



Avaliação da atividade antioxidante e da concentração de fenólicos totais em sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

Evaluation of antioxidant activity and total phenolic compounds in cupuaçu seeds (*Theobroma grandiflorum*)

Lucas Vinícius Kugler¹, Maria Eliana Penteado², Erica Roberta Lovo da Rocha Watanabe³

RESUMO

O estudo da atividade antioxidante de extratos provenientes de recursos naturais tem se destacado nos últimos anos principalmente devido ao grande interesse de indústrias dos mais diversos setores, como farmacêutica, alimentícia e química. Normalmente compostos como polifenóis, carotenoides, terpenoides, alcaloides, saponinas, glucosinolatos, fitosteróis, flavonóides e fitoestrogênios, são responsáveis por conferir tal propriedade. O presente trabalho buscou avaliar a atividade antioxidante de extratos de sementes de cupuaçu, uma das frutas de maior importância econômica para a região norte do Brasil, através do método de eliminação do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil) e determinar a concentração de compostos fenólicos totais nos extratos com o método de Folin-Ciocalteu. Os extratos foram preparados utilizando cinco solventes (metanol, etanol, isopropanol, butanol e acetato de etila) em banho ultrassônico por 1h de extração à 35°C. O extrato etanólico se mostrou com o melhor desempenho frente aos demais solventes, apresentando IC₅₀ de 77,77 ± 0,13 mg/mL e concentração de fenólicos totais de 355,03 ± 0,26 mg EAG/L.

PALAVRAS-CHAVE: atividade antioxidante; compostos fenólicos; cupuaçu.

ABSTRACT

The study of the antioxidant activity of extracts derived from natural resources has gained prominence in recent years, primarily due to the significant interest from industries across numerous sectors such as pharmaceuticals, food, and chemistry. Compounds such as polyphenols, carotenoids, terpenoids, alkaloids, saponins, glucosinolates, phytosterols, flavonoids, and phytoestrogens are typically responsible for conferring such properties. This current research aimed to assess the antioxidant activity of cupuaçu seed extracts, one of the most economically important fruits in the northern region of Brazil, using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging method and determining the concentration of total phenolic compounds in the extracts using the Folin-Ciocalteu method. The extracts were prepared using five solvents (methanol, ethanol, isopropanol, butanol, and ethyl acetate) via ultrasonic assisted extraction for 1 hour at 35°C. The ethanolic extract exhibited the best performance compared to the other solvents, with an IC₅₀ of 77,77 ± 0,13 mg/mL and a total phenolic concentration of 355,03 ± 0,26 mg GAE/L.

KEYWORDS: antioxidant activity; phenolic compounds; cupuaçu.

INTRODUÇÃO

A espécie *Theobroma grandiflorum*, conhecida como cupuaçu, é uma fruta nativa da Amazônia brasileira, apreciada em várias regiões do Brasil. As sementes de cupuaçu, anteriormente consideradas subprodutos, estão ganhando interesse devido à possibilidade de produzir produtos semelhantes aos derivados de cacau, como a gordura de cupuaçu, e são também na produção de cosméticos (DA SILVA MOTA; DA ROCHA SERUFFO; DA ROCHA, 2020).

Os compostos fenólicos são substâncias encontradas em frutas e vegetais, dividindo-se em dois grupos principais: flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides são

¹ Bolsista da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: lucaskugler@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 9280815602014365.

