UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caracterização química, composição centesimal e avaliação citotóxica dos frutos de *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum* e *Theobroma sylvestre*.

EDSON QUEIROZ DA FONSECA JUNIOR
DOUTORADO

Manaus/AM
Março/2026

EDSON QUEIROZ DA FONSECA JUNIOR

Caracterização química, composição centesimal e avaliação citotóxica dos frutos de *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum* e *Theobroma sylvestre*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas exigida para o título de Doutor em Química, com ênfase em Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Dra. JAQUELINE DE ARAÚJO BEZERRA
Orientadora

Manaus/AM
Março/2026

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F676c Fonseca Júnior, Edson Queiroz da
Caracterização química, composição centesimal e avaliação citotóxica dos frutos de Theobroma bicolor, Theobroma subincanum e Theobroma sylvestre / Edson Queiroz da Fonseca Júnior. - 2026.
139 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Jaqueline de Araújo Bezerra.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Química, Manaus, 2026.

1. Theobroma bicolor(macambo). 2. Theobroma subincanum(cupuí). 3. Theobroma sylvestre(cacau-azul). 4. compostos fenólicos. 5. citotoxicidade. I. Bezerra, Jaqueline de Araújo. II. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título

---

Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

"CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DOS FRUTOS DE THEOBROMA BICOLOR, THEOBROMA SUBINCANUM E THEOBROMA SYLVESTRE."

EDSON QUEIROZ DA FONSECA JÚNIOR

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor(a) em Química.

Aprovada em 30 de março de 2026.

Banca Examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
JAQUELINE DE ARAUJO BEZERRA
Data: 09/04/2026 15:24:05-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

PROFA. DRA. JAQUELINE DE ARAÚJO BEZERRA (PPGQ/UFAM)
PRESIDENTE/ORIENTADOR(A)

gov.br Documento assinado digitalmente
MARCOS BATISTA MACHADO
Data: 10/04/2026 11:52:08-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

PROF. DR. MARCOS BATISTA MACHADO (PPGQ/UFAM)

MEMBRO INTERNO

gov.br Documento assinado digitalmente
RENYER ALVES COSTA
Data: 10/04/2026 15:02:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

PROF. DR. RENYER ALVES COSTA (PPGQ/UFAM)

MEMBRO INTERNO

Documento assinado digitalmente
gov.br
PATRICIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE
Data: 10/04/2026 16:45:02-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

PROFA. DRA. PATRÍCIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE (UEA)

MEMBRO EXTERNO

Documento assinado digitalmente
gov.br
LYEGE MAGALHAES OLIVEIRA
Data: 13/04/2026 16:56:49-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

PROFA. DRA. LYEGE MAGALHÃES OLIVEIRA (IFAM)

MEMBRO EXTERNO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Manaus, 30 de março de 2026.

Av. General Rodrigo Octávio, 6200 - Bairro Coroado 1 Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho, Setor Norte - Telefone: (92) (92) 3305-1181 / Ramal 2403
CEP 69080-900 Manaus/AM - ppgq@ufam.edu.br

Referência: Processo nº 23105.008731/2026-78 SEI nº 3048664

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela força e por tudo o que Ele tem me proporcionado até aqui.

À minha mãe, Ivone de Souza Moraes, e ao meu pai, Edson Queiroz da Fonseca, cujo apoio, amor incondicional e encorajamento foram pilares essenciais ao longo da minha jornada acadêmica, acompanhando, apoiando e celebrando comigo todas as conquistas alcançadas.

À minha orientadora, Dra. Jaqueline de Araújo Bezerra, a quem expresso minha sincera gratidão. Sua orientação perspicaz, dedicação e inspiração foram cruciais para a realização deste trabalho. Agradeço por compartilhar seu conhecimento e experiência, contribuindo não apenas para o desenvolvimento desta pesquisa, mas também para o meu crescimento como pesquisador.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFAM, agradeço a oportunidade de fazer parte desta instituição de excelência. As experiências e os aprendizados proporcionados ao longo deste período contribuíram significativamente para minha formação e desenvolvimento profissional.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa Núcleo de Estudos em Ciência e Tecnologia da Amazônia (NECTAM) — Anderson da Silva Ferreira, Andreia Montoia Salvador, Andreza Cavalcante de Oliveira, Cláudia Almeida Alves Vermehren, Daniel de Queiroz Rocha, Débora Nogueira Cavalcante, Edinilze Souza Coelho Oliveira, João Vitor Souza Soares, Josiana Moreira Mar, Josias Martins dos Anjos Cruz, Laila Yasmin dos Santos Silva, Luís Felipe Matos Costa, Samuel Oliveira da Silva e Zilanir Carvalho Pereira —, minha gratidão pela colaboração, pelo apoio mútuo e pelas valiosas trocas de conhecimento no laboratório. O trabalho em equipe e o ambiente colaborativo foram fundamentais para o enriquecimento do meu projeto de pesquisa. Meu muito obrigado!

