

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

**Compostos fenólicos do cupuaçu**  
**(*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate:**  
**Composição e possíveis benefícios.**

**Alexandre Gruber Pugliese**

**Dissertação para obtenção do grau de**

**MESTRE**

**Orientadora:**

**Prof. Dr. MARIA INÉS GENOVESE**

**São Paulo**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ALEXANDRE GRUBER PUGLIESE**

**Compostos fenólicos do cupuaçu  
(*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate:  
Composição e possíveis benefícios.**

**Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

---

**Prof.<sup>ª</sup> Dr. Maria Inés Genovese  
orientadora/presidente**

---

**1º. examinador**

---

**2º. examinador**

**São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.**

**Dedico este trabalho aos meus pais,  
Maria Matilde e Luciano,  
pelo apoio, amor e ensinamentos.**

## AGRADECIMENTOS

Aos professores e especialistas Antônio Salatino, Felipe Dörr, Ian Castro-Gamboa, Inés Genovese, Massuo Kato e Raimundo Mororó pela orientação, amizade e valiosas contribuições neste trabalho.

Aos professores, alunos e técnicos Alexandre Lobo, Alexandre Pimentel, Any Gonçalves, Beatriz Cordenunsi, Celia Coli, Dominique Fischer, Ernani Junior, Gledson Guimarães, Inar Castro, Ivanir Pires, Katia Callou, Lena Ranilla, Lucia da Silva, Jorge Mancini, José Almeida, Marcela Alezandro, Marcia Moraes, Marilete Wolff, Neuza Hassimotto, Patrícia (Pat) Pécora, Ronaldo Pitombo, Rosângela Torres, Suzana Lannes, Tânia Shiga, Thiago (Belchior) de Oliveira e Wilson Junior pela amizade e colaboração neste trabalho, e às demais pessoas que por ventura tenham contribuído.

Aos funcionários Cleunice Cabral, Edilson (Dilsu) Santos, Elaine Eyshiko, Mônica Perucci e Jorge de Lima pelo suporte administrativo e colaboração.

Aos amigos André (dos) Santos, Bruno Rennó (zis), Igor Velecico (russo) e Leandro Foltran (leleco), pela amizade de tantos anos.

A minha namorada Julyane Poltronieri, sempre tão presente, amorosa e positiva.

Aos meus pais, que sempre me deram apoio e suporte em minhas empreitadas, e à minha irmã Giselle (não me esqueci de você, não!), companheira de vida e profissão.

A CEPLAC e a Fazenda Riachuelo, pela receptividade, pela disponibilização do local, equipamento e matéria prima para confecção do cupulate e do chocolate.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

A Universidade de São Paulo, local em que me graduei e agora me pós-graduo, com muito gosto pela possibilidade de aprendizado e pesquisa nesta renomada instituição. E a todas as instituições vinculadas ao ensino de Farmácia e Bioquímica brasileiras, na torcida de que haja cada vez mais interatividade com o setor privado, seja para conferir maior objetividade e financiamento à pesquisa, seja para promover maior oportunidade aos alunos e profissionais.

A todas essas pessoas e intuições, que tornaram possível a realização deste trabalho e de meu crescimento pessoal, muito obrigado!

## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1.	Cupuaçu e cupulate	20
1.1.1.	Produção de cupulate	25
1.2.	Compostos bioativos	30
1.2.1.	Flavonóides	12
1.2.2.	Ácidos fenólicos	31
1.2.3.	Taninos, proantocianidinas e procianidinas	36
1.2.3.1.	Quantificação de proantocianidinas	40
1.3.	Atividade inibitória de $\alpha$ -glicosidase e $\alpha$ -amilase	42
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
3.1.	Materiais	45
3.2.	Equipamentos	45
3.2.1.	Equipamentos utilizados na produção de cupulate/chocolate	45
3.2.2.	Equipamentos utilizados nas análises	46
3.3.	Métodos	47
3.3.1.	Amostragem	47
3.3.2.	Produção do cupulate e chocolate	47
3.3.3.	Composição centesimal	49
3.3.3.1.	Determinação de umidade	49
3.3.3.2.	Determinação de cinzas	49
3.3.3.3.	Determinação de proteínas	49
3.3.3.4.	Determinação de lipídios	49
3.3.3.5.	Determinação de carboidratos	50
3.3.4.	Análise de ácidos graxos	50
3.3.4.1.	Extração de Gordura	50
3.3.4.2.	Metilação (BF <sub>3</sub> )	51

3.3.4.3. Cromatografia a gás	51
3.3.4.4. Quantificação de ácidos graxos e da porcentagem de gordura	52
3.3.5. Análise de flavonóides	52
3.3.5.1. Extração de flavonóides	52
3.3.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	53
3.3.5.3. Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LCMS/MS)	53
3.3.6. Determinação do ácido ascórbico (vitamina C)	54
3.3.7. Determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	54
3.3.7.1. Extração	54
3.3.7.2. Redução do reagente de Folin-Ciocalteu (Fenólicos Totais)	55
3.3.7.3. Seqüestro de radicais livres (DPPH)	55
3.3.7.4. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	56
3.3.8. Determinação da atividade inibitória da $\alpha$ -glicosidase	57
3.3.8.1. Extração	57
3.3.8.2. Inibição de $\alpha$ -glicosidase	57
3.3.9. Determinação da atividade inibitória de $\alpha$ -amilase	58
3.3.9.1. Extração	58
3.3.9.2. Inibição da $\alpha$ -amilase	58
3.3.10. Quantificação das proantocianidinas	59
3.3.10.1.Extração	59
3.3.10.2.Quantificação das proantocianidinas pelo método da vanilina	60
3.3.10.3.Quantificação das proantocianidinas pelo método do butanol acidificado.	60
3.3.11. Identificação de proantocianidinas	61
3.3.11.1.Extração	61
3.3.11.2.Purificação em LH20	61
3.3.11.3.Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LCMS/MS)	62
3.4. Análise dos resultados	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Composição centesimal	63
4.2. Perfil de ácidos graxos da semente fresca e líquido	64
4.3. Teores de ácido ascórbico da polpa de cupuaçu	68

<b>4.4.</b>	<b>Capacidade inibitória de <math>\alpha</math>-amilase e <math>\alpha</math>-glicosidase</b>	<b>70</b>
<b>4.5.</b>	<b>Teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante</b>	<b>73</b>
<b>4.5.1.</b>	<b>Fenólicos totais, capacidade de seqüestro do DPPH• e ORAC</b>	<b>73</b>
<b>4.5.2.</b>	<b>Análise de polifenólicos</b>	<b>78</b>
<b>4.5.2.1.</b>	<b>Identificação de proantocianidinas</b>	<b>78</b>
<b>4.5.2.2.</b>	<b>Quantificação de proantocianidinas</b>	<b>86</b>
<b>4.5.2.3.</b>	<b>Identificação de flavonóides</b>	<b>91</b>
<b>4.5.2.4.</b>	<b>Quantificação de flavonóides</b>	<b>109</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>112</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>114</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>137</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – A - Cupuaçuzeiro em consórcio. B – Cupuaçu.
- Figura 2** – A – Corte longitudinal do cupuaçu. B - Manteiga e torta de cupuaçu.
- Figura 3** - Fluxograma da fabricação do chocolate. Fonte: MORORÓ (2007).
- Figura 4** – A - Despolpamento. B - Cochos de fermentação. C - Secagem.
- Figura 5** – A - Forneamento. B - Descascamento. C - Moagem.
- Figura 6** – A - Refinamento. B - Concheamento. C - Temperagem.
- Figura 7** - Estrutura básica dos flavonóides.
- Figura 8** - Estruturas das principais classes de flavonóides.
- Figura 9** - Flavonóides antioxidantes do cupuaçu: teograndina I (1), teograndina II (2) (+)-catequina (3), (-)-epicatequina (4), isocutelarina 8-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (5), hipolaetina 8-*O*- $\beta$  glucuronídeo (6), quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (7), éster metílico 6'' de quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (8), quercetina (9), caempferol (10), e éster metílico 6'' de isocutelarina 8-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (11).
- Figura 10** – A - Ácido p-hidroxibenzóico. B – Ácido protocatecuico.
- Figura 11** – A - Ácido p-hidroxicinâmico. B – Ácido caféico.
- Figura 12** – A - Ácido gálico. B – Ácido hexahidroxidifênico.
- Figura 13** - Procianidina C, um tanino condensado.
- Figura 14** – A - Cianidina (uma antocianidina). B - (-)-epicatequina. C - (+)-catequina.
- Figura 15** – Procianidinas diméricas. A - Procianidina A1. B - Procianidina A2.
- Figura 16** – Procianidinas diméricas. A - B1. B - B2. C - B3. D - B4.
- Figura 17** – Perfil de eluição do LH20 dos taninos das sementes frescas, a 540 nm.
- Figura 18** – Perfil de eluição da coluna de LH20 dos taninos do líquido, a 540 nm.
- Figura 19** - Cromatograma em 280 nm, usando coluna de polietilenoglicol (PEG), dos taninos das sementes frescas de cupuaçu.
- Figura 20** - Cromatograma em 280 nm, usando coluna de polietilenoglicol (PEG), dos taninos do líquido de cupuaçu.
- Figura 21** - Cromatograma de íons (EIC) dos taninos das sementes frescas de cupuaçu. A, B, C, D - monômero, dímero, trímero e tetrâmero monocarga, E, F, G, H -pentâmero, hexâmero, heptâmero e octâmero duplacarga, I, J – nonâmero e decâmero triplacarga.

**Figura 22** – Espectros de massa dos taninos das sementes frescas de cupuaçu. A – monômero monocarga ( $m/z = 289$ ), B – dímero monocarga ( $m/z = 577$ ), C – trímero monocarga ( $m/z = 865$ ), D – tetrâmero duplacarga ( $m/z = 576$ ), E – tetrâmero monocarga ( $m/z = 1153$ ), F – pentâmero duplacarga ( $m/z = 720$ ).

**Figura 23** – Espectros de massa dos taninos das sementes frescas de cupuaçu. A – hexâmero duplacarga ( $m/z = 864$ ), B – heptâmero duplacarga ( $m/z = 1008$ ), C – octâmero duplacarga ( $m/z = 1152$ ), D – octâmero triplacarga ( $m/z = 768$ ), E – nonâmero triplacarga ( $m/z = 864$ ), F – decâmero triplacarga ( $m/z = 960$ ).

**Figura 24** - Cromatograma de íons (EIC) dos taninos das sementes frescas de cupuaçu. A, B, C - monômero, dímero e trímero monocarga, D – tetrâmero duplacarga.

**Figura 25** – Espectros de massa dos taninos do liquor de cupuaçu. A – monômero monocarga ( $m/z = 289$ ), B – dímero monocarga ( $m/z = 577$ ), C – trímero monocarga ( $m/z = 865$ ), D – tetrâmero duplacarga ( $m/z = 576$ ).

**Figura 26** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol do extrato de semente fresca de cupuaçu após purificação em poliamida.

**Figura 27** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol : amônia do extrato de semente fresca de cupuaçu após purificação em poliamida.

**Figura 28** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol do extrato de liquor de cupuaçu após purificação em poliamida.

**Figura 29** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol : amônia do extrato de liquor de cupuaçu após purificação em poliamida.

**Figura 30** - Gráfico tridimensional mostrando a varredura da absorção da luz (eixo vertical) nos distintos comprimentos de onda (eixo a esquerda), variando com o tempo de corrida (eixo a direita) da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu.

**Figura 31** - Gráfico tridimensional mostrando a varredura da absorção da luz (eixo vertical) nos distintos comprimentos de onda (eixo a esquerda), variando com o tempo de corrida (eixo a direita) da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu; seccionado no comprimento de onda de 270 nm.

**Figura 32** - Gráfico tridimensional mostrando a varredura da absorção da luz (eixo vertical) nos distintos comprimentos de onda (eixo a esquerda), variando com o tempo de corrida (eixo a direita) da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu.

**Figura 33** - Gráfico tridimensional mostrando a varredura da absorção da luz (eixo vertical) nos distintos comprimentos de onda (eixo a esquerda), variando com o tempo

de corrida (eixo a direita) da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu; seccionado no comprimento de onda de 270 nm.

**Figura 34** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol do extrato de semente fresca de cupuaçu após purificação em poliamida. Sobrepostos ao cromatograma encontram-se os espectros de absorção no UV de cada banda (linha azul), indicando o(s) comprimento(s) de onda máximo. A linha vermelha é o espectro de absorção no UV dos distintos padrões comerciais com o qual as bandas foram comparadas, são eles (da esquerda para direita): (+)-catequina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-catequina, “não comparado” e rutina.

**Figura 35** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol : amônia do extrato de semente fresca de cupuaçu após purificação em poliamida. Sobrepostos ao cromatograma encontram-se os espectros de absorção no UV de cada banda (linha azul), indicando o(s) comprimento(s) de onda máximo. A linha vermelha é o espectro de absorção no UV dos distintos padrões comerciais com o qual as bandas foram comparadas, são eles (da esquerda para direita): (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-catequina, “não comparado”, homorientina, homorientina, homorientina, isovitexina, homorientina e isovitexina.

**Figura 36** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Catequina (linha vermelha).

**Figura 37** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Epicatequina (linha vermelha).

**Figura 38** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Quercetina (linha vermelha).

**Figura 39** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Rutina (linha vermelha).

**Figura 40** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol : amônia do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Epicatequina (linha vermelha).

**Figura 41** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol : amônia do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Homorientina (linha vermelha).

**Figura 42** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol : amônia do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Orientina (linha vermelha).

**Figura 43** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol : amônia do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Isovitexina (linha vermelha).

**Figura 44** - Cromatogramas em 270 nm da fração metanol : amônia do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de Vitexina (linha vermelha).

**Figura 45** - Cromatograma em 200 a 700 nm (linha azul) e espectro de massas TIC (linha amarela) da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu.

**Figura 46** - Cromatograma em 200 a 700 nm (linha magenta) e espectro de massas TIC (linha verde) da fração metanol : amônia do extrato de semente de cupuaçu.

**Figura 47** – Fragmentação proposta para o ânion da catequina e da epicatequina.

**Figura 48** - Fragmentação proposta para o ânion de um trímero (uma ligação).

**Figura 49** - Fragmentação proposta para o ânion da quercetina glucuronídeo.

**Figura 50** - Fragmentação proposta para o ânion da luteolina glucuronídeo.

**Figura 51** - Fragmentação proposta para o ânion da isorhamnetina glucuronídeo.

**Figura 52** - Fragmentação proposta para o ânion da theograndina I.

**Figura 53** - Fragmentação proposta para o ânion da theograndina II.

**Figura 54** - Fragmentação proposta para o ânion da theograndina II metilada.

**Figura 55** - Esquema ilustrativo do cupuaçu, cacau, cupulate, chocolate e do processamento.

**Figura 56** - Espectro de massa da banda em 7 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Catequina.

**Figura 57** - Espectro de massa da banda em 7,5 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (uma ligação).

**Figura 58** - Espectro de massa da banda em 8,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Epicatequina.

**Figura 59** - Espectro de massa da banda em 9 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (uma ligação).

**Figura 60** - Espectro de massa da banda em 10,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “A”.

**Figura 61** - Espectro de massa da banda em 12,5 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Isovitexina.

**Figura 62** - Espectro de massa da banda em 12,8 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (uma ligação).

**Figura 63** - Espectro de massa da banda em 14,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “B”.

**Figura 64** - Espectro de massa da banda em 15,3 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “C”.

**Figura 65** - Espectro de massa da banda em 15,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Quercetina ligada a uma pentose.

**Figura 66** - Espectro de massa da banda em 17,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “D”.

**Figura 67** - Espectro de massa da banda em 19 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Luteolina ou caempferol ligado a uma hexose.

**Figura 68** - Espectro de massa da banda em 19,1 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “E”.

**Figura 69** - Espectro de massa da banda em 19,4 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Quercetina glucuronídeo.

**Figura 70** - Espectro de massa da banda em 20,2 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Luteolina glucuronídeo.

**Figura 71** - Espectro de massa da banda em 20,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Isorhamnetina glucuronídeo.

**Figura 72** - Espectro de massa da banda em 8,3 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (uma ligação).

**Figura 73** - Espectro de massa da banda em 9,6 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Epicatequina.

**Figura 74** - Espectro de massa da banda em 10,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (duas ligações).

**Figura 75** - Espectro de massa da banda em 11,6 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. “A”.

**Figura 76** - Espectro de massa da banda em 12,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (duas ligações).

**Figura 77** - Espectro de massa da banda em 13,2 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (duas ligações).

**Figura 78** - Espectro de massa da banda em 13,7 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (duas ligações).

**Figura 79** - Espectro de massa da banda em 14,9 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Quercetina glucuronídeo e glicosídeo.

**Figura 80** - Espectro de massa da banda em 15,9 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (duas ligações).

**Figura 81** - Espectro de massa da banda em 17,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (três ligações).

**Figura 82** - Espectro de massa da banda em 18,2 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (duas ligações).

**Figura 83** - Espectro de massa da banda em 19,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (três ligações).

**Figura 84** - Espectro de massa da banda em 20,2 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Quercetina glucuronídeo.

**Figura 85** - Espectro de massa da banda em 20,6 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. "B".

**Figura 86** - Espectro de massa da banda em 22,1 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Luteolina glucuronídeo.

**Figura 87** - Espectro de massa da banda em 22,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Isorhamnetina glucuronídeo.

**Figura 88** - Espectro de massa da banda em 29,5 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Theograndina II.

**Figura 89** - Espectro de massa da banda em 31,5 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Uma theograndina II metilada.

**Figura 90** - Espectro de massa da banda em 31,5 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Theograndina I.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Composição centesimal das polpas e sementes de cupuaçu e das suas polpas comerciais (%).

**Tabela 2** - Composição centesimal da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate (%).

**Tabela 3** - Composição centesimal da polpa e semente de cacau e do chocolate (%).

**Tabela 4** - Percentual lipídico da semente fresca e líquido de cupuaçu por cromatografia.

**Tabela 5** – Teor de ácidos graxos em % do total de lipídios.

**Tabela 6** - Conteúdo de ácido ascórbico total em mg por 100 g de amostra b.s., presente nas polpas de cupuaçu e nas suas polpas comerciais.

**Tabela 7** - Atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de extratos purificados em poliamida ou em C18, obtidos a partir de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais.

**Tabela 8** - Atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de extratos purificados em poliamida ou em C18, obtidos da semente fresca de cupuaçu, intermediários de produção e cupulate.

**Tabela 9** – Teores de Fenólicos totais das polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais, determinados através do método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalente de catequina/g de amostra b.s.) e capacidade antioxidante por DPPH ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.) e ORAC ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra em b.s.).

**Tabela 10** - Fenólicos totais da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate, determinados através do método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalente de catequina/g de amostra b.s.) e capacidade antioxidante por DPPH ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.) e ORAC ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.).

**Tabela 11** - Fenólicos totais da polpa e semente de cacau e do chocolate, determinados através do método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalente de catequina/g de amostra b.s.) e capacidade antioxidante por DPPH ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.) e ORAC ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.).

**Tabela 12** - Coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) obtidos entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante e fenólicos totais.

**Tabela 13** – Íons correspondentes às proantocianidinas, de ligação simples, identificadas por LCMS. Análise do extrato das sementes frescas e líquido de cupuaçu.

**Tabela 14** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de catequina/g de amostra b.s.) de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais, obtidos usando-se dois meios de extração (metanol puro e metanol:ácido clorídrico = 99:1).

**Tabela 15** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de catequina/g de amostra b.s.) dos extratos da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate, obtidos usando-se dois meios de extração (metanol puro e metanol:ácido clorídrico = 99:1).

**Tabela 16** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de catequina/g de amostra b.s.) dos extratos de polpa e semente de cacau e chocolate, obtidos usando-se dois meios de extração (metanol puro e metanol:ácido clorídrico = 99:1).

**Tabela 17** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de tanino de quebracho/g de amostra b.s.) de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais, obtidos usando-se o analito moído e seu extrato em metanol:HCl = 99:1.

**Tabela 18** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de tanino de quebracho/g de amostra b.s.) da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate, obtidos usando-se o analito moído e seu extrato em metanol : HCl (99:1).

**Tabela 19** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de tanino de quebracho/g de amostra b.s.) de polpa e semente de cacau e chocolate, obtidos usando-se o analito moído e seu extrato em metanol:HCl = 99:1.

**Tabela 20** - Compostos identificados por LCMS/MS, modo negativo, seu tempo de retenção em minutos (tr), massa molar (Mr), fragmentação no MS2 e abundância relativa (%). Fração metanol do extrato de semente de cupuaçu.

**Tabela 21** - Compostos identificados por LCMS/MS, modo negativo, seu tempo de retenção em minutos (tr), massa molar (Mr), fragmentação no MS2 e abundância relativa (%). Fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu.

**Tabela 22** - Flavonóides, expressos em mg por 100 g de amostra b.s., de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais.

**Tabela 23** - Flavonóides, expressos em mg por 100 g de amostra b.s., da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate.

## **LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1** - Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, mineral, vitaminas e colesterol.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®: marca registrada	UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de alta performance acoplada com espectrômetros de massas em seqüência
%: por cento	Kcal: quilocalorias
°Brix: grau Brix	Kg: quilograma
°C: grau Celsius	KJ: quilojoule
μ: micro	L: litros
μg: micrograma	LDL: Lipoproteína de baixa densidade
μL: microlitro	M: molar
μM: micromolar	mg: miligrama
Ago.: agosto	mL: mililitro
B.s.: base seca	mm: massa molar
B.u.: base úmida	mM: milimolar
CEAGESP: Companhia de entrepostos e armazéns gerais de São Paulo	mUA: mili unidades de absorbância
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência	m/v: massa por volume
cm: centímetro	m/z: massa por carga elétrica
cm <sup>2</sup> : centímetro ao quadrado	nm: nanômetro
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio
EC: código enzimático	PEG: polietilenoglicol
EIC: Cromatograma de íons extraídos	pH: potencial hidrogênico
<i>et al.</i> : e colaboradores	Purif.: purificado
Fev.: fevereiro	RMN: Ressonância magnética nuclear
g: grama	Sem.: semente
HPLC: cromatografia líquida de alta performance	TIC: Cromatograma do total de íons
LCMS: cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas	TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico
	U: unidade de atividade enzimática

## RESUMO

PUGLIESE, A.G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: Composição e possíveis benefícios.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O cupuaçu é uma fruta nativa brasileira, com boa palatabilidade e grande potencial agroindustrial, seja na produção de polpa congelada, seja na de um produto análogo ao chocolate, o cupulate<sup>®</sup>. Polpas frescas de cupuaçu apresentaram composição centesimal e teor de fenólicos similares ao longo do ano, favorecendo sua industrialização. Esta regularidade também foi observada entre as distintas marcas avaliadas de polpa de cupuaçu congelada. Foi verificado, porém, diminuição de fenólicos, capacidade antioxidante e inibitória de  $\alpha$ -amilase da polpa congelada em relação à polpa fresca. Esta enzima foi inibida pela polpa deste fruto; no cupulate não foi detectada nenhuma inibição de  $\alpha$ -amilase ou de  $\alpha$ -glicosidase. O cupulate apresentou, aproximadamente, metade da capacidade antioxidante, do teor de fenólicos e de proantocianidinas totais do chocolate. Apresentou, ainda, menor teor de proteínas e maior teor de lipídios que o chocolate. Os ácidos graxos presentes em maior quantidade na semente de cupuaçu, tanto fresca como processada (líquor), são o oléico e o esteárico. Os efeitos do processamento das sementes de cupuaçu assemelham-se àqueles observados no cacau: grande perda de umidade, aumento de lipídios, redução de carboidratos e do teor de polifenólicos. O decréscimo destes compostos ocorre, possivelmente, devido à sua condensação oxidativa, gerando taninos insolúveis de alto peso molecular. Os flavonóides identificados no cupuaçu foram catequina, epicatequina, theograndinas e glucuronídeos de isorhamnetina, quercetina e luteolina. Foram, ainda, identificados procianidinas até decâmeros na semente fresca de cupuaçu, já no líquido, devido à baixa concentração, somente até tetrâmeros.

Palavras-chave: flavonóides, taninos, antioxidante, *Theobroma grandiflorum* e cupulate.

## ABSTRACT

PUGLIESE, A.G. **Cupuassu's (*Theobroma grandiflorum*) and cupulate's phenolic compounds: Chemical composition and possible benefits. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.**

Cupuassu is a Brazilian native fruit, with good flavor and great industrial potential, either in the production of frozen pulps or in the manufacturing process of a chocolate-like food, the cupulate<sup>®</sup>. Cupuassu's fresh pulp showed similar chemical composition and phenolics content over the year, supporting its industrialization. This regularity was also observed between different brands of cupuassu frozen pulp. It was found, however, that the processed pulp has a decrease on phenolics content, antioxidant capacity and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity, in relation to the fresh pulp. This enzyme was inhibited by the fruit pulp. Cupulate, on the other hand, did not inhibit either  $\alpha$ -amylase or  $\alpha$ -glucosidase. This product showed, approximately, half of the antioxidant capacity, of the total phenolics content and of the total proanthocyanidins content found in the regular chocolate. Cupulate showed, also, less proteins content and more lipids content than chocolate. The most abundant fatty acids, either in the cupuassu's fresh seed or in the processed seed (liquor), were the oleic acid and stearic acid. The processing effects observed in the cupuassu's seeds were similar to those observed in cocoa processing, i.e. high moisture reduction, lipids increase, carbohydrate and phenolics content reduction. The phenolics decrease occurs, possibly, due to oxidative condensation, yielding insoluble tannins of high molecular mass. The flavonoids identified on cupuassu were catechin, epicatechin, theograndins and glucuronides of isorhamnetin, quercetin and luteolin. Procyanidins up to decamers on the cupuassu's fresh seeds were also identified, but only up to tetramers on cupuassu's liquor, due to their low concentration.

**Key-words:** flavonoids, tannins, antioxidant, *Theobroma grandiflorum* and cupulate.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Cupuaçu e cupulate

Nos últimos 50 anos, a atenção dada ao setor agropecuário brasileiro aumentou muito, seja devido ao fato de que o Brasil é um exportador de inúmeros produtos, seja porque a ética do mundo atual considera fundamental não apenas melhorar a qualidade do produto em si, mas todo o contexto em que ocorre sua produção. Sendo assim, o desenvolvimento do setor rural brasileiro obteve atenção não somente política, mas também sócio-econômica nas mais diversas regiões do país. Desde então, projetos geraram não somente uma forte integração entre as famílias rurais e as novas formas de racionalidade produtiva, como também quebraram a relativa autonomia setorial (NAVARRO, 2001).

Este mesmo autor afirma que, a partir do século XXI, algumas questões foram ampliadas na discussão de tais projetos: preservação do meio ambiente, mudanças climáticas, desenvolvimento sustentável, aumento da demanda de alimentos, aspectos nutricionais, utilização de agrotóxicos, dentre tantos outros. O que se vê é o surgimento não somente de novas formas de gestão dos recursos naturais, com a utilização de uma extraordinária tecnologia, como também de uma nova visão sobre o mundo rural.

Assim, um estudo sobre qualquer produto produzido (ou potencialmente produzido) em solo nacional é fundamental para viabilizar novos projetos, visto que a produção agrícola tende cada vez mais a unir custo baixo, qualidade nutricional, facilidade de exportação e, por fim, mas não menos importante, preservação do meio ambiente.

Este trabalho visa estudar o fruto do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. K. Shum), espécie nativa das florestas tropicais, encontrado em estados brasileiros como o Pará e Maranhão. Pertence à família Malvaceae e ao gênero *Theobroma*, este último é composto de 22 espécies de plantas tropicais do continente americano, dentre elas o cacau (*Theobroma cacao* L.).

As possíveis aplicações deste fruto, somadas à facilidade de manejo em climas tropicais, levaram famílias a trocarem o cultivo de arroz, feijão e milho, sem muito sucesso, pelas árvores de cupuaçu. A fruticultura nacional se dá por cooperativas de pequenos agricultores do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, entre outros. O trabalho

destes grupos já conta com inovações como o plantio em consórcio com a pupunha palmeira, que provê coco, palmito e sombra necessária ao cupuaçu; e a geração de energia através da casca do cupuaçu (MÜLLER, *et al.*, 1995; COMCIÊNCIA, 2004). Já o cacau, tem como principais produtores os estados do Pará, Mato Grosso, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas. O cultivo voltado à exportação iniciou-se na América, África e Ásia já desde 1585. O Brasil participa no comércio internacional exportando cacau em amêndoas desde 1961 (CUENCA & NAZÁRIO, 2004).

Assim, há um considerável interesse econômico pelo cupuaçu (**Figura 1**), devido à sua polpa aromática e seu teor de acidez bastante apreciados pelos consumidores. O fruto é usado em geléias, sorvetes e bebidas (YANG *et al.*, 2003).



**Figura 1** – A - Cupuaçuzeiro em consórcio. B - Cupuaçus.

O aroma intenso e marcante do cupuaçu o distingue de outros frutos nativos brasileiros – como o umbu-cajá (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*) e o araçá-boi (*Eugenia stipitata*) –, por ser caracterizado pelo seu alto teor de ésteres (butanoato de etila, hexanoato de etila) e traços de terpenos (FRANCO *et al.*, 2000). Estes voláteis, que compõem o aroma, conferem ao cupuaçu um *flavor* frutado, floral, verde, amanteigado, pungente, caramélico, abaunilhado e notas de maçã e chocolate (FRANCO *et al.*, 2005).

Também com aroma agradável, as amêndoas, advindas das sementes torradas do cupuaçu, podem ser usadas na fabricação de um produto similar ao chocolate, conhecido como “cupulate”. Este produto foi desenvolvido e patentado pela EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (NAZARÉ *et al.*, 1990). Neste trabalho, para fins didáticos, será utilizado o termo cupulate para denominar este produto, ainda que seus percentuais e modos de processamento não sejam necessariamente iguais aos da patente (BRASIL, 2008).

Um estudo comparativo entre o chocolate (derivado do cacau) e o cupulate (derivado do cupuaçu) requer uma caracterização da sua composição química e de seus potenciais benefícios à saúde humana.

O **quadro 1** (TACO, 2006) apresenta a composição do fruto cupuaçu, deste sob a forma de polpa congelada, e do fruto cacau. Verifica-se que o cupuaçu apresenta quase o dobro de vitamina C que o cacau, e teor de potássio 4 vezes superior. Observa-se que o teor de carboidratos é metade do encontrado no cacau, seu teor lipídico, no entanto, é 10 vezes maior.

**Quadro 1** - Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, mineral, vitaminas e colesterol.

Descrição dos alimentos	Fruto cupuaçu	Polpa congelada de cupuaçu	Fruto cacau
Umidade (%)	86,2	86,6	79,2
Energia (kcal)	49	49	74
Proteína (g)	1,2	0,8	1
Lipídios (g)	1	0,6	0,1
Carboidratos (g)	10,4	11,4	19,4
Fibra alimentar (g)	3,1	1,6	2,2
Cinzas (g)	1,2	0,6	0,3
Cálcio (mg)	13	5	12
Magnésio (mg)	18	14	25
Manganês (mg)	0,07	0,17	0,04
Fósforo (mg)	21	14	9
Ferro (mg)	0,5	0,3	0,3
Sódio (mg)	3	1	1
Potássio (mg)	331	291	72
Cobre (mg)	0,07	0,14	0,15
Zinco (mg)	0,3	0,2	0,5
Tiamina (mg)	0,37	0,07	0,25
Riboflavina (mg)	0,04	0,07	Tr
Piridoxina (mg)	0,07	0,05	0,04
Niacina (mg)	4,34	Tr	Tr
Vitamina C (mg)	24,5	10,5	13,6

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO, 2006. Tr: Traços.

O cupuaçu possui alto teor de ácido ascórbico, apresentando 110 mg /100 g de amostra (GONÇALVES, 2008). Este valor supera, por exemplo, os teores de vitamina C da laranja Baía: 65 mg/100 g (TACO, 2006). Sabendo que este composto é de grande importância biológica, variedades com altos teores de ácido ascórbico são desejáveis.

Este fruto, por apresentar alto teor de lipídeos em sua semente, é utilizado em produtos de beleza, cremes e sabonetes, que também se valem do apelo de produto natural de origem amazônica. A composição da manteiga de cupuaçu (**Figura 2**), embora semelhante à do cacau, distingue-se desta. Para uma gordura ser considerada equivalente à do cacau (CBE – *cocoa butter equivalent*), deve possuir mais de 65 % de triacilgliceróis do tipo SOS (esteárico, oléico, esteárico) e menos de 45% de ácidos graxos insaturados. A manteiga de cupuaçu, no entanto, possui cerca de 29 % de triacilgliceróis SOS e 46 % de ácidos graxos insaturados (LUCCAS *et al.*, 2001). Mesmo não sendo equivalente à manteiga de cacau, sua composição lipídica semelhante, somada à sua maciez e alto ponto de fusão, faz com que ela possa ser usada na fabricação de produtos análogos ao chocolate em localidades onde as temperaturas são amenas (LANNES *et al.*, 2003).



**Figura 2** – A – Corte longitudinal do cupuaçu. B - Manteiga e torta de cupuaçu.

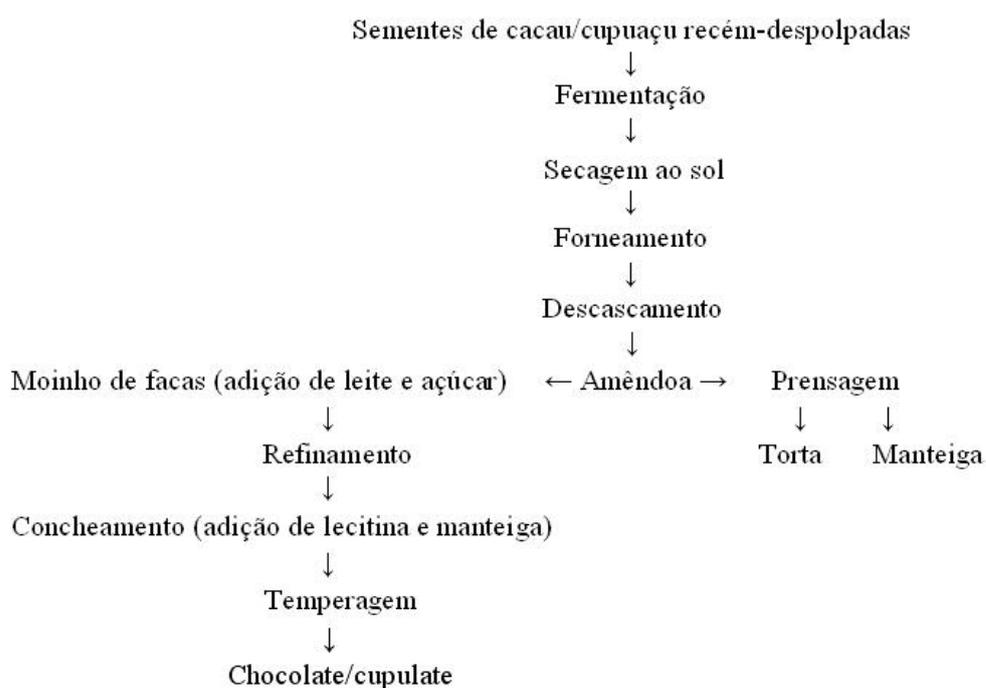
Na produção do chocolate, pode-se utilizar até 5 % em peso de manteiga de cupuaçu, sem alteração das características sensoriais. Já na produção do cupulate, há uma total substituição da manteiga e do macerado das amêndoas (líquor) do cacau pela do cupuaçu. Como resultado, tem-se um produto similar ao chocolate, mas com tempo de cristalização inferior. Isto se deve ao ponto de fusão (33,9 °C) superior ao do cacau (31,0 °C) (LUCCAS *et al.*, 2001).

O maior teor de ácidos graxos monoinsaturados confere maior maciez à gordura, característica bastante apreciada por consumidores no teste de aceitação do cupulate (COHEN *et al.*, 2005). A utilização desta gordura natural desprovida de ligações trans pode ainda substituir a gordura hidrogenada na fabricação de bolos e sorvetes (GILABERT-ESCRIVÁ, 2002).

Em relação às proteínas da semente de cupuaçu, estas apresentam valor biológico por conter boa composição aminoacídica e teores acima dos recomendados às crianças e adultos, para alguns dos aminoácidos essenciais. Além de enriquecer o alimento, suas proteínas melhoram certas propriedades funcionais, como a capacidade de emulsificação (CARVALHO, 2004; LOPES *et al.*, 2008). Esta qualidade também é verificada na polpa do cupuaçu, porém como resultado do alto teor de açúcares solúveis, possibilitando o seu uso como geléias, sucos e iogurtes (ROGEZ *et al.*, 2004).

### 1.1.1 Produção de cupulate

O cupuaçu, como o cacau, sofre diversos processos físico-químicos na conversão da semente para o derivado final (**Figura 3**). O processamento do cacau consiste nas seguintes etapas: colheita, retirada da polpa junto com as sementes (a polpa é drenada durante a fermentação, ou antes desta, com uma despulpadora), fermentação em recipientes sob aquecimento natural do processo, atingindo até 50 °C (usado para reduzir a adstringência e a acidez das sementes), secagem por aquecimento artificial ou sob o sol (**Figura 4**), forneamento a 120-150 °C (usado para o desenvolvimento do *flavor* e, por vezes, para facilitar a liberação da casca que envolve a semente), moagem (obtenção de uma pasta denominada “líqüor”, cuja fluidez se deve à quebra das paredes celulares e liberação da manteiga de cacau) (**Figura 5**), alcalinização (eventualmente usado para aprimoramento do *flavor*, cor e dureza), adição de parte dos demais ingredientes, mixagem, refinamento a 25-50 °C (a pressão de rolos aprimora a textura), armazenamento a 45-50 °C (maturação), concheamento (perde compostos voláteis e umidade, de 49 até 82 °C), adição das partes restantes dos ingredientes e temperagem (**Figura 6**), que é o resfriamento a 10 °C e reaquecimentos sucessivos a 29-31 °C (usado para obter uma boa cristalização) (WOLLGAST *et al.*, 2000). O processamento do cupuaçu para produzir o cupulate sofre as mesmas etapas que o cacau.



**Figura 3** - Fluxograma da fabricação do chocolate/cupulate. Fonte: MORORÓ (2007).



**Figura 4** – A - Despolpamento. B - Cochos de fermentação. C - Secagem.



**Figura 5** – A - Forneamento. B - Descascamento. C - Moagem.



**Figura 6** – A - Refinamento. B - Concheamento. C - Temperagem.

A fermentação ocorre em cochos cobertos com folhas de bananeira ou sacos de aniagem. Somente a folha de bananeira é utilizada por apresentar uma palma fechada, ideal para a conservação do calor gerado pelo metabolismo microbiano. O saco de aniagem também é bastante utilizado por, além de permitir a conservação da temperatura, possibilitar a liberação da água evaporada em decorrência do calor. Esta umidade é um grande problema para a qualidade do cacau, porque favorece o desenvolvimento de fungos. A fermentação é inicialmente anaeróbica. A partir do terceiro até o sétimo e último dia, as sementes são revolvidas diariamente. Desse modo, a fermentação se torna aeróbica e o calor produzido é homogenizado entre as sementes.

A fermentação das sementes de cupuaçu/cacau é uma etapa especialmente importante para a produção de cupulate/chocolate, pois além de desenvolver o *flavor* a semente precisa perder, através da fermentação, sua acidez (proveniente de ácidos como o cítrico, láctico, oxálico e succínico) e excessiva adstringência (resultante da presença de polifenóis, principalmente os flavan-3-óis e procianidinas). Logo no início dela, grandes alterações no conteúdo polifenólico podem ser percebidas: foi observado, no caso do cacau, um abrupto decréscimo do conteúdo de (-)-epicatequina entre o segundo e terceiro dia de fermentação. Ao sexto dia, devido à oxidação e à difusão dos polifenóis nos líquidos que exudam durante a fermentação, o conteúdo de (-)-epicatequina é reduzido a 10 – 20 % da quantidade inicial. Mesmo quando não há fermentação, observou-se um decréscimo de 50 % no teor de (-)-epicatequina após a secagem das sementes (BRACO *et al.*, 1969; BIEHL, 1973; KIM *et al.*, 1984; HERRMANN *et al.*, 1995; HANSEN *et al.*, 1998; HASLAM, 1998).

Durante a fermentação, microorganismos em condições anaeróbicas consomem os ácidos e açúcares presentes internamente e no resíduo externo da semente. Como resultado, diminui-se a acidez e o °Brix, e produzem-se ácido acético e etanol, que contribuem para a desestruturação das membranas celulares. Os polifenóis, uma vez lisadas as membranas, difundem-se com os demais líquidos celulares e são oxidados a quinonas. Essas di-cetonas cíclicas podem (1) reagir com peptídeos ou proteínas, atribuindo coloração marrom; (2) oxidar-se e formar taninos insolúveis de alto peso molecular ou (3) formar outros produtos. Estas reações ocorrem por auto-oxidação, ou com a enzima polifenol oxidase. Não apenas a condensação de subunidades é observada, mas também uma diminuição da quantidade total de polifenóis (HERRMANN *et al.*, 1994; ROMANCZYK *et al.*, 1997; BRAVO *et al.*, 1998; KEALEY *et al.*, 1998; HANSEN *et al.*, 1998; HASLAM, 1998).

Após a fermentação e a secagem, as sementes são forneadas. Esta etapa se utiliza de altas temperaturas, o que, somado à presença do oxigênio, provoca oxidação adicional nos compostos polifenólicos (KEALEY, 1998; WOLLGAST *et al.*, 2000). Um maior tempo de forneamento reduz o teor de polifenólicos, o que, por sua vez, aprimora sobremaneira o *flavor* e a textura: intensifica o sabor de chocolate, aumenta a viscosidade, reduz a adstringência (proveniente de polifenóis) e o amargor (resultante da presença de alcalóides como a theobromina, cafeína e dicetopiperazinas) (MISNAWI *et al.*, 2004; HASLAM, 1998). Durante este processamento há degradação de metade dos aminoácidos, desnaturação parcial de proteínas e destruição quase total de açúcares redutores. Há perda de compostos voláteis, incluindo aldeídos, cetonas, furanos, pirazinas, alcoóis e ésteres. Além destas perdas, o forneamento reduz a umidade, desprende o invólucro fibroso do cotilédone (amêndoa) e este se torna mais friável e escuro (MINIFIE, 1989).

De modo geral, para se obter um chocolate com alto teor de flavonóides e taninos – o que é bom nutricionalmente, mas diminui a palatabilidade – deve-se usar sementes naturalmente ricas em polifenóis, uma baixa temperatura, curto tempo de exposição a esta, e a utilização do processo de branqueamento (idealmente 95 °C por 5 minutos) para inibir a polifenol oxidase (KEALEY *et al.*, 1998). A etapa de alcalinização, utilizada por alguns produtores, também leva a consideráveis decréscimos do conteúdo polifenólico (MILLER *et al.*, 2008; SULISTYOWATI *et al.*, 2008).

Após o forneamento, ocorre a etapa de concheamento, ou conchagem. Este procedimento revolve o liquor por várias horas, podendo variar de 6 a 96 horas. Quanto mais tempo ocorre o conchemamento, melhores serão as qualidades sensoriais do produto final. Durante o concheamento, há perda de umidade e de alguns compostos voláteis, como a redução de mais de 50% dos aldeídos de baixo ponto de fusão e de aproximadamente 30% do ácido acético (FRISSE, 1985; LEY, 1994). Esta etapa aprimora as propriedades do fluido (redução do coeficiente de viscosidade plástica de Casson) pela perda de umidade. A redução final da viscosidade se dá pela adição do emulsificante lecitina de soja (COHEN & JACKIX, 2009). A temperatura de conchagem pode variar de 40-70 °C, para o chocolate ao leite, e de 40-80 °C, para o chocolate amargo. Uma temperatura maior do que as citadas causa a desnaturação das proteínas do leite, o conseqüente empelotamento da massa, uma maior intensidade da reação de *Maillard* e, com isso, o surgimento do aroma queimado (ITAL, 1998).