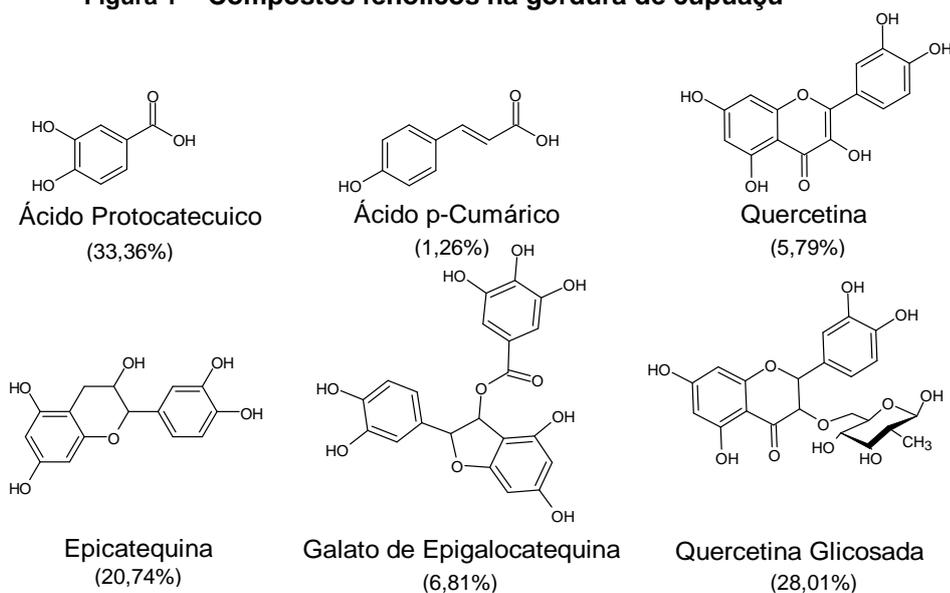
² Bolsista da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: mpenteado@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 4313603843725827.

³ Docente no Departamento Acadêmico de Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: ericawatanabe@utfpr.edu.br. ID Lattes: 6236461593058482.

uma classe diversificada de pigmentos naturais com estruturas complexas, enquanto os não flavonoides têm sua atividade antioxidante relacionada à posição dos grupos hidroxilas e à proximidade do grupo carboxila em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esses grupos estiverem, maior será a capacidade antioxidante (DA COSTA, 2022).

Costa et. al. (2019) realizou a identificação e quantificação dos compostos fenólicos na gordura de cupuaçu (Figura 1) utilizando um sistema de HPLC acoplado a um detector de fotodiodo “array”.

Figura 1 – Compostos fenólicos na gordura de cupuaçu



Fonte: Adaptado de Costa et. al, 2019.

Assim, o objetivo do presente trabalho consiste em avaliar a capacidade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos nas sementes de cupuaçu utilizando diferentes solventes.

MATERIAIS E MÉTODOS

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As sementes de cupuaçu foram previamente secas em estufa à 40°C até peso constante. Após o processo de secagem, foram submetidas à moagem, sendo selecionadas para este ensaio as partículas de diâmetro médio de 0,841mm (Mesh 20). Adicionou-se 3g das sementes moídas aos respectivos solventes na proporção 1:10 amostra/solvente em massa. A mistura foi inserida em um banho ultrassônico modelo HXBuc, durante 1h à temperatura de 35°C na frequência de 40Hz (SHI et. al, 2022). As extrações foram realizadas com os seguintes solventes puros: metanol, etanol, isopropanol, butanol e acetato de etila. Após a extração, a mistura foi filtrada para separar as sementes do extrato. Para retirar os ácidos graxos que compõem a gordura de cupuaçu, os extratos foram refrigerados à -1°C por 24h e posteriormente centrifugados por 20min à 2500 rpm. As análises foram realizadas no sobrenadante, sendo a concentração determinada em base de massa de semente por volume de solvente.



ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o método de eliminação do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil), o qual caracteriza-se como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, conferindo uma coloração púrpura com pico máximo de absorção em 516 nm. Através da ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH sofre uma reação de redução formando o 2,2-difenil-picril-hidrazina, o qual possui uma coloração amarelada. Desta forma, a atividade antioxidante é mensurada utilizando o decréscimo da absorbância da solução controle frente à solução com o extrato. Tal cálculo pode ser realizado conforme a Equação 1 (OLIVEIRA, 2015).

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_{Controle} - Abs_{Amostra}}{Abs_{Controle}} \cdot 100 \quad (1)$$

Como solução controle, preparou-se 80 μM em metanol de DPPH. Para a construção da curva de inibição, realizou-se 5 diluições sucessivas de cada extrato em balões de 5mL, partindo sempre de 2mL da solução anterior. Com a curva pode-se calcular a concentração de extrato necessária para inibir 50% dos radicais de uma solução (IC_{50}) (OLIVEIRA, 2015). O ensaio foi realizado em triplicata.

CONCENTRAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A concentração de fenólicos totais foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu, que envolve a mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstênio, onde ambos os metais estão no estado de oxidação IV, resultando em uma cor amarelada. Na presença de agentes redutores, com os compostos fenólicos, os metais são oxidados para os estados de oxidação V e VI. Isso ocorre porque os compostos fenólicos, em meio básico, são desprotonados e geram ânions carboxilato, que reagem com os metais, resultando em uma mudança na coloração do meio reacional para azul (OLIVEIRA, 2015).

A análise é realizada comparando o extrato frente a uma curva de calibração utilizando o ácido gálico puro, obtendo assim os resultados em miligramas equivalentes de ácido gálico (mg EAG). A leitura foi realizada em 765nm, onde o meio reacional foi composto por 2,75mL do reagente de Folin-Ciocalteu 3%, 0,25mL de extrato diluído no solvente utilizado na extração (2mL do extrato puro diluído em um balão de 5mL) e 0,25mL de uma solução saturada de carbonato de sódio. Após a mistura em tubo de ensaio, aguardou-se 1h à 35°C para a realização da leitura. Para a curva de calibração, preparou-se 6 diluições de ácido gálico nas concentrações de 200, 100, 80, 60, 40 e 20 mg/L com o solvente utilizado na extração (OLIVEIRA, 2015). O ensaio foi realizado em triplicata.

VARREDURA ESPECTROSCÓPICA NO ULTRAVIOLETA

Os compostos fenólicos geralmente apresentam duas bandas de absorção no espectro ultravioleta (UV) devido à sua estrutura molecular conter dois grupos funcionais específicos que interagem com a luz UV em diferentes comprimentos de onda (AMÂNCIO