Aos meus amigos Dra. Edinilze Souza Coelho Oliveira, e mestres Daniel de Queiroz Rocha e Josias Martins dos Anjos Cruz, agradeço profundamente pela colaboração nas etapas de elucidação estrutural dos compostos, nas discussões de RMN e na condução das técnicas cromatográficas, contribuições que enriqueceram significativamente esta pesquisa. Ao Dr. Renilto Frota Corrêa, agradeço pelo incentivo, pela confiança, pela troca

de conhecimentos e pelos momentos de descontração que tornaram esta jornada mais leve. Tenho grande admiração pelo profissional que você é e me inspiro em sua trajetória.

À banca examinadora — Profa. Dra. Lyege Magalhães Oliveira, Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque, Prof. Dr. Marcos Batista Machado e Prof. Dr. Renyer Alves Costa —, agradeço por terem aceitado o convite e por contribuírem para o engrandecimento deste trabalho.

“Digno é o Cordeiro de Deus de receber o poder,
riqueza, sabedoria, força, honra, glória e louvor!”

Apocalipse 5:12

RESUMO

As florestas tropicais úmidas, como a Amazônia, abrigam inúmeras espécies vegetais de interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica, com potencial para impulsionar o desenvolvimento científico, tecnológico e econômico da região. Entretanto, espécies como *Theobroma bicolor* (macambo), *Theobroma subincanum* (cupuí) e *Theobroma sylvestre* (cacau-azul), pertencentes à família Malvaceae e classificadas como Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), ainda são pouco exploradas e carecem de estudos detalhados sobre sua composição química e seu valor nutricional. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar a composição centesimal, o perfil químico de compostos bioativos e o potencial citotóxico dos frutos (cascas, polpas e sementes) de espécies amazônicas do gênero *Theobroma*. Os extratos de cacau-azul, cupuí e macambo foram obtidos por maceração à frio em banho ultrassônico. A composição centesimal (umidade, proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas) foi determinada para as diferentes partes dos frutos *in natura*. O perfil químico foi avaliado por técnicas espectroscópicas e cromatográficas, e os ensaios de citotoxicidade foram realizados frente às linhagens tumorais A549 e HCT-8 e às células endoteliais HUVEC. O fruto de *T. sylvestre* (cacau-azul) apresentou parâmetros físico-químicos compatíveis com padrões de derivados de cacau, destacando-se as sementes, com elevados teores de proteínas, carboidratos e valor energético (144,13 kcal/100 g). Foram identificados 23 metabólitos, incluindo flavonoides e metilxantinas, sendo quatro relatados pela primeira vez no gênero *Theobroma*: 3-metil-1-butanol-pentosil-hexosídeo-1, secoisolariciresinol-9′-*O*-*β*-D-glucopiranosídeo, um glicosídeo diterpenoide furanoide e siringina. Os extratos apresentaram citotoxicidade moderada e atividade antiproliferativa relevante contra as linhagens A549, HCT-8 e HUVEC. Em *T. subincanum* (cupuí), as sementes apresentaram elevados teores de proteínas, carboidratos e valor energético (360,69 kcal/100 g). A análise do perfil lipídico revelou a presença de ácidos graxos como palmítico e linoleico nas diferentes partes do fruto, além de ácido elaídico na polpa e na casca. Foram identificados seis constituintes, incluindo triptofano, o alcaloide teacrina e flavonoides como epicatequina, clovamida e luteolina, evidenciando similaridade química entre espécies do gênero. Para *T. bicolor* (macambo), a composição centesimal indicou as sementes com elevado teor energético (377,40 kcal/100 g) e predominância de carboidratos, enquanto o perfil lipídico mostrou altos teores de ácidos graxos saturados, especialmente derivados dos ácidos palmítico e esteárico. A caracterização química revelou compostos como ácido oleico, ácido fórmico, triptofano e as metilxantinas teofilina e teobromina. Nos ensaios de citotoxicidade, os extratos apresentaram atividade moderada e efeitos antiproliferativos, com maior inibição do crescimento celular observada para os extratos da casca. Os resultados demonstram que as espécies estudadas possuem relevante potencial nutricional e bioativo, constituindo fontes promissoras de compostos com propriedades antioxidantes e antiproliferativas. Portanto, essas contribuições ampliam o conhecimento fitoquímico sobre o gênero *Theobroma* e evidenciam o potencial de aproveitamento sustentável dessas espécies amazônicas no desenvolvimento de alimentos funcionais, ingredientes nutracêuticos e aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum*, *Theobroma sylvestre*, compostos fenólicos, citotoxicidade.