Enquanto a massa ainda está aquecida pelo processo de concheamento, esta é transferida para o equipamento de temperagem. Esta etapa promove a pré-cristalização do chocolate, influenciando nas características físicas e sensoriais do produto final. O fluido é aquecido e resfriado sucessivamente, enquanto sofre agitação. Este tratamento termo-mecânico tem por objetivo a obtenção da forma cristalina mais estável dentre as diversas estruturas polimórficas que a manteiga de cacau (WILLE & LUTTON, 1966) e de cupuaçu (LUCCAS, 2001) pode adquirir. A massa, inicialmente quente, é resfriada para induzir a cristalização. Um novo aquecimento é efetuado para que somente formas cristalinas estáveis sejam fundidas. O empacotamento adequado dos cristais de gordura atribui maior densidade e viscosidade à massa, o que facilita a moldagem, diminui o tempo de solidificação e aumenta a consistência e o brilho do produto final (COHEN *et al.*, 2004).

De modo semelhante à produção do chocolate de cacau, os componentes da semente de cupuaçu, e os ácidos e açúcares que a envolvem, sofrem trabalho metabólico microbiano. A fermentação, somado ao forneamento e demais processos, leva a alterações físico-químicas (NAZARÉ, 1990). Espera-se, portanto, que este processamento interfira na composição de compostos bioativos do cupuaçu, quali e quantitativamente, alterando os eventuais efeitos biológicos potencialmente favoráveis à saúde humana.

As formulações empregadas na produção de chocolate e cupulate são variadas, a utilizada no presente trabalho foi a de um chocolate/cupulate meio amargo:

52 % Amêndoas de cupuaçu/cacau  
8 % Manteiga de cupuaçu/cacau  
33,5 % Açúcar  
6 % Leite em pó  
0,5 % Lecitina

A formulação meio-amarga contém maiores quantidades da amêndoa. Desse modo, pôde-se avaliar um produto mais rico em polifenólicos e com melhor potencial à saúde humana.

## 1.2. Compostos bioativos

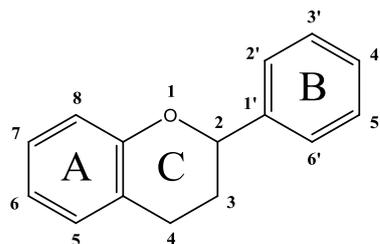
Através da alimentação obtemos macro e micronutrientes, e ainda compostos bioativos com atividades promotoras da saúde, como é o caso da capacidade antioxidante. Esta característica está relacionada aos teores de vitaminas A, C e E, carotenóides, e compostos fenólicos – como os flavonóides – presentes nos frutos e hortaliças em geral. Alimentos ditos funcionais, como o chá verde, vinho, soja, frutas vermelhas e chocolate, possuem, além da capacidade antioxidante, atividades antiinflamatória e/ou hipocolesterolêmica (SEIFRIED *et al.*, 2007; RICE-EVANS *et al.*, 1996; GERMAN e DILLARD, 1998).

Os compostos fenólicos compõem a maior categoria dentre os agentes fitoquímicos, que se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal. Estes compostos são derivados das vias bioquímicas do ácido chiquímico e fenilpropanoídico. Tais vias compõem o denominado metabolismo secundário, sua presença está associada à proteção contra a predação. Esse efeito se deve ao sabor adstringente dos compostos fenólicos, somado à diminuição sistemática do metabolismo dos nutrientes digeridos e absorvidos pelo herbívoro, particularmente o das proteínas. Uma teoria alternativa sugere que o metabolismo secundário ofereceria às plantas meios de adaptação às novas condições ambientais. Segundo essa visão, as enzimas sintetizadas para executar os processos do metabolismo secundário permitiriam a atuação da rede de enzimas do metabolismo primário, até que as condições voltem a ser propícias à atividade metabólica e ao crescimento. Desse modo, os processos do metabolismo secundário é que teriam valor à planta, e não necessariamente os produtos (HASLAM, 1998).

Independentemente de qual o benefício, a evolução levou a uma ampla variedade de metabólitos secundários, muitos deles sendo fenólicos. Estes compostos subdividem-se em três grupos principais: os flavonóides, os ácidos fenólicos, e os taninos. Os flavonóides possuem estrutura molecular C6-C3-C6 com diversas variações, e são compostos muito encontrados na natureza. Estes grupos estão distribuídos na natureza em frutas como o morango, a uva, a maçã e nas nozes. Os ácidos fenólicos abrangem os ácidos benzóicos e derivados (hidroxibenzóico, vanílico, gálico, etc.) e os ácidos cinâmicos e derivados (cumárico, caféico, ferúlico, clorogênico, etc.). Os taninos são polímeros de alto peso molecular e são divididos em três classes: taninos hidrolisáveis, taninos condensados (universais em Angiospermas), e os taninos complexos, de distribuição mais limitada na natureza (KING; YOUNG, 1999; COS *et al.*, 2003).

### 1.2.1. Flavonóides

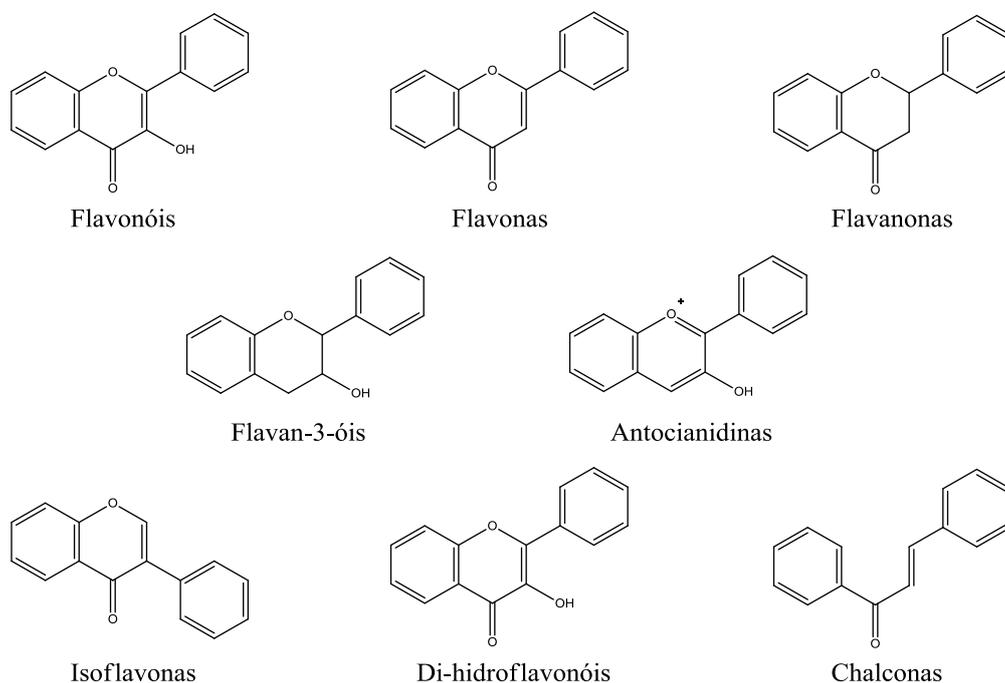
Os flavonóides são compostos bioativos encontrados amplamente nos alimentos e caracterizados por sua estrutura de difenilpropano (C6-C3-C6) composta por quinze carbonos (**Figura 7**) (HERTOG *et al.*, 1992). Sua estrutura é caracterizada por um grupo cromóforo, benzopirano, ligado a um anel aromático. O anel heterocíclico conhecido como benzopirano é chamado de anel C. Esta estrutura está fundida a um anel aromático, chamado de anel A, e possui um grupamento fenila, denominado anel B. Este anel aromático pode estar ligado em C2 (2-fenilbenzopiranos, os flavonóides), C3 (3-fenilbenzopirano, os isoflavonóides) ou C4 (4-fenilbenzopirano, os neoflavonóides). Todos os três grupos possuem uma chalcona como precursora, que é uma forma isomérica de cadeia aberta. Flavonóides com anel heterocíclico de cinco carbonos são denominados auronas. Possíveis modificações aos flavonóides incluem metoxilação, glicosilação nos grupos hidroxila (O-glicosídeos) e nos carbonos (C-glicosídeos), presença do grupo fenila e alquila ligado covalentemente a partes dos flavonóides e condensação adicional de anéis aromáticos no núcleo do flavonóide (ARON & KENNEDY, 2008). A forma glicosilada ocorre com carboidratos tais como a D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose. Os flavonóides subdividem-se em diversas classes incluindo antocianinas, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e flavonóis (**Figura 8**).



**Figura 7** - Estrutura básica dos flavonóides.

Flavonóides representam um grupo abundante e amplamente difundido entre as frutas e vegetais. Seu consumo está relacionado a efeitos cardioprotetores devido à sua influência em mecanismos associados à aterosclerose. Alguns dos possíveis efeitos benéficos dos flavonóides, como aqueles encontrados no cacau, incluem: propriedades antioxidantes, aprimoramento da função endotelial, redução da pressão arterial,

decréscimo do funcionamento e ativação da agregação plaquetária e modulação do sistema imune e das vias inflamatórias.



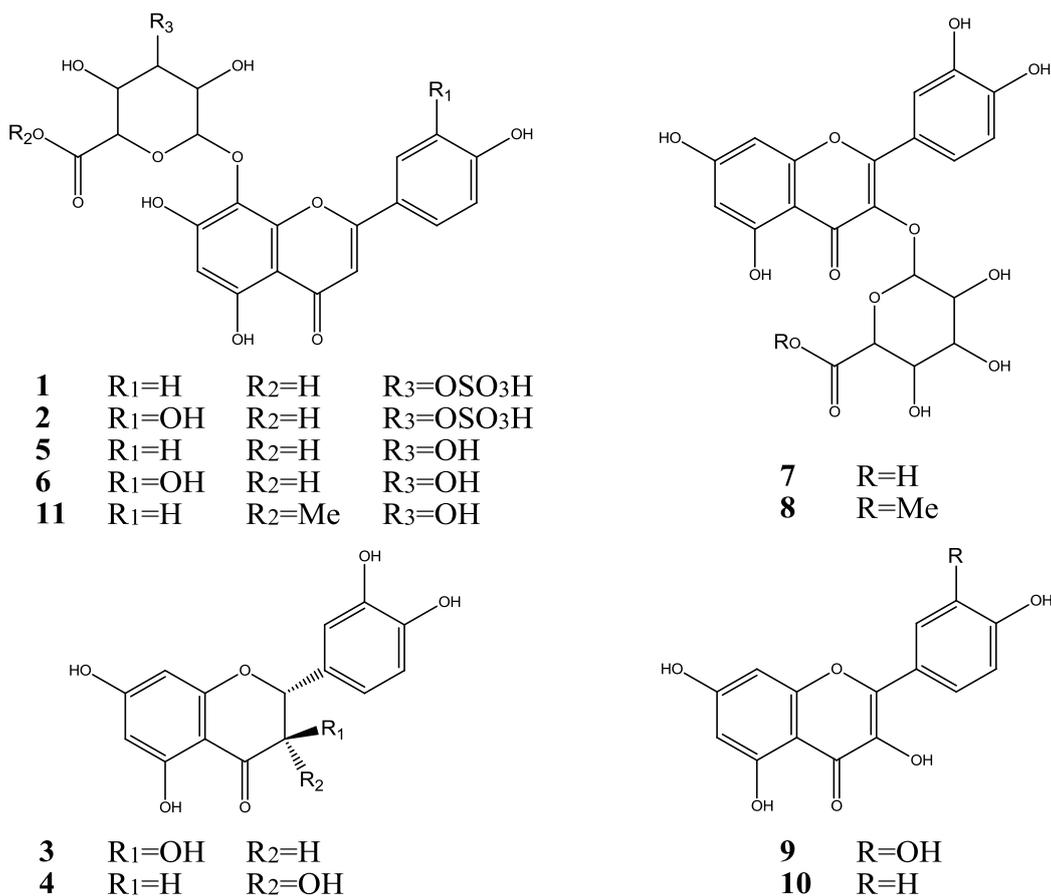
**Figura 8** - Estruturas das principais classes de flavonóides.

A ação biológica benéfica dos flavonóides é devida à habilidade sequestradora de radicais livres, redução da formação destes radicais e estabilização de membranas pelo decréscimo de sua fluidez. Os dois primeiros protegem contra danos por oxidação de moléculas como DNA, lipídios (como a LDL) e proteínas; o último efeito reduz a mobilidade de radicais livres na bicamada lipídica e, conseqüentemente, inibe a peroxidação das membranas das células endoteliais (ENGLER & ENGLER, 2004; GERMAN & DILLARD, 2005). Além destes efeitos, diversos estudos têm demonstrado que os flavonóides podem inibir e, às vezes, induzir uma grande variedade de enzimas envolvidas em importantes processos reguladores como o da divisão e proliferação celular, da agregação plaquetária, da atuação da resposta inflamatória e do sistema imune do organismo humano. Como conseqüência desta cascata de eventos, diversas condições patológicas podem ser evitadas, tais como o desenvolvimento de tumores, aterosclerose, trombose, câncer e inflamação crônica (ENGLER & ENGLER, 2004; HOLLMAN; KATAN, 1997a; 1999).

A oxidação nos sistemas biológicos é uma consequência da ação dos radicais livres no organismo. Tais radicais originam-se de fontes exógenas, substâncias com as quais entramos em contato, ou de fontes endógenas, substâncias originárias de processos biológicos do próprio organismo. A variedade de radicais livres existentes englobam radicais de oxigênio (íon superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), alcóxila ( $RO^{\bullet}$ ), peróxila ( $ROO^{\bullet}$ ), peridroxila ( $HOO^{\bullet}$ ) e oxigênio singlete  $^1O_2$ ), complexos de metais de transição ( $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  e  $Cu^{+2}/Cu^{+}$ ), radicais de carbono (triclorometil ( $CCl_3^{\bullet}$ )), radicais de enxofre (tiol ( $RS^{\bullet}$ )), radicais de nitrogênio (óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e fenildiazina ( $C_6H_5N=N^{\bullet}$ )), além de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ )) (ERENEL *et al.*, 1993; RICE-EVANS & BURDON, 1993).

A ação antioxidante ocorre tanto pela inibição da formação dos radicais quanto pela eliminação dos radicais formados. A neutralização se dá pela doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a cadeia reacional. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente à primeira atuação, sequestrando radicais livres e quelando metais. Os antioxidantes, como os flavonóides, possuem diversas duplas conjugadas em ressonância e hidroxilas que são capazes de estabilizar a carga positiva oriunda da perda do próton. Quanto maior a quantidade de hidroxilas e de ligações olefínicas adicionais no anel C, mais potencializada será sua capacidade antioxidante (NAKAMURA *et al.*, 2003; PIETTA, 2000; ROBARDS *et al.*, 1999; HOLLMAN, KATAN, 1997b).

As informações sobre a composição dos flavonóides do cupuaçu são escassas. YANG *et al.* (2003) identificaram através de RMN nove flavonóides antioxidantes na semente do cupuaçu (**Figura 9**): (+)-catequina (3), (-)-epicatequina (4), isocutelarina 8-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (5), hipolaetina 8-*O*- $\beta$  glucuronídeo (6), quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (7), éster metílico 6'' de quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (8), quercetina (9), caempferol (10), e éster metílico 6'' de isocutelarina 8-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (11); e dois novos flavonóides sulfatados glicosídicos, teograndina I (1) e teograndina II (2). Catequina e epicatequina são flavan-3-óis, quercetina e caempferol são flavonóis, isocutelarina, hipolaetina e teograndina são flavonas.



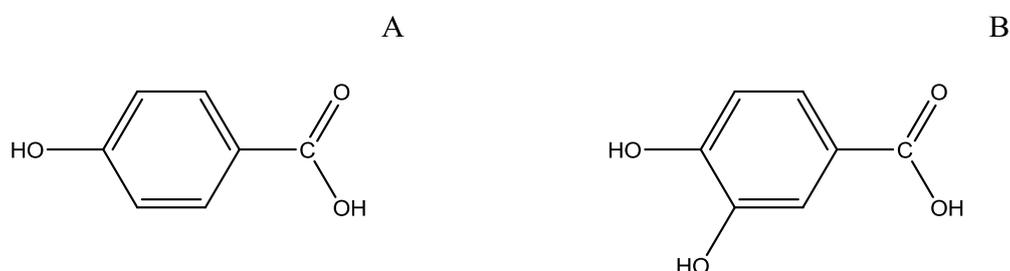
**Figura 9** - Flavonóides antioxidantes do cupuaçu: teograndina I (1), teograndina II (2) (+)-catequina (3), (-)-epicatequina (4), isocutelarina 8-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (5), hipolaetina 8-*O*- $\beta$  glucuronídeo (6), quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (7), éster metílico 6'' de quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (8), quercetina (9), caempferol (10), e éster metílico 6'' de isocutelarina 8-*O*- $\beta$ -D-glucuronídeo (11).

As informações sobre o cacau, fruto do mesmo gênero, e os flavonóides nele encontrados são mais difundidas, constituem-se de (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidinas (como a B2 e a B5), luteolina e seus glicosídeos, apigenina e seus glicosídeos, quercetina glicosilada e naringenina (SÁNCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2003; WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

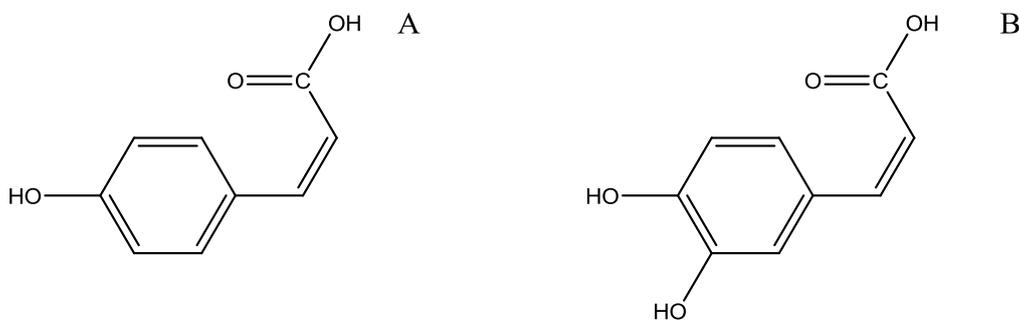
O perfil de flavonóides conhecidos do cupuaçu apresenta em comum com o do cacau a presença de flavanóis, como a (+)-catequina e a (-)-epicatequina. Pela existência destas catequinas presume-se a possível existência de procianidinas também no cupuaçu.

### 1.2.2 Ácidos Fenólicos.

Os ácidos fenólicos estão presentes em plantas como batatas, alcachofra, rabanete, beterraba, cenoura, berinjela, alface, brócolis, espinafre, entre outros (MATTILA & HELLSTRÖM, 2007). Os ácidos fenólicos ocorrem nas plantas predominantemente como derivados substituídos do ácido hidroxibenzóico, que possuem sete átomos de carbono ( $C_6-C_1$ ) (**Figura 10**), e derivados do ácido hidroxicinâmico, que possuem nove átomos de carbono ( $C_6-C_3$ ) (**Figura 11**). O ácido fenólico de sete carbonos é o mais comum e o mais encontrado na natureza. Estes derivados variam quanto aos seus padrões de hidroxilação e metoxilação do anel aromático (SHAHIDI & NACZK, 1995; HERMANN, 1989).



**Figura 10** – A - Ácido p-hidroxibenzóico. B – Ácido protocatecuico.



**Figura 11** – A - Ácido p-hidroxicinâmico. B – Ácido caféico.

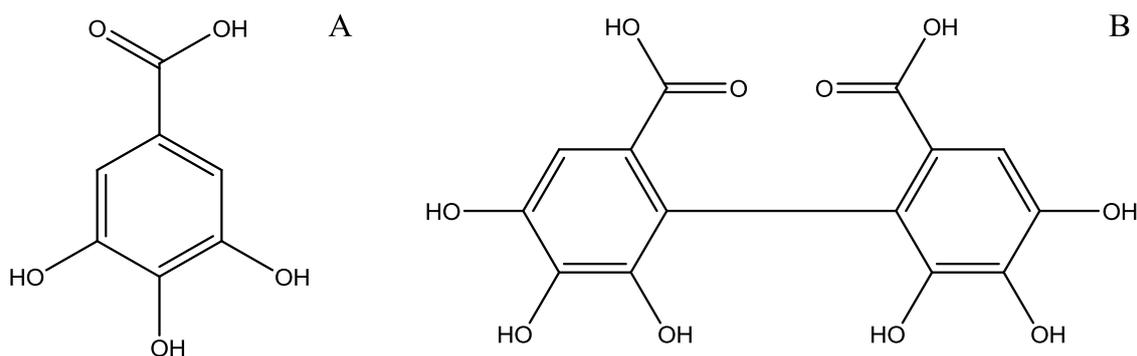
Os ácidos fenólicos podem também apresentar-se ligados entre si ou a outros compostos. A forma de arranjo mais encontrada ocorre com o ácido caféico, o qual, associado ao ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

Assim como outros compostos fenólicos, os ácidos fenólicos atraem atenção por seu potencial benefício à saúde. São atribuídas a eles atividades como antioxidante, antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, antiinflamatória e vasodilatadora (DUTHIE *et al.*, 2000; BREINHOLT, 1999; SHAHIDI & NACZK, 1995).

### 1.2.3. Taninos, proantocianidinas e procianidinas

Taninos são compostos com massa molecular intermediária ou alta, chegando a 30.000 Dalton. São moléculas altamente hidroxiladas e podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. O nome tanino, aliás, advém desta capacidade de ligação a proteínas: utilizam-se taninos no processo de curtume da pele de animais, em inglês “tanning”. O couro é, então, o resultado de complexos estáveis entre taninos e o colágeno da pele (BRAVO *et al.*, 1998; HERRMANN *et al.*, 1994; MAKKAR *et al.*, 1989; MAKKAR *et al.* 1987). De mesmo modo, os taninos se complexam com as proteínas salivares, atribuindo sensação de adstringência. Quanto mais polimerizado o tanino, maior é a sua precipitação. Os taninos resultantes em solução são aqueles de baixa massa molecular (SARNI-MANCHADO *et al.*, 1999).

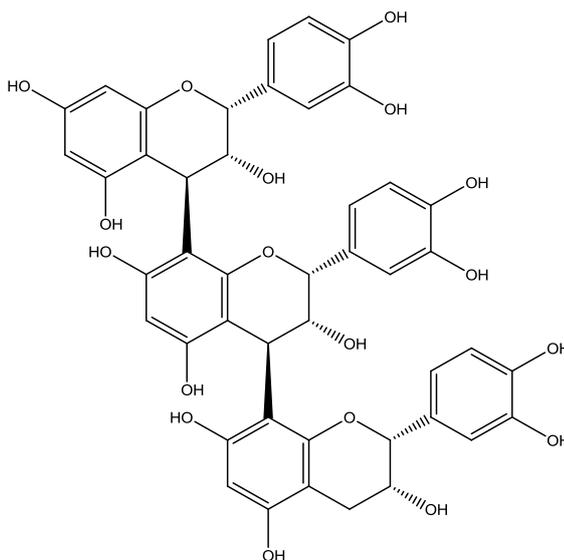
Os taninos podem ser subdivididos em três grupos: hidrolisáveis, complexos e condensados. O primeiro grupo consiste num núcleo de glicose ou outro poliol esterificado com o ácido gálico (também chamado tanino gálico) ou o com o ácido hexahidroxiidifênico (também chamado tanino elágico). A condensação oxidativa de 2 unidades galóil converte taninos gálicos em elágicos (**Figura 12**). Estes taninos são facilmente hidrolisáveis com ácidos, bases, aquecimento ou enzimas, produzindo álcool polihídrico e ácido fenilcarboxílico (RICE-EVANS *et al.*, 1996; CROFT, 1998; BRAVO, 1998).



**Figura 12** – A - Ácido gálico. B – Ácido hexahidroxiidifênico.

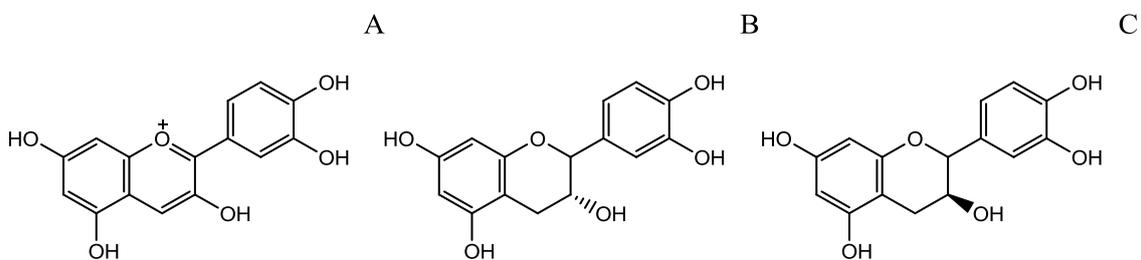
Os taninos complexos consistem em um flavan-3-ol ligado glicosidicamente a uma unidade de tanino gálico ou elágico. Eles são apenas parcialmente hidrolisáveis (COS *et al.*, 2003).

Os taninos condensados, ou proantocianidinas, são polímeros de alta massa molecular. As unidades monoméricas que os compõem são, em grande parte, os flavan-3-ol, sendo um flavan-3,4-diol seu precursor. A condensação oxidativa ocorre entre o carbono C-4 com o C-6 ou C-8 das unidades adjacentes (**Figura 13**). Eles não possuem em sua estrutura um grupo poliol ligado e não são imediatamente hidrolisáveis (BRAVO *et al.*, 1998; HERMANN *et al.*, 1994; FERREIRA, 2003).



**Figura 13** - Procianidina C<sub>1</sub>, um tanino condensado.

Os taninos condensados sob aquecimento em soluções alcoólicas (n-butanol) acidificadas (ácido clorídrico) se auto-oxidam produzindo pigmentos vermelhos de antocianidinas (**Figura 14**) e são, por isso, também denominadas proantocianidinas (PORTER *et al.*, 1986).



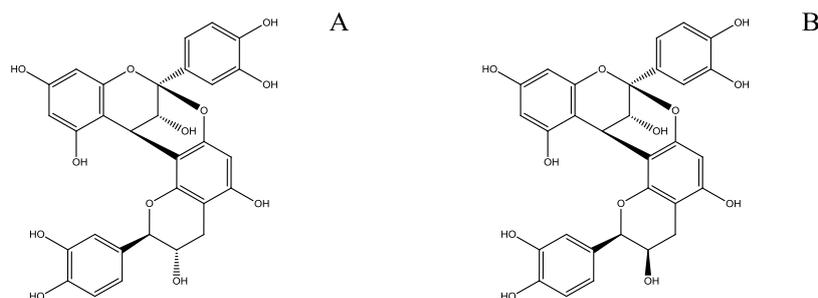
**Figura 14** – A - Cianidina (uma antocianidina). B - (-)-epicatequina. C - (+)-catequina.

Proantocianidinas são oligômeros de flavonóides, especialmente os flavan-3-ol: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina e (-)-epigalocatequina galato (BRAVO *et al.*, 1998; HERMANN *et al.*, 1995; KEALEY *et al.*, 1998; COS *et al.*, 2003). As ligações dos taninos condensados, ou proantocianidinas são ácido-lábeis, sua hidrólise ácida em meios alcoólicos produz antocianidinas. Se as subunidades monoméricas forem somente (+)-catequina e (-)-epicatequina, cianidina é o único produto resultante da hidrólise. Proantocianidinas são chamadas, então, de procianidinas (PORTER, L.J., 1989; WOLLGAST *et al.*, 2000; DIXON *et al.*, 2004; SCALBERT *et al.*, 2000).

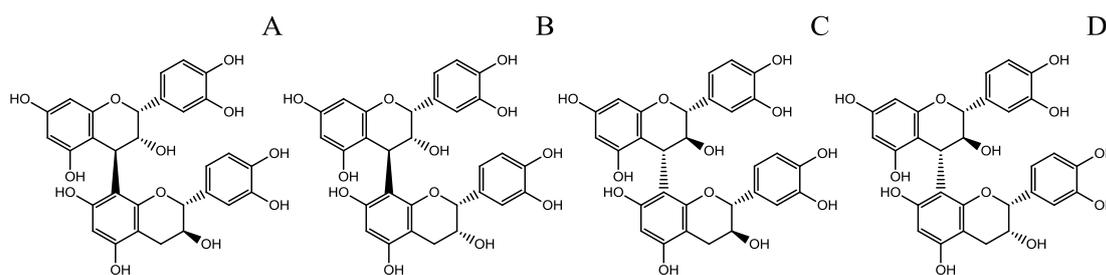
Taninos condensados são muito encontrados nas plantas superiores. Encontram-se como misturas complexas de polímeros compostos de 4 a 11 monômeros, associados aos flavan-3-ol que os compõem. Taninos hidrolisáveis e complexos, no entanto, tem baixa distribuição na natureza (HAMMERSTONE *et al.*, 2000; SCALBERT *et al.*, 2000; COS *et al.*, 2003).

Grande parte da literatura de taninos condensados refere-se apenas às proantocianidinas oligoméricas (dímeros, trímeros e tetrâmeros), devido à dificuldade de analisar moléculas com alto grau de polimerização. Proantocianidinas, no entanto, podem ocorrer num grau de polimerização de 50 ou mais. A falta de dados sobre a composição de taninos deve-se, ainda, à ausência de padrões comerciais, à distribuição irregular nos tecidos, e à variação sazonal e no processamento (COS *et al.*, 2003).

Proantocianidinas são classificadas de acordo com seu padrão de hidroxilação: procianidina (3,5,7,3',4'-OH), prodelfinidina (3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH), propelargonidina (3,5,7,4'-OH), profisetinidina (3,7,3',4'-OH), prorobinetidina (3,7,3',4',5'-OH), proguibourtinidina (3, 7, 4'-OH), proteracacinidina (3,7,8,4'-OH), promelacacinidina (3,7,8,3',4'-OH), entre outras (FERREIRA *et. al.*, 1996). As procianidinas, por sua vez, podem ser classificadas de acordo com o número de subunidades e modos de ligação: procianidina A (dímero com ligação entre C2 e C4 da unidade “superior” ao oxigênio em C7 e C6 ou C8, respectivamente, da unidade “inferior”), procianidina B (dímero com ligação entre C4 “superior” com C8 “inferior”), procianidina C (trímero), procianidina D (tetrâmero), entre outras. Cada subgrupo (**Figura 13, 15 e 16**) apresenta variações quanto à estereoquímica de suas ligações (FERREIRA *et. al.*, 1996; COOPER *et. al.*, 2008).



**Figura 15** – Procianidinas diméricas. A - Procianidina A1. B - Procianidina A2.



**Figura 16** – Procianidinas diméricas. A - B1. B - B2. C - B3. D - B4.

Proantocianidinas oligoméricas são solúveis em diferentes meios aquosos e orgânicos, o mesmo, no entanto, não é observado nos taninos condensados de alta massa molecular. Esta insolubilidade é fonte de erros na quantificação de polifenóis de plantas pois os extratos negligenciam a fração insolúvel (BRAVO *et al.*, 1998). Os estudos das proantocianidinas quantificaram o seu teor total por métodos colorimétricos e identificaram de dímeros até decâmeros pela utilização de CLAE, LCMS e UPLC-MS/MS (KEALEY *et al.*, 1998; ADAMSON *et al.*, 1999; LAZARUS *et al.*, 1999; HAMMERSTONE *et al.*, 1999; HAMMERSTONE *et al.*, 2000; ORTEGA *et al.*, 2008).

Os taninos condensados, de mesmo modo que os flavonóides, possuem diversas evidências de benefícios à saúde humana, a saber: analgésico, imunomodulador, propriedades hipocolesterolêmicas, modulador anti-inflamatório e plaquetário, anti-aterosclerótico, redutor da susceptibilidade de oxidação da LDL, bactericida e, por fim, anticancerígeno por ser antioxidante, antimutagênico e regulador da apoptose. Como desvantagem, afirma-se que os taninos reduzem a digestibilidade de proteínas e depletam micronutrientes como o zinco e o ferro (SCALBERT *et al.*, 1991; REED *et al.*, 1995; AERTS *et al.*, 1999; KARIN *et al.*, 2000; SMULIKOWSKA *et al.*, 2001; MATHUR *et al.*, 2002; SCHEWE *et al.*, 2001; SCHEWE *et al.*, 2002; MOINI *et al.*, 2002; COS *et al.*, 2003; DIXON *et al.*, 2004; ENGLER *et al.*, 2004; VINSON *et al.*, 2006; JALIL *et al.*, 2008; KENNY *et al.*, 2009).

### 1.2.3.1. Quantificação de proantocianidinas

O ensaio da vanilina é frequentemente usado para medições quantitativas de taninos condensados (ou seus componentes monoméricos). A maior vantagem deste método consiste em sua especificidade a uma estreita gama de flavanols e dihidrochalconas, que possuem uma ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxilas livres com orientação meta no anel B (SARKAR e HORWARTH, 1976). Ensaio baseado no poder redutor, como o Folin-Denis (BURNS, 1963) ou Azul da Prússia (PRICE e BUTLER, 1977), por outro lado, identificam indiscriminadamente qualquer fenol presente.

A quantificação do teor de taninos pela metodologia do butanol acidificado avalia a antocianidina, percebida pela coloração avermelhada, formada a partir das proantocianidinas do analito, seja moído ou o extrato deste. Esta reação ocorre por auto-oxidação, seguida de clivagem das ligações interflavonóide catalisada por ácido. A produção de antocianidina é grandemente afetada por traços de metais de transição, sendo os sais de  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  os melhores catalisadores. Estes íons metálicos aceleram a reação através da formação de radicais livres, normalmente *via* espécies de peróxido, tanto por etapas de oxidação como de redução (PORTER *et al.*, 1986).

O uso da temperatura, assim como o do íon metálico, não aumenta a intensidade da formação de antocianidinas da solução final, mas reduz grandemente o tempo reacional. Espera-se, no entanto, que a ligação do ferro metálico, por si só, cause um deslocamento batocrômico. Desse modo, a simples ligação deste íon já responde, ainda que sutilmente, pela formação da coloração vermelha (PORTER *et al.*, 1986).

A produção de antocianidina é influenciada pelo teor de água no meio reacional, corroborando o uso de meios orgânicos, como o metanol, na extração. O oxigênio atmosférico, por sua vez, contribui parcialmente na formação de antocianidina, pois existem três diferentes vias reacionais: autocatalítica (que não requer  $O_2$ ), auto-oxidação (requer  $O_2$ ) e por oxidação direta (requer íons metálicos ou *p*-benzoquinona) (PORTER *et al.*, 1986).

A luz atmosférica não influencia na formação de cor, porém a análise dos extratos deve ser feita logo na seqüência, pois diminui a formação das antocianidinas assim como a solubilidade em metanol, ao longo do tempo (PORTER *et al.*, 1986).

Os ensaios de avaliação do teor de taninos condensados, assim como o de fenólicos totais, estão vinculados à quantidade que se extraiu da matriz alimentar. Para

tal um solvente adequado é necessário e, ainda assim, as análises se prestam mais como um reflexo do conteúdo total de proantocianidinas entre as distintas amostras (AZIZAH *et al.*,1999).

Para uma análise qualitativa, faz-se necessário a separação e posterior quantificação dos oligômeros. A literatura propõe métodos de separação dos taninos extraídos, geralmente por cromatografia líquida de alta eficiência, e de sua posterior análise por espectrometria de massas (HAMMERSTONE *et.al.*, 2000; SÁNCHEZ-RABANEDA *et. al.*, 2003; ORTEGA *et. al.*, 2008).

### 1.3. Atividade inibitória de $\alpha$ -glicosidase e $\alpha$ -amilase

A  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase são importantes enzimas digestivas, que interferem na absorção da glicose. A presença deste açúcar no sangue é proveniente de carboidratos, como o amido, que são hidrolisados pelas duas principais enzimas digestivas:  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase. A  $\alpha$ -glicosidase, situada na membrana ciliada do intestino delgado, que promove a quebra do amido e da sacarose (clivagem de ligação  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6), liberando moléculas de glicose para serem absorvidas. Já a  $\alpha$ -amilase, presente na saliva e suco pancreático, é responsável por clivar ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de amilose, liberando dextrina, maltose e maltodextriose (BISCHOFF, 1994; MCCARTER e WITHERS, 1994).

Ainda no que diz respeito ao metabolismo sanguíneo, a hiperglicemia pós-prandial, quando ocorre com elevada recorrência, pode causar dano às células  $\beta$ . Estas células são responsáveis pela produção e liberação da insulina. O dano a estas células terá como consequência a diminuição progressiva da secreção deste hormônio (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

Diabetes mellitus consiste numa desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, resultando em deficiências na secreção de insulina, insensibilidade do receptor à produção endógena deste hormônio, ou ambos (WHO, 1999). Seu tratamento pode ser feito, no caso específico do tipo 2, pela diminuição da hiperglicemia pós-prandial. Para tal, retarda-se a absorção de glicose através da inibição das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase no trato digestivo. Tais enzimas hidrolisam o amido, liberando glicose, e com esta inibição, prolonga-se o tempo de digestão de carboidratos, reduzindo, assim, a proporção de glicose absorvida e, conseqüentemente, o aumento brusco de glicose pós-prandial no plasma (TOELLER, 1994).

O estresse oxidativo, gerado por breves episódios de hiperglicemia, acarreta dano celular, seguido de peroxidação lipídica e inativação de proteínas. Como consequência deste processo, temos complicações como retinopatia, nefropatia e neuropatia (AL-AZZAWIE e ALHAMDANI, 2006; ROLO e PALMEIRA, 2006).

Apesar de mecanismos não esclarecidos e poucos estudos relatados, as hipóteses salientam que a alta capacidade antioxidante de compostos fenólicos, principalmente dos flavonóides, também pode ser efetiva na redução do estresse oxidativo e progressão

da diabetes mellitus e hipertensão (SONG *et al.*, 2005; MATSUI *et al.* , 2001; KNOW *et al.*, 2006; APOSTOLIDIS *et al.* 2006). Além disso, os flavonóides encontrados em frutos poderiam também atuar inibindo diretamente as enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (GONÇALVES, 2008), diminuindo a glicemia pós prandial. Neste sentido, é de extremo interesse verificar se os compostos fenólicos presentes no cupuaçu apresentam capacidade inibitória das enzimas digestivas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi o de estudar a potencial qualidade do cupulate e da polpa de cupuaçu na alimentação e promoção da saúde humana. O consumo continuado de um alimento com maior teor de polifenólicos e, como consequência, com maior atividade antioxidante e, possivelmente, inibitória das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase apresentaria benefícios à saúde. Os objetivos específicos foram determinar:

- Os teores de compostos fenólicos (fenólicos totais, flavonóides e proantocianidinas);
- Os tipos de flavonóides e proantocianidinas;
- O teor de ácido ascórbico;
- A composição centesimal e a de ácidos graxos;
- A atividade antioxidante e inibitória das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase.

As amostras avaliadas foram:

- Polpas frescas de cupuaçu;
- Polpas congeladas comerciais de cupuaçu;
- Sementes de cupuaçu;
- Cupulate;
- Intermediários de produção do cupulate.

Para fins de comparação, também foram avaliados os teores de fenólicos totais e proantocianidinas e composição centesimal das seguintes amostras:

- Polpa fresca de cacau;
- Semente fresca de cacau;
- Chocolate.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

As amostras de cupuaçu foram obtidas do CEAGESP. O revendedor, Luma – Frutas exóticas, obteve esta fruta de um mesmo cultivar da Bahia. O cupuaçu foi comprado especificamente em três diferentes épocas do ano: fevereiro 2009 (verão), maio 2008 (outono), agosto 2008 (inverno). O mês de novembro (primavera) é uma época de entressafra para esta fruta. As amostras de cupuaçu, seus intermediários de produção, e de cacau foram produzidas junto à CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira com colaboração da Fazenda Riachuelo, Bahia.

O cupuaçu foi lavado, seco, aberto e teve sua polpa e sua semente separadas da casca, que foi descartada. Congelou-se imediatamente as amostras em nitrogênio líquido; a polpa foi, então, separada da semente. A polpa e a semente foram liofilizadas, trituradas em nitrogênio líquido em graal com pistilo, homogeneizadas em moinho analítico refrigerado (modelo A10 S2, IKA Works inc., Wilmington, NC) e, posteriormente, armazenadas a -20 °C (freezer) até o momento da análise.

O cupulate e seus derivados (semente seca, torrada e amêndoas) não receberam este tratamento, devido à sua baixa umidade. Estas amostras foram trituradas em nitrogênio líquido em graal com pistilo, homogeneizadas em moinho analítico refrigerado (modelo A10 S2, IKA Works inc., Wilmington, NC) e, posteriormente, armazenadas a -20 °C até o momento da análise. Todos os reagentes foram de grau analítico ou grau CLAE.

#### **3.2. Equipamentos**

##### **3.2.1 Equipamentos utilizados na produção de cupulate/chocolate**

- Torradora Circular, Jafinox.
- Descascador de 5 plataformas, Jafinox.
- Moinho de Facas, Jafinox.
- Refinador de 5 rolos, Jafinox.
- Concha de chocolate automática, Jafinox.
- Temperadeira seca de três estágios, Jafinox

### 3.2.2. Equipamentos utilizados nas análises

- Estufa (Fanem, 315 SE).
- Mufla (Quimis).
- Aparelho digestor (Gerhardt, Kjeldahltherm).
- Espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech).
- Cromatógrafo a gás GC 17 A Shimadzu/ Class GC 10 equipado com detector de ionização de chama, equipado com uma coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m x 0,25 mm. de d.i. x 0,25 µm de filme, utilizando Hélio como gás de arraste (1 ml/min) e 1/200 como razão de divisão da amostra no injetor – Análise de ácidos graxos.
- Ultra-Turrax (Polytron®- Kinematica GnbH, Kriens-Luzern).
- Rota-evaporador (RE 120 – Büchi).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Hewlett Packard série 1100, equipado com detector com arranjo de diodo (DAD). Coluna prodigy 5 µ ODS(3) 250 x 4,60 mm (Phenomemex Ltd, Reino Unido) – Quantificação de flavonóides.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo Prominence (Shimadzu, Japão). A coluna utilizada foi uma coluna prodigy 5 µ ODS(3) 250 x 4,60 mm (Phenomemex Ltd, Reino Unido) – Identificação de flavonóides.
- Espectrômetro de massas tipo ion trap, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha). “Electrospray” no modo negativo, com 3000 volts de voltagem capilar, 6 L/min de gás secante a 300°C, nebulizador a 40 psi, split de 1:5 e varredura de massas de 100 a 1200 m/z – Identificação de flavonóides.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo Prominence (Shimadzu, Japão). Coluna PEG Discovery (Supelco) 50 x 2.0 mm. – Identificação de taninos.
- Espectrômetro de massas tipo ion trap, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha). “Electrospray” no modo negativo, com três mil volts de voltagem capilar, 6 L/min de gás secante a 300°C, nebulizador a 40 psi, split de 1:5. e varredura de massas de 100 a 1800 m/z – Identificação de taninos.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Hewlett Packard série 1100, equipado com detector com arranjo de diodo (DAD). Coluna 150 mm x 3.6 mm i.d., HP®, NucleoSil 100C18 – Determinação de ácido ascórbico.
- Espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules).
- Espectrofotômetro de fluorescência F-3010 (HITACHI, Japão).

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Amostragem**

Os frutos cupuaçu de cada época foram obtidos em triplicata, suas polpas e sementes congeladas, liofilizadas e, então, homogeneizadas.

As amostras de cupulate e seus intermediários, em virtude de serem produzidas em escala piloto para os fins deste trabalho, não permitiram uma amostragem em triplicata de lotes.