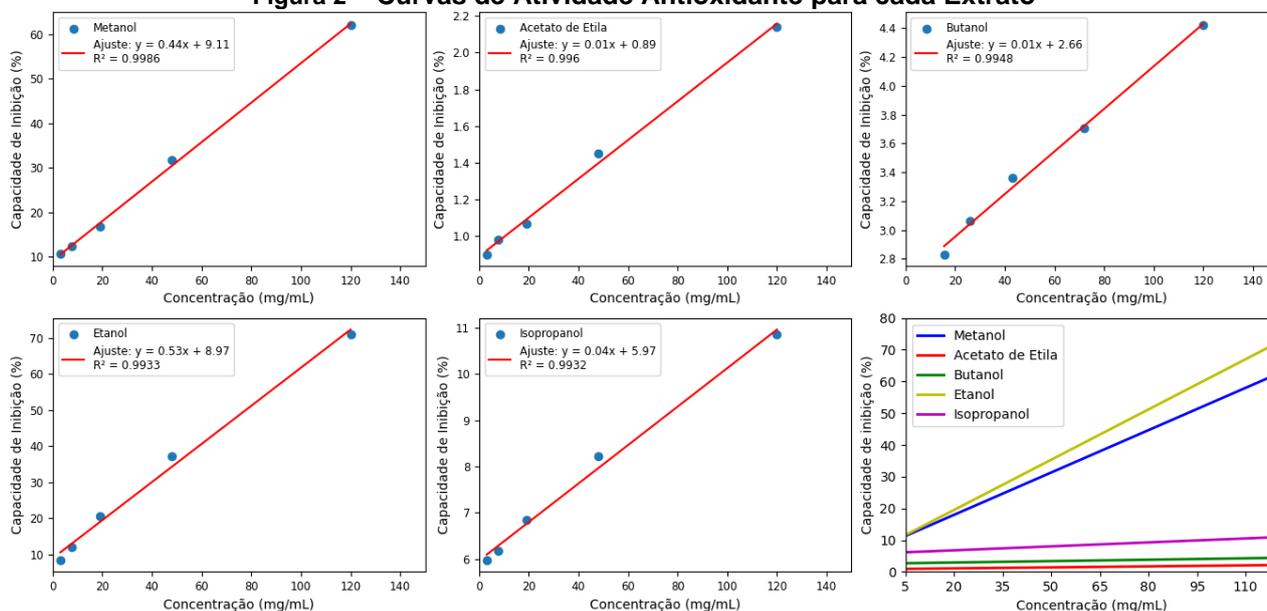


et. al, 2013). A varredura foi realizada no intervalo de 190 a 400nm, diluindo 1mL do extrato em um balão volumétrico de 25mL com o solvente utilizado na extração. Para o tratamento de dados, utilizou-se da biblioteca SciPy, na linguagem de programação Python, o método de Savitzky-Golay para suavizar ruídos do espectro.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade antioxidante dos extratos apresentou resultados com um baixo erro e boa repetibilidade. Na Figura 2 pode-se observar as curvas de inibição para cada extrato.

Figura 2 – Curvas de Atividade Antioxidante para cada Extrato



Fonte: Autores (2023).

Os extratos metanólico e etanólico apresentaram a melhor atividade antioxidante. Observa-se que quanto maior o carácter apolar do solvente, menor é atividade antioxidante, o que pode ser um indício de que os compostos fenólicos que tendem a formar polímeros, como a catequina e a epicatequina, estão em sua fórmula estrutural isolada (BRAHEM et. al, 2017).

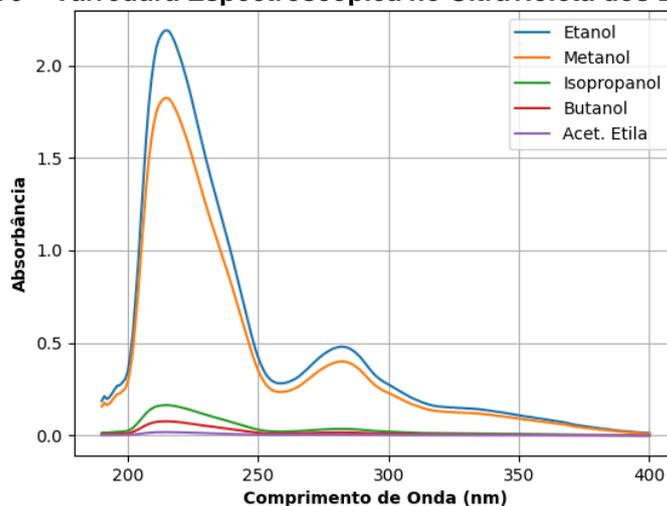
Tabela 1 – Fenólicos Totais e IC₅₀ por extrato

Extrato	Fenólicos Totais (mg EAG/L)	IC ₅₀ (mg/mL)
Etanol	355,03 ± 0,26	77,77 ± 0,13
Metanol	232,95 ± 0,72	92,93 ± 0,22
Isopropanol	109,74 ± 0,57	1059,52 ± 1,75
Butanol	42,62 ± 0,44	3205,54 ± 5,29
Acetato de Etila	19,95 ± 0,19	4650,88 ± 7,67

Fonte: Autores (2023).

Os resultados da análise de compostos fenólicos são concordantes com a atividade antioxidante, sendo os extratos etanólico e metanólico, os de maior concentração de fenólicos. Por serem ricos nesses compostos, os valores de IC₅₀ são bem menores ao se comparar com os demais solventes, conforme pode ser visto na Tabela 1.