ABSTRACT

Humid tropical forests, such as the Amazon, harbor countless plant species of interest to the food and pharmaceutical industries, with the potential to drive the region's scientific, technological, and economic development. However, species such as *Theobroma bicolor* (macambo), *Theobroma subincanum* (cupuí), and *Theobroma sylvestre* (blue cacao), belonging to the Malvaceae family and classified as Unconventional Food Plants (UFPs), remain underexplored and require detailed studies on their chemical composition and nutritional value. In this context, this study aimed to investigate the proximate composition, chemical profile of bioactive compounds, and cytotoxic potential of the fruits (peels, pulps, and seeds) of Amazonian *Theobroma* species. Extracts of blue cacao, cupuí, and macambo were obtained by cold maceration in an ultrasonic bath. The proximate composition (moisture, proteins, lipids, carbohydrates, and ash) was determined for the different parts of the fresh fruits. The chemical profile was evaluated using spectroscopic and chromatographic techniques, while cytotoxicity assays were performed against the A549 and HCT-8 tumor cell lines and HUVEC endothelial cells. The fruit of *T. sylvestre* (blue cacao) exhibited physicochemical characteristics consistent with cocoa-derived products, with the seeds standing out for their high protein and carbohydrate contents and energy value (144.13 kcal/100 g). A total of 23 metabolites were identified, including flavonoids and methylxanthines, four of which were reported for the first time in the genus *Theobroma*: 3-methyl-1-butanol-pentosyl-hexoside-1, secoisolariciresinol-9′-*O*-*β*-D-glucopyranoside, a furanoid diterpenoid glycoside, and syringin. The extracts exhibited moderate cytotoxicity and relevant antiproliferative activity against the A549, HCT-8, and HUVEC cell lines. In *T. subincanum* (cupuí), the seeds showed high protein and carbohydrate contents and a high energy value (360.69 kcal/100 g). Lipid profile analysis revealed the presence of fatty acids such as palmitic and linoleic acids in the different parts of the fruit, as well as elaidic acid in the pulp and peel. Six constituents were identified, including tryptophan, the alkaloid theacrine, and flavonoids such as epicatechin, clovamide, and luteolin, highlighting the chemical similarity among species within the genus. For *T. bicolor* (macambo), proximate composition analysis indicated that the seeds had a high energy value (377.40 kcal/100 g) and were predominantly composed of carbohydrates, whereas the lipid profile showed high levels of saturated fatty acids, particularly derivatives of palmitic and stearic acids. Chemical characterization revealed compounds such as oleic acid, formic acid, tryptophan, and the methylxanthines theophylline and theobromine. In the cytotoxicity assays, the extracts demonstrated moderate activity and antiproliferative effects, with the greatest inhibition of cell growth observed for the peel extracts. These findings demonstrate that the studied species possess significant nutritional and bioactive potential, representing promising sources of compounds with antioxidant and antiproliferative properties. Therefore, these contributions expand the phytochemical knowledge of the genus *Theobroma* and highlight the potential for the sustainable use of these Amazonian species in the development of functional foods, nutraceutical ingredients, and biotechnological applications.