#### **3.3.2. Produção do cupulate e chocolate**

A produção do cupulate e do chocolate foi realizada com o auxílio da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) nas dependências da planta piloto da Fazenda Riachuelo. A metodologia usada foi a de MORORÓ (2007).

Vinte quilos de sementes de cupuaçu, para o cupulate, e de cacau, para o chocolate, foram postas para fermentar em cochos de madeira recobertos por folhagens diversas. Por dois dias as sementes foram deixadas em descanso, permitindo fermentação em condições anaeróbicas. A partir do terceiro dia até o sétimo, transferiu-se o produto de cocho em cocho, uma vez ao dia, revolvendo-o para permitir aeração e uniformidade de aquecimento. Após a fermentação, as sementes de cupuaçu/cacau foram submetidas a secagem ao sol em terraços apropriados, até reduzirem sua umidade para cerca de 5-10%.

Fez-se uma seleção das sementes de cupuaçu/cacau, procurando retirar as que estavam murchas e germinadas. As sementes de cupuaçu selecionadas foram, então, forneadas por volta de 1 hora e 40 minutos a 120 °C em uma torradora com pás de agitação. A torrefação foi por tempo suficiente para atingir de 1 - 2 % de umidade.

As sementes, após serem resfriadas até aproximadamente 50 °C, foram descascadas (Descascador de 5 plataformas, Jafinox). As amêndoas obtidas passaram por um novo processo de seleção, visando à retirada de cascas que ainda estavam presentes.

As amêndoas foram trituradas por um moinho de facas por dois minutos, formando uma pasta denominada líquor. A ela foram adicionados 13 Kg de açúcar e 2,3 Kg de leite em pó, e triturou-se por mais dois minutos. Imediatamente, o líquor passou por um refinador em duas seções de duas horas. Este procedimento foi continuado até o

pó formado ter uma granulidade menor de 15 µm, o que torna a textura mais palatável.

O líquido obtido foi posto em uma concheadeira e adicionado de 1,5 Kg de manteiga de cupuaçu, para a produção de cupulate; e da manteiga de cacau, para a produção de chocolate. Esta manteiga de cacau foi extraída de parte das amêndoas obtidas, aplicando-se uma pressão de, aproximadamente, 300 Kg/cm<sup>2</sup>; com o auxílio de um prensa hidráulica manual, exsudou-se esse óleo, que, por sua vez, foi acondicionado e então ressolubilizado por aquecimento (90 °C) no momento de uso. Este processo durou 24 horas.

Terminadas as 24 horas iniciais do concheamento, adicionou-se ao líquido mais 1,5 Kg de manteiga de cupuaçu/cacau e 190 g de lecitina. E um novo processo de concheamento foi feito por mais uma hora. Este procedimento diminui o sabor azedo do produto através da liberação dos ácidos voláteis, sendo que um maior tempo de concheamento torna desnecessária a etapa de alcalinização. Todo o processo ocorre a uma temperatura de 58 °C, e resulta no cupulate/chocolate.

Por fim, o produto foi transferido para uma temperadeira onde permaneceu em movimento a 42 °C por 15 minutos. A temperatura foi reduzida para 28 °C e, então, o chocolate começou a ser enformado. As formas foram acondicionadas em geladeira (4-8 °C) por 30 minutos, período após o qual o chocolate foi retirado. Este acondicionamento formou microcristais, atribuindo dureza e brilho adequado.

A formulação do cupulate e do chocolate foi a de um produto meio amargo e consistiu em:

20 Kg	Amêndoas de cupulate/chocolate
3 Kg	Manteiga de cupuaçu/cacau
13 Kg	Açúcar
2,3 Kg	Leite em pó
0,19 Kg	Lecitina

As etapas analisadas do processo produtivo do cupulate foram: Semente fresca, semente fermentada (e seca), semente torrada (e selecionadas), líquido e cupulate. O chocolate de cacau foi produzido para servir de comparação com o cupulate.

### **3.3.3. Composição centesimal**

#### **3.3.3.1. Determinação de umidade**

Pesou-se 3 g de amostra, que foram secas em estufa a 105 °C até o seu peso permanecer constante. O percentual de umidade foi calculado pela diferença do peso final em relação ao inicial (AOAC, 2005).

#### **3.3.3.2. Determinação de cinzas**

Aqueceu-se cadinhos de porcelana em mufla a 600°C por uma hora. Registrou-se o peso inicial dos cadinhos secos. Dois gramas da amostra foram adicionadas a este recipiente e então foi deixado por duas horas na mufla, em mesmas condições. Os cadinhos foram retirados da mufla e foram postos para resfriar em dessecador. Umedeceu-se as amostras com álcool absoluto. Os cadinhos tornaram à mufla por mais duas horas. Novamente, as amostras foram retiradas da mufla e resfriaram em dessecador. O peso final foi registrado; a quantidade de cinzas foi calculado pela diferença entre a massa inicial e a final; o percentual se deu pela razão desta diferença com o peso inicial da amostra, multiplicado por 100 (AOAC, 2005).

#### **3.3.3.3. Determinação de proteínas**

A determinação de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl (CHANG, 1998; AOAC, 1980) utilizando o fator de 6,25, próprio para produtos de cacau (AOAC, 2005).

#### **3.3.3.4. Determinação de lipídios**

Esta determinação foi feita segundo o método de Soxhlet (AOAC, 2005). Dois gramas de amostra foram postas dentro de cartuchos feitos de papel filtro e algodão. Uma vez fechado os cartuchos, eles foram colocados dentro do vidro intermediário do Soxhlet. O balão do Soxhlet foi previamente secado em estufa a 105 °C por 1 hora e seu peso, anotado; este foi, então, encaixado no intermediário. Éter etílico foi adicionado em quantidade suficiente para permitir o sifonamento do mesmo. Os balões foram aquecidos em manta de aquecimento e a parte superior do intermediário foi conectada a

um destilador. O gotejamento foi uniforme e ocorreu por 8 horas. Os cartuchos foram retirados do intermediário para então permitir mais um sifonamento, este último para limpar o intermediário. Secaram-se as amostras até resultar somente os lipídios, mas antes que estes começassem a escurecer. Os balões foram postos para secar em estufa a 105 °C por uma hora, e então pesados. A quantidade de lipídios foi calculada pela diferença entre a massa final e a massa do balão; o percentual se deu pela razão desta diferença com o peso inicial da amostra, multiplicado por 100 (AOAC, 2005).

### **3.3.3.5. Determinação de carboidratos**

Esta determinação foi feita segundo o método colorimétrico de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Adicionou-se 1 mL de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado a 1 mL da suspensão em água da amostra. Foi efetuada a leitura da absorbância a 490 nm e o valor comparado com uma curva padrão de glicose (0,1 mg/mL). Calculou-se o percentual de açúcares (com grupos redutores ou potencialmente redutores) em relação à massa total adicionada à suspensão.

### **3.3.4. Análise de ácidos graxos**

A análise de ácidos graxos foi feita segundo o método da AOAC (2002). Gordura e ácidos graxos foram extraídos do alimento por métodos hidrolíticos (hidrólise ácida). Ácido pirogálico foi adicionado para minimizar a degradação oxidativa dos ácidos graxos durante as análises. Triglicerídeo tritridecanoína foi adicionado como padrão interno. A gordura foi extraída em éter, metilada para ésteres metílicos de ácidos graxos usando BF<sub>3</sub> em metanol.

#### **3.3.4.1. Extração de Gordura**

As amostras de semente fresca e do líquido de cupuaçu foram moídas finamente e homogenizadas com almofariz e pistilo. Pesou-se uma porção da amostra contendo 50-100 mg de gordura no tubo de ensaio. Adicionou-se, aproximadamente, 50 mg de ácido pirogálico, 1 ml de uma solução de tritridecanoína (triglicerídeo C13:0, usado como padrão interno) 5 mg/mL em clorofórmio, pérolas de vidro e 1 ml de etanol 95%. Misturou-se até que toda amostra estivesse em contato com o solvente. Adicionou-se 5

ml de HCl 8,3 M e misturou-se bem. O tubo foi levado ao shaker 70 - 80°C, com agitação moderada, por 40 min. Foi utilizado o Vortex a cada 10 min. Após este procedimento, esperou-se esfriar até atingir a temperatura ambiente. Adicionou-se 12 mL de éter etílico, tampou-se o frasco e agitou-se por 1 min. Adicionou-se, então, 12 mL de éter de petróleo, tampou-se e agitou-se por mais 1 min. Centrifugou-se a 600 g por 5 min até a fase superior estar clara. Transferiu-se o éter (fase superior) para um tubo de ensaio de rosca (30 mL / pyrex 9826).

#### **3.3.4.2. Metilação (BF<sub>3</sub>)**

Evaporou-se o éter lentamente em banho termostático (com temperatura menor que 40°C), usando gás nitrogênio. Adicionou-se 1 ml de reagente trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>) 7% em metanol e 1 ml de tolueno. Tampou-se o tubo e aqueceu-o a 100 °C por 45 min. Agitou-se suavemente a cada 10 min. Esperou-se, então, esfriar a temperatura ambiente. Adicionou-se 2,5 ml de água, 1 ml de hexano e, aproximadamente, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tampou-se o frasco e agitou-se por 1 min. Permitiu-se a separação das fases e então, cuidadosamente, transferiu-se a fase superior para o vial do auto-injetor contendo pequena quantidade de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro.

#### **3.3.4.3. Cromatografia a gás**

Foi empregado um cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama, equipado com uma coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m x 0,25 mm. de d.i. x 0,25 µm de filme, utilizando Hélio como gás de arraste (1 ml/min) e 1/200 como razão de divisão da amostra no injetor.

A condição cromatográfica foi isotérmica a 140°C por 5 min. e então aquecimento a 4°C/min. até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 20 min. A temperatura do injetor foi de 250°C e no detector foi de 260°C. O tempo total de análise foi 50 min.

#### **3.3.4.4. Quantificação de ácidos graxos e da % de gordura**

Após injetados os compostos no cromatógrafo a gás, obteve-se a área de cada banda referente a um ácido graxo. O fator de conversão de triacilglicerol para ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) para o triglicerídeo C13:0, usado como padrão interno, foi de 1,0059. O percentual dos ácidos graxos foi calculado pela área do banda do ácido graxo em relação à área total de todos os ácidos graxos. O percentual de gordura foi calculado como uma somatória das massas de triacilgliceróis saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, divididos pela massa da amostra e expressos como triglicerídeos equivalentes.

#### **3.3.5. Análise de flavonóides**

##### **3.3.5.1. Extração de flavonóides**

A extração foi realizada segundo ARABBI *et al.* (2004) com adaptações. As amostras foram extraídas com metanol 70 % (armazenado em freezer) na proporção de 1:200 (m/v), através da utilização do Ultra-Turrax, por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. Os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes. Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador em temperaturas de banho de 40 °C (até aproximadamente 20 mL). As amostras concentradas, já sem metanol, tiveram o seu volume ajustado com adição de água em um balão volumétrico de 25 mL. Uma alíquota de 10 mL (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Marcherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 40 mL de metanol seguido de 40 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado manifold Visiprep 24DL da Supelco. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1mL de metanol (grau cromatográfico) e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação dos flavonóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### 3.3.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a quantificação dos flavonóides, estes foram separados por uma coluna prodigy 5  $\mu$  ODS(3) 250 x 4,60 mm, de acordo com ARABBI *et al.* (2004). Foi utilizado um gradiente de solventes constituído por: (A) Água : Tetraidrofurano : Ácido trifluoroacético (97,9 : 2 : 0,1) e (B) Acetonitrila. A proporção do solvente B foi alterando nas seguintes proporções: 15 % do início até 2 minutos, ascensão a 25 % em 5 minutos, a 35 % em 8 minutos, a 50 % em 5 minutos, a 90 % em 5 minutos, manteve-se esta concentração por mais 5 minutos e retorno às condições iniciais (15 %) em 5 minutos. O fluxo usado foi de 1 mL/ minuto a 25 °C. Para limpeza da coluna, foi alterada a porcentagem inicial do solvente B para 90 % e, a seguir, re-equilibrada nas condições iniciais por 10 minutos. A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção, dos espectros de absorção do UV e de adição de padrões às amostras (*spiking*): Catequina, Epicatequina, Orientina, Homorientina, Vitexina, Isovitexina, Rutina, Quercetina, Caempferol, Scutelarina, Cianidina, Ácido Protocatecuico e Caféico. As curvas de calibração foram feitas com os compostos acima no mesmo método usado para a análise das amostras. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra, em base seca. A procianidina dimérica e a trimérica foram quantificadas como equivalentes de catequina; a quercetina glucuronídeo foi quantificada como quercetina rutinosídeo (rutina); a luteolina glucuronídeo, a isorhamnetina e as theograndina I, II e III foram quantificadas como equivalentes de homorientina.

### 3.3.5.3. Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LCMS/MS)

A identificação dos flavonóides por LCMS/MS foi realizada conforme descrito por SÁNCHEZ-RABANEDA *et al.* (2003), com modificações. A análise foi feita em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas do tipo “iontrap”, “electrospray” no modo negativo. A coluna utilizada foi uma coluna prodigy 5  $\mu$  ODS(3) 250 x 4,60 mm. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e a eluição dos compostos monitorada por UV a 270 nm. Os solventes utilizados foram água com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). O solvente B, na avaliação da fração metanol, foi alterado nas seguintes proporções: 15 % do início até 2 minutos, ascensão a 25 % em 5 minutos, a 35 % em 8 minutos, a 50 % em 5 minutos, a 90 % em 5 minutos, manteve-se esta concentração por mais 5 minutos e retorno às condições iniciais (15 %) em 5

minutos. Já na avaliação da fração metanol – amônia, o solvente B foi alterando nas seguintes proporções: 15 % do início até 2 minutos, ascensão a 20 % em 5 minutos, a 25 % em 8 minutos, a 50 % em 15 minutos, a 90 % em 5 minutos, manteve-se esta concentração por mais 5 minutos e retorno às condições iniciais (15 %) em 5 minutos.

### **3.3.6. Determinação do ácido ascórbico (vitamina C)**

As análises do ácido ascórbico e do Desidroascórbico foram realizadas segundo PASTERNAK *et al.* (2005). As amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido foram homogenizadas com solução de ácido metafosfórico a 6 % (m/v), em proporção 1:2 ou 1:5 dependendo do fruto. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45 µm, e diluído 1 vez com ácido metafosfórico para a análise do ácido ascórbico e com ditiotreitol 0,5 M para análise da vitamina C total. O conteúdo de ácido desidroascórbico foi obtido pela diferença entre o conteúdo de vitamina C total e de ácido ascórbico. As amostras foram analisadas em CLAE utilizando coluna 150 mm x 3.6 mm i.d., HP®, NucleoSil 100C18, fase móvel composta por tampão cloreto de potássio 2 mM, pH 2,5 corrigido com ácido ortofosfórico, fluxo de 0,8mL/minuto. A curva padrão foi feita com padrões de ácido ascórbico de concentrações entre 10 e 100 µg/mL. A detecção foi realizada por UV a 254 nm. Os resultados foram expressos em mg/100 g de amostra, em base seca.

### **3.3.7. Determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro***

#### **3.3.7.1. Extração**

A extração foi realizada em duplicata homogeneizando-se cerca de 0,5 g de amostra liofilizada em 20 mL de metanol/água na proporção de 70:30, utilizando-se Ultra-Turrax, por um minuto em velocidade 4 e banho de gelo. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar.

### 3.3.7.2. Redução do reagente de Folin-Ciocalteu (Fenólicos Totais)

Este ensaio foi realizado de acordo com SINGLETON *et al.* (1999), modificado por GENOVESE *et al.* (2003). Utilizou-se 0,25 mL dos extratos obtidos em 3.2.7.1., adicionou-se a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37 °C durante 30 minutos para desenvolvimento de cor e posterior medição da absorbância.

A absorção da luz a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro e o conteúdo de fenólicos totais calculado utilizando-se curva-padrão de catequina (Sigma chemical Co., St. Louis, EUA). Os resultados obtidos foram expressos como mg equivalente de catequina / g de amostra, em base seca.

### 3.3.7.3. Seqüestro de radicais livres (DPPH)

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, método proposto por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (0,05 mM) de forma a apresentar aproximadamente 0,4 de absorbância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 250 µL da solução de DPPH•, 50 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos quando necessário. Foram efetuadas leituras de absorbância a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca a 25 °C. O cálculo foi efetuado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoramento do DPPH} = \frac{A_{517(C)} - A_{517(A)}}{A_{517(C)}} \times 100$$

na qual,  $A_{517(C)}$  refere-se à absorvância do controle a 517 nm e  $A_{517(A)}$  refere-se à absorvância da amostra a 517 nm. A curva padrão foi preparada com uma solução de Trolox em diferentes concentrações para a determinação de suas respectivas porcentagens de descolorimento. Os resultados foram expressos em  $\mu$ moles equivalentes de Trolox/g amostra, em base seca.

#### 3.3.7.4. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Utilizou-se a metodologia descrita por D'ÁVALOS e colaboradores (2004), adaptada para leitura em cubetas individuais. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4 e o volume final da mistura será de 2 mL. Neste ensaio, 200  $\mu$ L de amostra foram misturados a 1200  $\mu$ L de uma solução de fluoresceína (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) a 70 nM e incubados a uma temperatura constante de 37 °C por 15 minutos antes da adição de 600  $\mu$ L da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH, Wako Chemicals Inc., Richmond, EUA) a 24 mM, que dá início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nm<sub>ex</sub>/525 nm<sub>em</sub>) foi verificada a cada 10 minutos durante 80 minutos em cubeta de quartzo. O tampão fosfato também foi usado para zerar o equipamento. Como controle da reação, adicionou-se 200  $\mu$ L de metanol à solução de fluoresceína (HUANG *et al.*, 2005; OU *et al.*, 2001).

O cálculo da perda de fluorescência da fluoresceína, ou área sob a curva (ASC), foi efetuado com auxílio da seguinte fórmula:

$$ASC = 1 + f_1/f_0 + \dots f_i/f_0 + \dots + f_{80}/f_0$$

na qual  $f_0$  representa a fluorescência obtida no tempo 0 e  $f_i$  a fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 0 e 80 minutos.

Os resultados foram expressos em  $\mu$ moles equivalentes de trolox, utilizando-se curva padrão de trolox, realizada a cada ensaio, nas concentrações de 0,4 a 4,8  $\mu$ M. A determinação de fluoresceína foi realizada utilizando-se espectrofotômetro de fluorescência.

Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores foram expressos em  $\mu$ moles equivalentes de Trolox/g de amostra, em base seca.

### **3.3.8. Determinação da atividade inibitória da $\alpha$ -glicosidase**

#### **3.3.8.1. Extração**

Os extratos obtidos por 3.2.7.1. foram rotaevaporados até secagem completa. Em seguida, o resíduo obtido foi ressuspensionado em água destilada e seu volume foi ajustado para 10 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de 5 mL deste extrato aquoso (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel). A coluna foi então lavada com 20 mL de água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com 20 mL de metanol e 20 mL metanol:amônia (99,5:0,5). Novamente, as frações eluídas de metanol e metanol:amônia foram unidas e rotaevaporadas até secagem completa, e ressuspensionadas em 10 mL de metanol.

#### **3.3.8.2. Inibição de $\alpha$ -glicosidase**

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por WATANABE *et al.* (1997), com algumas modificações realizadas por KIM *et al.* (2000), e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de glicose, liberada na quebra do substrato pela enzima. A enzima  $\alpha$ -glicosidase (EC 3.2.1.20, tipo I, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) - 0.7 U / 10  $\mu$ g/mL - isolada de fungo, foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) contendo 2 g/L de albumina bovina sérica (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 0,2 g/L de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ). O substrato utilizado na reação foi o p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo, também dissolvido em tampão fosfato pH 7,0. Para o ensaio a 100  $\mu$ L da solução enzimática foram adicionados 20  $\mu$ L de extrato em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), e incubados por 5 minutos a 37 °C. Após incubação, foram adicionados 100  $\mu$ L de substrato e, novamente, incubou-se por mais 5 minutos a 37 °C. Foram efetuadas leituras de absorbância a 405 nm no tempo 0 e após 10 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca a 37 °C. Os extratos foram diluídos em várias proporções (1/2, 1/3, 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40) em cada análise realizada, de modo a obter-se linearidade em relação à porcentagem de inibição da amostra.

Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{405(C)} - A_{405(A)}}{A_{405(C)}} \times 100$$

na qual,  $A_{405(C)}$  refere-se à absorbância do controle a 405 nm e  $A_{405(A)}$  refere-se à absorbância da amostra a 405 nm.

Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{g}$  de amostra em base seca / mL do meio de reação necessário para inibir 50 % da produção de glicose, ou IC 50.

### **3.3.9. Determinação da atividade inibitória de $\alpha$ -amilase**

#### **3.3.9.1. Extração**

Os extratos obtidos por 3.2.7.1. foram rotaevaporados até secagem completa. Em seguida, o resíduo obtido foi ressuscitado em água destilada e seu volume foi ajustado para 10 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de 5 mL deste extrato aquoso (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel). A coluna foi então lavada com 20 mL de água, e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com 20 mL de metanol e 20 mL metanol:amônia (99,5:0,5). Novamente, as frações eluídas de metanol e metanol:amônia foram unidas e rotaevaporadas até secagem completa, e ressuscitadas em 10 mL de metanol.

#### **3.3.9.2. Inibição da $\alpha$ -amilase**

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por ALI *et al.* (2006), e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de maltose pela ação da enzima  $\alpha$ -amilase sobre o amido. Para tanto, foi preparada uma solução 0,5 mg/mL da enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI-A, Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) dissolvida em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,9). O substrato utilizado na reação foi amido de batata 0,5 % (m/v), também dissolvido em tampão fosfato 0,2 M após breve aquecimento. Neste ensaio, 40  $\mu\text{L}$  do extrato, 160  $\mu\text{L}$  de água destilada e 200  $\mu\text{L}$  de solução enzimática foram adicionados a um tubo de ensaio e incubados a 25  $^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 400  $\mu\text{L}$  da solução de amido 0,5 %. Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da solução foi retirada em intervalos de tempo diferentes (0, 1, 2 e 3 minutos) e adicionada a outro tubo de ensaio, contendo 100  $\mu\text{L}$  de

solução de DNS (96 mM - ácido 3,5-dinitrosalicílico) e levada diretamente para o banho a 85 °C. Após 15 minutos, a mistura foi retirada do banho e diluída com 900 µL de água destilada. A atividade de α-amilase foi determinada pela leitura a 540 nm em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), utilizando-se espectrofotômetro de microplaca. O controle positivo da reação representa 100 % da atividade enzimática e foi conduzido da mesma forma, usando 40 µL de metanol ao invés de extrato. Para o branco da reação, a solução enzimática foi substituída por água destilada, e o procedimento foi realizado da mesma forma como descrito acima. No tempo 0, as amostras foram adicionadas à solução de DNS imediatamente após a adição de enzimas.

A produção de maltose foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Produção de maltose} = A_{540} \text{ extrato ou controle} - A_{540} \text{ branco}$$

no qual,  $A_{540}$  representa a absorbância referente à produção de maltose do controle ou do extrato. Através da absorbância de maltose produzida, pode-se calcular a porcentagem de maltose (massa/volume) gerada pela equação da reta obtida na curva padrão de glicose (0 - 1 mg/mL).

A porcentagem de inibição de formação de maltose foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - [(\% \text{ maltose produzida pelo extrato no tempo 3 minutos} / \% \text{ maltose produzida pelo controle no tempo 3 minutos}) \times 100]$$

Os resultados obtidos foram expressos em µg de amostra em base seca / mL do meio de reação necessário para inibir em 50 % a formação de maltose.

### **3.3.10. Quantificação das proantocianidinas**

#### **3.3.10.1. Extração**

A extração foi realizada em triplicata homogeneizando-se cerca de 0,5 g de amostra liofilizada em 20 mL dos meios de extração descritos a seguir, utilizando-se

Ultra-Turrax por um minuto em velocidade 4 e banho de gelo. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar.

### **3.3.10.2. Método da vanilina**

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por BURNS (1971) com aprimoramentos por PRICE (1978), e quantifica as proantocianidinas através da vanilina.

As análises foram feitas em dois meios de extração: metanol puro, indicado por AZIZAH *et al.* (1999) como o melhor solvente para extração de polifenóis do cacau, e metanol acidificado (metanol:ácido acético = 99:1), conforme empregado por COELHO (1987) para extrair taninos de semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Desse modo, pode-se comparar o melhor meio de extração.

Os extratos e reagentes foram postos em banho-maria a 30 °C. Quando estes atingiram a temperatura do banho, preparou-se tubos de ensaio contendo 1 mL da amostra e 5 mL de solução 1 % de vanilina e 4 % de HCl em metanol; o branco foi feito adicionando 1 mL de amostra e 5 mL de solução 4 % de HCl em metanol. De mesmo modo, foi preparado uma curva padrão, variando de 0 a 2 mg/mL de catequina. As amostras foram deixadas em banho a 30 °C por 20 minutos; então, após leve agitação, tiveram sua absorvância medida em espectrofotômetro a 500 nm em cubeta de vidro de caminho ótico de 1 cm.

A quantidade de proantocianidinas é calculada com base na curva e é expressa em miligramas de catequina por 100 gramas de amostra em base seca.

### **3.3.10.3. Método do butanol acidificado**

Este ensaio foi adaptado do método cromogênico descrito por PORTER *et al.* (1986), e quantifica as proantocianidinas através do butanol acidificado. As análises foram feitas em extrato de metanol (metanol:ácido acético = 99:1), conforme empregado por COELHO (1987), e no analito finamente moído.

Preparou-se uma solução de n-butanol e ácido clorídrico concentrado na proporção de 3 para 2. Foi adicionado 77 mg de sulfato de ferro hidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a meio litro do butanol acidificado. Adicionou-se 2,5 mL desta solução a

250 µL do extrato devidamente diluído em um tubo de ensaio. De mesmo modo, foi preparada uma curva padrão, variando de 0 a 2,4 mg/mL de catequina. Os tubos foram tampados e deixados em banho 95°C por 15 minutos; então, após leve agitação, tiveram sua absorvância medida em espectrofotômetro a 540 nm em cubeta de vidro de caminho ótico de 1 cm.

A quantidade de proantocianidinas foi calculada com base na curva padrão e foi expressa em miligramas equivalentes de tanino quebracho por 100 gramas de amostra em base seca.

### **3.3.11. Identificação de proantocianidinas**

#### **3.3.11.1. Extração**

A extração foi realizada homogeneizando-se cerca de 1 g de amostra liofilizada em 200 mL de metanol : ácido clorídrico (99:1), utilizando-se Ultra-Turrax por um minuto em velocidade 4 e banho de gelo. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6, seu pH foi corrigido para 7 com hidróxido de sódio, rotaevaporado, ressuspendido a 1mL (aproximadamente 4% do volume da coluna descrita a seguir) e armazenado em frascos de vidro âmbar.

#### **3.3.11.2. Purificação em LH20**

A purificação em LH20 foi adaptada a partir da metodologia de COELHO (1987). Uma coluna de cromatografia líquida de 13 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro foi adequadamente preenchida com resina LH20. O extrato foi aplicado na coluna e o fluxo utilizado foi de 0,1 mL/min. O primeiro solvente empregado foi álcool etílico 95 %. Manteve-se o uso deste solvente até que a absorvância a 280 nm foi nula, esta etapa durou por volta de doze horas. Após esta purificação, os taninos foram eluídos da coluna com acetona : água (1:1) e monitorados em espectrofotômetro a 540 nm. A eluição se encerrou quando a absorvância neste comprimento de onda se aproxima de zero, o que demorou por volta de três horas. Após secagem completa através de rotaevaporação, a fração acetona : água foi ressuspendida em 1mL de

metanol (grau cromatográfico) e filtrada utilizando-se filtro de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro.

### **3.3.11.3. Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LCMS/MS)**

A identificação das proantocianidinas por LCMS/MS foi adaptada da metodologia de SASAKI, *et al.* (2009). A análise foi feita em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas tipo “ion trap”, “electrospray” no modo negativo. A coluna utilizada foi uma PEG Discovery (Supelco) 50 x 2.0 mm. O fluxo utilizado foi de 0.25 mL/min e a eluição dos compostos monitorada por UV a 280 nm. Os solventes utilizados foram água com 10 mM de acetato de amônio e 0,1 % de ácido fórmico (A) e metanol (B). A composição deste foi de 15 % de B no início, ascendeu a 25 % em três minutos, a 80 % em mais doze minutos, a 90 % em mais dois minutos, decresceu a 15 % em um minuto e manteve esta concentração por mais três minutos.

### **3.4. Análise dos resultados**

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos na forma de média e desvio padrão. A comparação das médias foi realizada por ANOVA ( $p < 0,05$ ) e LSD (least significant difference). A análise das médias dos teores de ácidos graxos foi feita pelo teste T para amostras dependentes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Composição centesimal

As amostras frescas de cupuaçu, polpa e semente, apresentaram certa regularidade ao longo do ano quanto à sua composição centesimal (**Tabela 1**). Os percentuais das polpas frescas somente apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre si quanto ao teor de cinzas. Adicionalmente, o teor protéico da polpa fresca de agosto de 2008 diferiu-se dos demais. Já os percentuais das sementes frescas apresentaram regularidade estatística, com exceção do teor de proteínas, que diferiu entre as três amostras. O teor de cinzas da semente de fevereiro de 2009, o teor de lipídios da semente de agosto de 2008 e os teores de carboidratos das sementes também apresentaram diferenças estatísticas em relação ao teor das demais amostras. Apesar destas diferenças, de modo geral o fruto cupuaçu apresentou regularidade ao longo do ano. Esta constância é esperada para um fruto cuja colheita se dá somente através daqueles que já se desprenderam naturalmente de seus galhos e que, portanto, estão no mesmo estado de maturação. A constância da composição e dos aspectos físico-químicos da matéria prima favorece uma possível industrialização deste fruto, seja como polpa congelada, sobremesa, manteiga de cacau, cosmético, ou como cupulate.

**Tabela 1** - Composição centesimal das polpas e sementes de cupuaçu e das suas polpas comerciais (%).

Amostra	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
Polpa Maio/08	83 ± 1 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,7 <sup>a</sup>
Polpa Ago/08	82 ± 3 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,04 <sup>b</sup>	10,2 ± 0,6 <sup>a</sup>
Polpa Fev/09	83,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	11 ± 1 <sup>a</sup>
Semente Maio/08	52,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,02 <sup>d</sup>	22 ± 1 <sup>cd</sup>	4,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	13,6 ± 0,9 <sup>b</sup>
Semente Ago/08	52 ± 1 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,01 <sup>d</sup>	21 ± 1 <sup>c</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>d</sup>	16 ± 1 <sup>c</sup>
Semente Fev/09	52,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>e</sup>	22 ± 1 <sup>d</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>e</sup>	17,9 ± 0,6 <sup>d</sup>
Polpa comercial A	90 ± 1 <sup>c</sup>	0,46 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,99 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,68 ± 0,04 <sup>b</sup>	5,4 ± 0,1 <sup>e</sup>
Polpa comercial B	89 ± 1 <sup>c</sup>	0,46 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,97 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,68 ± 0,03 <sup>b</sup>	6,3 ± 0,6 <sup>e</sup>
Polpa comercial C	90 ± 1 <sup>c</sup>	0,47 ± 0,02 <sup>f</sup>	0,95 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,03 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,3 <sup>e</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os percentuais das polpas frescas diferiram-se estatisticamente dos percentuais das polpas comerciais em todos os atributos avaliados na composição centesimal, somente o teor de lipídio de fevereiro de 2009 e o teor de proteínas de agosto de 2008

apresentaram semelhança estatística com as polpas comerciais. Os percentuais das polpas comerciais das distintas marcas, no entanto, apresentaram regularidade estatística em todos os atributos da composição centesimal. De mesmo modo, avaliações sensoriais demonstraram constância de sabor e textura entre produtores diferentes (FREIRE *et al.*, 2009). Isto sugere procedimentos semelhantes na cadeia de processamento do cupuaçu entre as distintas indústrias.

O excedente de umidade, observado em todas as polpas comerciais, pode ser devido à condensação de umidade atmosférica no processamento ou, na pior das hipóteses, à adulteração consciente por parte dos produtores, visando lucro devido ao aumento de peso. Note que a diluição da polpa de cupuaçu é uma prática proibida por lei (BRASIL, 2000).

Os percentuais da polpa fresca e comercial se assemelham aos apresentados pela TACO (2006), e os da semente de cupuaçu se assemelham aos apresentados por ARAGÃO *et al.* (1992). Pequenas variações podem ser devidas tanto aos distintos solos de plantio, quanto à existência de mais de um tipo de cupuaçu, como o mamaú, o redondo e o sem sementes. O mamaú, de formato oblongo, foi o tipo avaliado no presente trabalho. As diferenças encontradas podem, ainda, serem devidas às variabilidades genéticas dentro de um mesmo tipo de cupuaçu, resultantes de fatores evolutivos individuais.

Avaliando a composição centesimal dos intermediários de produção e do cupulate (**Tabela 2**), observa-se que cada etapa do processamento leva a diferenças estatisticamente significantes em todos os atributos da composição centesimal das amostras. Nota-se uma grande perda de umidade, especialmente durante a etapa de fermentação/secagem. Com esta perda, os demais componentes aumentam proporcionalmente. Quando da passagem da semente torrada para líquido, há a perda do tegumento fibroso (STEINBERG *et al.*, 2003) que reveste a amêndoa, refletindo na redução do percentual de carboidratos (fibras da casca), e no aumento do percentual de lipídios (concentrados na amêndoa resultante). A etapa final, adição de ingredientes (33,5 % de açúcar, 8 % de manteiga de cupuaçu, 6 % de leite em pó e 0,5 % de lecitina) ao líquido (52 %), é caracterizada pelo aumento de carboidratos, proveniente do substancial incremento de açúcar na fórmula, e na conseqüente redução proporcional dos demais ingredientes.

**Tabela 2** - Composição centesimal da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate (%).

Amostra	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
Semente Fresca <sup>#</sup>	53 ± 1 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,06 <sup>a</sup>	22 ± 1 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	16 ± 1 <sup>a</sup>
Semente Fermentada	8,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,76 ± 0,01 <sup>b</sup>	45 ± 3 <sup>b</sup>	10,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	31 ± 1 <sup>b</sup>
Semente Torrada	3,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	3,02 ± 0,02 <sup>c</sup>	48 ± 2 <sup>b</sup>	10,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	31 ± 2 <sup>b</sup>
Líquor	2,64 ± 0,03 <sup>d</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	54 ± 2 <sup>c</sup>	10,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	27 ± 1 <sup>c</sup>
Cupulate	1,12 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,78 ± 0,05 <sup>d</sup>	37 ± 2 <sup>d</sup>	7,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	52 ± 3 <sup>d</sup>

<sup>#</sup> Média das sementes Maio/08, Agosto/08, Fevereiro/09. Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Uma vez caracterizado o cupuaçu e o produto de seu processamento, procederam-se análises com o objetivo de comparar este fruto com outro do mesmo gênero (*Theobroma*), o cacau. A análise de composição centesimal realizada mostrou que a polpa de cupuaçu possui percentual de água um pouco inferior ao de cacau (**Tabela 3**), já a semente de cupuaçu apresenta teor de umidade maior que a de cacau.

**Tabela 3** - Composição centesimal da polpa e semente de cacau e do chocolate (%).

Amostra	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
Cacau Polpa	85 ± 2 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,02 <sup>a</sup>	11,7 ± 0,9 <sup>a</sup>
Cacau Semente	46 ± 2 <sup>b</sup>	2,09 ± 0,05 <sup>b</sup>	20 ± 1 <sup>b</sup>	9,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	19 ± 1 <sup>b</sup>
Chocolate	1,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	1,55 ± 0,04 <sup>c</sup>	35 ± 2 <sup>c</sup>	7,8 ± 0,6 <sup>c</sup>	53 ± 4 <sup>c</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A composição da semente fresca de cupuaçu difere-se da composição da semente de cacau, por apresentar menos umidade e mais proteínas. Já os produtos do processamento destas sementes, cupulate e chocolate, apresentaram composições centesimais semelhantes entre si.

O líquor de cupuaçu apresentou composição centesimal semelhante à de COHEN & JACKIX (2005), exceto por um conteúdo lipídico superior apresentado por este autor (cerca de 65%). Esta variação pode ser devida a diferenças no solo, tempo, tipo de cupuassu avaliado e outras variações genéticas. Já o cupulate apresentou composição semelhante à de GENOVESE & LANNES. (2009), que igualmente produziram uma formulação meio amarga. O conteúdo lipídico apresentado por estas autoras, ao contrário, foi ligeiramente inferior ao apresentado neste trabalho (cerca de 29 %). A avaliação de um produto final, o cupulate, é eivada de variações, pois é dependente da receita utilizada por cada autor. Por fim, a composição do chocolate se assemelha às das bases de dados FINELI (2009) e, especialmente, SOUCI *et al.* (1994).

## 4.2. Perfil de ácidos graxos da semente fresca e líquido

A análise do total de lípidos (**Tabela 4**), por cromatografia gás-líquido, confirmou os dados do percentual lipídico, obtidos em 4.1., da semente fresca e do líquido de cupuaçu. Já a composição de ácidos graxos (**Tabela 5**), obtida pela mesma metodologia, demonstrou que seis deles alteraram seu teor significativamente ( $p < 0,05$ ) com o processamento do cupuaçu e cinco deles não. Um estudo semelhante feito com a manteiga de cacau, obtida de sementes que passaram por diferentes tempos de fermentação e por diferentes tempos e temperaturas de forneamento, também demonstrou baixa correlação entre o processamento e o teor de ácidos graxos (ASEP *et al.*, 2007).

O oléico (41 %), o esteárico (32 %), o eicosanóico (10 %) e o palmítico (7,5 %) foram os ácidos graxos presentes em maior quantidade no cupuaçu. O primeiro e o segundo são encontrados em grandes concentrações no cacau (35 % cada um), junto com o ácido palmítico (25 %) (BRACCO, 1994). O ácido oléico e o esteárico têm um efeito neutro no nível lipídico do sangue, isto é, não aumentam o colesterol sanguíneo (COOPER *et al.*, 2008; STEINBERG *et al.*, 2003).

**Tabela 4** - Percentual lipídico da semente fresca e líquido de cupuaçu por cromatografia.

Amostra	% de gordura
Semente fresca	22,4 ± 0,8 <sup>a</sup>
Líquor	54 ± 4 <sup>b</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5** – Teor de ácidos graxos (% do total de lipídios).

Fórmula	Nome	Semente fresca %	Líquor %
16:0	Palmítico	7,54 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,86 ± 0,05 <sup>b</sup>
17:0	Margárico	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>
18:0	Esteárico	32,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	31,4 ± 0,2 <sup>b</sup>
18:1 (n-9)	Oléico	41,31 ± 0,06 <sup>a</sup>	43,5 ± 0,1 <sup>b</sup>
18:1 (n-7)	Vacênico	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>
18:2 (n-6)	Linoleico	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,04 ± 0,01 <sup>a</sup>
18:3 (n-3)	α-Linolênico	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>b</sup>
20:0	Eicosanóico	10,51 ± 0,04 <sup>a</sup>	10,23 ± 0,09 <sup>b</sup>
20:1 (n-9)	Eicosenóico	0,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>b</sup>
22:0	Docosanóico	1,72 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,05 <sup>a</sup>
24:0	Tetracosanóico	0,19 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>
	Saturados	52,81 ± 0,07 <sup>a</sup>	50,5 ± 0,4 <sup>b</sup>
Totais	Monoinsaturados	42,12 ± 0,04 <sup>a</sup>	44,4 ± 0,1 <sup>b</sup>
	Polinsaturados	5,07 ± 0,11 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,01 <sup>a</sup>

Valores na mesma linha com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A composição de ácidos graxos confere com a encontrada por COHEN *et al.* (2005), exceto pelo maior percentual de gordura saturada descrito pelo autor. LUCCAS (2001), por outro lado, apresentou percentuais semelhantes de ácidos graxos saturados e insaturados na gordura do cupuaçu. Esse mesmo autor afirma que, apesar do ponto de fusão mais alto da manteiga de cupuaçu (33,9 °C) frente à do cacau (31 °C), o alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oléico, torna a gordura do primeiro mais macia que a do segundo. Tal característica é uma vantagem, por ser mais apreciada pelos consumidores.

Por fim, o perfil de ácidos graxos da polpa de cupuaçu, avaliado por ROGÉZ *et al.* (2004), difere um pouco do encontrado na semente, pois é composto de alta concentração de ácido palmítico (55 %) e de moderada concentração de ácidos oléico (18,8 %) e  $\alpha$ -linolênico (17,9 %).

### 4.3. Teores de ácido ascórbico da polpa de cupuaçu

Analisando o conteúdo de ácido ascórbico na polpa de cupuaçu (**Tabela 6**), pode-se verificar que as polpas comerciais são estatisticamente semelhantes ( $p < 0,05$ ) entre si e diferem-se das polpas frescas. Somente as polpas frescas de maio de 2008 e fevereiro de 2009 apresentaram teores estatisticamente semelhantes entre si, diferindo-se da polpa de agosto de 2008.

Os teores de ácido ascórbico na polpa fresca de cupuaçu são semelhantes aos obtidos por GONÇALVES (2008); e um pouco mais baixos do que os publicados por TACO (2006), SANTOS *et al.* (2002), CARVALHO *et al.* (1999) e CALZAVARA *et al.* (1984). A polpa congelada apresentou resultados semelhantes ao encontrado por FREIRE *et al.* (2009), mas inferiores aos obtidos por SCHWAN *et al.* (2000) e BUENO *et al.* (2002). Em base úmida, o teor das amostras de polpa fresca avaliadas variam de 9,6 a 11 mg/100 g e as de polpas comerciais variam de 1,5 a 2,1 mg/100 g. Na literatura supra-citada, estes valores variam de 10,5 a 65 mg/100 g e 0,82 a 25,8 mg/100 g, respectivamente. Como se pode ver, os valores apresentados diferem grandemente de autor para autor. Isto pode se dever às influências que o local de plantio, o clima, o modo de cultivo, a colheita, o armazenamento (CHITARRA *et al.*, 2005; SOUZA FILHO *et al.*, 1999) e as variações genéticas exercem sobre o teor de ácido ascórbico.

**Tabela 6** - Conteúdo de ácido ascórbico total (mg/100 g de amostra em b.s.), presente nas polpas de cupuaçu e nas suas polpas comerciais.

Amostra	Ácido Ascórbico total
Polpa Maio/08	98 ± 5 <sup>a</sup>
Polpa Agosto/08	111 ± 7 <sup>b</sup>
Polpa Fevereiro/09	96 ± 8 <sup>a</sup>
Polpa comercial A	9,0 ± 0,5 <sup>c</sup>
Polpa comercial B	12 ± 1 <sup>c</sup>
Polpa comercial C	13 ± 1 <sup>c</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Como esperado, o conteúdo de ácido ascórbico das polpas congeladas é inferior ao encontrado no fruto *in natura*. Isto se deve às perdas decorrentes do tratamento térmico recebido pelas polpas e, principalmente, ao processo oxidativo que antecede a pasteurização. Variação na intensidade do tratamento térmico utilizado por cada empresa pode levar a diferentes teores deste componente, justificando as variações entre as amostras comerciais (FREIRE, 2009).

O teor de ácido ascórbico da polpa in natura se assemelha ao de outras frutas nativas brasileiras como o araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) e o jaracatiá (*Jaracatia spinosa* DC), assim como de polpas comerciais como a do umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) (GENOVESE *et al.*, 2008). O teor de ácido ascórbico no cupuaçu é superior ao do cacau (13,6 mg/100 g) e ao da laranja baia (56,9 mg/ 100g) mas é quase dez vezes inferior ao teor da acerola (941 mg/100 g) (TACO, 2006).