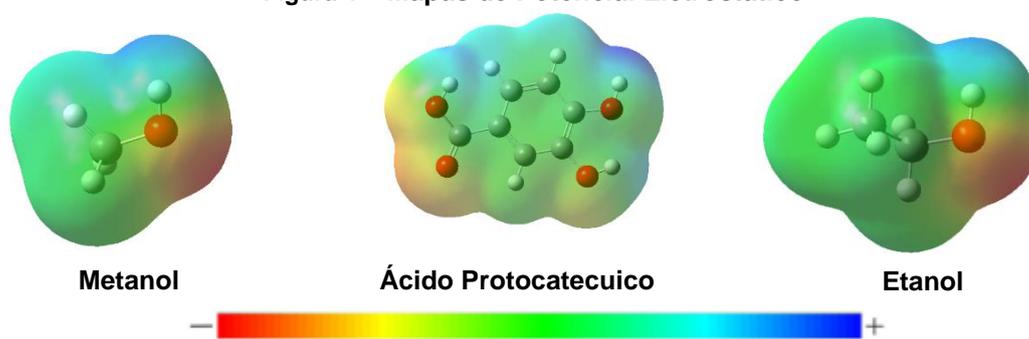
Figura 3 – Varredura Espectroscópica no Ultravioleta dos Extratos



Fonte: Autores (2023).

Através da análise de varredura espectroscópica na região do ultravioleta (Figura 3) pôde-se confirmar a presença dos compostos fenólicos nos extratos obtidos, principalmente utilizando-se os solventes metanol e etanol. Essas duas bandas de absorção são conhecidas como as bandas $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ e estão relacionadas aos elétrons nos orbitais atômicos das moléculas dos compostos fenólicos. Na banda $\pi-\pi^*$ a absorção ocorre entre 220 e 240nm e está relacionada à excitação de elétrons na estrutura do anel aromático. Já na banda $n-\pi^*$ a absorção ocorre entre 270 e 290nm, devido aos grupos funcionais hidroxilas (AMÂNCIO et. al, 2013).

Figura 4 – Mapas de Potencial Eletrostático



Fonte: Autores (2023).

Tanto o metanol quanto o etanol, possuem em suas estruturas um grupo hidroxila que confere à molécula uma estrutura polar. No entanto, devido à presença de um átomo de carbono adicional no etanol, o carácter apolar é mais acentuado, fazendo com que os compostos fenólicos majoritários no cupuaçu tenham uma melhor interação eletrostática, já que apesar de possuírem hidroxilas, carbonilas e estruturas glicosiladas, estas moléculas



apresentam regiões eletrostáticas mais similares com o etanol em comparação com o metanol, conforme pode-se analisar na Figura 4. Os mapas de potencial eletrostático foram calculados utilizando o software Gaussian 09W através da Teoria do Funcional da Densidade (do inglês, Density Functional Theory, DFT).

CONCLUSÃO

O extrato etanólico exibiu a maior atividade antioxidante, com IC_{50} 77,77 mg/mL, o que está em consonância com a análise de compostos fenólicos (355,03 mg EAG/L) em comparação aos demais solventes analisados. Além disso, a análise de varredura espectroscópica confirmou a presença de compostos fenólicos.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela estrutura fornecida para realização da pesquisa e pelo auxílio financeiro.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

AMÂNCIO, D. et al. Determinação estrutural de compostos fenólicos partindo da absorção UV recolhida on-line por HPLC/DAD. **8º Encontro Nacional de Cromatografia**, 2 a 4 de Dezembro de 2013, Covilhã, p. 198-191, 2013.

BRAHEM, Marwa et al. Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars. **Food Research International**, 2017.

COSTA, Russany Silva da et al. Bioactive compounds and value-added applications of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) agroindustrial by-product. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 401-407, 2019.

DA COSTA, Caroline Machado et al. Aproveitamento integral do cupuaçu na área de panificação. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e34711528176-e34711528176, 2022.

DA SILVA MOTA, Luciana Serra; DA ROCHA SERUFFO, Heloísa Helena; DA ROCHA, Carlos Alberto Machado. Prospecção Tecnológica de *Theobroma grandiflorum*: mapeamento de tecnologias geradas a partir do Cupuaçu. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 3, p. 733-733, 2020.

OLIVEIRA, Mônica Bezerra dos Santos et al. Avaliação da capacidade antioxidante e perfil químico de extratos da fibra da casca do coco (*Cocos nucifera* L. Palmae). **Repositório PPGQB UFAL**. 2015.

SHI, Linghong et al. Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 54, p. 81112-81129, 2022.