Keywords: *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum*, *Theobroma sylvestre*, phenolic compounds, cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

A549	Células de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano
ANOVA	Análise de Variância
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EAG	Equivalente de ácido gálico
GI_{50}	Concentração de extrato que inibe o crescimento celular em 50%
H_2O UP	Água Ultrapura
HCT-8	Células de adenocarcinoma ileocecal colorretal humano
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
IC_{50}	Concentração de extrato que inibe a viabilidade celular em 50%
LC_{50}	Concentração de extrato que resulta em 50% de morte celular
PANC	Plantas Alimentícias Não Convencionais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
IS	Índice de Seletividade
UPLC-QToF/MS	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UPLC) acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolo–tempo de voo (*time-of-flight)*
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de um estilo de vida saudável, destacando a prática de atividade física associada ao consumo de alimentos naturais e hidratação adequada, elementos fundamentais para a promoção da saúde e bem-estar físico e metabólico. 16
Figura 2 - Ocorrência de *Theobroma* spp. em todo o mundo. 22
Figura 3 - Mesocarpo e sementes de frutos de *Theobroma subincanum* (A), *Theobroma bicolor* (B) e *Theobroma sylvestre* (C). 24
Figura 4 - Alcaloides purínicos encontrados em espécies de *Theobroma*: Cafeína (A), Teobromina (B) e Teacrina (C). 25
Figura 5 - Estruturas dos compostos identificados em *Theobroma* spp. 30
Figura 6 - Fruto de *Theobroma bicolor*. 32
Figura 7 - Fruto de *Theobroma subincanum*. 33
Figura 8 - Estrutura da Isoscutelareína-8-*O*-*β*-D-glucoronídeo. 34
Figura 9 - *Theobroma sylvestre* Mart.: (a) Fruto preso ao caule; (b) Frutos reunidos, destacando suas características morfológicas e coloração. Imagens registradas em Manaus, Amazonas - Brasil. 55
Figura 10 - Estruturas químicas dos constituintes identificados nos frutos de *T. sylvestre* por análises de LC-HRMS e RMN. 61
Figura 11 - A avaliação da citotoxicidade de PFPe (Fração Fenólica da Casca), PFPu (Fração Fenólica da Polpa) e PFS (Fração Fenólica das Sementes) foi realizada nas linhagens celulares A549, HCT-8 e HUVEC. (A, D e G) IC_{50}: concentração do agente que reduz o crescimento celular em 50%. (B, E e H) GI_{50}: concentração do agente que diminui o crescimento em 50% em comparação com as células não tratadas. (C, F e I) LC_{50}: concentração do agente que causa uma redução líquida de 50% das células em relação à contagem inicial de células no início do tratamento. 72
Figura 12 - *Theobroma subincanum* Mart.: (A) Pericarpo do fruto; (B) Frutos maduros de cupuí, destacando suas características morfológicas e fenotípicas. Imagens capturadas em Manaus, Amazonas – Brasil. 84
Figura 13 - Avaliação da citotoxicidade do ESC (Extrato da Semente de Cupuí); ECC (Extrato da Casca de Cupuí) e EPC (Extrato da Polpa de Cupuí) foi realizada nas linhagens celulares A549, HCT-8 e HUVEC. (A, D e G) IC_{50}: a concentração do agente que reduz o crescimento celular em 50%. (B, E e H) GI_{50}: a concentração do agente que diminui o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas. (C, F e I) LC_{50}:

a concentração do agente que causa uma redução líquida de 50% das células em relação à contagem inicial de células no início do tratamento..... 95
Figura 14 - *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. (macambo): (A) Pericarpo do fruto aberto, mostrando a cavidade interna; (B) Fruto maduro inteiro, evidenciando suas características morfológicas externas. Material registrado em Manaus, Amazonas – Brasil..... 105
Figura 15 - Avaliação da citotoxicidade do ESM (Extrato da Semente do Macambo); ECM (Extrato da Casca do Macambo) e EPC (Extrato da Polpa do Macambo) foi realizada nas linhagens celulares A549, HCT-8 e HUVEC. (A, D e G) IC_{50}: a concentração do agente que reduz o crescimento celular em 50%. (B, E e H) GI_{50}: a concentração do agente que diminui o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas. (C, F e I) LC_{50}: a concentração do agente que causa uma redução líquida de 50% das células em relação à contagem inicial de células no início do tratamento.....117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - PANC da família Malvaceae empregadas em pratos culinários. 20
Tabela 2 - Espécies de *Theobroma* com estudos químicos, biológicos e farmacológicos. 22
Tabela 3 - Compostos identificados em *Theobroma* spp. 27
Tabela 4 - Análise do panorama de Propriedade Intelectual para aplicações das espécies do gênero *Theobroma*. 36
Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos, composição proximal (g/100 g de matéria seca) e valor energético (kcal/100 g de matéria seca) da casca, polpa e semente de *T. sylvestre*. 59
Tabela 6 - Metabólitos identificados nas frações fenólicas dos frutos de *T. sylvestre* por LC-HRMS e espectroscopia de RMN 1D/2D. PFPe = fração fenólica da casca; PFPu = fração fenólica da polpa; PFS = fração fenólica das sementes. 65
Tabela 7 - IC_{50} e Índice de Seletividade (IS) dos extratos PFPe, PFPu e PFS. 71
Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos, composição centesimal (g/100 g de matéria seca) e energia (kcal/100 g de matéria seca) da polpa, semente e casca de *T. subincanum* (cupuí). 89
Tabela 9 - Compostos identificados nos extratos de *T. subincanum* por UPLC-QToF/MS e RMN. ECC: casca, EPC: polpa, ESC: semente. 92
Tabela 10 - IC_{50} e Índice de Seletividade (IS) dos extratos ESC (Extrato da Semente de Cupuí); ECC (Extrato da Casca de Cupuí) e EPC (Extrato da Polpa de Cupuí). 94
Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos, composição centesimal (g/100 g de matéria seca) e energia (kcal/100 g de matéria seca) da polpa, semente e casca de *T. bicolor* (macambo). 110
Tabela 12 - Metabólitos identificados em extratos de *T. bicolor* (macambo) por 1D e 2D RMN. ECM: casca, EPM: polpa, ESM: semente. 114
Tabela 13 - IC_{50} e Índice de Seletividade (IS) dos extratos ESM, EPM e ECM. 115

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. OBJETIVOS 15
2.1 GERAL 15
2.2 ESPECÍFICOS 15
3. REVISÃO DA LITERATURA 16
3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS E ESTILO DE VIDA 16
3.2 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC) COMO ALIMENTO FUNCIONAL 17
3.3 FAMÍLIA MALVACEAE A. JUSS 19
3.4 GÊNERO *Theobroma* spp. 21
3.4.1 Frutos de *Theobroma* spp. 23
3.4.2 Composição Química de *Theobroma* spp. 24
3.4.3 Composição Nutricional de *Theobroma* spp. 31
3.5 *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. 31
3.6 *Theobroma subincanum* Mart. 33
3.7 *Theobroma sylvestre* Mart. 34
3.8 PATENTES DE *Theobroma* spp. 35
4. REFERÊNCIAS 38
Capítulo I 51
INTRODUÇÃO 53
MATERIAIS E MÉTODOS 55
RESULTADOS E DISCUSSÃO 58
CONCLUSÃO 73
REFERÊNCIAS 73
Capítulo II 80
INTRODUÇÃO 82
MATERIAIS E MÉTODOS 84
RESULTADOS E DISCUSSÃO 88
CONCLUSÃO 96
REFERÊNCIAS 96
Capítulo III 101
INTRODUÇÃO 103
MATERIAIS E MÉTODOS 106
RESULTADOS E DISCUSSÃO 109

CONCLUSÃO.....118
CONCLUSÃO GERAL 119
REFERÊNCIAS..... 121
APÊNDICE 126

1. INTRODUÇÃO

A crescente busca pela diversidade de frutas está ligada ao seu papel indispensável em uma dieta saudável, pois estas são fontes ricas de vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos, cujos benefícios significativos atuam na prevenção de inúmeras doenças (Carrillo-Perdomo et al., 2015; Charoenkiatkul; Thiyajai; Judprasong, 2016; Pinheiro et al., 2024; Zhao et al., 2023). Assim, o consumo diário e regular oferece ao indivíduo quantidades substanciais de micronutrientes, fibras, antioxidantes e compostos fitoquímicos que atuam na prevenção de doenças crônicas, como câncer e infarto (Angelino et al., 2019; Baraldi et al., 2025).