#### 4.4. Capacidade inibitória de $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase

Quanto à atividade inibitória das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (**Tabela 7**), o extrato de cupuaçu purificado em poliamida (polpa e semente) apresentou apenas inibição de  $\alpha$ -amilase, assim como verificado por GONÇALVES (2008). Sua polpa apresentou uma elevada atividade inibitória desta enzima, assim como se observa em outras frutas nativas como o cambuci (*Campomanesia phaea* Berg.) e o panã (*Annona crassifolia* Mart.). Já a semente de cupuaçu apresentou apenas uma pequena inibição de  $\alpha$ -amilase, semelhante à atividade observada no coquinho azedo (*Butia capitata* Becc.) (GONÇALVES *et al.*, 2010).

As polpas frescas apresentaram teores de  $\alpha$ -amilase significativamente ( $p < 0,05$ ) similares entre si e entre elas e as polpas comerciais. Somente a polpa fresca de fevereiro de 2009 diferiu-se das polpas comerciais B e C. As sementes frescas diferiram-se das polpas, e a semente de maio de 2008 diferiu-se das demais sementes.

**Tabela 7** - Atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de extratos purificados em poliamida ou em C18, obtidos a partir de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais.

Amostra	Atividade inibitória de $\alpha$ -amilase IC50 (mg amostra b.s./mL reação Purificado	
	Poliamida	C18
Polpa Maio/08	1,32 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	n.a.
Polpa Ago/08	1,14 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	n.a.
Polpa Fev/09	1,05 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	n.a.
Semente Maio/08	8,6 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	9,8 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
Semente Ago/08	8,2 $\pm$ 0,4 <sup>bc</sup>	9,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
Semente Fev/09	8,0 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	9,5 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
Polpa comercial A	1,29 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	n.a.
Polpa comercial B	1,40 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	n.a.
Polpa comercial C	1,38 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	n.a.

n.a. - não avaliado. Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Não foi possível avaliar a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de extratos metanólicos brutos (sem purificação), pois o ensaio avalia a formação da maltose resultante da ação desta enzima sobre o amido presente no meio. Tanto os açúcares redutores naturais do cupuaçu quanto a maltose reagem com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), reduzindo-o e formando um composto que absorve luz, tendo seu máximo de

absorbância a 540 nm. A análise da atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase foi feita, então, somente na amostra purificada.

Já a avaliação da atividade inibitória de  $\alpha$ -glicosidase foi realizada em seu extrato bruto e no extrato purificado. Ambas as abordagens não apresentaram atividade inibidora da enzima pela metodologia utilizada.

O chocolate de cupuaçu e seus intermediários (**Tabela 8**) de produção não apresentaram qualquer atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, sugerindo que a oxidação de compostos, quando da fermentação, leva à inativação deles quanto à sua capacidade inibitória da enzima  $\alpha$ -amilase.

**Tabela 8** - Atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de extratos purificados em poliamida ou em C18, obtidos da semente fresca de cupuaçu, intermediários de produção e cupulate.

Amostra	Atividade inibitória de $\alpha$ -amilase IC50 (mg amostra b.s/mL reação)	
	Poliamida	C18
Semente Fresca	8,3 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 0,6
Semente Fermentada	n.d.	n.d.
Semente Torrada	n.d.	n.d.
Líquor	n.d.	n.d.
Cupulate	n.d.	n.d.

n.d. - não detectado.

Considerando que estas amostras foram previamente purificadas em poliamida, e que esta resina sabidamente retém taninos irreversivelmente (GUSTAVSON, 2003), havia a possibilidade de as proantocianidinas da semente do cupuaçu terem sua capacidade de inibição de  $\alpha$ -amilase negligenciada. Para responder a esta questão, foram avaliados os mesmo extratos, porém, com suas purificações feitas em C18 (**Tabelas 7 e 8**).

Na avaliação com purificação em C18, as sementes frescas apresentaram atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase, e estes valores foram estatisticamente semelhantes entre si. Já na análise dos intermediários de produção e cupulate, novamente não se obteve inibição de  $\alpha$ -amilase. A análise dos extratos purificados nesta resina confirmou que as proantocianidinas do cupulate e de seus intermediários de produção já não possuem mais esta qualidade.

A semente fresca, ainda que apresente uma pequena inibição desta enzima, não é consumida crua. Somente os polifenóis da polpa de cupuaçu, portanto, têm valor na

alimentação como regulador da quebra do amido via inibição da  $\alpha$ -amilase. Seu consumo diminui a absorção do açúcar, a hiperglicemia pós-prandial e a hipertensão associada, sendo um alimento adequado para pessoas portadoras de diabetes do tipo 2, não dependentes de insulina, como citado anteriormente (KWON *et al.*, 2008).

Por fim, um estudo realizado por MCCUE *et al.* (2005) em uvas vermelhas e canela verificou uma correlação entre a alta atividade antioxidante com a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase, tal como verificado com a polpa de cupuaçu. No entanto, uma inibição excessiva desta enzima pode resultar numa fermentação anormal do amido não digerido no cólon (HORII *et al.*, 1987; BISCHOFF *et al.*, 1985). De fato, uma alta inibição de  $\alpha$ -amilase é o maior obstáculo das drogas atuais usadas como inibidoras de  $\alpha$ -glicosidase, como a acarbose, causando distensão abdominal, flatulência, meteorismo e diarreia (PULS *et al.*, 1975; BISCHOFF, 1994). A polpa de cupuaçu, portanto, por apresentar apenas inibição de  $\alpha$ -amilase, deve ser consumida numa dieta balanceada, com outras frutas e vegetais.

## 4.5. Teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante

### 4.5.1. Fenólicos totais, capacidade de seqüestro do DPPH• e ORAC.

Os teores de fenólicos totais e de atividade antioxidante (seqüestro do DPPH• e ORAC) do cupuaçu são apresentados na **tabela 9**. As polpas frescas apresentaram resultados significativamente ( $p < 0,05$ ) semelhantes entre si, exceto para a polpa de maio de 2008 na avaliação ORAC. As polpas comerciais apresentaram, igualmente, resultados significativamente próximos entre si, exceto quanto às polpas A e B (na avaliação de DPPH) que diferiram entre si. Os resultados das polpas comerciais diferiram-se significativamente, em sua maioria, dos resultados das polpas frescas, somente a avaliação de fenólicos totais apresentou algumas semelhanças entre polpas frescas e comerciais. Por fim, os resultados das sementes frescas só apresentaram semelhança significativa entre a amostra de agosto de 2008 e fevereiro de 2009 nas análises de fenólicos totais e seqüestro de DPPH•.

**Tabela 9** – Teores de Fenólicos totais das polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais (mg equivalente de catequina/g de amostra b.s.) e capacidade antioxidante por DPPH ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.) e ORAC ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.).

Amostra	Folin Ciocalteu	DPPH	ORAC
Polpa Maio/08	4,9 $\pm$ 0,2 <sup>abc</sup>	26 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	154 $\pm$ 10 <sup>a</sup>
Polpa Agosto/08	5,3 $\pm$ 0,2 <sup>ac</sup>	26 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	245 $\pm$ 11 <sup>b</sup>
Polpa Fevereiro/09	5,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	28 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	253 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
Semente Maio/08	20 $\pm$ 2 <sup>e</sup>	130 $\pm$ 8 <sup>d</sup>	470 $\pm$ 23 <sup>c</sup>
Semente Agosto/08	23,0 $\pm$ 0,4 <sup>f</sup>	153 $\pm$ 3 <sup>e</sup>	713 $\pm$ 18 <sup>d</sup>
Semente Fevereiro/09	22 $\pm$ 2 <sup>f</sup>	148 $\pm$ 3 <sup>e</sup>	521 $\pm$ 16 <sup>e</sup>
Polpa comercial A	3,5 $\pm$ 0,2 <sup>bd</sup>	10 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	108 $\pm$ 2 <sup>f</sup>
Polpa comercial B	3,6 $\pm$ 0,1 <sup>cd</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>bc</sup>	109 $\pm$ 3 <sup>f</sup>
Polpa comercial C	3,7 $\pm$ 0,3 <sup>ad</sup>	17 $\pm$ 1 <sup>ac</sup>	111 $\pm$ 4 <sup>f</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os teores de fenólicos totais e de atividade antioxidante (seqüestro do DPPH•) da polpa de cupuaçu são baixos quando comparados aos das frutas nativas brasileiras camu-camu (*Myrciaria dúbia* Mc. Vaugh) e cambuci (*Campomanesia phaea* Berg.). O teor de fenólicos totais é semelhante ao do araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mc. Vaugh) e a capacidade de seqüestro do DPPH• é semelhante à da jaracatia (*Jaracatiá spinosa* (Aubli) A. DC.) (GENOVESE *et al.*, 2008). Os teores de fenólicos totais foram

superiores à quantidade apresentada por SPADA *et al.* (2008) para a polpa do mesmo fruto.

Os teores de fenólicos totais e as atividades antioxidantes avaliados na polpa congelada são um pouco inferiores aos das frutas frescas. Estas diferenças podem ser devidas ao processamento por despulpadoras automáticas, ao congelamento, ao ínterim entre produção e consumo, ou às condições de armazenamento, de distribuição e do local de venda. Estes fatores levariam a uma redução no conteúdo polifenólico e de ácido ascórbico. Mercados consumidores acostumados com o consumo do cupuaçu *in natura* notam diferenças de *flavor* e consistência entre este e o industrializado (EMBRAPA, 1998).

Já em uma comparação entre polpa e semente, observa-se que o teor de fenólicos totais da semente do cupuaçu é de 4 a 5 vezes superior ao da polpa deste fruto, o que evidencia uma maior quantidade de polifenólicos na semente. As substâncias polifenólicas são substâncias protetoras contra herbívoros, micróbios e vírus (WINK, 2003). Flavonóides e taninos, no entanto, não são comumente identificados em sementes, mas em folhas e cascas (HARBORNE, 1993). Substâncias como alcalóides, terpenos e flavonóides estão grandemente presentes nas angiospermas. Como possível resultado da seleção natural, o metabolismo secundário das plantas produz tais compostos, responsável pela proteção das plantas contra herbívoros (larvas, caramujos, etc), bactérias e vírus, atração de polinizadores e, especialmente no caso dos taninos, redução de palatabilidade e digestibilidade (HARBORNE, 1993; KESSLER, 2006). Uma maior concentração dos polifenólicos nas sementes seria, então, um possível mecanismo de defesa desta estrutura contra doenças e pestes. De fato, MARTÍN *et al.* (1991), ISLAM *et al.* (2003) e LATANZIO *et al.* (2005), demonstraram que a semente, embora seja basicamente composta de substâncias de reserva (carboidratos e lipídios), possui polifenólicos na cobertura externa desta estrutura, o tegumento (em inglês, *testa*), conferindo proteção à semente contra parasitas..

Quanto ao processamento das sementes de cupuaçu (**Tabela 10**), observou-se uma diferença significativa no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante entre a semente fresca e os demais intermediários de produção e o cupulate. Houve, portanto, uma diminuição significativa do teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante quando de sua fermentação e secagem.

**Tabela 10** - Fenólicos totais da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate (mg equivalente de catequina/g de amostra b.s.) e capacidade antioxidante por DPPH ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.) e ORAC ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.).

Amostra	Folin Ciocalteu	DPPH	ORAC
Semente Fresca*	22 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	144 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	568 $\pm$ 19 <sup>a</sup>
Semente Fermentada	2,9 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	13,4 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	267 $\pm$ 12 <sup>b</sup>
Semente Torrada	2,7 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	12,1 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	103 $\pm$ 5 <sup>c</sup>
Líquor	2,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	12,0 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	82 $\pm$ 5 <sup>c</sup>
Cupulate	1,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	8,3 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	60 $\pm$ 4 <sup>c</sup>

\* Média das sementes Maio/08, Agosto/08, Fevereiro/09. Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A etapa de fermentação é apontada como a mais significativa em termos de perda de (-)-epicatequina no processamento do cacau. Após 24 a 48 horas da fermentação, micro-organismos sob condições anaeróbicas produzem ácido acético e metanol. Estes compostos contribuem para mudanças estruturais nas sementes como a quebra de membranas e paredes celulares (WOLLGAST & ANKLAM, 2000). Os polifenóis, difusos com os demais líquidos celulares, passam a serem oxidados pela enzima polifenol oxidase. O produto da oxidação dos polifenóis são taninos insolúveis de alta massa molecular. A oxidação também ocorre de modo não enzimático, uma vez que restam somente 6% da atividade desta enzima após dois dias de fermentação. A condensação dos polifenóis, quando de sua oxidação, é a explicação para o decréscimo de 10 a 20 % do conteúdo de epicatequina e de polifenóis solúveis duante a fermentação. Esta perda se deve, ainda, à difusão dos polifenóis nos líquidos que exudam durante a fermentação (BRACO *et al.*, 1969; BIEHL, 1973; KIM *et al.*, 1984; HERRMANN *et al.*, 1995; HANSEN *et al.*, 1998; KIM & KEENEY, 1984).

O processo de secagem, por si só, também foi descrito como uma etapa que traz consideráveis alterações no conteúdo polifenólico do cacau. Dois dias de secagem ao sol foi capaz de reduzir 50 % do teor de epicatequina de sementes frescas, não fermentadas. Dado que a atividade da enzima polifenol oxidase reduz para 2 % após o processo secagem, acredita-se que a fermentação não enzimática possa ser um processo importante durante a secagem (HANSEN *et al.*, 1998; KIM & KEENEY, 1984).

Comparando semente fermentada, torrada, líquido e cupulate, houve uma diminuição não significativa dos teores de fenólicos totais e atividade antioxidante (seqüestro do DPPH• e ORAC). As amostras de semente fermentada e torrada, no entanto, apresentaram diferença significativa na avaliação por ORAC.

O forneamento e, secundariamente, as demais etapas que utilizam temperaturas moderadas (refinamento, concheamento e temperagem) foram descritas como etapas que ocasionam redução adicional no teor de polifenólicos da semente do cacau (KEALEY *et al.*, 1998). Kealey e seus colaboradores verificaram uma correlação entre o aumento da temperatura de forneamento e a diminuição do teor de oligômeros. Esta perda é possivelmente resultante de fatores como: alta temperatura, contato com o oxigênio e alto poder redutor dos polifenóis. Como resultado, ocorre oxidação adicional dos compostos polifenólicos (WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

O decréscimo do teor de fenólicos e capacidade antioxidante observado na transformação de líquido em cupulate, ainda que estatisticamente não significativo, pode ser devido à simples diluição dos compostos fenólicos das amêndoas nos demais ingredientes adicionados (açúcar, manteiga de cupuaçu, leite em pó e lecitina), além, é claro da utilização de temperaturas moderadas quando do concheamento e temperagem.

Na confecção do chocolate, já foi observado que a adição da etapa de alcalinização (com bicarbonato de sódio, por exemplo) reduziu os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante (MILLER *et al.*, 2008; SULISTYOWATI *et al.*, 2008). Assim, é provável que os teores de compostos fenólicos do cupulate seriam menores caso houvesse esta etapa de alcalinização no processamento das sementes de cupuaçu.

Alcalinização, concheamento e fermentação são etapas que contribuem grandemente no aprimoramento do *flavor*, da textura, da cor, e nas reduções de adstringência, acidez e umidade. Contudo são essas mesmas etapas que comprometem o conteúdo de compostos fenólicos (**Tabela 10**). O chocolate ao leite é o tipo mais vendido, porém seu baixo percentual de sementes e alto teor de açúcares diminuem seus efeitos potencialmente benéficos, e apresentam riscos à saúde dental, assim como aumento da predisposição a diabetes (COOPER *et al.*, 2008). O produtor de chocolate deve balancear, então, um produto palatável e, ao mesmo tempo, saudável.

O valor de fenólicos totais e de atividade antioxidante da semente do cupuaçu (**Tabela 9**) é por volta de 3 vezes inferior ao da semente do cacau (**Tabela 11**), em conformidade com os resultados de JONFIA-ESSIEN *et al.* (2008). Já a polpa de cupuaçu, considerando estes mesmos parâmetros, é apenas 2 vezes inferior à do cacau. Os teores de fenólicos totais e capacidade antioxidante da polpa e semente de cacau e do chocolate são estatisticamente diferentes entre si.

**Tabela 11** - Fenólicos totais da polpa e semente de cacau e do chocolate (mg equivalente de catequina/g de amostra b.s.) e capacidade antioxidante por DPPH ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.) e ORAC ( $\mu$ moles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.).

Amostra	Folin Ciocalteu	DPPH	ORAC
Cacau Polpa	9,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	61 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	311 $\pm$ 12 <sup>a</sup>
Cacau Semente	78 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	427 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	1087 $\pm$ 56 <sup>b</sup>
Chocolate	3,5 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	16 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	127 $\pm$ 5 <sup>c</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Comparando os dois produtos, produzidos nas mesmas proporções e condições, o de cupuaçu é 2 vezes inferior ao de cacau em termos de fenólicos totais e de atividade antioxidante. Avaliando os dados da semente e de seu produto, é inegável que este, produzido a partir de cacau, apresente maior teor de polifenólicos; contudo, tal característica geralmente atribui adstringência ao produto (SARNI-MACHADO, 1999). O chocolate é descrito como mais amargo, ácido e característico; já o cupulate é percebido como mais doce e de sabor mais suave (QUEIROZ *et al.*, 2000).

Por fim, os dados de fenólicos totais e capacidade antioxidante correlacionam-se positivamente, como se verifica na **Tabela 12**. O coeficiente de correlação ( $r$ ) foi mais próximo de um entre as análises Folin Ciocalteu e DPPH e, quanto ao conjunto de dados, as sementes, líquido e chocolate tiveram o maior coeficiente.

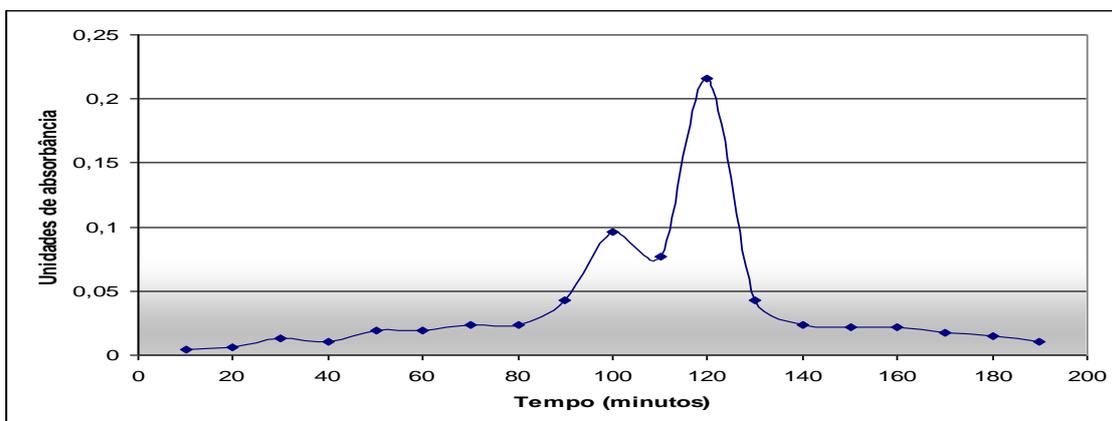
**Tabela 12** - Coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) obtidos entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante e fenólicos totais.

Coeficiente de correlação ( $r$ )	Apenas as polpas	Apenas as sementes, líquido e chocolate	Todas as amostras
Folin Ciocalteu X DPPH	0,8981	0,9895	0,9898
Folin Ciocalteu X ORAC	0,7594	0,7415	0,7128
DPPH X ORAC	0,5329	0,8182	0,7697

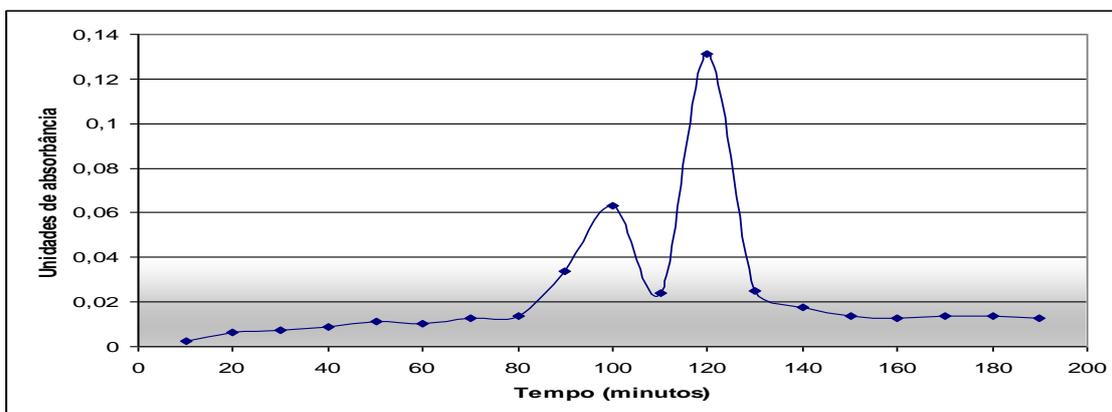
## 4.5.2. Análise de polifenólicos

### 4.5.2.1. Identificação de proantocianidinas

Para a análise dos taninos condensados foi utilizado o metanol acidificado como meio extrator, dado que este foi o meio que apresentou maiores concentrações na avaliação do teor de proantocianidinas totais (conforme visto no item 4.5.2.). A separação inicial dos taninos condensados dos demais compostos contidos no extrato foi feita com uma coluna de LH20 (WOLLGAST & ANKLAM, 2000). Esta coluna separa os compostos por tamanho molecular, retendo por mais tempo os compostos menores, que se infiltram por entre os poros da dextrana. O primeiro solvente utilizado foi o álcool etílico 95°, eliminando compostos como sais, açúcares e flavonóides da coluna. Já o segundo solvente, a acetona:água (1:1), eluiu os taninos da resina e os elimina conforme seu tamanho molecular. O perfil de eluição dos taninos das sementes frescas (**Figura 17**) e do líquido (**Figura 18**) foi monitorado por absorção a 540 nm.



**Figura 17** – Perfil de eluição do LH20 dos taninos das sementes frescas, a 540 nm.



**Figura 18** – Perfil de eluição da coluna de LH20 dos taninos do líquido, a 540 nm.

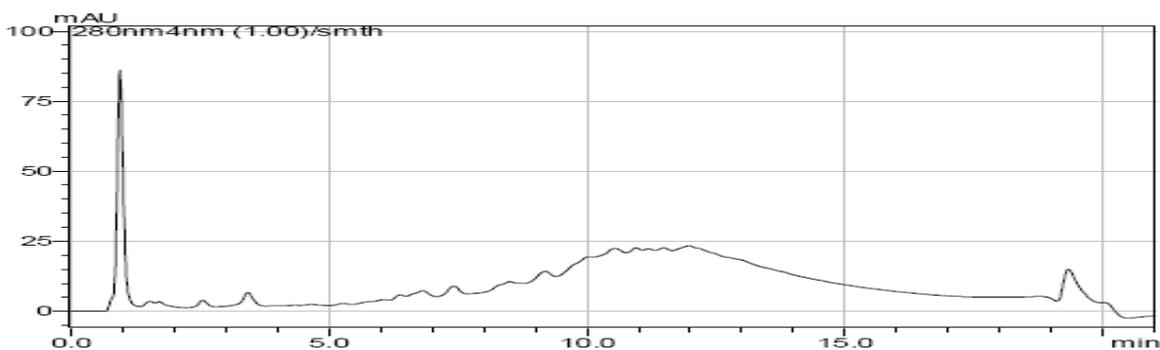
Observando a intensidade de absorção destes cromatogramas, pode-se verificar que a quantidade de taninos condensados das sementes frescas é superior ao do líquido, assim como foi observado na medição de proantocianidinas totais (item 4.5.2.).

O eluato de acetona : água, das frações que apresentaram absorbância, foram reunidas. Os taninos condensados, purificados dos demais compostos do extrato, foram posteriormente injetadas em CLAE para separação qualitativa dos taninos. Outros autores (GINER-CHAVEZ et al., 1997) realizam esta etapa de purificação com a LH20 fora da coluna (*in batch*), sendo um procedimento mais rápido para fins de simples purificação dos taninos.

Utilizou-se uma coluna de CLAE de fase normal de polietilenoglicol (PEG) para efetuar a separação subsequente dos taninos condensados. Esta coluna já foi empregada na separação de procianidinas do jatobá (SASAKI *et al.*, 2009). Outras colunas de fase normal também já foram usadas na separação dos taninos, como a diol (KALILI & VILLIERS, 2009) e a de sílica (CALDERÓN et al., 2009; ORTEGA et al., 2008; COUNET et al., 2004; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003; HAMMERSTONE et al., 1999; KEALEY et al., 1998; RIGAUD et al., 1993).

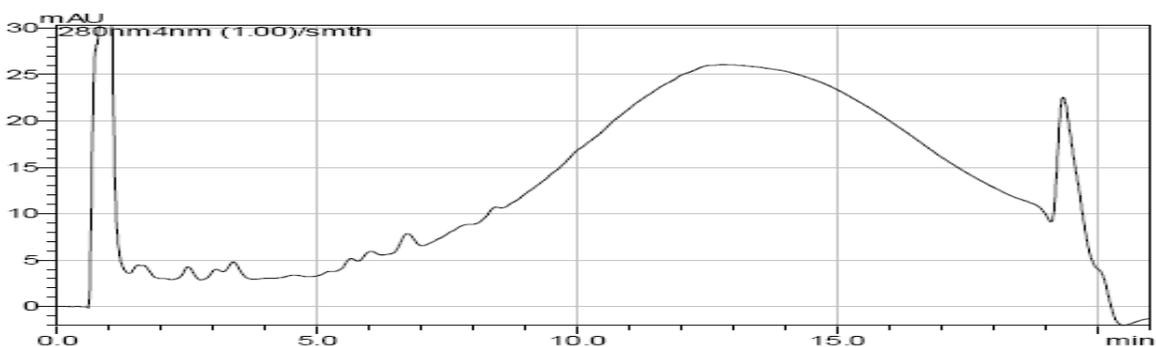
Os cromatogramas a 280 nm (**Figuras 19 e 20**) obtidos com coluna de PEG dos taninos das sementes frescas de cupuaçu e do líquido assemelham-se aos obtidos por RIGAUD et al. (1993). A baixa concentração das proantocianidinas resulta numa baixa absorção da luz, por volta de 5 mUA. Isto, aliado à elevação da linha de base como resultado da interferência da absorção da luz a 280 nm pelo metanol (*cutoff*), prejudica a análise isolada do cromatograma em UV. A monitoração dos cromatogramas de íons extraídos (EIC) (**Figuras 21 e 24**) possibilita visualizar, com clareza, o tempo de retenção médio de oligômeros de catequina ou epicatequina (massa molar 290 g), seus dímeros (mm 578 g), trímeros (mm 866 g), tetrâmeros (mm 1154 g), pentâmeros (mm 1442 g), hexâmeros (mm 1730 g), heptâmeros (mm 2018 g), octâmeros (mm 2306 g), nonâmeros (mm 2594 g) e decâmeros (mm 2882 g). Nota-se que o grau de polimerização aumenta conforme o tempo de retenção, começando por volta de 3 minutos (monômero) e termina em 15 minutos (decâmero). Tal resultado era esperado para uma coluna de fase normal.

Para possibilitar a identificação até decâmeros, foi utilizado o modo negativo de ionização. Utilizando o modo positivo, somente oligômeros até pentâmeros são detectados. Já foi demonstrado que a maioria dos polifenóis apresenta maior ionização no modo negativo (SELF *et al.*, 1986).



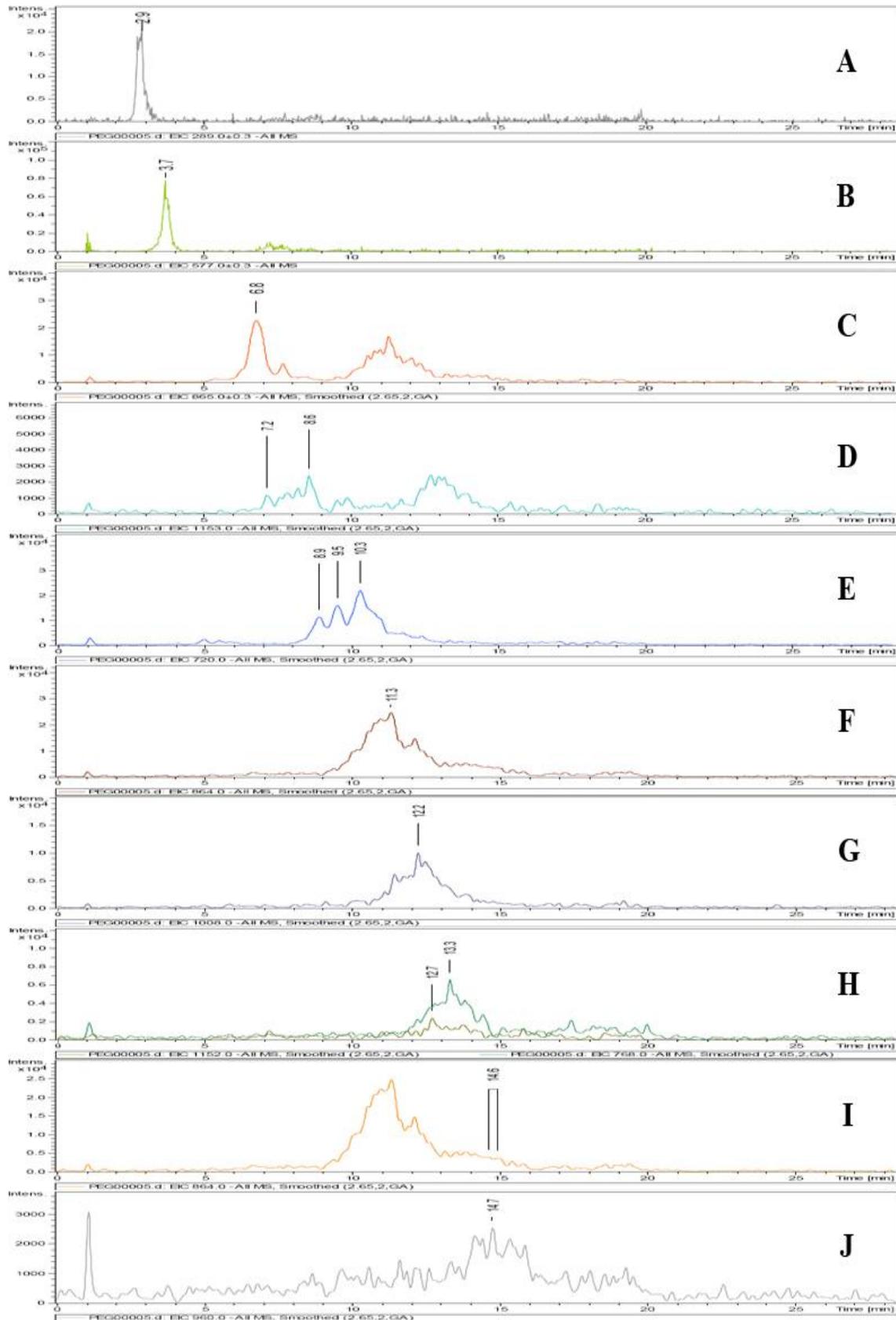
**Figura 19** - Cromatograma em 280 nm, usando coluna de polietilenoglicol (PEG), dos taninos das sementes frescas de cupuaçu.

Os espectros de massas de cada oligômero (**Figuras 22, 23 e 25**) podem ser identificados pela relação entre massa/carga elétrica ( $m/z$ ) e pelo espaçamento entre cada pico, que é uma consequência da abundância isotópica do carbono ( $C^{12}$  e  $C^{13}$ ). A relação  $m/z$  é equivalente a massa molecular subtraída do número de prótons perdidos, dividido por esse mesmo número. O espaçamento entre cada pico é indicativo do número de prótons perdidos: Uma unidade  $m/z$  indica 1 próton perdido; 0,5 unidades  $m/z$  indicam 2 prótons perdidos e 0,3 unidades  $m/z$  indicam 3 prótons perdidos.

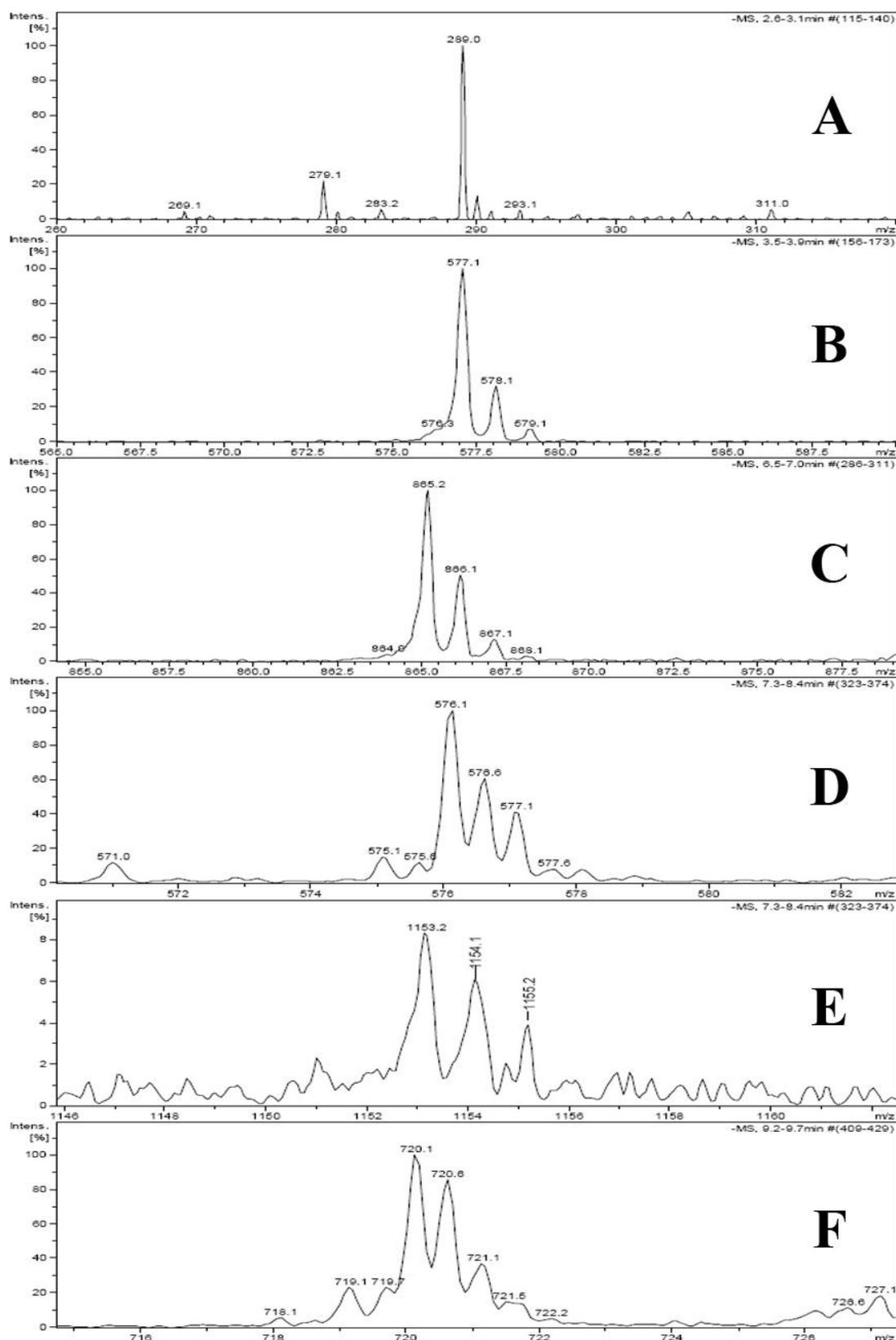


**Figura 20** - Cromatograma em 280 nm, usando coluna de polietilenoglicol (PEG), dos taninos do líquido de cupuaçu.

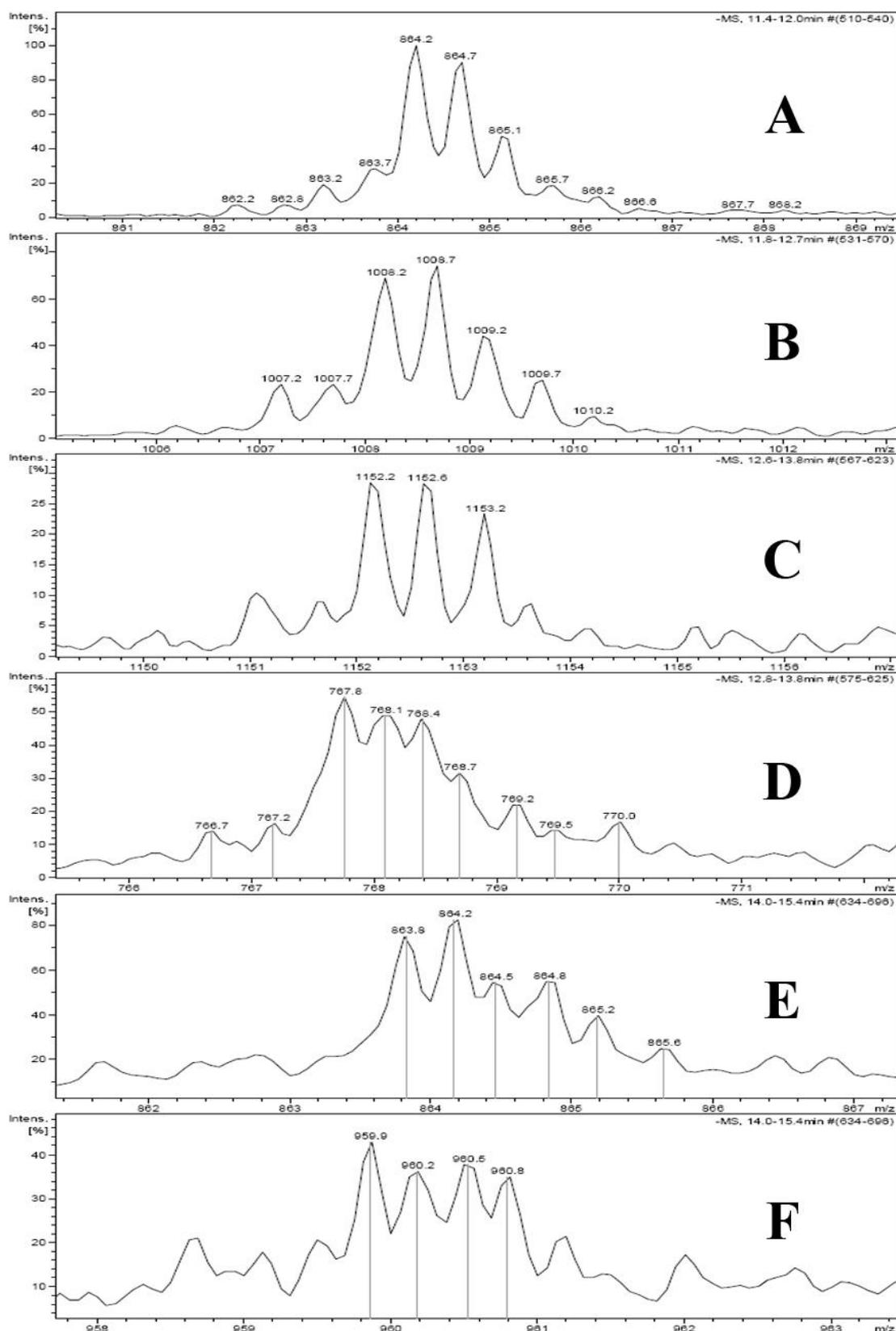
Os íons observados para cada oligômero das proantocianidinas das sementes frescas e do líquido de cupuaçu estão descritos na **tabela 13**.



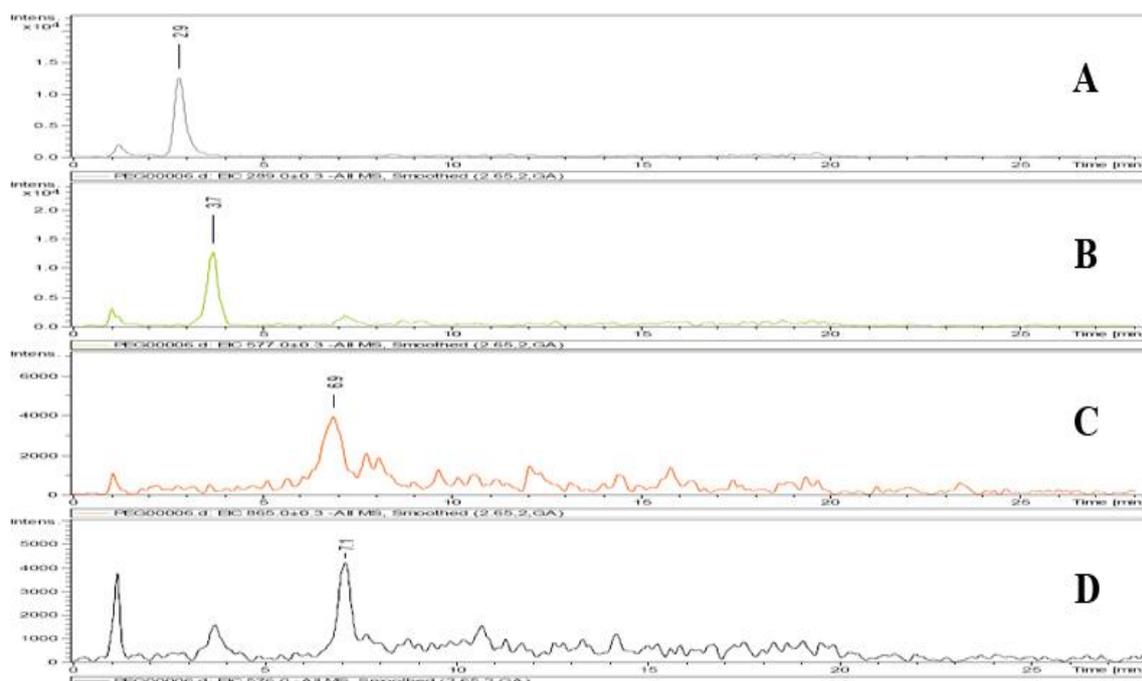
**Figura 21** - Cromatograma de íons (EIC) dos taninos das sementes frescas de cupuacu. A, B, C, D - monômero, dímero, trímero e tetrâmero monocarga, E, F, G, H -pentâmero, hexâmero, heptâmero e octâmero duplacarga, I, J - nonâmero e decâmero triplacarga.



