; LAMARÃO, C. V.; PIERE, F. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Food and cosmetic applications of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). In: TODOROV, S. D.; PIERI, F. A. (Eds.) *Tropical Fruits*. Brasil: Nova, 2018.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“Cupuaçu”). *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 11, p. 1501–1504, 2003.

ZHOU, W.; SHAN, J.; WANG, S.; JU, W.; MENG, M.; CAI, B.; DI, L. Simultaneous determination of caffeic acid derivatives by UPLC-MS/MS in rat plasma and its application in

pharmacokinetic study after oral administration of Flos Lonicerae-Fructus Forsythiae herb combination. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 949–950, p. 7–15, 2014.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Florianópolis: Artmed, p. 502, 2007.