Entre os constituintes químicos das frutas, destacam-se os compostos fenólicos, oriundos do metabolismo secundário. Considerados antioxidantes naturais, eles protegem múltiplos órgãos contra a oxidação e exercem ações farmacológicas, como as atividades anti-inflamatória e neuroprotetora (Ramos et al., 2015; Silva et al., 2023a; Stefanucci et al., 2020). Embora as frutas mais consumidas sejam cultivadas em larga escala, há potencial para frutas consumidas localmente que são menos conhecidas e que podem se mostrar benéficas quando investigadas (Rodrigues; Silva; Brito, 2018).

Nos últimos anos, a busca e utilização de frutas nativas, como as frutas amazônicas, têm apresentado uma tendência crescente no mercado, refletindo a demanda dos consumidores por produtos naturais com propriedades nutricionais e funcionais (Cruz et al., 2024; Oliveira et al., 2025; Rodrigues et al., 2023). Entre elas destacam-se as espécies do gênero *Theobroma.* Entretanto, poucos são os relatos científicos publicados relacionados à diferentes desse gênero, bem como sua caracterização química, propriedades biológicas e farmacológicas, manejo pós-colheita e/ou dados experimentais direcionados a sua utilização na área de alimentos (Quijano; Pino, 2009; Mar et al., 2024; Soleri; Cleveland, 2007).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou a caracterização química e avaliação do potencial citotóxico de extratos obtidos das cascas, polpas e sementes de três espécies do gênero *Theobroma*: *Theobroma bicolor* (macambo), *Theobroma subincanum* (cupuí) e *Theobroma sylvestre* (cacau-azul), visando contribuir para o conhecimento científico da química deste gênero e gerar subsídios para o desenvolvimento de produtos alimentícios alternativos ao cacau.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar a composição química, nutricional e propriedades citotóxicas dos frutos (cascas, polpas e sementes) de *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum* e *Theobroma sylvestre*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a composição centesimal (umidade, proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas) dos frutos (cascas, polpas e sementes) de *Theobroma* spp.;
- Identificar os compostos presentes nas frações lipídicas desses frutos por CG-MS;
- Analisar a citotoxicidade dos extratos desses frutos frente às células A549, HCT-8 e HUVEC;
- Obter frações ricas em metilxantinas e compostos fenólicos dos extratos dos frutos de *Theobroma* spp. por Sistema de Extração em Fase Sólida;
- Caracterizar os compostos majoritários desses frutos por RMN e UPLC-QToF/MS.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS E ESTILO DE VIDA

Um estilo de vida saudável constitui um sistema multifatorial, que compreende a prática regular de atividade física, a manutenção do bem-estar mental, hábitos adequados de higiene, escolhas alimentares balanceadas e a abstinência do uso recreativo de substâncias nocivas (Szakály et al., 2012). Nos últimos anos, a sociedade tornou-se cada vez mais consciente da íntima relação entre saúde e alimentação. Isso ocorre porque o estilo de vida de um indivíduo, incluindo seus hábitos alimentares, influencia rotineiramente sua longevidade (Chen, 2011; Gutiérrez-Domingo; Vivas, 2025) (Figura 1). Como resultado, observa-se uma mudança no comportamento do consumidor de hoje, caracterizada por um maior cuidado a saúde e uma atenção criteriosa ao perfil nutricional dos alimentos que consomem (Özenoğlu et al., 2024; Szakály et al., 2012).

Figura 1 - Representação de um estilo de vida saudável, destacando a prática de atividade física associada ao consumo de alimentos naturais e hidratação adequada, elementos fundamentais para a promoção da saúde e bem-estar físico e metabólico.



Fonte: Freepik (2025)

Entre as diversas categorias de alimentos atualmente, tem-se em ascensão os alimentos funcionais, pois hoje os alimentos não se destinam apenas em satisfazer a fome e a fornecer os nutrientes necessários ao indivíduo, mas também a prevenir doenças relacionadas à nutrição e melhorar o bem-estar físico e mental dos consumidores (Menrad, 2003; Obayomi et al., 2026). Conforme Siró et al. (2008), um alimento só pode ser considerado funcional se, além de seu efeito nutricional básico, tiver um efeito benéfico sobre uma ou mais funções do corpo humano, seja melhorando a condição física geral e/ou reduzindo o risco de progressão de doenças. A quantidade e a forma do alimento funcional devem ser as esperadas normalmente para fins dietéticos. Portanto, não deve estar na forma de um comprimido ou cápsula, mas semelhante a um alimento convencional (Diplock et al., 1999).