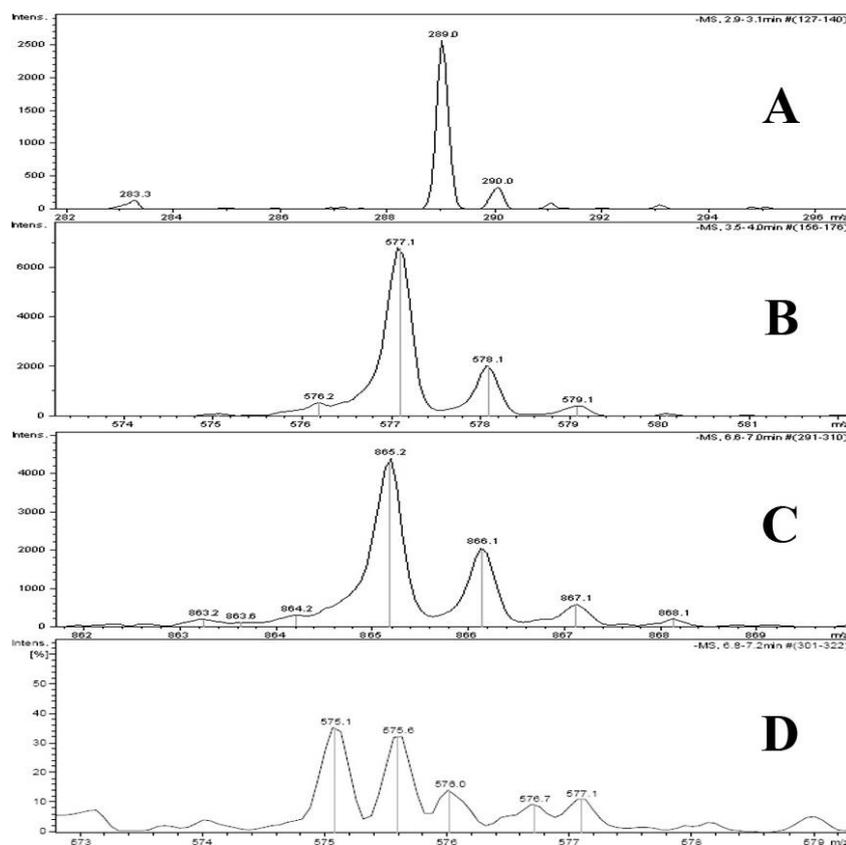
**Figura 22** – Espectros de massa dos taninos das sementes frescas de cupuaçu. A – monômero monocarga ( $m/z = 289$ ), B – dímero monocarga ( $m/z = 577$ ), C – trímero monocarga ( $m/z = 865$ ), D – tetrâmero duplაცarga ( $m/z = 576$ ), E – tetrâmero monocarga ( $m/z = 1153$ ), F – pentâmero duplაცarga ( $m/z = 720$ ).



**Figura 23** – Espectros de massa dos taninos das sementes frescas de cupuaçu. A – hexâmero duplacarga ( $m/z = 864$ ), B – heptâmero duplacarga ( $m/z = 1008$ ), C – octâmero duplacarga ( $m/z = 1152$ ), D – octâmero triplacarga ( $m/z = 768$ ), E – nonâmero triplacarga ( $m/z = 864$ ), F – decâmero triplacarga ( $m/z = 960$ ).



**Figura 24** - Cromatograma de íons (EIC) dos taninos das sementes frescas de cupuaçu. A, B, C - monômero, dímero e trímero monocarga, D – tetrâmero duplacarga.



**Figura 25** – Espectros de massa dos taninos do liquor de cupuaçu. A – monômero monocarga ( $m/z = 289$ ), B – dímero monocarga ( $m/z = 577$ ), C – trímero monocarga ( $m/z = 865$ ), D – tetrâmero duplacarga ( $m/z = 576$ ).

Observa-se na **Tabela 13** que oligômeros compostos por quatro ou mais subunidades são mais propensos a formar múltiplas cargas. Temos como exemplo o tetrâmero, que é encontrado como monocarga ( $m/z = 1153$ ) e duplacarga ( $m/z = 576$ ), e ainda o pentâmero, heptâmero e octâmero. A formação de espécies com múltiplas cargas em taninos com maior número de subunidades sugere que tal ocorrência seja uma consequência probabilística natural, pois apresenta mais sítios de ionização. A formação de múltiplas cargas em polímeros já foi observada por GUYOT *et al.* (1997).

**Tabela 13** – Íons correspondentes às proantocianidinas, de ligação simples, identificadas por LCMS. Análise do extrato das sementes frescas e líquido de cupuaçu.

Amostra	Oligômeros	Íon molecular (M-H) <sup>-</sup>	Múltiplas cargas	
			$((M-2H)/2)^{2-}$	$((M-3H)/3)^{3-}$
Semente fresca	Monômeros	289		
	Dímeros	577		
	Trímeros	865		
	Tetrâmeros	1153	576	
	Pentâmeros	1441	720	
	Hexâmeros		864	
	Heptâmeros		1008	672
	Octâmeros		1152	768
	Decâmeros			960
Líquor	Monômeros	289		
	Dímeros	577		
	Trímeros	865		
	Tetrâmeros	1553	576	

Foi possível identificar, no extrato de taninos das sementes frescas de cupuaçu, de monômeros até decâmeros. Já no extrato de taninos do líquido de cupuaçu, foi identificado apenas de monômeros até tetrâmeros. Resultados semelhantes foram obtidos por KEALEY *et al.* (1998) para as sementes de cacau. Tanto para o cupuaçu quanto para o cacau, o que se observa é uma diminuição equitativa de cada oligômero quando de seu processamento. Aqueles de maior massa molecular, com maior número de subunidades, estão naturalmente presentes em menores quantidades. A reação que ocorre nos taninos da semente de cupuaçu, em sua fermentação e torrefação, faz com que os de maior massa não sejam mais detectados no líquido pelo espectrômetro de massas. A baixa concentração de pentâmeros até decâmeros do líquido de cupuaçu faz com que o sinal de seus íons perca-se no ruído da linha de base do espectro de massas.

#### 4.5.2.2. Proantocianidinas totais.

Os teores de taninos condensados foram primeiramente avaliados pelo método da vanilina após extração em metanol puro, como sugerido por AZIZAH *et al.* (1999) para uma melhor extração dos polifenólicos do cacau, e em metanol acidificado, conforme empregado por COELHO (1987) para extração de taninos do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

Os resultados obtidos neste experimento (**Tabelas 14, 15 e 16**) mostraram que a extração pelo segundo meio é mais extensiva do que pelo metanol puro. O uso do metanol acidificado para a extração de taninos também foi apontado como ideal em outros experimentos utilizando sementes comestíveis (VENKATALACHAM & SATHE, 2006). Estes autores sugerem que a maior quantidade de taninos verificada no extrato em metanol acidificado se deve à extração adicional dos taninos de caráter polar.

**Tabela 14** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de catequina/g de amostra b.s.) de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais, obtidos usando-se dois meios de extração (metanol puro e metanol:ácido clorídrico = 99:1).

Amostra	mg catequina/g de amostra (b.s.)	
	Metanol puro	Metanol:HCl = 99:1
Polpa Maio/08	1,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
Polpa Agosto/08	1,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Polpa Fevereiro/09	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
Semente Maio/08	122 ± 6 <sup>b</sup>	165 ± 4 <sup>b</sup>
Semente Agosto/08	167 ± 1 <sup>c</sup>	186 ± 3 <sup>c</sup>
Semente Fevereiro/09	130 ± 1 <sup>d</sup>	178 ± 1 <sup>d</sup>
Polpa comercial A	0,64 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,06 <sup>a</sup>
Polpa comercial B	0,44 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,03 <sup>a</sup>
Polpa comercial C	0,74 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,06 <sup>a</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

As polpas de cupuaçu frescas e comerciais apresentaram teores de proantocianidinas estatisticamente ( $p < 0,05$ ) semelhantes entre si, mas diferiram-se significativamente dos teores encontrados nas sementes frescas.

A quantidade de taninos condensados avaliada é modesta se comparada à de outras sementes, como as de feijão, que podem apresentar até 449 miligramas equivalentes de catequina por grama de amostra em base úmida (RANILLA *et al.*, 2007), enquanto o valor mais alto obtido para a semente de cupuaçu foi de 88 em b.u.

Na **Tabela 15** temos o teor de proantocianidinas avaliado nos intermediários de produção e no cupulate. Assim como foi verificado na análise de fenólicos totais (**Tabela 10**), observa-se que a etapa que gera redução significativa de compostos fenólicos é a fermentação. O teor de proantocianidinas das sementes frescas difere-se estatisticamente dos demais intermediários de produção e do cupulate.

**Tabela 15** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de catequina/g de amostra b.s.) dos extratos da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate, obtidos usando-se dois meios de extração (metanol puro e metanol:ácido clorídrico = 99:1).

Amostra	mg catequina/g de amostra (b.s.)	
	Metanol puro	Metanol:HCl = 99:1
Semente Fresca*	140 ± 2 <sup>a</sup>	176 ± 3 <sup>a</sup>
Semente Fermentada	12 ± 1 <sup>b</sup>	35 ± 1 <sup>b</sup>
Semente Torrada	7,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	21 ± 1 <sup>c</sup>
Líquor	6,9 ± 0,6 <sup>b</sup>	17 ± 1 <sup>c</sup>
Cupulate	1,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	8 ± 1 <sup>d</sup>

\* Média das sementes Maio/08, Agosto/08, Fevereiro/09. Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

De mesmo modo, os teores de proantocianidinas da polpa e semente de cacau e chocolate (**Tabela 16**) são estatisticamente diferentes entre si, como foi observado anteriormente na análise de fenólicos totais (**Tabela 11**).

**Tabela 16** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de catequina/g de amostra b.s.) dos extratos de polpa e semente de cacau e chocolate, obtidos usando-se dois meios de extração (metanol puro e metanol:ácido clorídrico = 99:1).

Amostra	mg catequina/g de amostra (b.s.)	
	Metanol puro	Metanol:HCl = 99:1
Cacau polpa	41 ± 4 <sup>a</sup>	76 ± 6 <sup>a</sup>
Cacau semente	560 ± 9 <sup>b</sup>	569 ± 5 <sup>b</sup>
Chocolate	6,1 ± 0,4 <sup>c</sup>	26 ± 2 <sup>c</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Além da metodologia da vanilina, foi utilizado também o procedimento do butanol acidificado (**Tabelas 17, 18 e 19**). Ambos são métodos colorimétricos, mas cada um possui um modo de interagir com os taninos condensados.

A reação da vanilina com as proantocianidinas é positiva quando esta apresenta em sua estrutura uma ligação simples na posição 2 – 3 do anel C e um grupo hidroxila

livre na posição meta do anel B (SARKAR & HOWARTH, 1976). Esta especificidade é uma vantagem frente a outras metodologias como a que usa Folin Ciocalteu.

Já a reação do butanol acidificado age sobre proantocianidinas por autocatálise, auto-oxidação (requer O<sub>2</sub>) e oxidação direta (requer a ligação de íons metálicos nas hidroxilas vicinais do anel B), formando antocianidinas. A coloração vermelha se deve em grande parte à estrutura de ressonância obtida pelo ganho da ligação olefínica no anel C e, em menor grau, ao deslocamento batocrômico causado pela ligação do íon metálico na hidroxila em meta do anel B (PORTER *et al.*, 1986).

A metodologia do butanol foi utilizada para avaliar o extrato em metanol acidificado, que se mostrou o melhor meio de extração, e no analito finamente moído. A avaliação direta do analito bruto já foi descrita por PORTER *et al.* (1986) e seria um modo de reduzir erros causados pela insolubilização dos taninos de alta massa molecular.

**Tabela 17** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de tanino de quebracho/g de amostra b.s.) de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais, obtidos usando-se o analito moído e seu extrato em metanol:HCl = 99:1.

Amostra	mg tanino/g de amostra (b.s.)	
	Analito moído	Extrato em metanol:HCl = 99:1
Polpa Maio/08	31,0 ± 0,4 <sup>ab</sup>	20 ± 1 <sup>ab</sup>
Polpa Ago/08	38 ± 2 <sup>a</sup>	25,2 ± 0,2 <sup>c</sup>
Polpa Fev/09	34,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	23,0 ± 0,2 <sup>ac</sup>
Semente Maio/08	171 ± 7 <sup>c</sup>	159 ± 4 <sup>d</sup>
Semente Ago/08	177 ± 7 <sup>c</sup>	161 ± 5 <sup>d</sup>
Semente Fev/09	174 ± 7 <sup>c</sup>	160 ± 4 <sup>d</sup>
Polpa comercial A	25 ± 1 <sup>b</sup>	16,0 ± 0,5 <sup>be</sup>
Polpa comercial B	24 ± 1 <sup>b</sup>	15,0 ± 0,3 <sup>e</sup>
Polpa comercial C	25 ± 1 <sup>b</sup>	16,2 ± 0,5 <sup>be</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Comparando as metodologias da vanilina (**Tabelas 14, 15 e 16**) e do butanol (**Tabelas 17, 18 e 19**), e analisando os extratos em metanol acidificado, observaram-se resultados proporcionais. A metodologia do butanol, entretanto, se mostrou mais sensível, pois gera resultados com mais diferenças estatisticamente significantes entre as amostras. Esta maior sensibilidade já foi observada por MARLES *et al.* (2003).

**Tabela 18** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de tanino de quebracho/g de amostra b.s.) da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate, obtidos usando-se o analito moído e seu extrato em metanol : HCl (99:1).

Amostra	mg tanino/g de amostra (b.s.)	
	Analito moído	Extrato em metanol:HCl = 99:1
Semente Fresca*	174 ± 7 <sup>a</sup>	160 ± 4 <sup>a</sup>
Semente Fermentada	111 ± 1 <sup>b</sup>	63,1 ± 0,3 <sup>b</sup>
Semente Torrada	102 ± 1 <sup>c</sup>	43 ± 1 <sup>c</sup>
Líquor	101 ± 2 <sup>c</sup>	36,8 ± 0,4 <sup>d</sup>
Cupulate	44 ± 4 <sup>d</sup>	24,6 ± 0,4 <sup>e</sup>

\* Média das sementes Maio/08, Agosto/08, Fevereiro/09

**Tabela 19** – Teores de proantocianidinas (mg equivalentes de tanino de quebracho/g de amostra b.s.) de polpa e semente de cacau e chocolate, obtidos usando-se o analito moído e seu extrato em metanol:HCl = 99:1.

Amostra	mg tanino/g de amostra (b.s.)	
	Analito moído	Extrato em metanol:HCl = 99:1
Cacau polpa	109 ± 4 <sup>a</sup>	55 ± 3 <sup>a</sup>
Cacau semente	499 ± 16 <sup>b</sup>	478 ± 15 <sup>b</sup>
Chocolate	68 ± 2 <sup>c</sup>	40 ± 3 <sup>c</sup>

Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Para comparar os resultados do butanol tanto no analito bruto como no seu extrato metanólico (**Tabelas 17, 18 e 19**), devemos lembrar que os taninos de baixa massa molecular são prontamente solubilizados em soluções alcoólicas e aquosas, já os de alta massa molecular necessitam de hidrólise prévia para se difundir em solução (BRAVO, 1998; WOLLGAST, 2000). Neste ensaio foi observado que tanto polpa como semente apresentaram um teor de tanino no ensaio sobre o analito bruto superior ao feito em seu extrato (taninos solúveis). A maior quantidade de proantocianidinas liberada pode ser devido à hidrólise parcial de taninos de alta massa molecular que, de outro modo, permaneceriam insolúveis, seja devido à sua alta massa molecular, seja devido ao seu grande número de hidroxilas potencialmente associadas a polissacarídeos e proteínas da membrana celular. (BRAVO, 1998). Se dividirmos o valor de taninos solúveis pelo valor de taninos do analito bruto (um valor mais próximo do total), obtemos as seguintes razões: 0,92, 0,57, 0,42 e 0,36 (respectivamente: semente fresca, fermentada/seca, torrada e líquido). Isso pode ser devido à condensação de monômeros e oligômeros a polímeros insolúveis de alta massa molecular, ao longo do processo produtivo. Deve-se considerar, no entanto, que a presença de açúcar e proteína no

analito bruto, somado ao calor do meio reacional, pode caramelizar ou ocorrer reação de *Maillard*. O produto resultante pode absorver luz no comprimento de onda medido. Isto pode ter especialmente interferido na amostra de cupulate, que teve bastante açúcar e leite adicionado a ele e, como consequência, apresentou uma razão de 0,56 (superior ao do líquido).

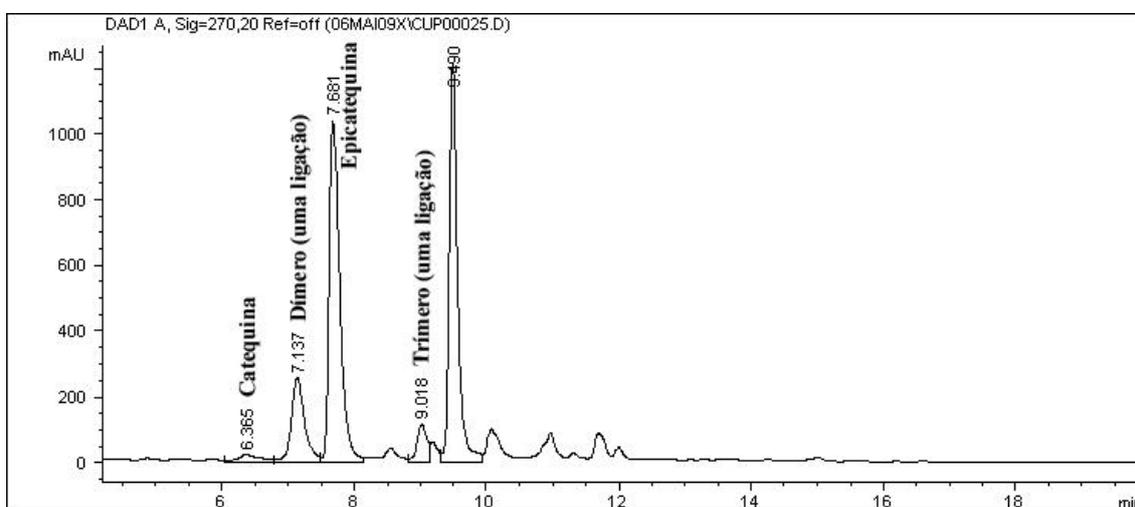
Comparando os resultados obtidos no experimento do butanol acidificado com o cacau e cupuaçu, obteve-se uma proporção semelhante à encontrada no experimento de fenólicos totais usando Folin Ciocalteu: a semente do primeiro possui por volta de 3 vezes mais proantocianidinas que a do segundo; a polpa do cacau, 2 vezes mais taninos que a do cupuaçu; e o chocolate, 2 vezes mais proantocianidinas que o cupulate.

Os resultados obtidos pelo experimento da vanilina formam uma relação bastante discrepante entre cacau/cupuaçu comparada àquelas encontradas nos demais experimentos (fenólicos totais e taninos avaliados por butanol). Isto ocorre porque o método apresenta baixa sensibilidade, prejudicando especialmente a análise de amostras com diminutos teores de proantocianidinas (MARLES *et al.*, 2003). Logo, as amostras de polpa de cupuaçu e cupulate, que possuem baixo teor de fenólicos, foram as mais prejudicadas no teste da vanilina. Estas amostras apresentaram, então, uma baixíssima produção de cor, desproporcional com os resultados do butanol e do Folin-Ciocalteu. As amostras de semente fresca de cupuaçu, como apresentam maior teor de compostos fenólicos, não foram prejudicadas no experimento da vanilina. A relação de taninos da semente de cacau pela de cupuaçu continua sendo por volta de 3, como nos demais experimentos.

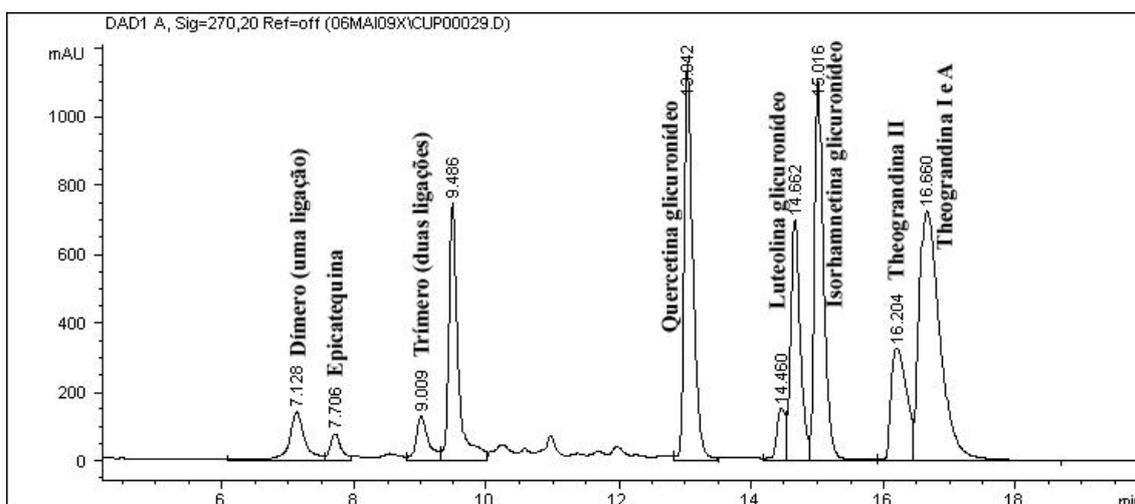
Por fim, no que diz respeito às proantocianidinas, a proporção de semente/polpa do cupuaçu varia de 50 a 60 pelo método da vanilina e de 5 a 7 pelo método do butanol. Nesta comparação, mesmo a análise por butanol se difere da avaliação de fenólicos totais, que apresentou uma proporção semente/polpa de 4 a 5. Isto sugere que a semente, além de possuir uma proporção maior de compostos fenólicos do que a verificada na polpa, apresenta estes polifenólicos sob a forma de proantocianidinas em uma proporção maior ainda do que a verificada na polpa.

### 4.5.2.3. Identificação de flavonóides

Para a quantificação dos flavonóides, a amostra foi extraída com metanol 70 %, rotaevaporado e purificado em poliamida. Estes compostos são eluídos da poliamida, primeiramente, com metanol puro e então com metanol : amônia = 99,5 : 0,5. Estas duas frações foram analisadas por CLAE e LCMS/MS. A identificação dos flavonóides consistiu da comparação do espectro de absorção UV com padrões comerciais, adição de padrão à amostra (*spiking*) e perfil de fragmentação por LCMS/MS. Estas duas frações apresentaram perfis diferentes (**Figuras 26 e 27**).



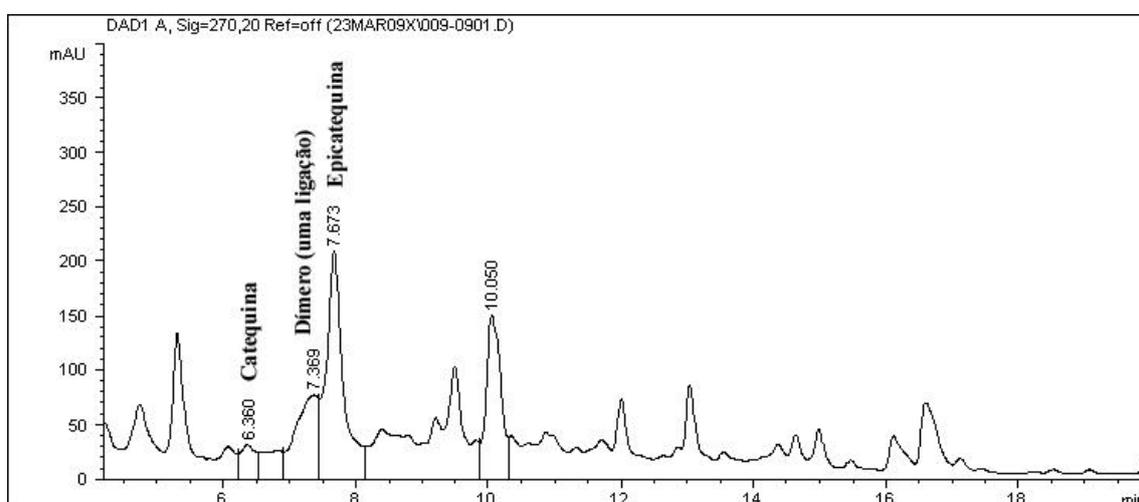
**Figura 26** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol do extrato de semente fresca de cupuaçu após purificação em poliamida.



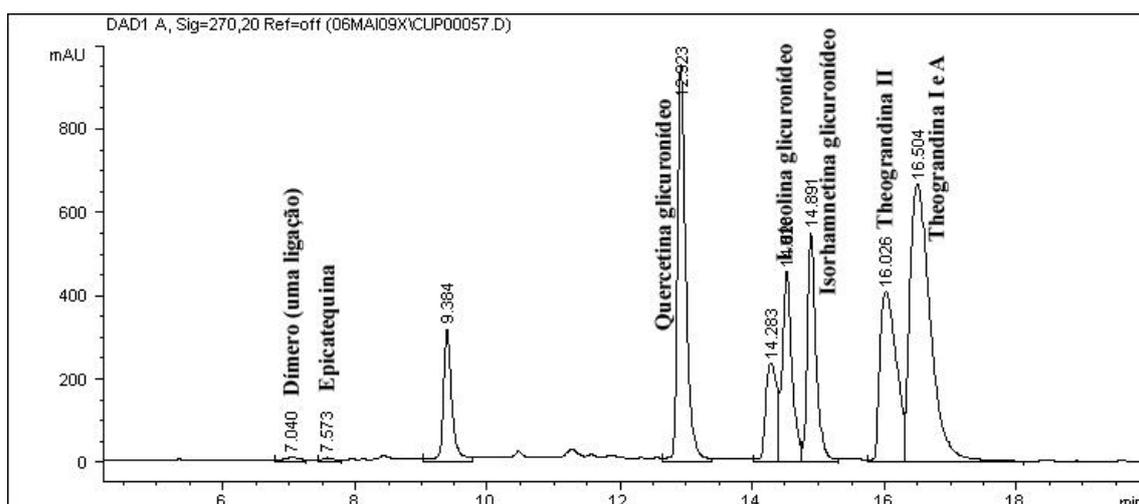
**Figura 27** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol : amônia do extrato de semente fresca de cupuaçu após purificação em poliamida.

A primeira (**Figura 26**) apresentou catequina, epicatequina, procianidina dimérica e trimérica. A segunda fração (**Figura 27**) apresentou epicatequina, procianidina dimérica e trimérica, quercetina glucuronídeo, luteolina glucuronídeo, isorhamnetina glucuronídeo e theograndinas.

Os cromatogramas nas **Figuras 26 e 27** são de extrato de semente fresca de cupuaçu. Os espectros da polpa fresca e comercial, assim como da semente processada, apresentam perfil similar, em especial o da fração metanol : amônia (**Figuras 28 e 29**).



**Figura 28** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol do extrato de líquido de cupuaçu após purificação em poliamida.



**Figura 29** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol : amônia do extrato de líquido de cupuaçu após purificação em poliamida.

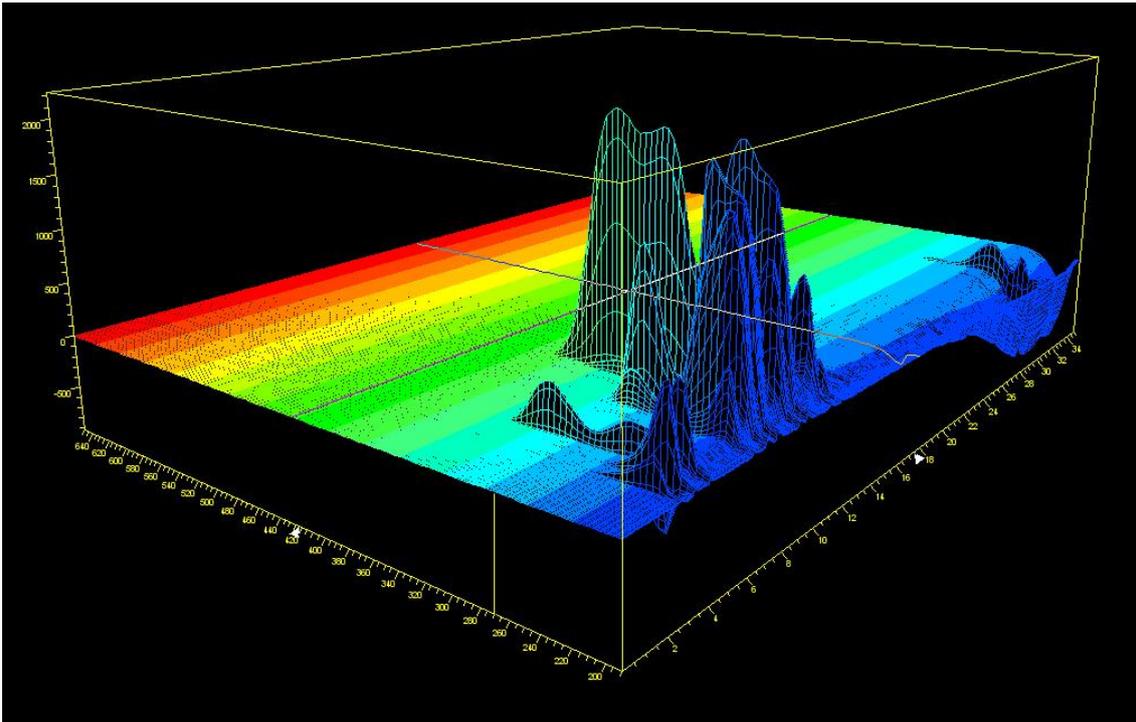
Os nomes sobrepostos aos cromatogramas das **Figuras 26, 27, 28 e 29** denominam os compostos identificados e quantificados após todo o procedimento descrito acima. O comprimento de onda utilizado para monitorar a eluição dos compostos foi 270 nm (**Figuras 30, 31, 32 e 33**), pois todos eles geram grande absorção da luz nesse comprimento de onda sem haver interferência do solvente (*cutoff*). Segue, abaixo, o procedimento investigativo para a identificação destes compostos.

Pelos espectros de absorção no UV da fração metanol, identificou-se catequina em 6,8 min (com 98,6% de semelhança com o padrão), epicatequina em 7,7 min (com 99,9% de semelhança com o padrão) e um derivado de quercetina em 12 min (com 99,7% de semelhança com um padrão de quercetina rutinosídeo). Três compostos foram detectados, mas não corretamente identificados: em 7,1 min (com semelhança de 95,0% com o padrão de catequina), em 9,0 min (com semelhança de 97,5% com o padrão de catequina) e em 9,5 min (substância pura com baixa semelhança com os compostos da biblioteca) (**Figura 34**).

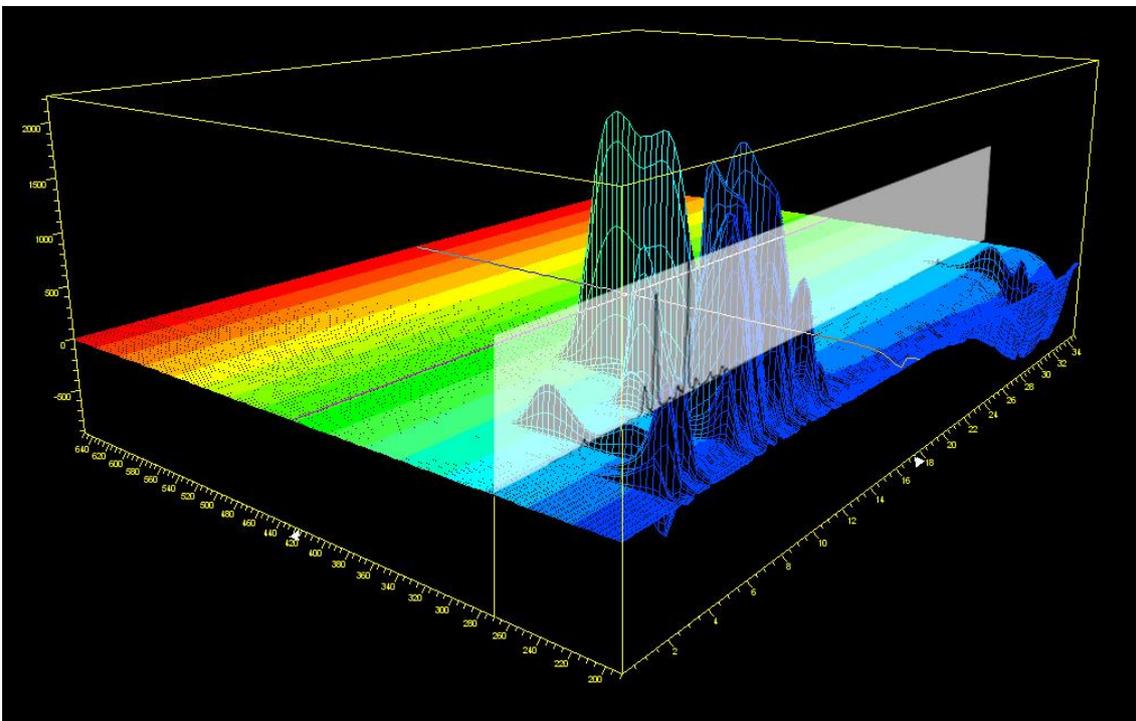
Já na fração metanol : amônia, pelos espectros de absorção no UV, identificou-se em 7,7 min a epicatequina (com 99,9% de semelhança com o padrão). Novamente, encontraram-se as bandas em 7,1 min (98,8% de semelhança com o padrão de catequina), em 9,0 min (com semelhança de 97,5% com o padrão de catequina) e em 9,5 min (substância pura com baixa semelhança com os compostos da biblioteca). Quatro bandas foram detectadas em 13,0 min, 14,5 min, 14,7 min e 16,2 min (todos com 99,5% de semelhança com o padrão de homorientina); e dois em 15,0 min e 16,7 min (com semelhança de 99,6% e 99,7% com o padrão de isovitexina) (**Figura 35**).

Pela técnica de adição de padrão à amostra (*spiking*), confirmaram-se, na fração metanólica, as bandas em 6,8 min e 7,7 min como catequina e epicatequina, respectivamente (**Figura 36 e 37**). Assim, o composto em 7,1 min não poderia, portanto, ser nenhum destes dois. Já a banda em 12 min não foi confirmada nem como quercetina aglicona (**Figura 38**), nem como rutina (**Figura 39**).

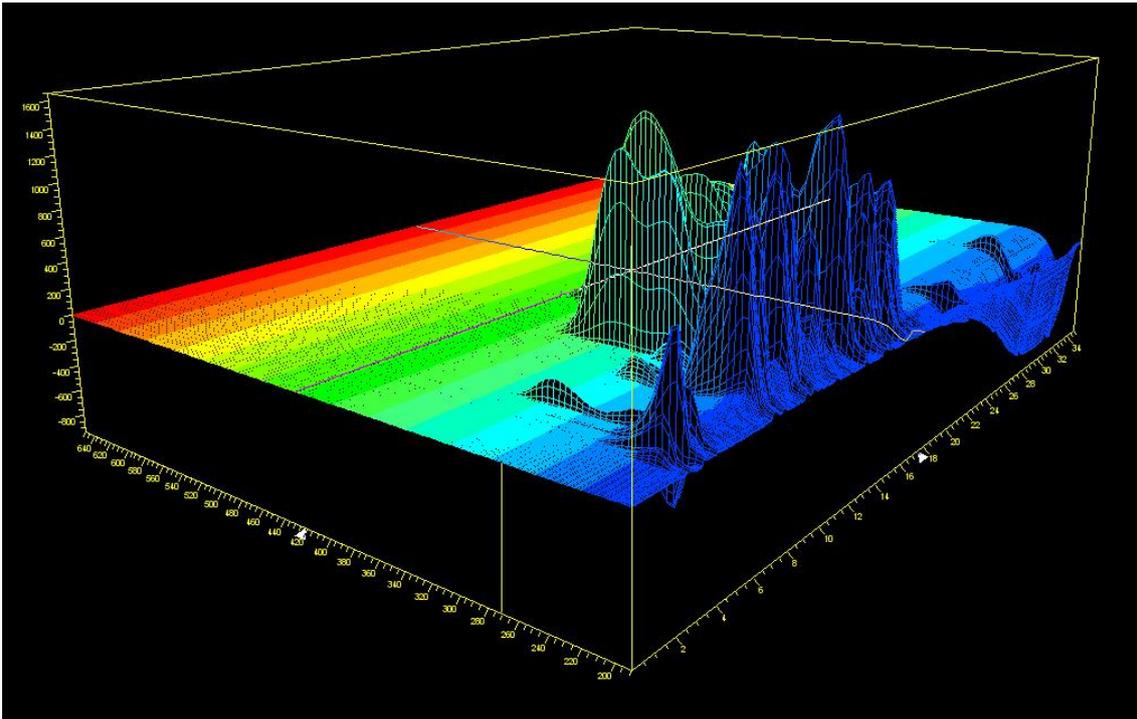
Na fração metanol : amônia, também se confirmou por *spiking* a identidade do banda em 7,7 min como sendo a epicatequina (**Figura 40**). Os compostos semelhantes à homorientina, em 13,0 min, 14,5 min, 14,7 min e 16,2 min, não foram confirmados pela adição de padrão de homorientina (**Figura 41**) e orientina (**Figura 42**). Os compostos semelhantes à isovitexina, em 15,0 min e 16,7 min, não foram confirmados pela adição de padrão de isovitexina (**Figura 43**) e vitexina (**Figura 44**).



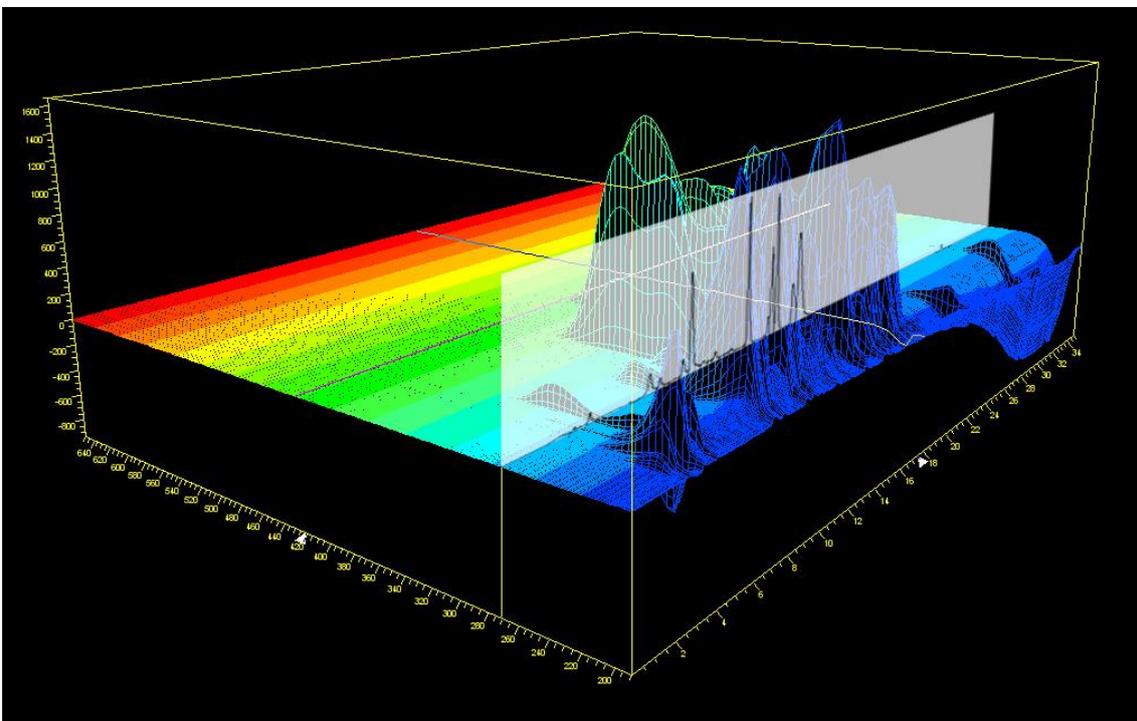
**Figura 30** - Gráfico tridimensional mostrando a varredura da absorção da luz (eixo vertical) nos distintos comprimentos de onda (eixo a esquerda), variando com o tempo de corrida (eixo a direita) da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu.



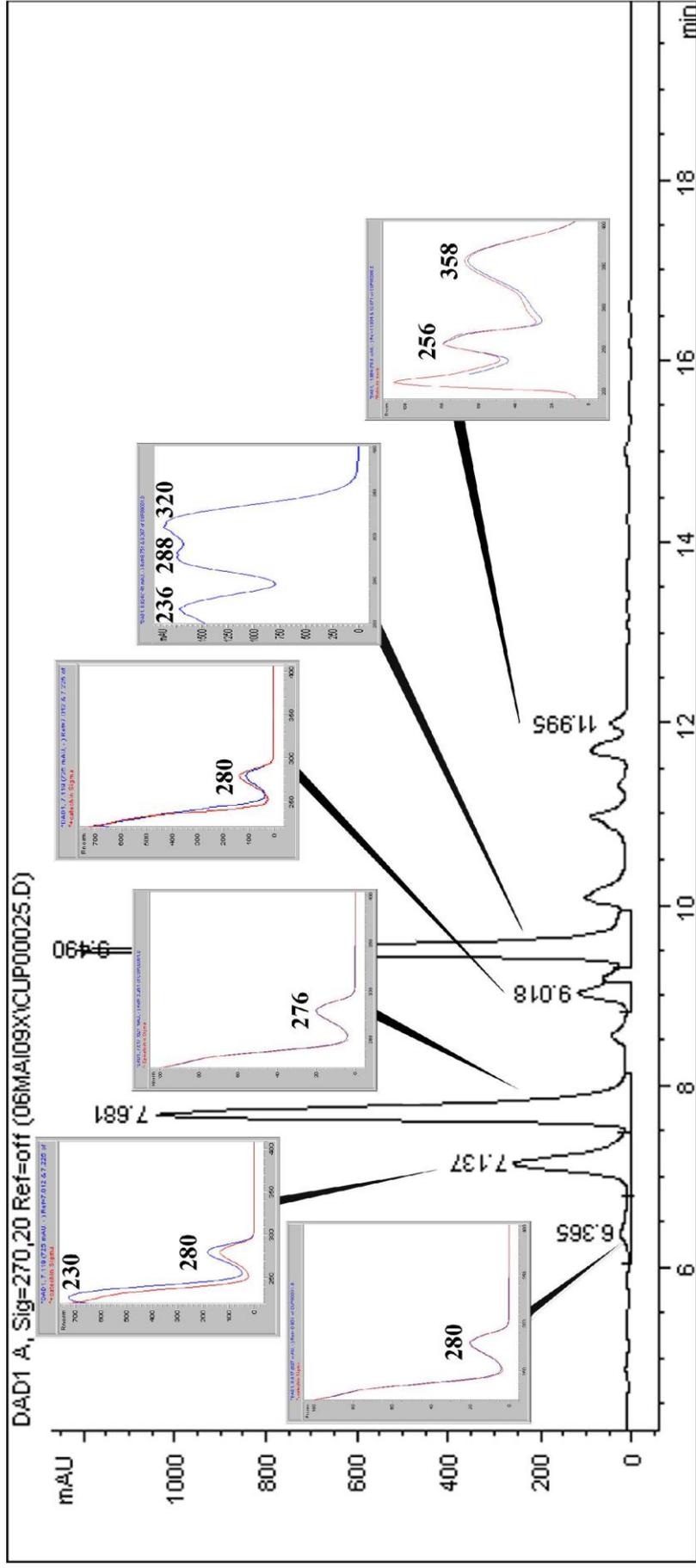
**Figura 31** - Gráfico tridimensional mostrando a varredura da absorção da luz (eixo vertical) nos distintos comprimentos de onda (eixo a esquerda), variando com o tempo de corrida (eixo a direita) da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu; seccionado no comprimento de onda de 270 nm.