Com base nos estudos de Souza et al. (2023), o mercado de alimentos funcionais é o setor que rapidamente tem crescido no mercado alimentar global, atingindo 300 milhões de dólares em 2017, e acima de 440 milhões de dólares em 2022, sendo, portanto, uma tendência desafiadora para a indústria de alimentos. Países como China, Estados Unidos, Coreia do Sul e Japão — reconhecido como pioneiro no desenvolvimento desses produtos — estão liderando uma corrida tecnológica emergente no setor de alimentos funcionais marinhos. Esses constituem uma fonte ainda subexplorada de compostos bioativos, como peptídeos, polissacarídeos, carotenoides e ácidos graxos como ômega-3, cujos efeitos benéficos à saúde já são evidenciados (Guo et al., 2026).

Entre os alimentos funcionais promissores, as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) da região amazônica emergem como um grupo destaque, pois apresentam compostos bioativos, como ácidos fenólicos e flavonoides, e outros compostos nutracêuticos, com índices acima dos alimentos convencionais (Silva et al., 2021). Sua oferta em mercados locais não somente se dá pelo fruto *in natura*, mas também nota-se seu uso em subprodutos, como em bebidas (licores, sucos), geleias, doces, sorvetes, picolés, chás, condimentos, entre outras formas ainda artesanais (Passos, 2019).

3.2 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC) COMO ALIMENTO FUNCIONAL

No Brasil, o acrônimo PANC foi criado pelo professor e biólogo Valdely Ferreira Kinupp, em 2008, com o intuito de referir-se às plantas que possuem uma ou mais partes comestíveis, sendo elas espontâneas ou cultivadas, nativas ou exóticas, que

não estão incluídas no cardápio cotidiano (Kinupp; Barros, 2004). Eram anteriormente conhecidas como plantas daninhas, silvestres, inços ou mato devido à falta de conhecimento e ao desuso pela maior parte da população. Contudo, essas são espécies que podem ter importância biológica, nutricional e econômica com potenciais ainda inexplorados (Ferreira et al., 2024; Kinupp; Barros, 2004).

Dentre as partes de PANC, ricas em nutrientes e consumidas *in natura* ou em preparos culinários, descritas na literatura estão as flores, cascas de frutos maduros, sementes e rizomas, dentre outras (Kinupp; Lorenzi, 2014). Como exemplo, tem-se o estudo conduzido por Pires et al. (2018) que abordou a avaliação da produção e propriedades sensoriais de iogurtes com extratos de pétalas de *Rosa damascena* (Rosaceae) e *Centaurea cyanus* L. (Asteraceae), ambas flores comestíveis ricas em antocianinas. Outra espécie muito utilizada na culinária brasileira e também catalogada como PANC é *Viola x wittrockiana* (híbrido) conhecida como amor-perfeito. Suas flores são particularmente exploradas, pois apresentam alto valor nutricional e também são ricas em compostos bioativos, como flavonoides e antocianinas (Kinupp; Lorenzi, 2014; Orr, 2011). Folhas de *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nóbis), conhecidas pelo alto teor de compostos fenólicos e mucilagem, que conferem propriedades antioxidantes e emulsificantes, são utilizadas no preparo de hambúrgueres à base de proteína de soja (Oliveira et al., 2026). Já suas sementes, que apresentam baixo teor lipídico e são fonte de açúcares como arabinofuranose, arabinopiranose e ramnopiranose, são largamente empregadas na produção de pães, destacando-se como uma planta alimentar não convencional de múltiplas aplicações (Lira et al., 2023; Martinevski et al., 2013).

No Brasil, ainda existem poucos trabalhos científicos e divulgação a respeito de PANC. As principais famílias botânicas amplamente utilizadas em aplicações alimentícias estão Lamiaceae, Rutaceae, Piperaceae e Malvaceae, pois são fontes de nutrientes como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios, além de compostos bioativos e fitoquímicos, que exercem ação terapêutica e são empregados também em nutracêuticos. Na família Malvaceae estão catalogadas como PANC algumas espécies dos gêneros *Ceiba*, *Hibiscus*, *Malviscus* e *Theobroma*. Cálices e folhas de *Hibiscus sabdariffa* L. têm sido muito utilizadas na indústria alimentícia para a produção geleias, molhos, bebidas instantâneas e infusões com intuito ao apelo sensorial dos pratos tradicionais e criação de novas receitas (Mariutti et al., 2021; Mendonça et al., 2023). Já no gênero *Theobroma*, a polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K.Schum), por exemplo, é amplamente utilizada na região amazônica para a elaboração de sucos,