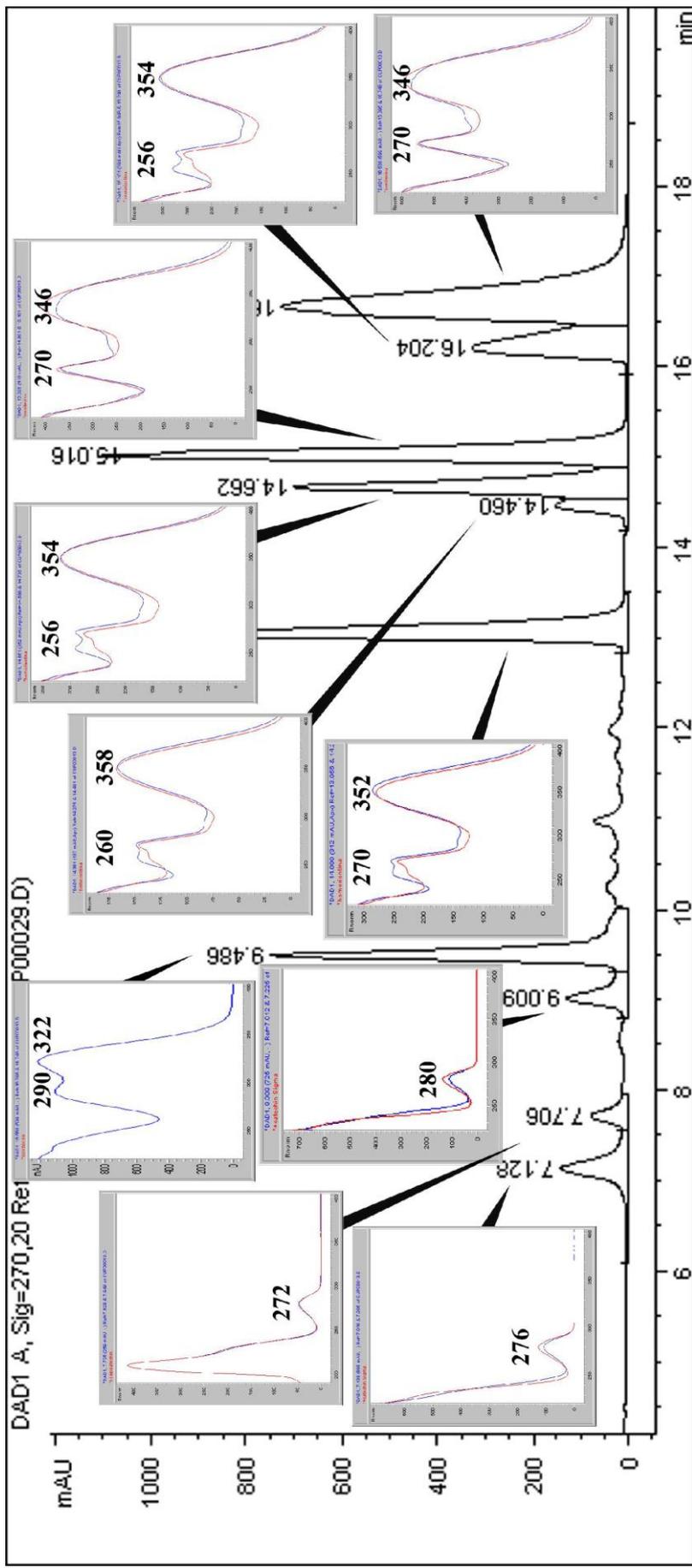
**Figura 32** - Gráfico tridimensional mostrando a varredura da absorção da luz (eixo vertical) nos distintos comprimentos de onda (eixo a esquerda), variando com o tempo de corrida (eixo a direita) da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu.



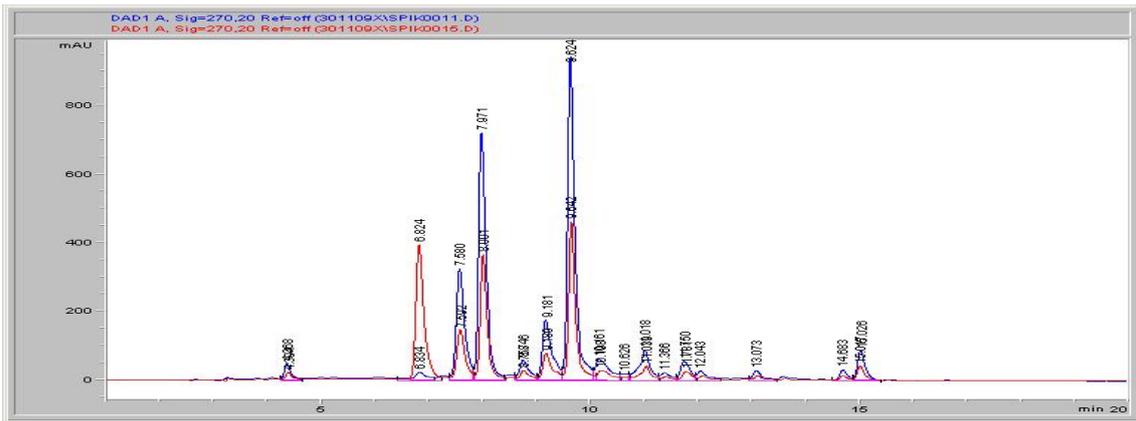
**Figura 33** - Gráfico tridimensional mostrando a varredura da absorção da luz (eixo vertical) nos distintos comprimentos de onda (eixo a esquerda), variando com o tempo de corrida (eixo a direita) da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu; seccionado no comprimento de onda de 270 nm.



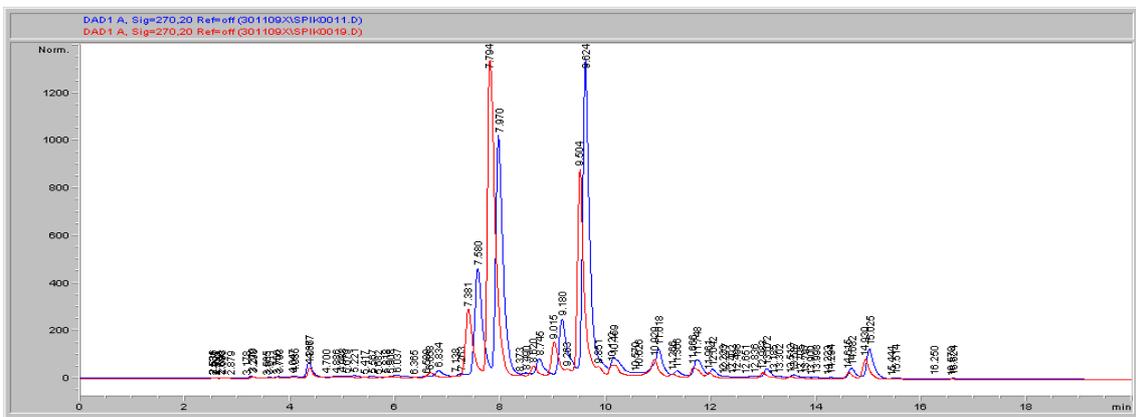
**Figura 34** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol do extrato de semente fresca de cupuaçu após purificação em poliamida. Sobrepostos ao cromatograma encontram-se os espectros de absorção no UV de cada banda (linha azul), indicando o(s) comprimentoo(s) de onda máximo. A linha vermelha é o espectro de absorção no UV dos distintos padrões comerciais com o qual as bandas foram comparadas, são eles (da esquerda para direita): (+)-catequina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-catequina, “não comparado” e rutina.



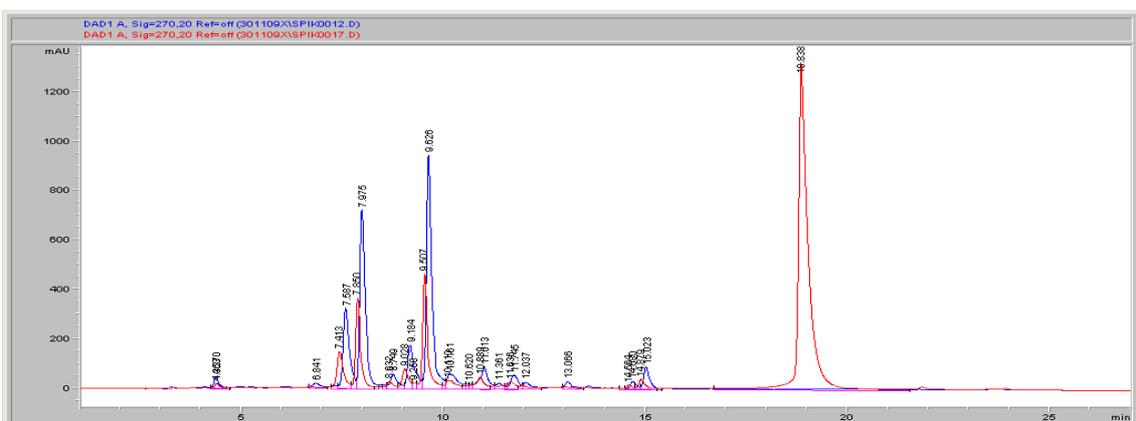
**Figura 35** - Cromatograma em 270 nm, usando coluna prodigy, da fração metanol : amônia do extrato de semente fresca de cupuaçu após purificação em poliamida. Sobrepostos ao cromatograma encontram-se os espectros de absorção no UV de cada banda (linha azul), indicando o(s) comprimento(s) de onda máximo. A linha vermelha é o espectro de absorção no UV dos distintos padrões comerciais com o qual as bandas foram comparadas, são eles (da esquerda para direita): (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-catequina, “não comparado”, homorientina, homorientina, isovitexina, isovitexina, homorientina e isovitexina.



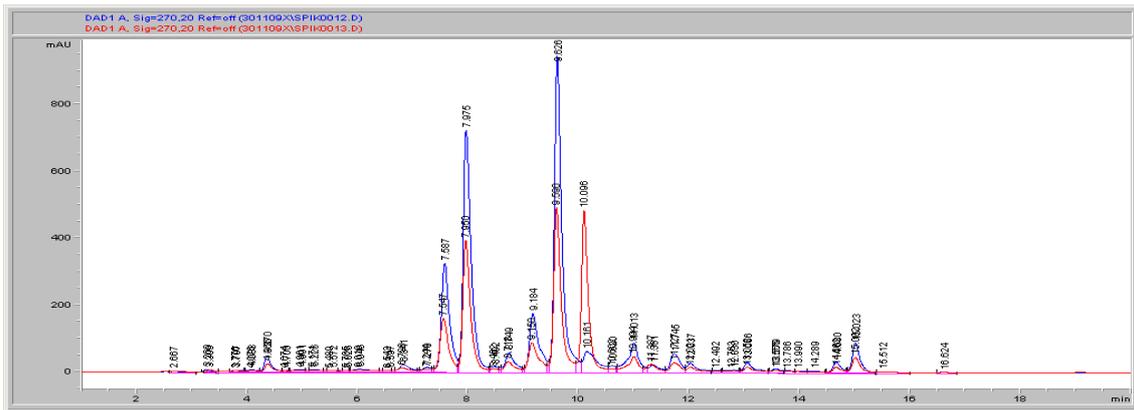
**Figura 36** - Cromatogramas em 270 nm da fração CH<sub>3</sub>OH do extrato de semente de cupuacu (linha azul) e deste adicionado de catequina (linha vermelha).



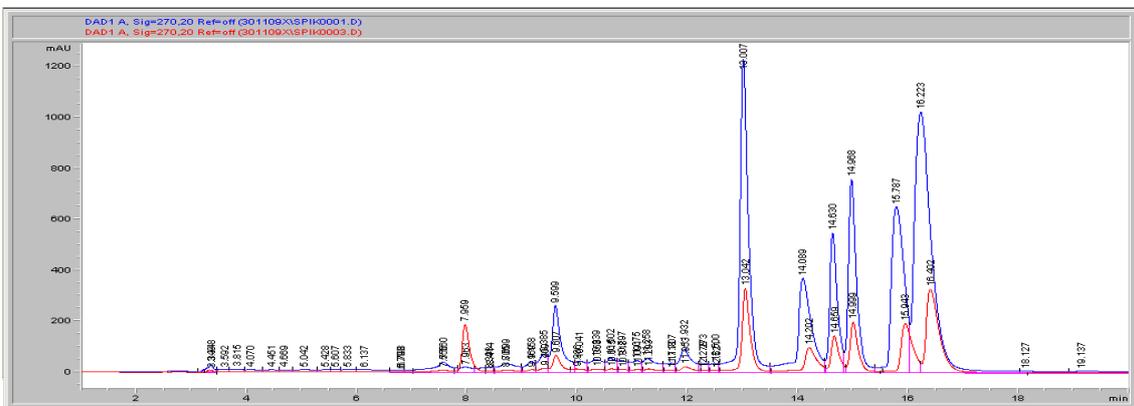
**Figura 37** - Cromatogramas em 270 nm da fração CH<sub>3</sub>OH do extrato de semente de cupuacu (linha azul) e deste adicionado de epicatequina (linha vermelha).

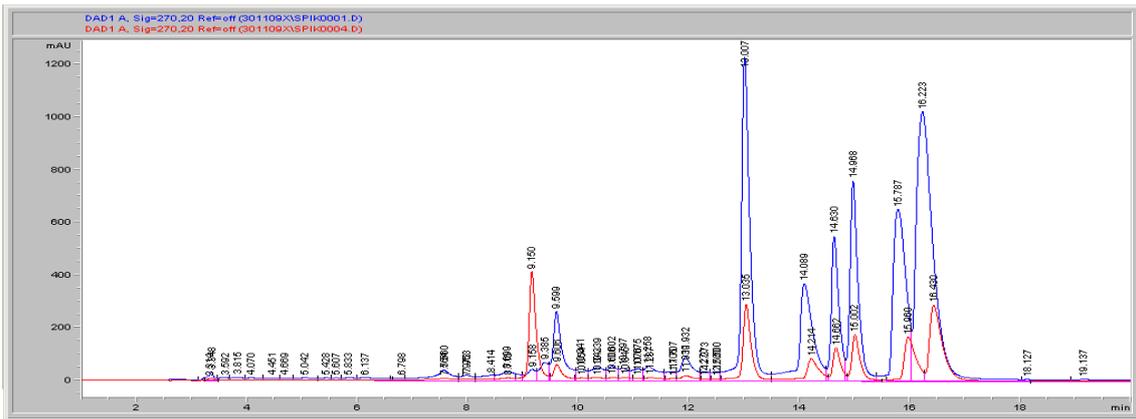


**Figura 38** - Cromatogramas em 270 nm da fração CH<sub>3</sub>OH do extrato de semente de cupuacu (linha azul) e deste adicionado de quercetina (linha vermelha).

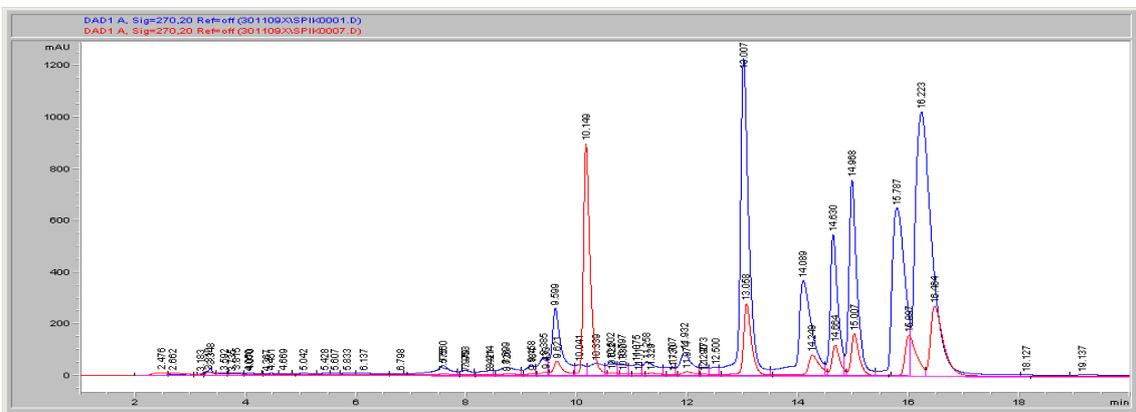


**Figura 39** - Cromatogramas em 270 nm da fração CH<sub>3</sub>OH do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de rutina (linha vermelha).

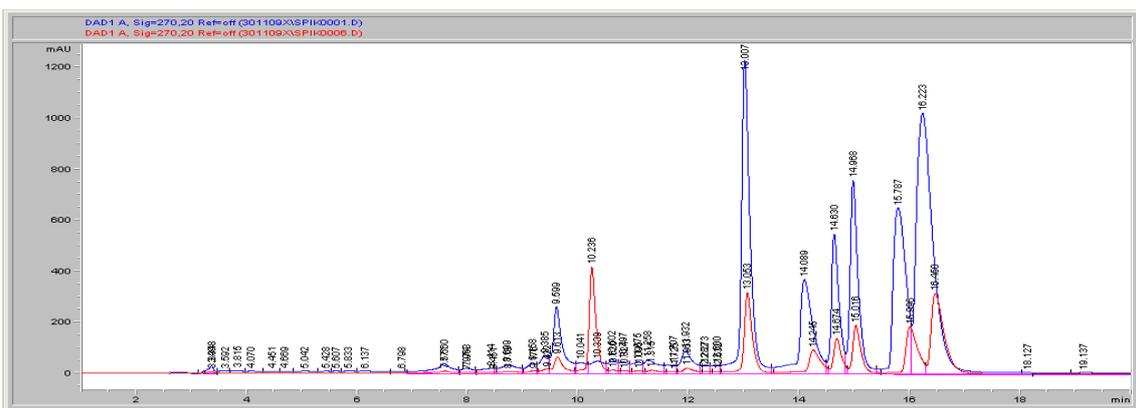




**Figura 42** - Cromatogramas em 270 nm da fração CH<sub>3</sub>OH : NH<sub>4</sub> do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de orientina (linha vermelha).



**Figura 43** - Cromatogramas em 270 nm da fração CH<sub>3</sub>OH : NH<sub>4</sub> do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de isovitexina (linha vermelha).



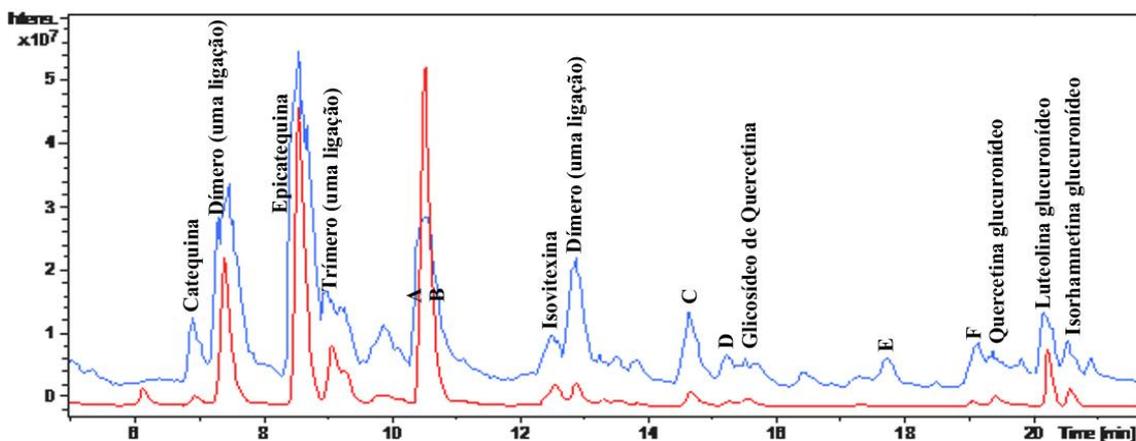
**Figura 44** - Cromatogramas em 270 nm da fração CH<sub>3</sub>OH : NH<sub>4</sub> do extrato de semente de cupuaçu (linha azul) e deste adicionado de vitexina (linha vermelha).

Por último, foram analisados o peso molecular e o padrão de fragmentação dos compostos por espectro de massas. O solvente composto por água : tetraidrofurano : ácido trifluoroacético (97,9: 2 : 0,1), utilizado inicialmente na avaliação por UV no HPLC, foi substituído por água : ácido fórmico (99,9 : 0,1) para não danificar a tubulação utilizada no LCMS. A coluna utilizada foi a mesma (Prodigy, Phenomemex). A separação dos compostos obtido no LCMS (**Figuras 45 e 46**) foi semelhante àquela obtida inicialmente no HPLC (**Figuras 26 e 27**). As **Tabelas 20 e 21** mostram os íons obtidos, seu padrão de fragmentação e a abundância relativa de cada um deles. Os espectros de massa de cada um destes íons encontram-se em **Anexos** (ítem 7).

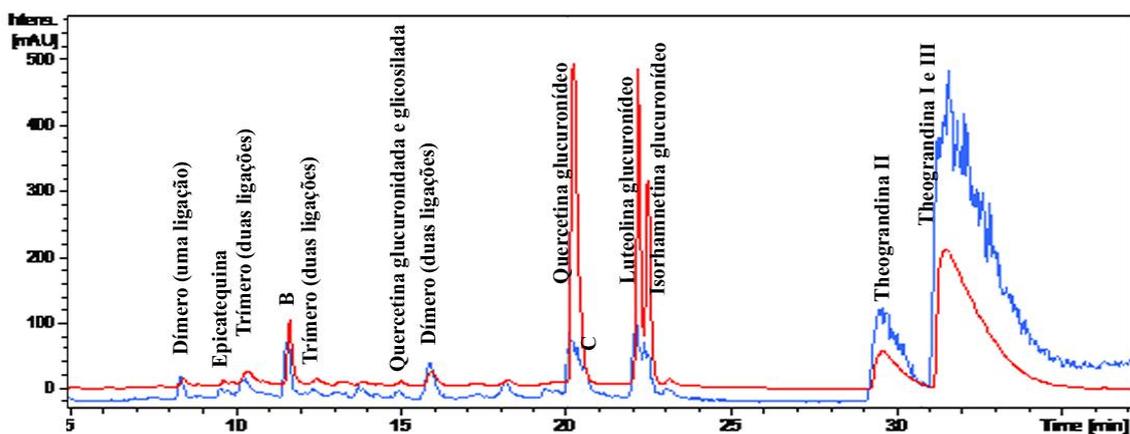
Comparando estes dados com os da literatura (SÁNCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2003; ORTEGA, *et al.*, 2008; CALDERÓN, *et al.*, 2009; MASSBANK, 2010; DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS, 2010; PHENOL-EXPLORER, 2010), confirmou-se a identidade dos compostos encontrados. Catequina e epicatequina foram quantificados utilizando-se uma curva de calibração de padrões comerciais de (+)-catequina e (-)-epicatequina, respectivamente.

A banda em 7,1 min (tempo referente aos cromatogramas das **Figuras 26 e 27**) foi confirmada como sendo um dímero; o composto em 9 min, como sendo um trímero. Ambos os compostos foram quantificados como mg equivalentes de (+)-catequina.

O espectro de massas evidenciou, ainda, diferentes tipos de dímero e trímero. Na fração metanol, somente foram identificados os dímeros e trímeros com uma única ligação entre cada subunidade. A relação  $m/z$  destes é de 578 e 866, respectivamente. Na fração metanol – amônia, foi possível identificar dímeros com duas ligações entre cada subunidade, dímeros da família A, tendo uma relação  $m/z$  de 576. Ainda na fração metanol – amônia, foram identificados trímeros com duas e até três ligações a mais, apresentando relação  $m/z$  de 864 e 862.



**Figura 45** - Cromatograma em 270 nm (linha vermelha) e espectro de massas TIC (linha azul) da fração CH<sub>3</sub>OH do extrato de semente de cupuaçu.



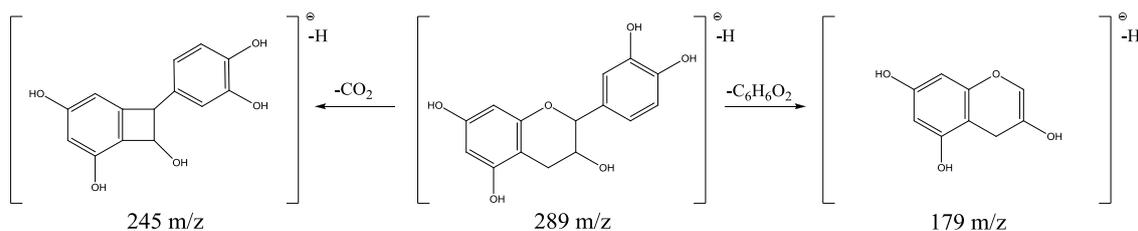
**Figura 46** - Cromatograma em 270 nm (linha vermelha) e espectro de massas TIC (linha azul) da fração CH<sub>3</sub>OH : NH<sub>4</sub> do extrato de semente de cupuaçu.

A banda em 13 min (fração metanol - amônia) foi identificada como sendo o composto quercetina glucuronídeo. A banda em 12 min (fração metanol), que havia apresentado 99,7% de semelhança com o padrão de quercetina rutinosídeo, pode referir-se a dois compostos detectados no LCMS: a própria quercetina glucuronídeo ou a uma quercetina ligada a uma pentose. Devido a essa incerteza, a área da banda em 13 min (fração metanol – amônia) não foi adicionada à da banda em 12 min (fração metanol), quando do cálculo da massa de quercetina glucuronídeo. Este composto foi quantificado como mg equivalentes de quercetina rutinosídeo.

Os compostos em 14,6 min e 15 min foram identificados como sendo os compostos luteolina glucuronídeo e isorhamnetina glucuronídeo, respectivamente. Estes glucuronídeos de flavona foram quantificados como mg equivalentes de homorientina, que também é um flavona ligada a um açúcar.

O composto em 16,2 min foi identificado como theograndina II. Esta flavona, assim como a theograndina I, foi detectada na semente do cupuaçu e descrita pela primeira vez por YANG e colaboradores (2003). A banda em 16,7 min é uma mistura da theograndina I com uma terceira forma de theograndina. Este outro composto apresenta fragmentação semelhante à da theograndina II e possui uma diferença de 14 m/z com esta, sugerindo que seja uma forma metilada da theograndina II. Tal composto não foi encontrado na literatura. A banda em 16,2 min (theograndina I) e em 16,7 min (theograndina I e theograndina metilada) foram quantificados como mg equivalentes da flavona homorientina. As **Figuras 47 até 54** mostram as estruturas dos íons formados dos principais compostos identificados.

Os compostos, nomeados nas **Tabelas 20 e 21** como “A”, “B”, “C”, “D” e “E”, não foram identificados. Não foi encontrado nenhum composto com fragmentação semelhante. Os compostos A e B surpreendem por possuir massa molar ímpar. Massa ímpar, no estudo dos espectros de massas, costuma ser indicativo da presença de nitrogênio. Não foi encontrado na literatura, porém, qualquer flavonóide ou ácido fenólico de massa ímpar.



**Figura 47** – Fragmentação proposta para o ânion da catequina e da epicatequina.

**Tabela 20** – Compostos identificados por LCMS/MS, modo negativo, seu tempo de retenção em minutos ( R), massa molar (Mr), fragmentação no MS2 e abundância relativa (%). Fração metanol do extrato de semente de cupuaçu.

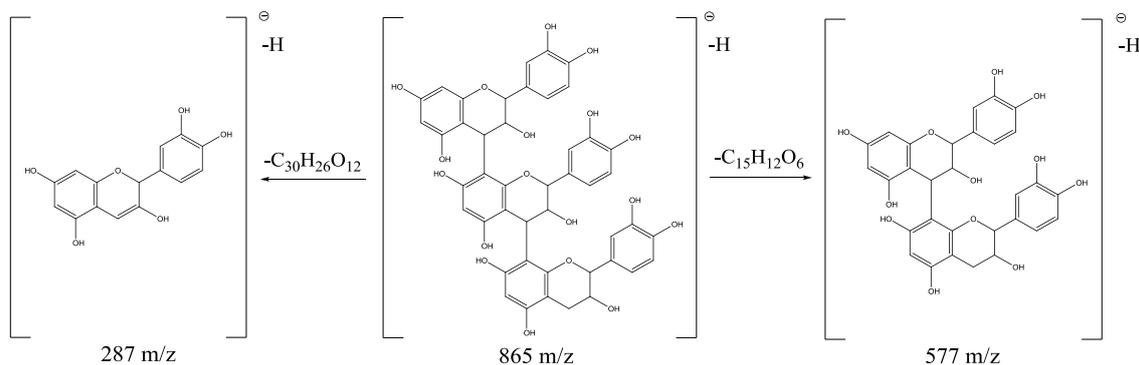
Composto	R (min)	Mr	Íons MS/MS (m/z (abundância relativa, %))
Catequina	7,0	290	288,9 (53,1); 244,9 (100); 230,9 (14,2); 204,9 (42,7); 202,9 (15,9); 178,9 (14,5)
Dímero (uma ligação)	7,5	578	577,3 (<0,1); 451 (26); 424,9 (100); 407 (80,5); 289 (20,3)
Epicatequina	8,6	290	288,9 (44,3); 244,9 (100); 230,9 (9,3); 204,9 (25,3); 202,9 (7,9); 178,9 (4,6)
Trímero (uma ligação)	9	866	865,5 (<0,1); 739 (30,7); 713 (35) 695,1 (100); 577 (63,5); 543 (29,7); 407 (37,6); 287 (40,5)
"A"	10,6	359	358,1 (<0,1); 314 (5,3); 222,9 (6,5); 221,9 (100); 178,9 (9); 177,9 (43,6); 160,9 (6,3); 134,9 (2,2)
Isovitexina	12,5	432	431,1 (0,9); 412,9 (2,9); 352,9 (2,1); 341,8 (3,0) 340,9 (26,5); 312,0 (21,1); 310,9 (100); 282,9 (7,4)
Dímero (uma ligação)	12,8	578	577,3 (<0,1); 450,9 (18,4); 425 (100); 407 (83,4); 288,9 (17,2); 286,9 (17,1)
"B"	14,6	373	372,3 (<0,1); 328 (10,4); 235,9 (71,2); 221,9 (100); 177,9 (68,9); 174,9 (11,4)
"C"	15,3	436	435,2 (<0,1); 398,8 (2,4); 356,9 (1,9); 345 (13,5); 315,9 (1,1); 315 (100); 208,9 (1,3)
Quercetina ligada a pentose	15,6	434	433,3 (<0,1); 432,9 (4,6); 301,9 (14,5); 300,9 (100); 300,0 (96,2); 178,8 (2,5); 150,8 (2,6)
"D"	17,6	838	837 (<0,1); 792,3 (0,5); 791,3 (27,7); 790,5 (100)
Luteolina ou caempferol ligado a hexose	19	448	447,2 (<0,1); 446,9 (0,2); 285 (11,1), 284,9 (100); 241 (0,7)
"E"	19,1	951	950,1 (<0,1); 904,5 (31,3); 903,6 (100)
Quercetina glucuronídeo	19,4	478	477,1 (<0,1); 458,7 (0,7); 414,8 (1,6); 370,9 (0,5); 301,9 (6,8); 300,9 (100); 174,9 (0,1)
Luteolina glucuronídeo	20,2	462	461,2 (<0,1); 398,9 (1,1); 285,9 (15,2); 284,9 (100); 174,8 (0,9)
Isorhamnetina glucuronídeo	20,6	492	491,2 (<0,1); 315,9 (11,2); 314,9 (100); 300,9 (2,6); 299,9 (12,3); 174,9 (1,6)

**Tabela 21** – Compostos identificados por LCMS/MS, modo negativo, seu tempo de retenção em minutos (tr), massa molar (Mr), fragmentação no MS2 e abundância relativa (%). Fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu.

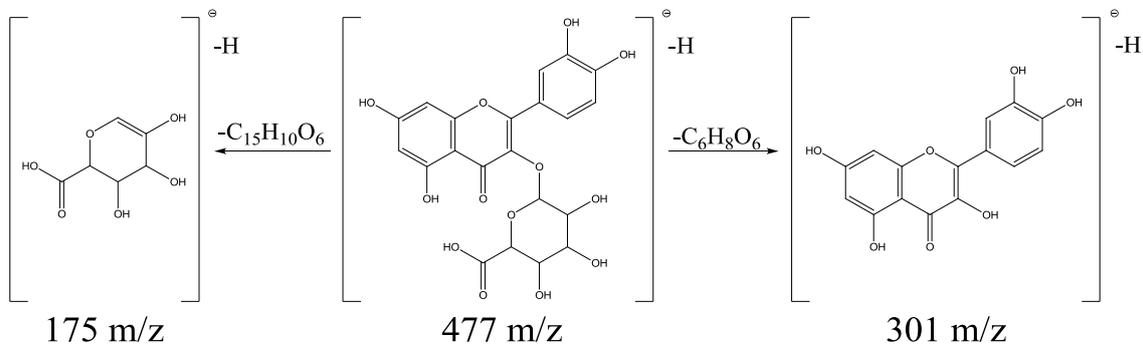
Composto	tr (min)	Mr	MS/MS íons (m/z (abundância relativa, %))
Dímero (uma ligação)	8,3	578	577,2 (<0,1); 559 (9,1); 451 (21,1); 425 (100); 407,9 (6,4); 407 (90,9); 298,9 (12,1); 289 (15,1); 245 (6,3)
Epicatequina	9,6	290	288,9 (36,3); 245,9 (10,1); 245 (100); 230,9 (10,8); 204,9 (25,6); 202,9 (16,6); 178,9 (9,4)
Trímero (duas ligações)	10,4	864	863,6 (<0,1); 712 (22,3); 711 (100); 693,1 (28,3); 573 (31,5); 559 (33,4); 451 (36,8); 411 (46,5); 298,9 (22,4); 289 (18,5)
"A"	11,6	359	358,1 (<0,1); 314 (4,1); 254,8 (3,5); 222,3 (3,9); 221,9 (100); 177,9 (44,2); 161 (3,4); 160,8 (3,4); 160 (6,7)
Trímero (duas ligações)	12,4	864	863,3 (<0,1); 712 (26,6); 711 (100); 694,1 (14,8); 693 (38,2); 573,1 (9,8); 559 (49,2); 541 (13,7); 451 (25); 412,1 (13,1); 411 (46,7); 299 (9,7)
Trímero (duas ligações)	13,2	864	863,3 (<0,1); 737,1 (8,3); ; 712 (13,8); 711 (74,7); 693,9 (8,5); 693 (33,2); 576 (18,8); 575 (100); 423 (7,4)
Dímero (duas ligações)	13,7	576	575,1 (<0,1); 539 (7,3); 448,9 (17,3); 447,9 (1,7); 422,9 (100); 411 (13,5); 407 (9,5); 289 (5,4); 284,9 (10,2)
Quercetina glucuronídeo e glicosídeo	14,9	640	639,3 (<0,1); 621 (6,2); 477,9 (6,4); 476,9 (42,4); 464 (8,6); 463 (57,2); 301,9 (8,7); 300,9 (100)
Dímero (duas ligações)	15,9	576	575,3 (<0,1); 448,9 (22,6); 422,9 (100); 411 (9,6); 407 (9); 312,9 (8,2); 288,9 (5); 286,9 (7); 284,9 (8,2)
Trímero (três ligações)	17,4	862	861,4 (<0,1); 825 (20,5); 738 (25,1); 735 (100); 700,1 (17,6); 693 (15,6); 575,1 (44,2); 571,9 (16,1); 571 (44,4); 449 (26,3)
Dímero (duas ligações)	18,2	576	575 (<0,1); 557 (28); 539 (28,7); 451,9 (16,9); 449 (88,1); 435 (15,4); 423 (100); 407 (32,5); 327 (14,6); 288,9 (23,4); 284,9 (19)
Trímero (três ligações)	19,4	862	861,4 (<0,1); 825 (48,3); 739,1 (31,2); 738,1 (25,9); 736 (20,5); 735,1 (100); 575 (75,3); 571 (78,8); 449 (40,5); 285 (46,9)
Quercetina glucuronídeo	20,2	478	477,2 (<0,1); 458,9 (1,2); 301,9 (9,3); 300,9 (100); 258,9 (1,8)
"B"	20,6	951	950,2 (<0,1); 905,2 (1); 904,4 (32,9); 903,6 (100)

**Tabela 21 (continuação)** – Compostos identificados por LCMS/MS, modo negativo, seu tempo de retenção (tr), massa molar (Mr), fragmentação no MS2 e abundância relativa (%). Fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu.

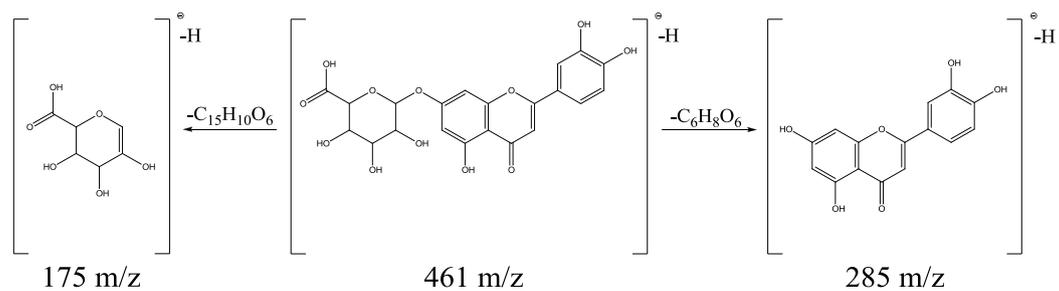
Composto	tr (min)	Mr	MS/MS íons (m/z (abundância relativa, %))
Luteolina glucuronídeo	22,1	462	461,2 (<0,1); 398,9 (0,8); 285,9 (8,3); 284,9 (100); 215,9 (1,1)
Isorhamnetina glucuronídeo	22,4	492	491,2 (<0,1); 315,9 (12); 315,6 (1,4); 314,9 (100); 300,9 (0,6); 299,9 (6,8); 174,8 (1,2)
Theograndina II	29,5	558	557,2 (<0,1); 477,9 (19,2); 476,9 (100); 476,5 (7,8); 380,9 (4,7); 301,9 (3,7); 300,9 (13,1); 255,8 (3,8); 254,8 (80,2); 174,9 (2,2)
Theograndina II metilada	31,5	572	571,1 (<0,1); 491,9 (2,5); 490,9 (53,9); 394,8 (2,8); 316 (2,5); 314,9 (6); 255,9 (2,1); 254,8 (100); 174,8 (4,3)
Theograndina I	31,5	542	541,1 (<0,1); 460,9 (5,5); 285,9 (1,3); 284,9 (5,2); 255,8 (2,4); 254,8 (100); 210,8 (0,3); 175,7 (0,4)



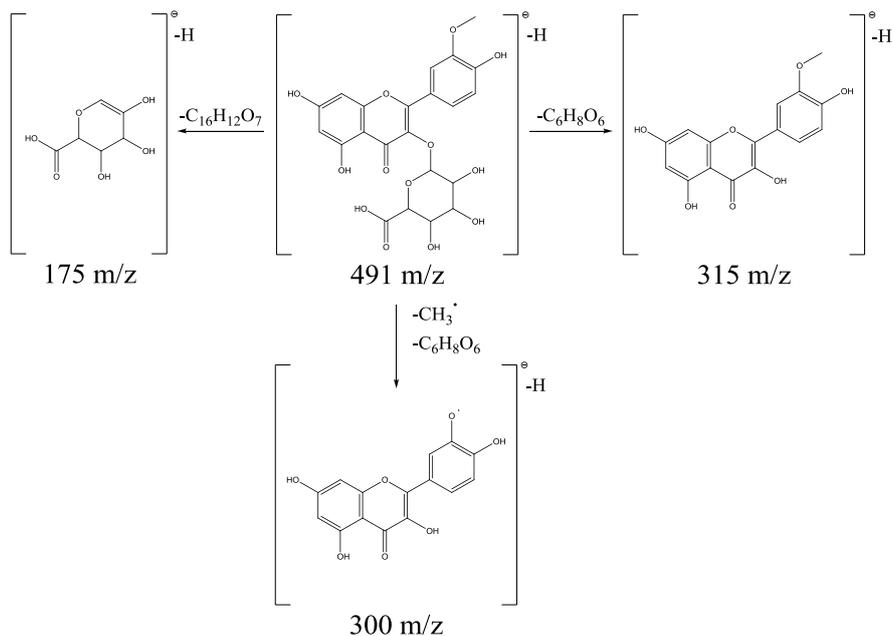
**Figura 48** - Fragmentação proposta para o ânion de um trímero (uma ligação).



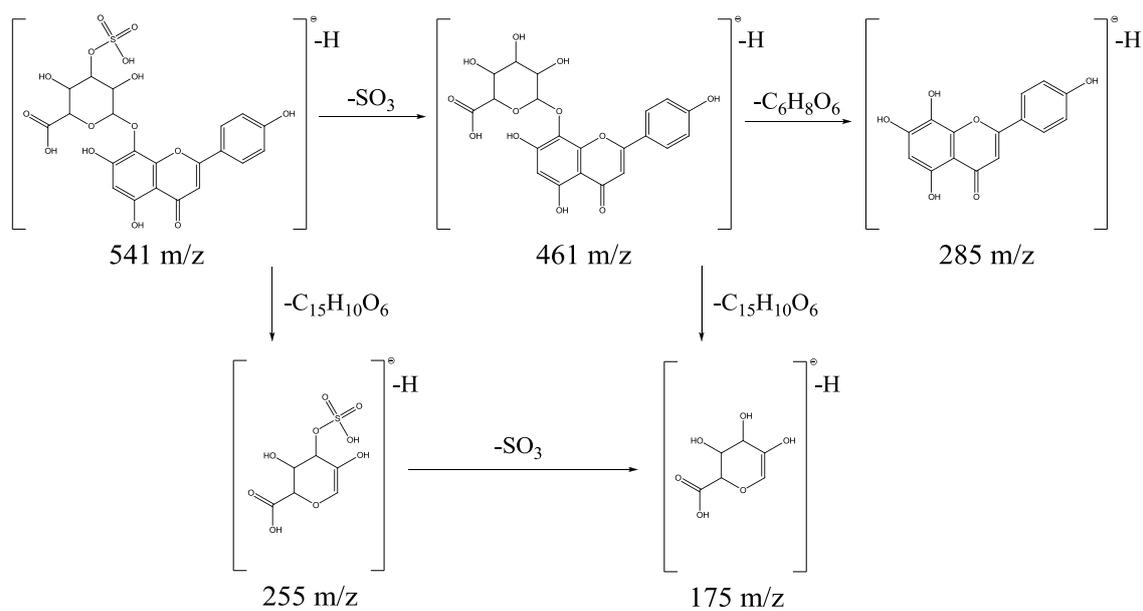
**Figura 49** - Fragmentação proposta para o ânion da quercetina glucuronídeo.



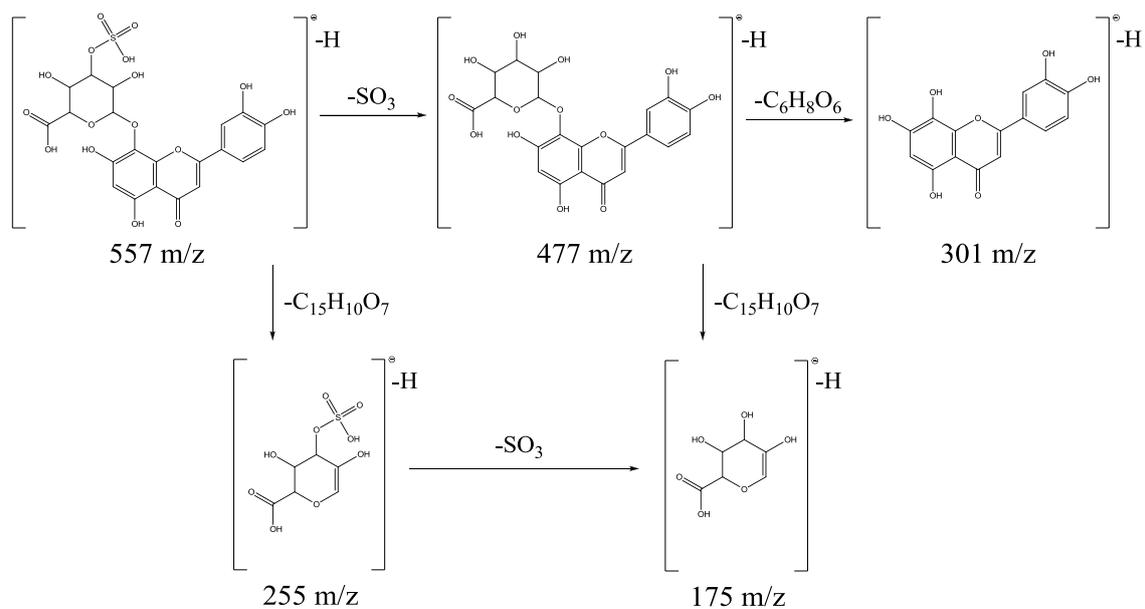
**Figura 50** - Fragmentação proposta para o ânion da luteolina glucuronídeo.



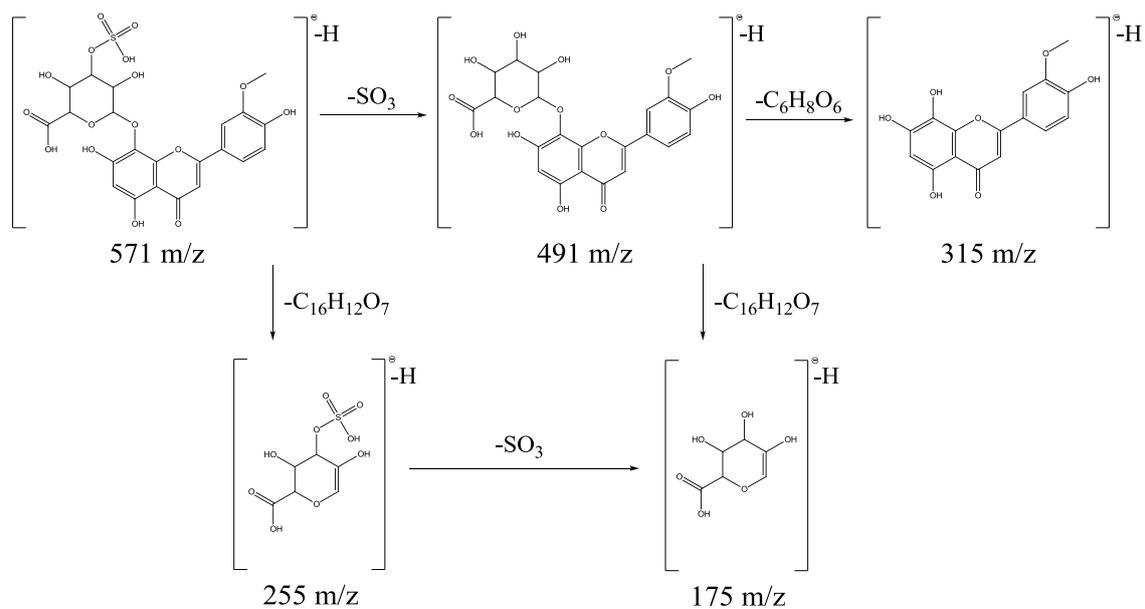
**Figura 51** - Fragmentação proposta para o ânion da isorhamnetina glucuronídeo.



**Figura 52** - Fragmentação proposta para o ânion da theograndina I.



**Figura 53** - Fragmentação proposta para o ânion da theograndina II.



**Figura 54** - Fragmentação proposta para o ânion da theograndina II metilada.

#### 4.5.2.4. Quantificação de flavonóides

Com relação à análise quantitativa dos compostos detectados (**Tabela 22**), polpas frescas e congeladas, em sua maioria, apresentaram semelhança estatística ( $p < 0,05$ ) entre os teores destes compostos. Os teores das sementes frescas, pelo contrário, diferiram-se estatisticamente entre si, especialmente a de maio de 2008, e entre estes e os teores das polpas frescas e congeladas.

Avaliando os teores de flavonóides da semente fresca, semente fermentada (e seca), semente torrada, líquido e cupulate (**Tabela 23**), observou-se que a semente fresca é a amostra que mais se difere estatisticamente das demais. Assim, a etapa de fermentação e secagem é a que mais alterou o conteúdo de flavonóides no processo produtivo do cupulate. Contudo, se avaliarmos somente o teor de flavonóis (quercetina glucuronídeo) e de flavonas (luteolina glucuronídeo, isorhamnetina glucuronídeo e theograndina I, II e III) durante o processo produtivo, pode-se verificar que não houve um decréscimo significativo destes, como o que foi observado para os flavan-3-óis. Esta diferença se deve ao fato de que somente os flavan-3-óis, em sua maioria, se condensam na forma de taninos insolúveis de alta massa molecular (HAGERMAN, 2009).

KIM *et al.* (1984) avaliou o teor de fenólicos do cacau e os efeitos de seu processamento com base na quantidade de (-)-epicatequina. Este autor afirma que resta apenas 10-20 % do teor inicial deste composto ao término da fermentação. Este decréscimo também foi observado nos flavan-3-óis quantificados do cupuaçu (catequina, epicatequina, dímero e trímero). A semente fermentada, por exemplo, apresenta apenas 12 % da quantidade inicial de epicatequina. Como se vê, o processo fermentativo afeta ao cupuaçu de mesmo modo que ao cacau.

**Tabela 22** - Flavonóides (mg/100 g de amostra b.s.) de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais.

Amostra	mg/100 g de amostra (b.s.)			
	Catequina	Epicatequina	Dímero	Trímero
Polpa Maio/08	3,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	n.d.
Polpa Ago/08	2,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	10,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	n.d.
Polpa Fev/09	2,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	n.d.
Semente Maio/08	46 ± 3 <sup>b</sup>	190 ± 10 <sup>b</sup>	65 ± 1 <sup>b</sup>	18 ± 1 <sup>a</sup>
Semente Ago/08	56 ± 4 <sup>c</sup>	283 ± 25 <sup>c</sup>	84 ± 6 <sup>c</sup>	63 ± 5 <sup>b</sup>
Semente Fev/09	58 ± 5 <sup>c</sup>	264 ± 24 <sup>c</sup>	83 ± 4 <sup>c</sup>	41 ± 2 <sup>c</sup>
Polpa comercial A	0,54 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,06 <sup>a</sup>	n.d.
Polpa comercial B	0,87 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	n.d.
Polpa comercial C	0,56 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,05 <sup>a</sup>	n.d.

n.d. - não detectado. Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 22 (continuação)** - Flavonóides (mg/100 g de amostra b.s.) de polpas e sementes de cupuaçu e de suas polpas comerciais.

Amostra	mg/100 g de amostra (b.s.)				
	Quercetina glucuronídeo	Luteolina glucuronídeo	Isorhamnetina glucuronídeo	Theograndina II	Theograndina I e II metilada
Polpa Maio/08	2,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,99 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Polpa Ago/08	11 ± 1 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	0,61 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Polpa Fev/09	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,85 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Semente Maio/08	31 ± 3 <sup>c</sup>	20 ± 2 <sup>b</sup>	8,4 ± 0,5 <sup>d</sup>	25 ± 2 <sup>b</sup>	11 ± 1 <sup>b</sup>
Semente Ago/08	71 ± 2 <sup>d</sup>	26 ± 1 <sup>c</sup>	33 ± 1 <sup>e</sup>	30 ± 2 <sup>c</sup>	51 ± 5 <sup>c</sup>
Semente Fev/09	85 ± 5 <sup>e</sup>	24 ± 1 <sup>d</sup>	27 ± 1 <sup>f</sup>	32 ± 1 <sup>d</sup>	57 ± 5 <sup>d</sup>
Polpa comercial A	0,78 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>
Polpa comercial B	0,65 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>
Polpa comercial C	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,67 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>a</sup>

n.d. – não detectado. Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 23** - Flavonóides (mg/100 g de amostra b.s.) da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate.

Amostra	mg/100 g de amostra (b.s.)			
	Catequina	Epicatequina	Dímero	Trímero
S Fresca*	54 ± 4 <sup>a</sup>	246 ± 20 <sup>a</sup>	77 ± 4 <sup>a</sup>	41 ± 3
S Ferm	7,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	31 ± 2 <sup>b</sup>	19 ± 1 <sup>b</sup>	n.d.
S Torra	3,9 ± 0,3 <sup>c</sup>	23 ± 2 <sup>b</sup>	13 ± 1 <sup>c</sup>	n.d.
Líquor	3,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	24 ± 1 <sup>b</sup>	15 ± 1 <sup>c</sup>	n.d.
Cupulate	3,6 ± 0,3 <sup>c</sup>	17 ± 1 <sup>b</sup>	8,6 ± 0,5 <sup>d</sup>	n.d.

\* Média das sementes Maio/08, Agosto/08, Fevereiro/09. n.d. – não detectado. Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 23 (continuação)** - Flavonóides (mg/100 g de amostra b.s.) da semente fresca de cupuaçu, dos intermediários de produção e do cupulate.

Amostra	mg/100 g de amostra (b.s.)				
	Quercetina glucuronídeo	Luteolina glucuronídeo	Isorhamnetina glucuronídeo	Theograndina II	Theograndina I e II metilada
S Fresc*	63 ± 4 <sup>a</sup>	23 ± 1 <sup>a</sup>	23 ± 1 <sup>a</sup>	29 ± 2 <sup>a</sup>	40 ± 4 <sup>a</sup>
S Ferm	59 ± 5 <sup>a</sup>	21 ± 2 <sup>ab</sup>	15 ± 1 <sup>b</sup>	27 ± 2 <sup>ab</sup>	39 ± 3 <sup>ab</sup>
S Torra	48 ± 4 <sup>b</sup>	21 ± 2 <sup>ab</sup>	12 ± 1 <sup>c</sup>	21 ± 1 <sup>c</sup>	30 ± 3 <sup>c</sup>
Líquor	58 ± 3 <sup>a</sup>	26 ± 1 <sup>c</sup>	16 ± 1 <sup>b</sup>	26 ± 2 <sup>b</sup>	43 ± 4 <sup>a</sup>
Cupulate	43 ± 2 <sup>b</sup>	20 ± 1 <sup>b</sup>	12 ± 1 <sup>c</sup>	21 ± 1 <sup>c</sup>	33 ± 2 <sup>bc</sup>

\* Média das sementes Maio/08, Agosto/08, Fevereiro/09. Valores na mesma coluna com letras diferentes são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

O composto encontrado em maior quantidade foi a epicatequina, como ocorre com o cacau (KIM *et al.*, 1984). Os teores de dímeros, da catequina, da quercetina glucuronídeo e de trímeros, nesta ordem, também se destacaram frente aos demais compostos avaliados.

Alguns dos flavonóides encontrados no cacau, como a cianidina (ORTEGA *et al.*, 2008), não são encontrados no cupuaçu, e alguns dos flavonóides encontrados neste, como a Theograndina I e II (YANG *et al.*, 2003), não são encontrados naqueles. Ainda assim, grandes semelhanças existem na composição de flavonóides destes frutos. Tais similaridades, somadas à proximidade filogenética destes frutos de mesmo gênero, sugerem semelhanças no metabolismo secundário destas espécies.

Por fim, já foi verificado por análise sensorial que o cupulate possui sabor menos amargo que o chocolate (QUEIROZ *et al.*, 2000). Pode-se supor que o baixo teor de fenólicos do cupuaçu frente ao cacau (conforme visto no item 4.5.1.) é o que faz do cupulate ser naturalmente menos amargo que o chocolate. Assim, poder-se-ia reduzir o tempo de fermentação das sementes de cupuaçu, pois ela não precisa perder tanto de sua adstringência e amargor (MORORÓ, 2007). Tal procedimento evitaria a perda de fenólicos e tornaria o cupulate mais semelhante sensorialmente ao chocolate.

## 5. CONCLUSÕES

As amostras frescas de polpa de cupuaçu apresentaram características similares ao longo do ano quanto à sua composição centesimal, teor de ácido ascórbico, capacidade antioxidante, teor de fenólicos totais, proantocianidinas totais e flavonóides, favorecendo a sua industrialização.

As polpas comerciais também apresentaram regularidade entre as distintas marcas quanto aos atributos supracitados, sugerindo procedimentos semelhantes na cadeia de processamento do cupuaçu entre as distintas indústrias. Possivelmente devido a este tratamento, estes valores foram inferiores aos da polpa *in natura*. Todas as polpas, processadas ou não, apresentaram alta atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase. Assim, este trabalho confirmou a potencial qualidade biológica da polpa de cupuaçu.

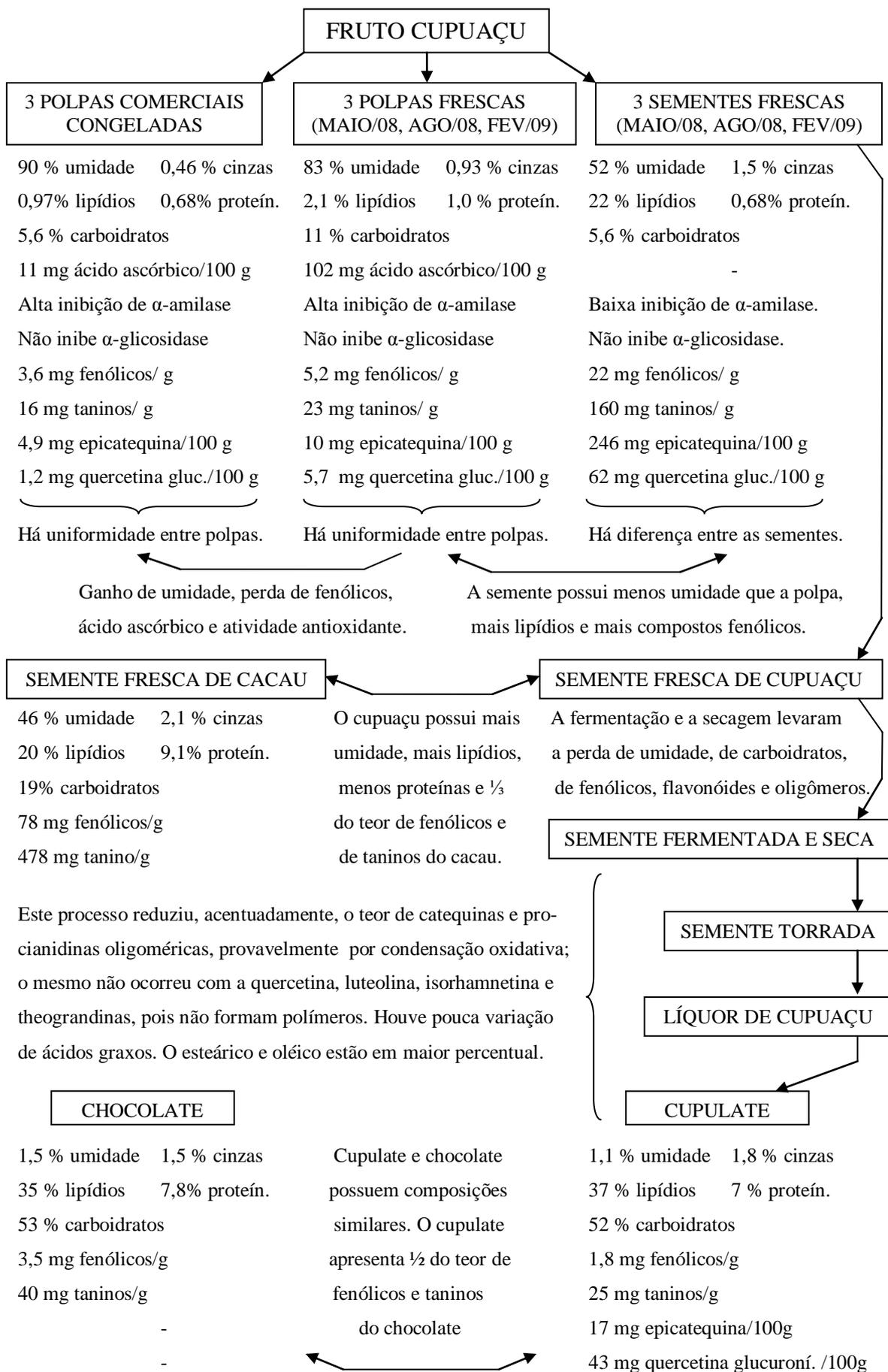
Em termos de quantidade de polifenólicos, a polpa apresentou menor teor que a semente, e esta ainda maior percentual de proantocianidinas. O cupuaçu, no entanto, possui sementes com  $\frac{1}{3}$  do teor de polifenólicos e taninos que as sementes do cacau.

Durante o processamento da semente de cupuaçu até o líquido, observou-se uma grande perda de umidade, redução de carboidratos e aumento de lipídios. O processo de fermentação e secagem foi a etapa responsável pela maior decréscimo dos teores de fenólicos totais, capacidade antioxidante, flavonóides e proantocianidinas oligoméricas solúveis, tal como relatado para o processamento do cacau. O cupulate apresentou  $\frac{1}{2}$  do teor de fenólicos, taninos e atividade antioxidante quando comparado ao chocolate.

Os produtos da semente de cupuaçu e cacau, cupulate e chocolate, apresentaram composições centesimais semelhantes entre si. Os ácidos graxos presentes em maior quantidade no cupuaçu foram o oléico, o esteárico, o palmítico e o eicosanóico, com composição semelhante à do cacau.

O flavonóide encontrado em maior quantidade no cupuaçu foi a epicatequina, tal como ocorre no cacau. Foi possível detectar catequina, epicatequina, theograndinas e os glucuronídeos de quercetina, luteolina e isorhamnetina. O processamento das sementes de cupuaçu diminuiu especialmente os teores de flavanóis e oligômeros. Identificaram-se de monômeros até decâmeros na semente fresca, e somente até tetrâmeros no líquido.

O cupulate, assim como o chocolate, mas em menor grau, é um potencial promotor da saúde. Sua produção é uma boa estratégia financeira ao empresário no aproveitamento das sementes do cupuaçu, um subproduto das polpas congeladas.



**Figura 55** – Esquema ilustrativo do cupuaçu, cacau, cupulate, chocolate e do processamento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, G.E.; LAZARUS, S.A.; MITCHELL, A.E.; PRIOR, R.L.; CAO, G.; JACOBS, P.H.; KREMERS, B.G.; HAMMERSTONE, J.F.; RUCKER, R.B.; RITTER, K.A.; SCHMITZ, H.H. Hplc method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, 4184-4188, 1999.

AERTS, R.J.; BARRY, T.N., MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages, **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.75, 1-12, 1999.

AL-AZZAWIE, H.F.; ALHAMDANI, M-S.S. Hypoglycemic and antioxidant affect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v.76, p.1371-1377, 2006.

ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, n.3, p.449-455, 2006.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.I; SHETTY, K. Potential of select yogurts for diabetes and hypertension management, **Journal of Food Biochemistry**, v.30, p.699-717, 2006.

ARABBI, PR; GENOVESE, MI; LAJOLO, FM. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1124-1131, 2004.

ARAGÃO, C. G. **Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) durante o processo fermentativo**. Manaus, 1992. 175 p. Tese (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

ARON, P.M.; KENNEDY, J.A. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition Food Research**, v.52, p.79-104, 2008.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Method 996.06, 2002.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis of AOAC international**. Methods 931.04 (moisture), 972.15 (ashes), 963.15 (lipids), 970.22 (nitrogen), 18<sup>th</sup> edition, 2005.

ASEP, E.K.; JINAP, S.; TAN, T.J.; RUSSLY, A.R.; HARCHARAN, S.; NAZIMAH, S.A.H. The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on supercritical fluid extraction of cocoa butter. **Journal of Food Engineering**, v.85, p. 450-458, 2008.

AZIZAH, A.H.; NIK RUSLAWATI, N.M.; SWEE TEE, T. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chemistry**, v.64(2), p.199-202(4), 1999.

BIEHL, B. Veränderungen der subcellulären struktur in Keim-blättern von kakaosamen (*Theobroma cacao* L.) während der fermentation und trocknung. **Zeitschrift fuer lebensmitteln-untersuchung und forschung**, v. 153, 137-150, 1973.

BISCHOFF, H.; PULS, W.; KRAUSE, H.P.; SHUTT, H.; THOMAS, G.. Pharmacological properties of the novel glucosidase inhibitors BAY m 1099 (miglitol) and BAY o 1248. **Diabetes Research Clinical Practice**, v.1, p.53-57, 1985.

BISCHOFF, H. Pharmacology of  $\alpha$ -glucosidase inhibition. **European Journal of Clinical Investigation**, v.24, p.3-10, 1994.

BRACCO, U.; GRAILHE, N.; ROSTANGO, W.; & EGLI, R. Analytical evaluation of cocoa curing in the Ivory Coast, **Journal of the science of food and agriculture**, v.20, 713-717, 1969.

BRACCO, U. Effect of triglyceride structure on fat absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 1002S-1009S, 1994.

BRASIL. Ministério Público Federal. **Lei número 11.675, de 19 de maio de 2008**. Procuradoria da República do Pará, 03 de novembro de 2008. Acesso em 18 de maio de 2010. Disponível em <http://www.prpa.mpf.gov.br/setorial/biblioteca/legislacao/lei-n-11-675-de-19-de-maio-de-2008>.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Aprova os regulamentos técnicos para a fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa das seguintes frutas: acerola, cacau, cupuaçu, graviola, açaí, maracujá, caju, manga, goiaba, pitanga, uva, mamão, cajá, melão e mangaba. **Instrução Normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000**. Diário Oficial da União de 10 de janeiro de 2000 , Seção 1 , Página 54. Acesso em 02 de março de 2010. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7777>.

BREINHOLT, V. Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids. In: Kumpulainen, J., Salonen, J.E. (Eds.), **Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 93–105, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT, Food Science and Technology**, v.28(1), p.25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, **Nutrition Reviews**, v 56(11), 317-333, 1998.

BUENO, S. M.; LOPES, M.R.V.; GRACIANO, R.A.S.; FERNÁNDEZ, E.C.B.; GARCIA-CRUZ, C.H. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revistas do Instituto Adolfo Lutz**, v.62(2), p.121-126, 2002.

BURNS, R.E. Methods of Tannin Analysis for Forage Crop Evaluation. **Georgia Agriculture Experiment Station**, 1963.

BURNS, R.E. Method for estimation of tannin in grain sorghum. **Agronomy Journal**, v.63, p.511-512, 1971.

CALDERON, A.I.; WRIGHT, B.J.; HURST, W.J.; BREEMEN, R.B. Screening antioxidants using LC-MS: case study with cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.5693-5699, 2009.

CALZAVARA, B.B.G.; MÜLLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.C. **Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro**. Cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. EMBRAPA – CPATU. Documentos, 32. 101p., 1984.

CARVALHO, A.V. **Extração, concentração e caracterização físico-química e funcional das proteínas de semente de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2004.

CARVALHO, J.E..U.; MULLER, C.H.; BENCHIMOL, R.L.; KATE, A.K.; ALVES, R.M. **Theobroma grandiflorum (Willd. E Spreng.) Schum.: cultivo y utilizacion**. 142p., 1999. Disponível em: <http://www.otca.org/publicação/SPT-TCA-VEN-SN%20copoasu.pdf>. Acesso em: 10 Jan. 2008.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 785 p. Lavras: UFLA, 2005.

COELHO, J.V. **Fenólicos totais e taninos durante o desenvolvimento e o armazenamento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 118f. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

COHEN, K.O.; SOUSA, M.V.; JACKIX, M.N.H. Otimização de processo de temperagem de produto análogo de chocolate ao leite elaborado a partir de amêndoas de cupuaçu (liquor e gordura). **Documentos 196 / Embrapa Amazônia Oriental**, 21 p., 2004.

COHEN, K.O., JACKIX, M.N.H. Estudo do líquido de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.25(1), p.182-190, 2005.

COHEN, K.O., JACKIX, M.N.H. Efeitos do processamento de conchagem nas características físicas e químicas do chocolate ao leite e de produtos análogos. **Documentos 268 / Embrapa Cerrados**, 22 p., 2009.

COMCIÊNCIA. **Notícias. Cupuaçu. 2004**. Disponível em. Acesso em 19 mar. 2008.

COS, P.; DE BRUYNE, N.; HERMANS, N.; APERS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A.J. Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. **Current medicinal chemistry**, v.10, p.1345-1359, 2003.

COOPER, K.A.; DONOVAN, J.L.; WATERHOUSE, A.L.; WILLIAMSON, G. Cocoa and health: a decade of research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 1-11, 2008.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annuary of New York Academy of Science**, v.854, 435, 1998.

CUENCA, M.A.G.; NAZÁRIO, C.C. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros, 2004.

**Importância econômica e evolução da cultura do cacau no Brasil e na região dos tabuleiros costeiros da Bahia entre 1990 e 2002.** Documentos 72.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.48-54, 2004.

DEVASAGAYAM, T.P.A.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radical and antioxidant in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of the Physicians of India**, v. 52, 2004.

DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS. **Search.** Disponível em: <http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=5231067&si=>. Acesso em 01 de fevereiro de 2010.

DIXON, R.A.; XIE, D.Y.; SHARMA, S.B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? **New Phytologist**, v.165, 9-28, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NOVOA, A.V.; LINARES, A.F.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant foods for human nutrition**, v.61, n.4, p.187-192, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p. 350-356, 1956.

DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, J.A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 79–106, 2000.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre, 1998. **Uma visão prospectiva do cupuaçu nos limites do Acre: Vila Nova Califórnia e Extrema, RO.** Circular técnica N° 21.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. **Nutrition Research**, v.24, 695-706, 2004.

ERENEL, G.; ERBAS, D.; ARICIOGLU, A. Free radicals and antioxidant systems. **Materia Medica Polona**, v.1, n.85, p.37-43, 1993.

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

FRANCO, M.R.B.; JANZANTTI, N.S. Aroma of minor tropical fruits. **Journal of Flavor and Fragrance**, v.20, p. 358-371, 2005.

FERREIRA, D.; BEKKER, R. Oligomeric proanthocyanidins: Naturally occurring O-heterocycles. **Natural Products Reports**, v.13, p.411-433, 1996.

FERREIRA, D.; MARAIS, J.P.J.; SLADE, D. Phytochemistry of the mopane, *Colophospermum mopane*, **Phytochemistry**, v.64, 31-51, 2003.

FINELI - Finnish Food Composition Database, 2009. **Chocolate plain.** Disponível em: [www.fineli.fi/index.php?lang=en](http://www.fineli.fi/index.php?lang=en). Acesso em: 02 de maio de 2009.

FINELI - Finnish Food Composition Database, 2009. **Milk chocolate.** Disponível em: [www.fineli.fi/index.php?lang=en](http://www.fineli.fi/index.php?lang=en). Acesso em: 02 de maio de 2009.

FREIRE, M.T.A.; PETRUS, R.R.; FREIRE, C.M.A; OLIVEIRA, C.A.F.; FELIPE, A.M.P.F; GATTI, J.B. Physical-chemical, microbiological and sensory evaluation of frozen cupuaçu pulp (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12(1), p.09-16, 2009.

FRISSE, R. The enrichment of chocolate mass. Comparison and judgement of conching system. **Confectionery Production**, v.51, n.8, p. 429-436, 1985.

GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.3, p.67-69, 2003.

GENOVESE, M.I; LANNES, S.C.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.

GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Phytochemicals and targets of chronic disease. In: **Phytochemicals – a new paradigm**. BIDLACK, W.R.; OMAYE, S.T.; MESKIN, M.S.; JAHNER, D. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1998. **Chemistry**, v. 53, p. 1370-1373, 2005.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, n.11, p.1106-1114, 2000.

GILABERT-ESCRIVÁ, M.V. **Caracterização e seleção de gorduras do gênero *Theobroma* para aplicação tecnológica**. 165p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2002.

GINER-CHAVEZ, B.I.; SOEST, P.J.V.; ROBERTSON, J.B.; LASCANO, C.; REED, J.D.; PELL, A.N. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts

with trivalent Ytterbium. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.74, p.359-368, 1997.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 77p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONÇALVES, A.E.; LAJOLO, F.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.

GUSTAVSON, K.H. Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. **Journal of Polymer Science**, v.12, p. 317 – 324, 2003.

GUYOT, S.; DOCO, T.; SOUQUET, J.M. ; MOUTOUNET, M.; DRILLEAU, j.f. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v.16, p.351-357.

HAGERMAN, A.E. **Tannin Chemistry**. Disponível em: [www.users.muohio.edu/hagermae/](http://www.users.muohio.edu/hagermae/). Acesso em 08 de fevereiro de 2010.

HAMMERSTONE, J.F.; LAZARUS, S.A.; MITCHELL, A.E.; RUCKER, R.; SCHMITZ, H.H. Identification of Procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47(2), p. 490-496, 1999.

HAMMERSTONE, J.F.; LAZARUS, S.A.; SCHMITZ, H.H. Procyanidins content and variation in some commonly consumed foods, **Journal of Nutrition**, v.130, 2086S-2092S, 2000.

HANSEN, C.E.; del OLMO, M.; e BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 77, 273-281, 1998.

HARBORNE, J.B. Insect feeding preferences. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 4<sup>a</sup> ed., cap. 5, p. 128-161, 1997.

HASLAM, E. Taste, bitterness and astringency. **Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action**, cap 4, p.178–225, 1998.

HERRMANN, K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 315–347, 1989.

HERRMANN, K. Bemerkungen zum “Gerbstoff” – Gehalt in Lebensmitteln. **Gordian**, v.94(1-2), 12-14, 1994.

HERRMANN, K. Neuere Erkenntnisse ueber Kakao-inhaltsstoffe. II Catechine und Procyanidine und deren oxidative Kondensation sowie Ballaststoffe der Kakaoschalen, **Gordian**, v.95(9), 141-142, 144, 1995.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAM, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruit commonly consumed in The Netherlands. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.40, p. 2379-2383, 1992.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v.37, p. 937-942, 1999.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.51, p.305-310, 1997a.

HOLLMAN, P.C.H.; VAN TRIJP, J.M.P.; BUYSMAN, M.N.C.P.; GAAG, M.S.; MENGELERS, M.J.B.; DE VRIES, J.H.M.; KATAN, M.B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.418, p. 152-156, 1997b.

HORII, S.; FUKASSE, K.; MATSUO, T.; KAMEDA, K.; ASANO, N.; MASUI, Y. Synthesis and  $\alpha$ -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potent oral antidiabetic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.29, p.1038-1046, 1987.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ISLAM, F.M.A.; RENGIFO, J.; REDDEN, R.J.; BASFORD, K.E.; BEEBE, S.E. Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. **Plant foods for human nutrition**, v.58, p. 285-297, 2003.

ITAL. **Desenvolvimento de recheios para bombons: ingredientes e parâmetros de controle**. Campinas, 1998.

JALIL, A.M.M., ISMAIL, A.; CHONG, P.P.; HAMID, M.; KAMARUDDIN, S.H.S. Effects of cocoa extract containing polyphenols and methylxanthines on biochemical parameters of obese-diabetic rats, **Journal of the science of Food and Agriculture**, v.89, 130-137, 2008.

KALILI, K.M.; VILLIERS, A. Off-line comprehensive 2-dimensional hydrophilic interaction x reversed phase liquid chromatography analysis of procyanidins. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.6274-6284, 2009.

KEALEY, K.S., SNYDER, R.M., ROMANCZYK, L.J., GEYER, H.M., MYERS, M. E., WITHCARE, E.J., HAMMERSTONE, J.F., e SCHMITZ, H.H. **Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses**. *Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 98/09533*, Mars Incorporated, USA, 1998.

KESSLER, A. Plant-insect interactions in the era of consolidation in biological sciences: *Nicotiana attenuata* as an ecological expression system. **Chemical Ecology. From gene to Ecosystem**, 19-38, 2006.

KIM, H.; KEENEY, P.G. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, v.49, 1090-1092, 1984.

KIM, J.S.; KWON, C.S.; SON, K.H. Inhibitors of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.64, n.11, p.2458-2461, 2000.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of American Dietetic Association**, Chicago, v.99, n.2, p. 213-218, 1999.

KWON, Y.I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Inhibitory potential of wine and tea against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. **Journal of Food Biochemistry**, v.32, p.15-31, 2008.

LANNES, S.C.S.; MEDEIROS, M.L.; GIOIELLI, L.A. Interacciones físicas entre grasas de cupuasú y cação. **Grasas y Aceites**, v.54, n.3, p. 253-258, 2003.

LATTANZIO, V.; TERZANO, R.; CICCIO, N.; CARDINALI, A.; DI VENERE, D.; LINSALATA, V. Seed coat tannins and bruchid resistance in stored cowpea seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p. 839-846, 2005.

LAZARUS, S.A.; ADAMSON, G.E.; HAMMERSTONE, J.F.; SCHMITZ, H.H. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in food and beverages, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, 3693-3701, 1999.

LEY, D. Conching. In: BECKETT, S.T. (Ed.) **Industrial chocolate manufacture and use**. 2. Ed. London: Blanckie Academic & Professional, p.117-138, 1994.

LU, Y.R.; FOO, L.Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, p. 81-85, 2000.

LOPES, A.S.; PEZOA-GARCIA, N.H.; AMAYA-FARFÁN, J. Qualidade nutricional das proteínas de cupuaçu e de cacau. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28(2), 2008.

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas à manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. 195 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2001.

MARLES, M.A.S.; RAY, H.; GRUBER, M.Y. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. **Phytochemistry**, v.64, 367-383, 2003.

MARTÍN, A.; CABRERA, A.; MEDINA, J.L. Antinutritional factors in faba bean. Tannin content in *Vicia faba*: possibilities for plant breeding. **Options Méditerranéennes**, Série Séminaires, n. 10, p. 105-110, 1991.

MASSBANK – High Resolution Mass Spectral Data Base. **Spectrum search**. Disponível em: <http://www.massbank.jp/SearchPage.html>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2010.

MATILLA, P.; HELLSTRÖM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p. 152-160, 2007.

MATHUR, S.; DEVARAJ, S.; GRUNDY, S.M.; JIALAL, I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans, **Human Nutrition and Metabolism**, v.132, 3663-3667, 2002.

MATSUI, T.; UEDA, T.; OKI, T.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K.;  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.1952-1956, 2001.

MCCARTER, J.D.; WITHERS, S.J. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v.4 (6), p.885-892, 1994.

MCCUE, P.; KWON, Y.I; SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. **Journal of Food Biochemistry**, v.29, p.278-294, 2005.

MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa and confectionery. Science and Technology**. Aspen Publication, 3<sup>a</sup> Edição. 1989.

MISNAWI; JINAP, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. **Food Quality and Preference**, v.15, p. 403-409, 2004.

MILLER, K.B.; HURST, W.J.; PAYNE, M.J.; STUART, D.A.; APGAR, J.; SWEIGART, D.S.; OU, B. Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol

content of commercial cocoa powders. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.8527-8533, 2008.

MISNAWI SELAMAT, J.; BAKAR, J.; SAARI, N. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, 559-566, 2002.

MOINI, H.; GUO, Q.O.; PACKER, L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.132, 1825, 2002.

MORORÓ, R.C. Aproveitamento dos derivados, subprodutos e resíduos do cacau. **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. Itabuna – Bahia. Editora Vital, p. 371-421, 2007.

MÜLLER, C.H.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; NASCIMENTO, W.M.O.; GALVÃO, E.U.P.; STEIN, R.L.B.; SILVA, A.B.; RODRIGUES, J.E.L.F.; CARVALHO, J.E.U.; NUNES, A.M.L.; NAZARÉ, R.F.R.; BARBOSA, W.C. **A cultura do cupuaçu**. Coordenação Editorial, 1995.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v.51, p. 3309-3312, 2003.

NAVARRO, Z. Desenvolvimento rural no Brasil: os limites do passado e os caminhos do futuro. **Estudos Avançados**, n.43, v.15, 2001.

NAZARÉ, R.F.R.; BARBOSA, W.C.; VIÉGAS, R.M.F. Processamento das sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate. **EMBRAPA - CPATU** (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido. 38p. Belém, PA, 1990.

ORTEGA, N.; ROMERO, M.P.; MACIÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J.R.; MOTILVA, M.J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.9621-9627, 2008.

ORTEGA, N.; REGUANT, J.; ROMERO, M.P.; MACIÀ, A.; MOTILVA, M.J. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.5743-5749, 2009.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p. 4619-4629, 2001.

PASTERNAK, T., POTTERS, G., & CAUBERGS, R. Complementary interaction between oxidative stress and auxin control plant growth responses at plant, organ and cellular level. **Journal of Experimental Botany**, 56(418), 1991–2001, 2005.

PHENOL-EXPLORER. **Compounds**. Disponível em: <http://www.phenol-explorer.eu/compounds>. Acesso em 01 de fevereiro de 2010.

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, **Phytochemistry**, v.25. 223-230, 1986.

PORTER, L.J. Tannins. **Methods in plant biochemistry**, v.1, 389-419, 1989

PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.25, p.1268-1273, 1977.

PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.26, nº5, 1978.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53: 4290-4302, 2005.

PULS, W.; KEUP, U. Metabolic studies with an amylase. In: **Recent Advances in Obesity Research**, v.3. Howard A, eds. Newman, London, p.391, 1975.

QUEIROZ, M.B.; GARCIA, N.H.P. Avaliação sensorial de amêndoas de cupuaçu e cacau torradas utilizando análise descritiva quantitativa. **B.Ceppa**, v.18(2), p.249-266, 2000.

RANILLA, L.G.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian beans cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 90-98, 2007.

REED, J.D. Nutrition toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes, **Journal of Animal Science**, v.73, 1516-1528, 1995.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v.20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, v.32, n.1, p.71-110, 1993.

RIGAUD, J.; ESCRIBANO-BAILON, M.T.; PRIEUR, J.-M.; SOUQUET; CHEYNIER, V. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. **Journal of Chromatography A**, v.654, p.255-260, 1993.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Oxford, v.66, p. 401-436, 1999.

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

ROLO, A.P.; PALMEIRA, C.M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.212, p.167-178, 2006.

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

SANTOS, S. C. M.; SALLES, J. R. J.; CHAGAS FILHO, E.; ALVES, L.M.C. Diagnóstico organizacional e tecnológico de polpa de fruta do município de São Luís – MA, com vista à implementação de um programa de controle de qualidade. In: Seminário de Iniciação Científica, 14.; Encontro de Iniciação Científica da Uema, 7., 2002, São Luis. **Resumos...** São Luis: [s.n.], 2002. p. 139-141. Livro de resumos do SEMIC.

SARKAR, S.K.; HOWARTH, R.E.; **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.24, p.317-320, 1976.

SARMA, A.D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. **Phytochemistry**, v. 45, p. 671-674, 1997.

SARNI-MANCHADO, P.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Interaction of grape seed tannins with salivary proteins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, 42-47, 1999.

SASAKI, K.; MATSUKURA, Y.; SHIJIMA, K.; MIYAKE, M.; FUJIWARA, D.; KONISHI, Y. High-performance liquid chromatographic purification of oligomeric procyanidins, trimers up to nonamers, derived from the bark of jatoba (*Hymenaea courbaril*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73(6), p.1274-1279, 2009.

SCALBERT, J.P.E. Antimicrobial properties of tannins, **Phytochemistry**, v.30, 3875-3883, 1991.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567-579, 2007.

SELF, R.; EAGLES, J.; GALLETTI, G.C.; MUELLER-HARVEY, I.; HARTLEY, R.D.; LEA, A.G.H.; HAGNOLATO, D.; RICHLI, U.; GUJER, R.; HASLAM, E. Fast atom bombardment mass spectrometry of polyphenols (syn. vegetable tannins). **Biomedical and Environmental Mass Spectrometry**, v.13, p.449-468, 1986.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics**. Technomic Publishing Co, Lancaster, Basel, 1995.

SCHEWE, T.; SADIK, C.; KLOTZ, L.O.; YOSHIMOTO, T.; KÜHN, H.; SIES, H. **Biology Chemistry**, v.382, 1687, 2001

SCHEWE, T.; KÜHN, H.; SIES, H. **Journal of Nutrition**, v.132, 1825, 2002.

SCHWAN, R.F.; SOUZA, S.M.M.; MENDONÇA, M.A.S.; FREIRE, E.S. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng. K. Schum). In: MOURA *et al.* 2000.

**Caracterização de Frutas Nativas da América Latina.** Jaboticabal: FUNEP, 2000. Série Frutas Nativas, 9, 66p.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SMULIKOWSKA, S.; PASTUSZEWSKA, B.; SWIECH, E.; OCHTABINSKA, A.; MIECZKOWSKA, A.; NGUYEN, V.C.; BURACZEWSKA, L. Tannin content affects negatively nutrition value of pea for monogastrics, **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.10, 511-523, 2001

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Nutrition Revision**, Campinas v.15, p.71-81, 2002.

SONG, Y.; MANSON, J.E.; BURING, J.E.; SESSO, H.D.; LIU, S. Associations of Dietary Flavonoids with Risk of Type 2 Diabetes, and Markers of Insulin Resistance and Systemic Inflammations in Women: A prospective Study and Cross-Sectional Analysis. **Journal of the American College of Nutrition**, v.24(5), p.376-384, 2005.

SOUCI, S.W.; FACHMANN, W.; KRAUT, H. Cacao. **Food Composition and Nutrition Tables**. Germany. Editora CRC press Boca Raton Ann Arbor London Tokio, p.1042, 1994.

SOUZA FILHO, M.S.M.; LIMA, J.R.; SOUZA, A.C.R. Efeito do branqueamento, processo osmótico, tratamento térmico e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de caju processados por métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19(2), p.211-213, 1999.

SPADA, P.D.S.; DE SOUZA, G.G.N.; BORTOLINI, G.V.; HENRIQUES, J.A.P.; SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of medicinal food**, v.11, 144-151, 2008.

STEINBERG, F.M.; BEARDEN, M.M.; KEEN, C.L. Cocoa and chocolate flavonoids: implication for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, v.103(2), p.215-223, 2003.

SULISTYOWATI; MISNAWI. Effects of alkali concentration and conching temperature on antioxidant activity and physical properties of chocolate. **International Food Research Journal**, v. 15 (3), p. 297-304, 2008.

TACO. LIMA, A.M.; COLUGNATI, F.A.; PADOVANI, R.M.; RODRIGUEZ-AMAVA, D.B.; SAIAY, E.; GALEAZZI, M.A.M. **Tabela brasileira de composição dos alimentos**. Versão II, 2 ed., 2006.

TOELLER, M. Alpha glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. **European Journal of Clinical Investigation**, v.24(3), p.31-35, 1994.

TOMAS-BARVERÁN, F.A.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; MARÍN, A.; MUGUERZA, B.; GIL-IZQUIERDO, A.; CERDÁ, B.; ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J.; IBARRA, A.; PASAMAR, M.A.; RAMÓN, D.; ESPÍN, J.C. 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, 3926-3935, 2007.

VENKATALACHAM, M; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, 4705-4714, 2006.

VINSON, J.A.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA, P.; SHUTA, D.; SAMMAN, N.; AGBOR, G.A. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant,

na antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the european and american diets, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, 8071-8076, 2006.

WATANABE, J.; KAWABATA, J.; KURIHARA, H.; NIKI, R. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, n.1, p.177-178, 1997.

WHO – World Health Organization, 1999. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus.** Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/publications/en/>. Acesso em: 19 de novembro de 2007.

WHO – World Health Organization, 2002. **The world health report 2002 – Reducing risks, promoting healthy life.** Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/>. Acesso em: 25 de julho de 2008.

WILLE, L.R.; LUTTON, S.E. Polymorphism of cocoa butter. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 43, p. 491-496, 1966.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v.64, p.3-19, 2003.

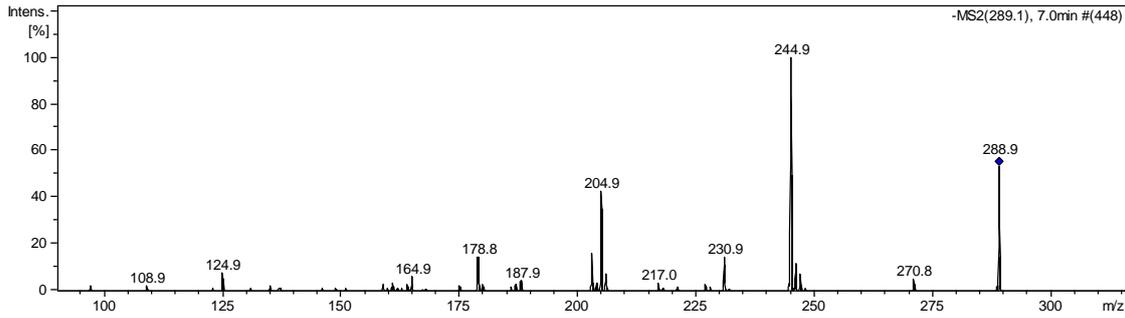
WOLLGAST, J., ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, 33, 423-447, 2000.

YAMAMOTO, M.; YAMATO, E.; SHU-ICHI, T.; TASHIRO, F.; IKEGAMI, H.; YODOI, J.; MIYAZAKI, J. Transgenic Expression of Antioxidant Protein Thioredoxin

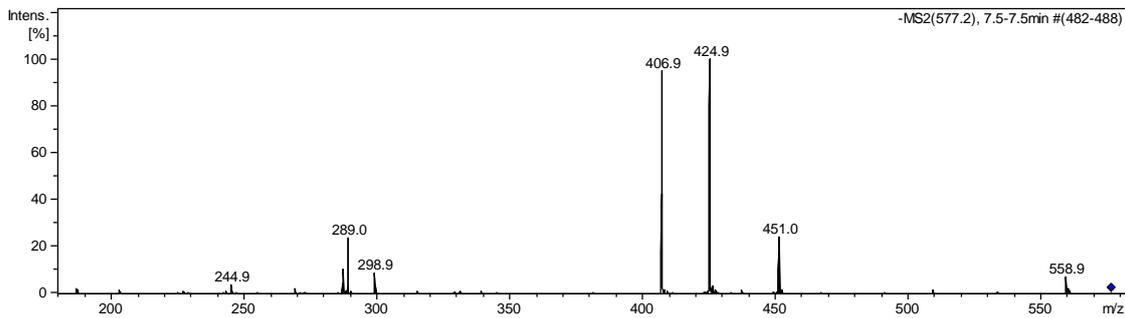
in Pancreatic  $\beta$  Cells Prevents Progression of Type 2 Diabetes Mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10(1), p.43-50, 2008.

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

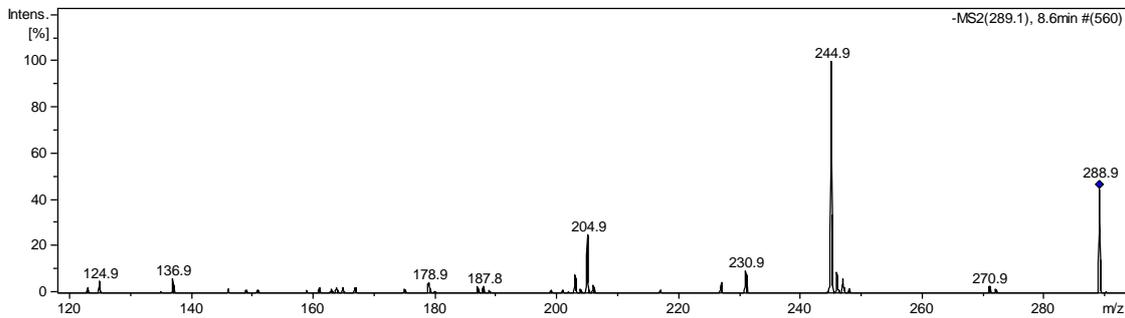
## **7. ANEXOS**



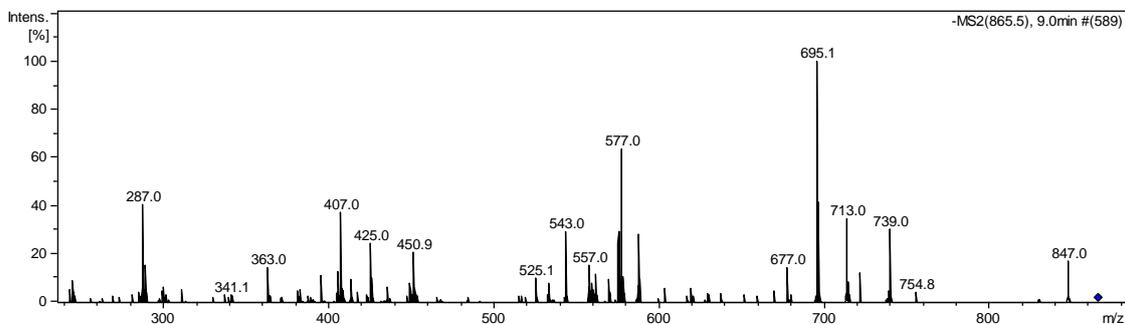
**Figura 56** - Espectro de massa da banda em 7 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Catequina.



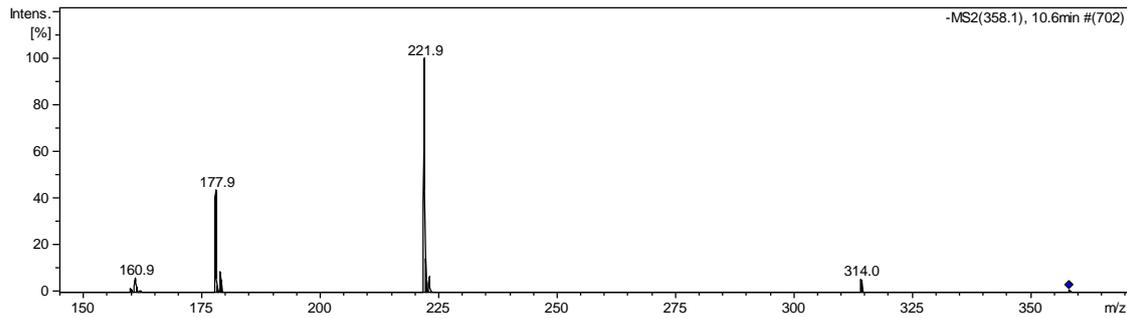
**Figura 57** - Espectro de massa da banda em 7,5 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (uma ligação).



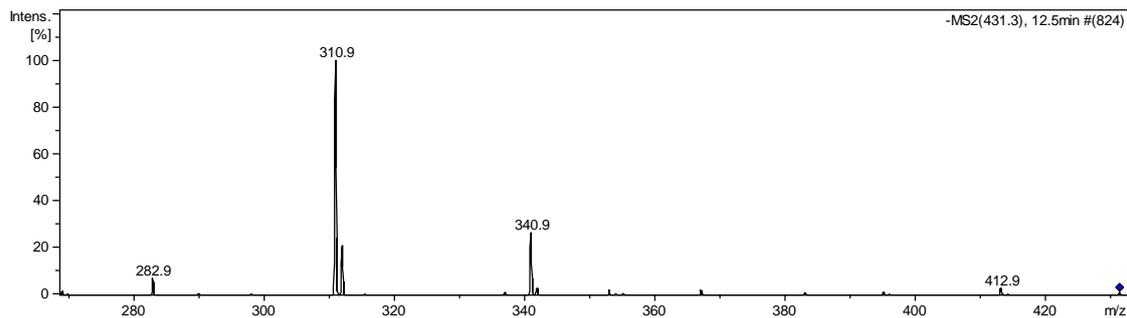
**Figura 58** - Espectro de massa da banda em 8,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Epicatequina.



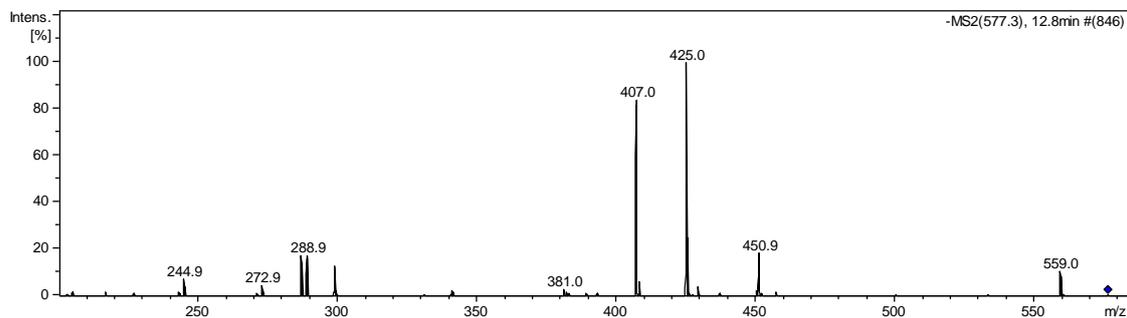
**Figura 59** - Espectro de massa da banda em 9 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (uma ligação).



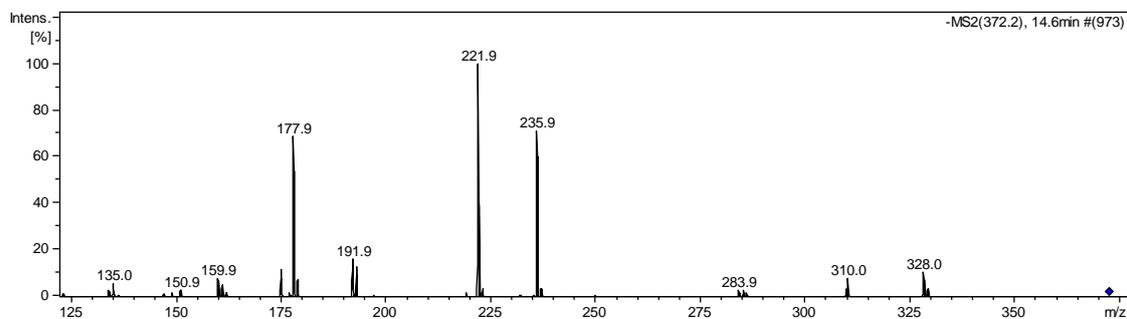
**Figura 60** - Espectro de massa da banda em 10,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “A”.



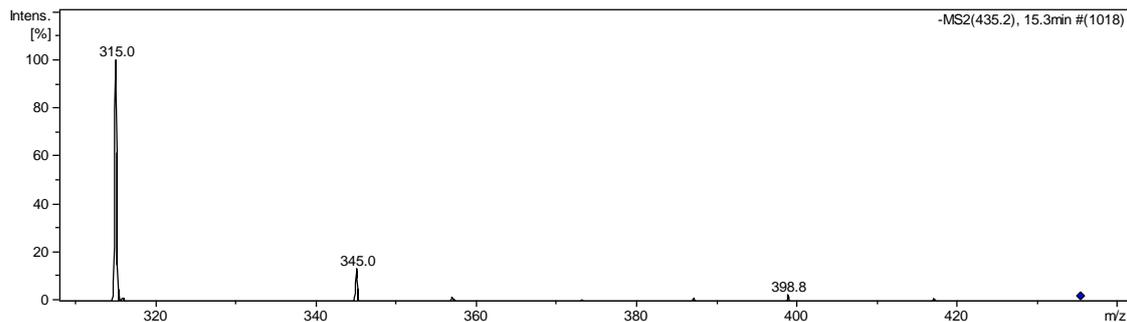
**Figura 61** - Espectro de massa da banda em 12,5 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Isovitexina.



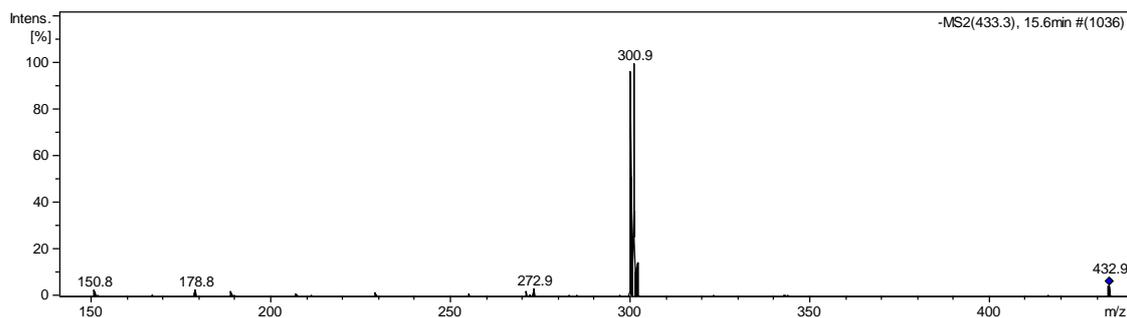
**Figura 62** - Espectro de massa da banda em 12,8 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (uma ligação).



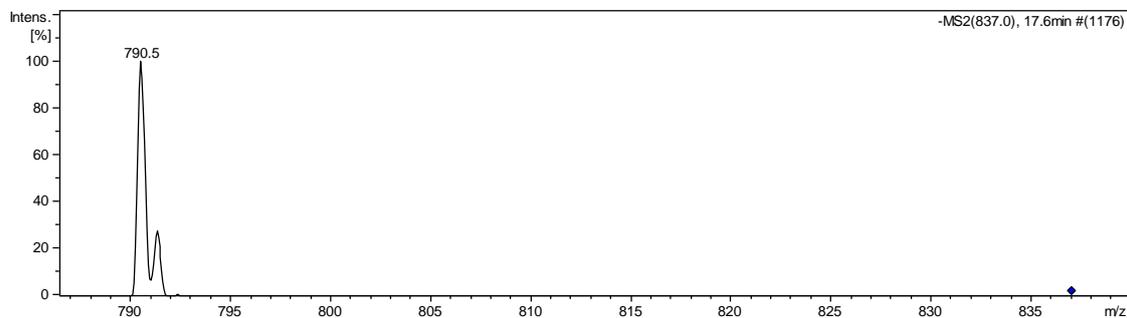
**Figura 63** - Espectro de massa da banda em 14,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “B”.



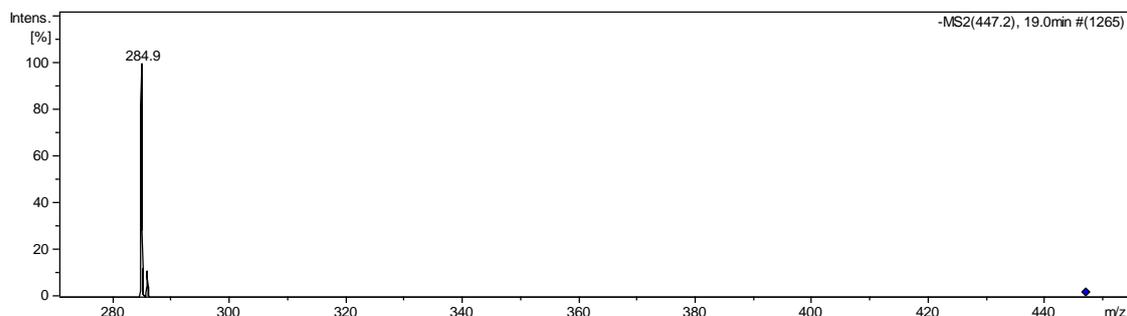
**Figura 64** - Espectro de massa da banda em 15,3 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “C”.



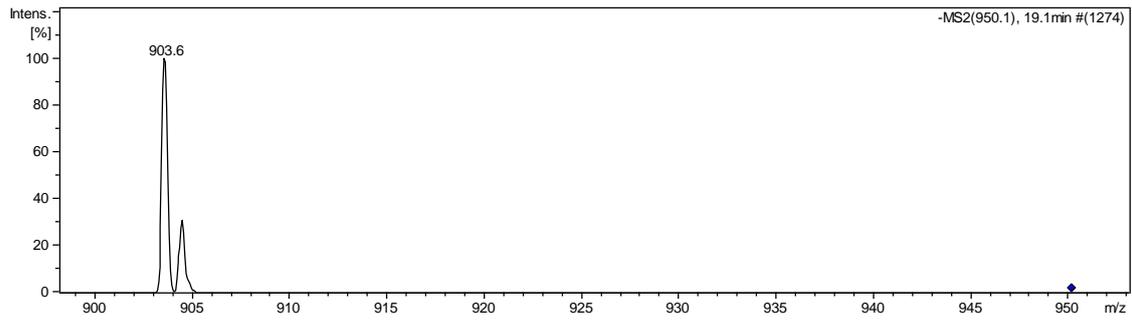
**Figura 65** - Espectro de massa da banda em 15,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Quercetina ligada a uma pentose.



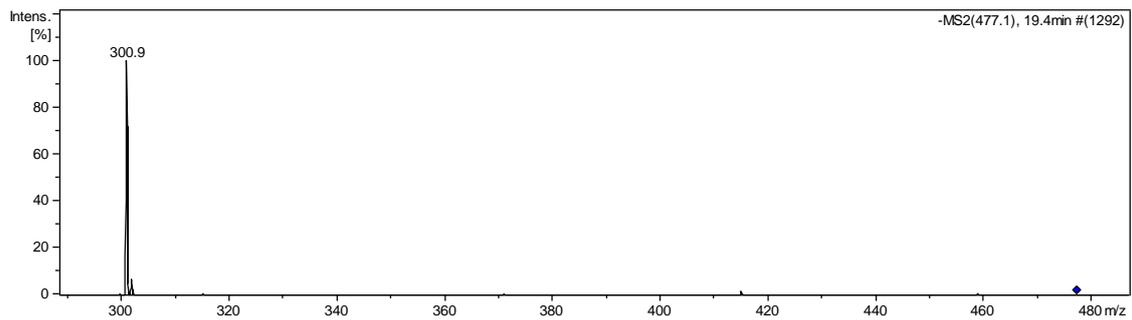
**Figura 66** - Espectro de massa da banda em 17,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “D”.



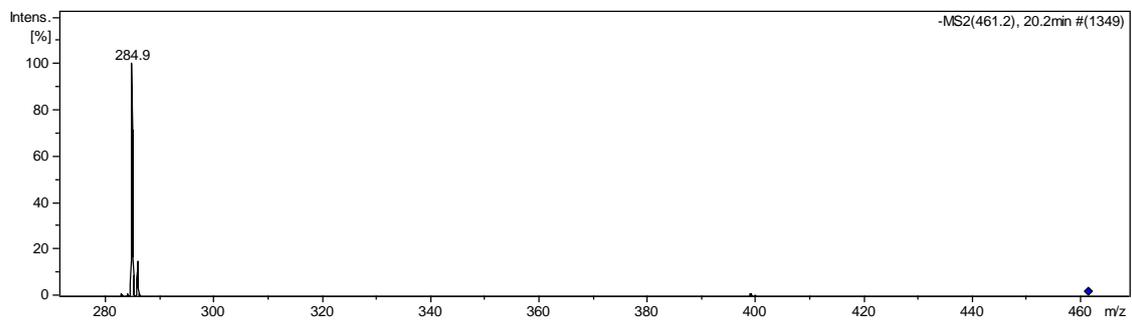
**Figura 67** - Espectro de massa da banda em 19 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Luteolina ou caempferol ligado a uma hexose.



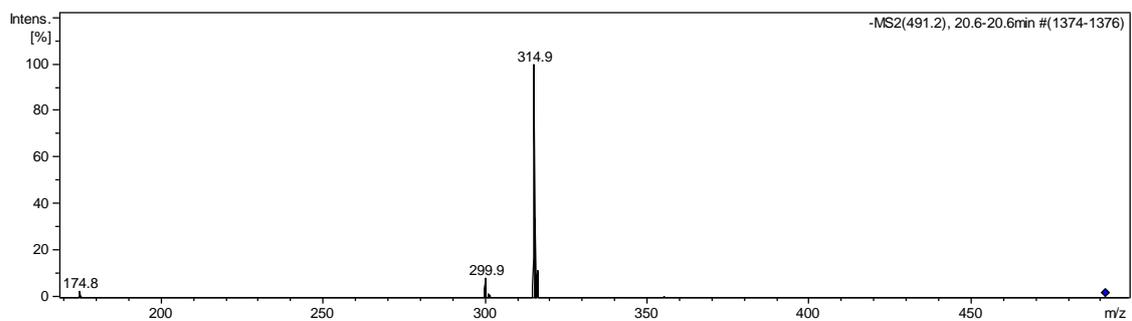
**Figura 68** - Espectro de massa da banda em 19,1 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. “E”.



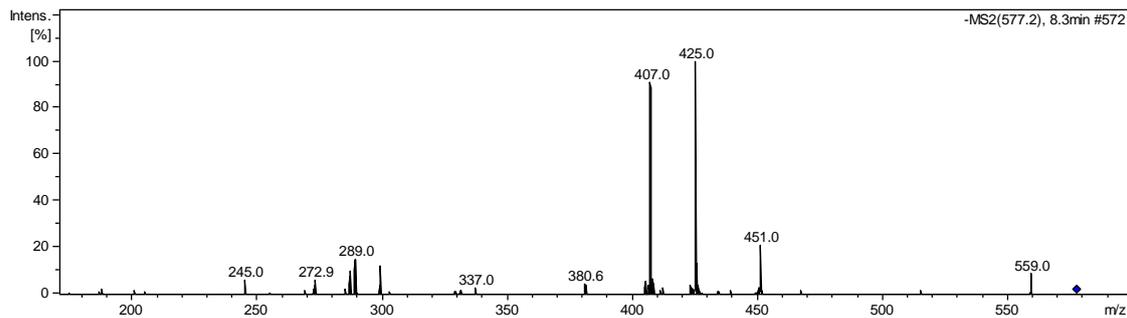
**Figura 69** - Espectro de massa da banda em 19,4 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Quercetina glucuronídeo.



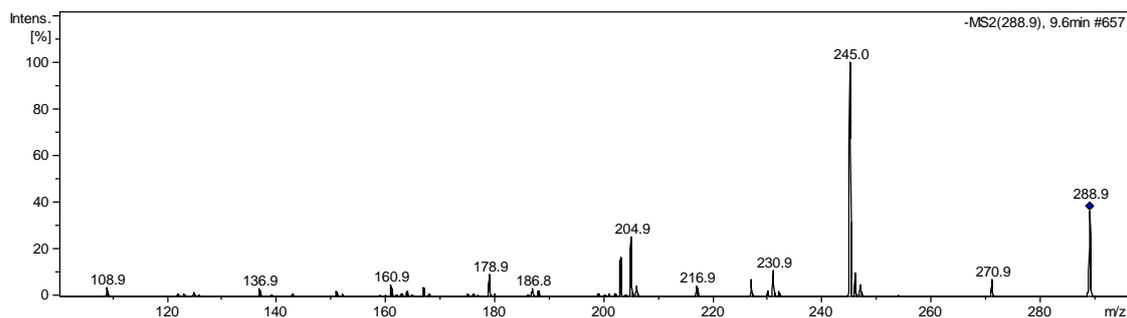
**Figura 70** - Espectro de massa da banda em 20,2 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Luteolina glucuronídeo.



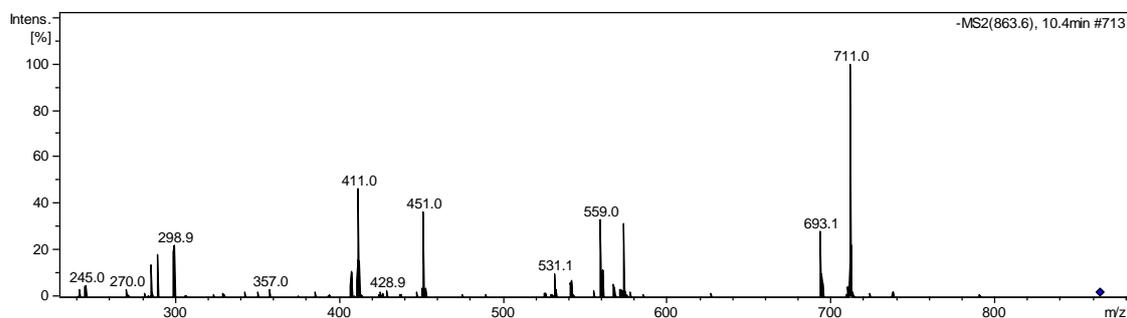
**Figura 71** - Espectro de massa da banda em 20,6 min da fração metanol do extrato de semente de cupuaçu. Isorhamnetina glucuronídeo.



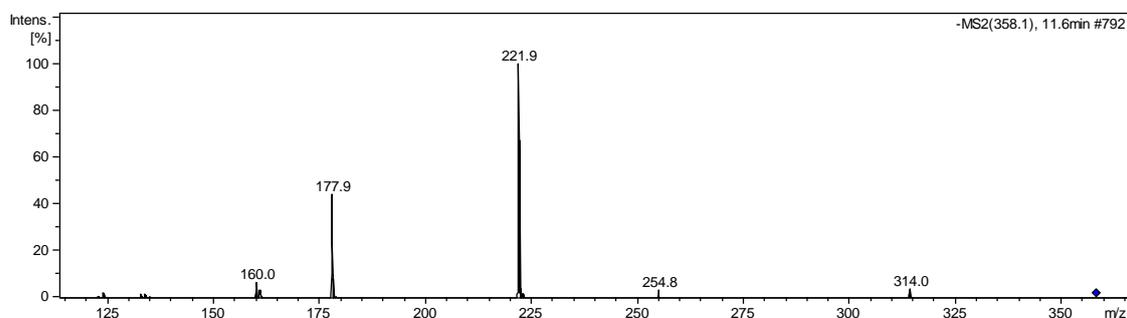
**Figura 72** - Espectro de massa da banda em 8,3 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (uma ligação).



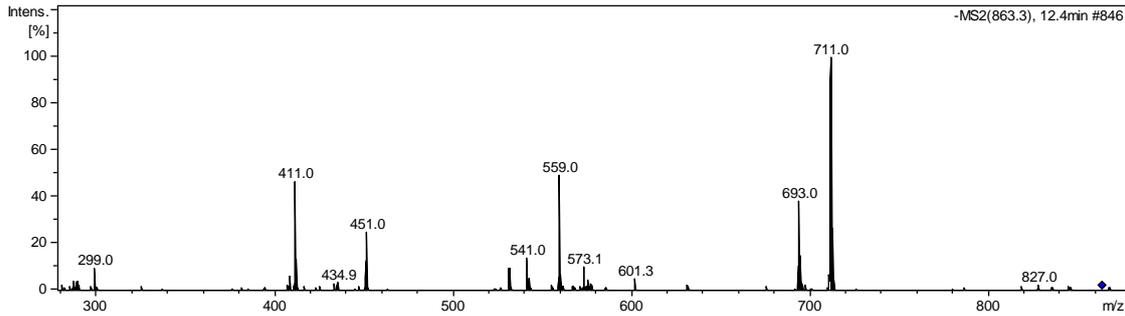
**Figura 73** - Espectro de massa da banda em 9,6 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Epicatequina.



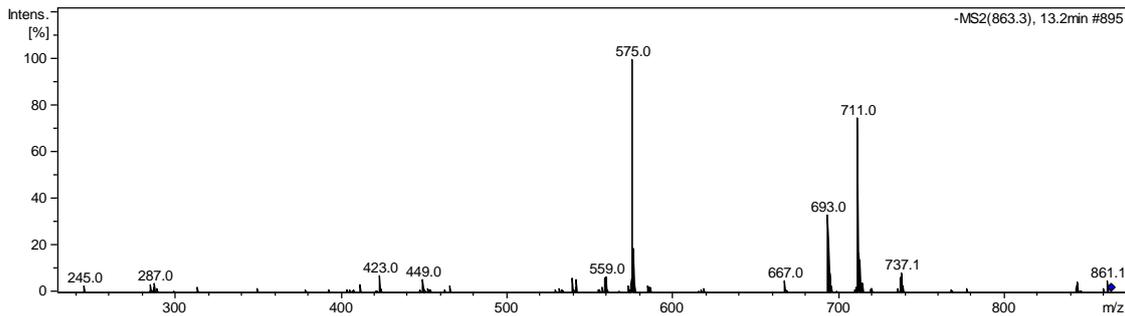
**Figura 74** - Espectro de massa da banda em 10,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (duas ligações).



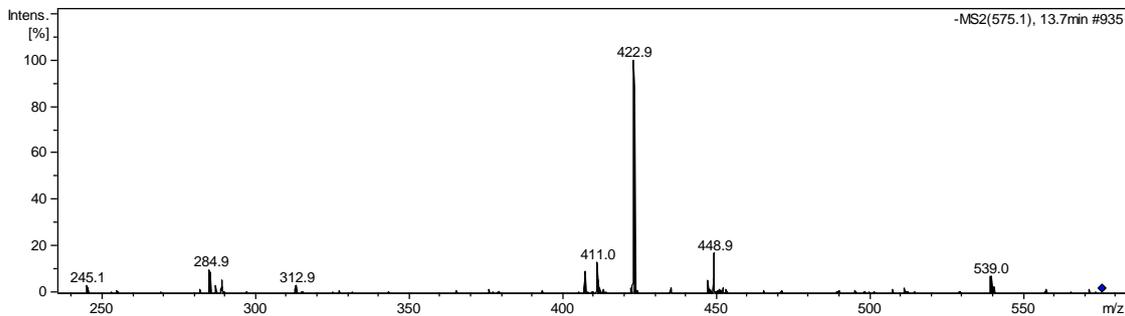
**Figura 75** - Espectro de massa da banda em 11,6 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. "A".



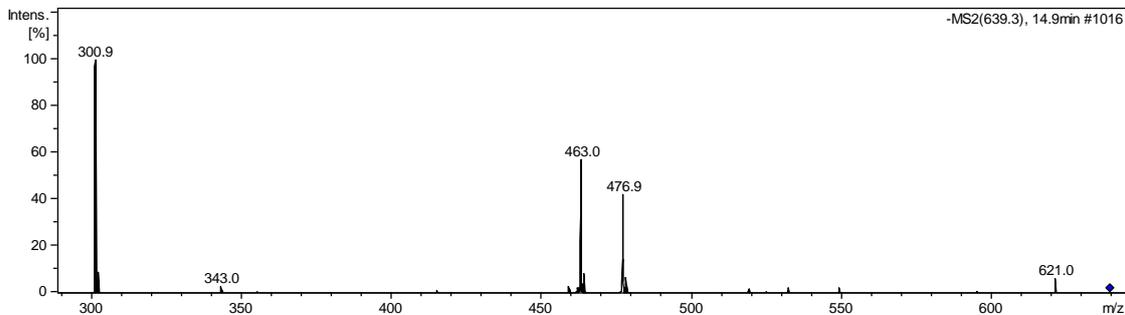
**Figura 76** - Espectro de massa da banda em 12,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (duas ligações).



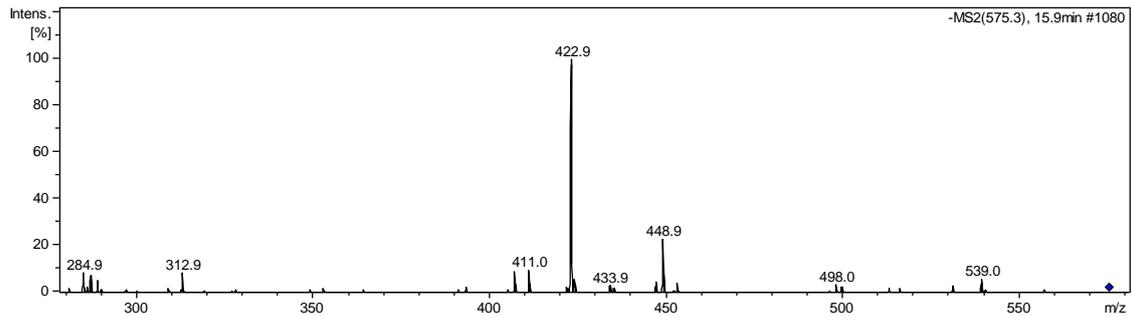
**Figura 77** - Espectro de massa da banda em 13,2 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (duas ligações).



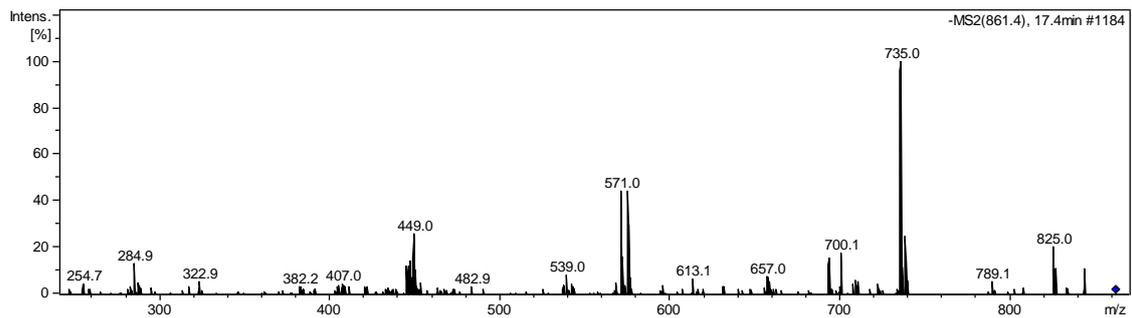
**Figura 78** - Espectro de massa da banda em 13,7 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (duas ligações).



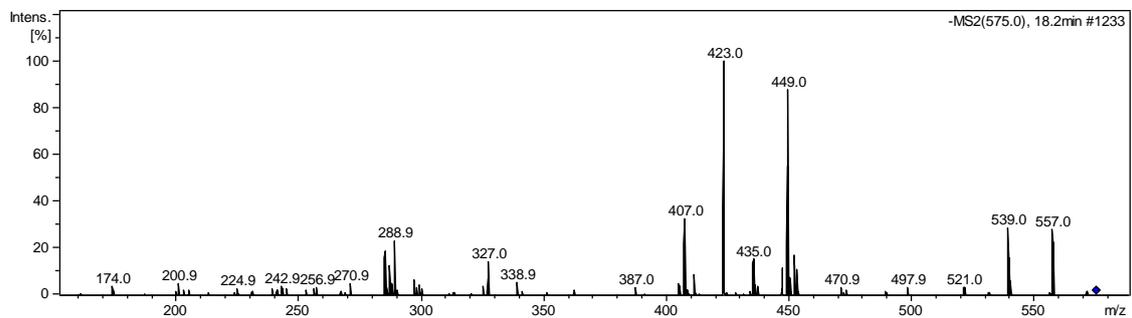
**Figura 79** - Espectro de massa da banda em 14,9 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Quercetina glucuronídeo e glicosídeo.



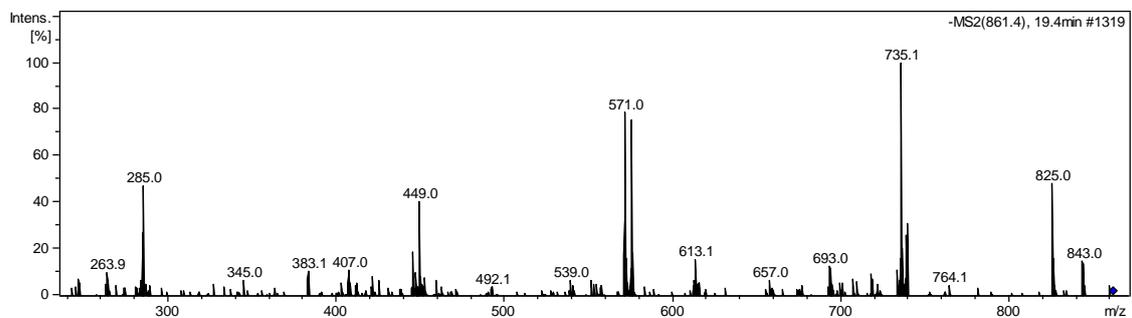
**Figura 80** - Espectro de massa da banda em 15,9 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (duas ligações).



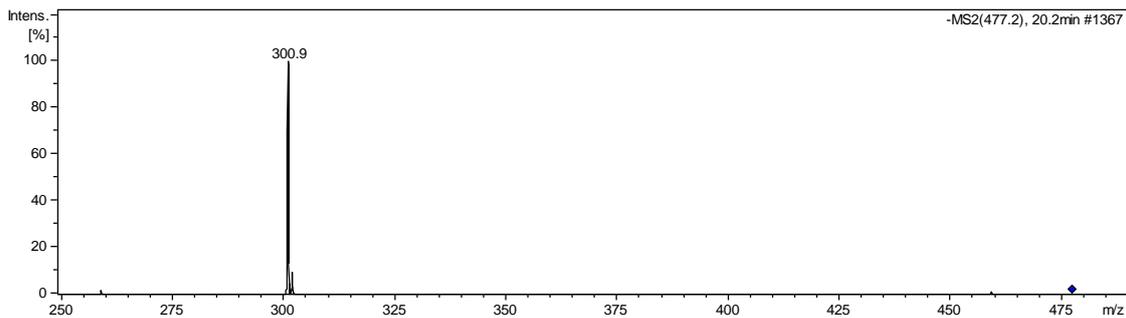
**Figura 81** - Espectro de massa da banda em 17,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (três ligações).



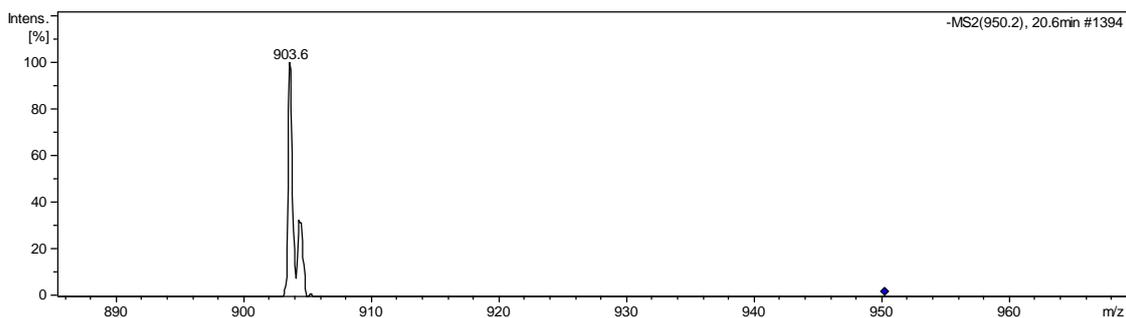
**Figura 82** - Espectro de massa da banda em 18,2 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Dímero (duas ligações).



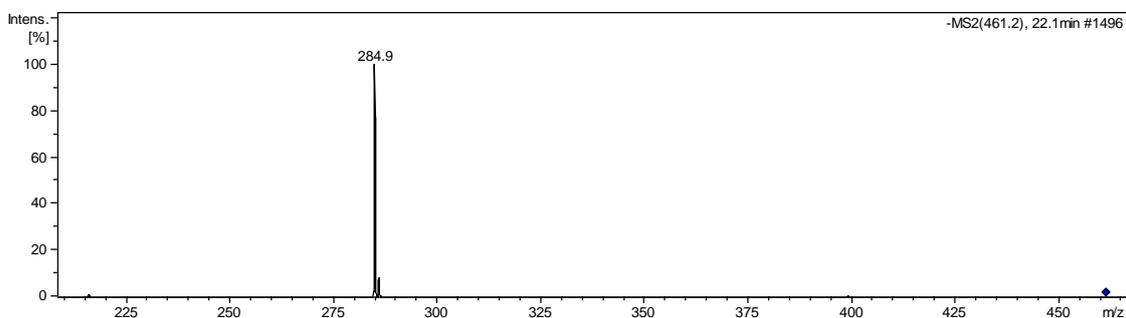
**Figura 83** - Espectro de massa da banda em 19,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Trímero (três ligações).



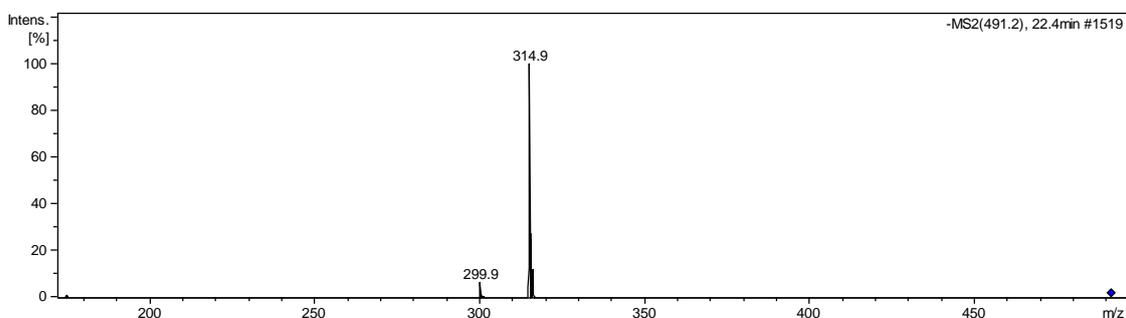
**Figura 84** - Espectro de massa da banda em 20,2 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Quercetina glucuronídeo.



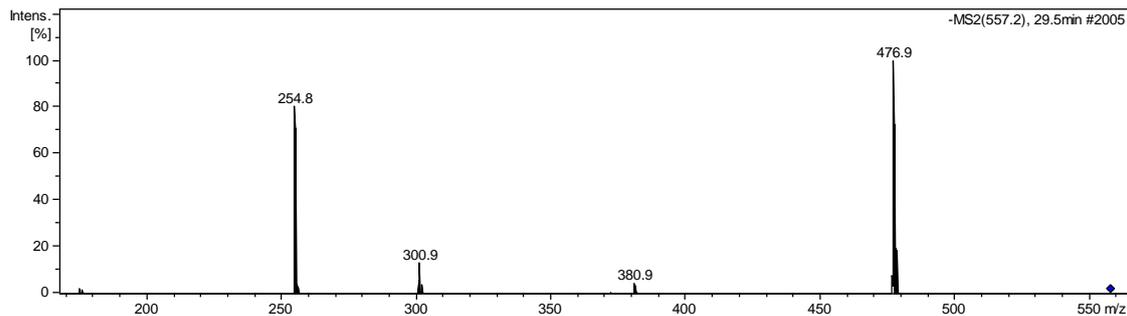
**Figura 85** - Espectro de massa da banda em 20,6 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. "B".



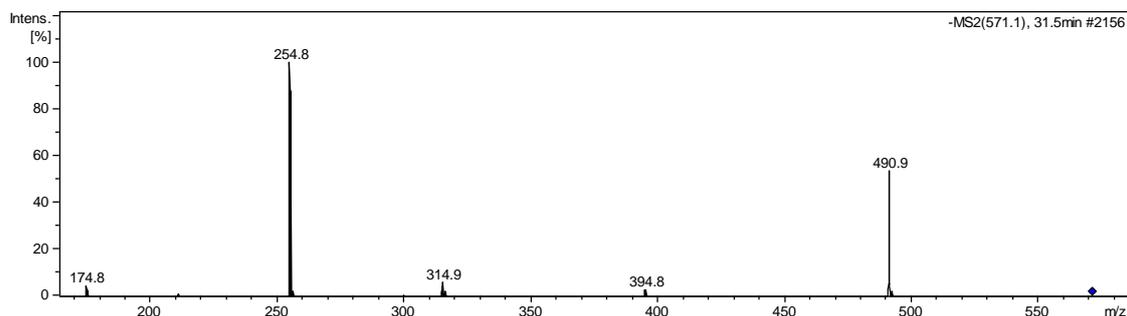
**Figura 86** - Espectro de massa da banda em 22,1 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Luteolina glucuronídeo.



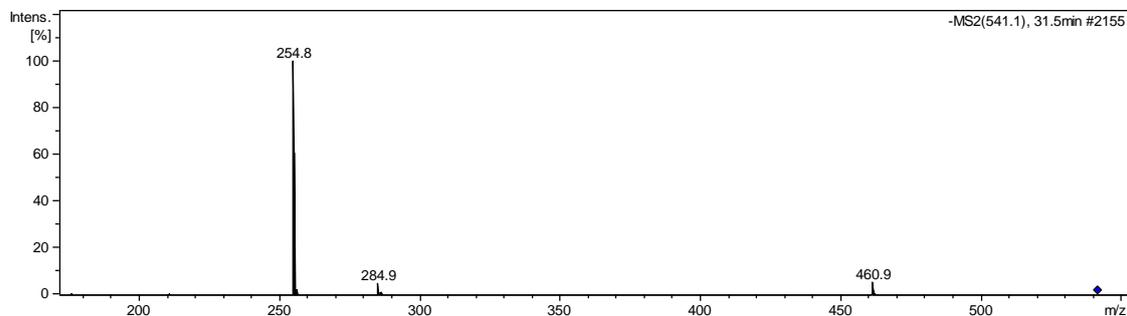
**Figura 87** - Espectro de massa da banda em 22,4 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Isorhamnetina glucuronídeo.



**Figura 88** - Espectro de massa da banda em 29,5 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Theograndina II.



**Figura 89** - Espectro de massa da banda em 31,5 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Uma theograndina II metilada.



**Figura 90** - Espectro de massa da banda em 31,5 min da fração metanol-amônia do extrato de semente de cupuaçu. Theograndina I.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)