sorvetes, compotas, geleias e bebidas fermentadas, como iogurtes e cervejas (Bezerra et al., 2024; Costa et al., 2017; Fonseca Júnior et al., 2025; Ipiranga; Souza; Fonseca Júnior, 2022; Vriesmann; Silveira; Petkowicz, 2010).

3.3 FAMÍLIA MALVACEAE A. JUSS

A família Malvaceae A. Juss, pertencente à ordem denominada Malvales e proposta por Jussieu em 1789, sendo constituída por 252 gêneros e cerca de 4.330 espécies, encontra-se distribuída em zonas temperadas, subtropicais e tropicais na África, Ásia e Europa, incluindo países como China, Índia, Ásia Central, Mediterrâneo, América do Sul e México (Le Péchon; Gigord, 2014; Sharifi-Rad et al., 2020). No Brasil, existem 73 gêneros e 791 espécies, das quais 7 e 422, respetivamente, são endêmicas (Silva; Gallão; Arruda, 2023).

As plantas da família Malvaceae podem ser encontradas na forma de ervas, arbustos, com folhas em disposição alternadas ou espiraladas, enquanto suas flores exibem cores intensas, como *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiern (vinagreira-roxa), *Ceiba speciosa* (A.St.-Hil.) Ravenna (paineira-rosa) e *Malva parviflora* L. (malva) que são de tonalidade rosadas e roxas, e *Hibiscus arnottianus* (hibiscus-de-flor-branca) e *Sida rhombifolia* L. (guanxuma) de coloração brancas (Mar et al., 2020; Pires et al., 2023; Silva et al., 2023b). Muitas espécies da família são famosas por serem cultivadas como plantas ornamentais, como as dos gêneros *Malva* e *Hibiscus*, e também presentes em fins paisagísticos e jardinagem, como espécie *Ceiba speciosa* (Habtemariam, 2019; Sazima; Sazima, 2022).

Embora certas espécies sejam extensivamente empregadas na agricultura, silvicultura e horticultura no Brasil, destacando o algodão (*Gossypium* spp.) e a cola (*Cola* spp.) como exemplos notórios, algumas espécies pertencentes à família Malvaceae são reconhecidas como PANC (Bayer; Kubitzki, 2003; Milião et al., 2022).

Algumas PANC da família, presentes no país, estão a sumaúma (*Ceiba pentandra* (L.) Gaertn), a paineira-rosa (*Ceiba speciosa* (St.-Hill.) Ravenna), o cacau-jacaré (*Herrania mariae* (Mart.) Decne. ex Goudot) e a vinagreira-roxa (*Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiern) (Rodrigues; Spence, 2023). Muitas vezes, elas são plantas nativas, exóticas, cultivadas ou silvestres que permanecem desconhecidas ou subutilizadas pela maioria da população brasileira (Costa et al., 2023). Geralmente, as PANC destacam-se como rica fonte de nutrientes, como vitaminas, minerais e fibras, além de possuírem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Bezerra; Brito, 2020;

Folharini et al., 2019). Por isso, folhas, flores e sementes dessas espécies são empregados como ingredientes no preparo de saladas, bolos, geleia e chás, conforme apresentado na Tabela 1 (Mariutti et al., 2021; Rodrigues; Spence, 2023).

Tabela 1 - PANC da família Malvaceae empregadas em pratos culinários.

Espécie	**Nome Popular**	**Parte da Planta**	**Prato Culinário**	**Referência**
Ceiba pentandra (L.) Gaertn	Sumaúma	Semente	Amendoim	(Baraniak; Kania-Dobrowolska, 2023)
Corchorus olitorius L.	Melóquia	Folhas	Mucilagem	(Oh; Kim, 2022)
Hibiscus sabdariffa L.	Vinagreira	Folhas	Bebidas	(Mendonça et al., 2021)
Malva nicaeensis All. e *Lavatera cretica* L.	Malva-branca e Malva-alta	Folhas	Saladas frescas e cozidas	(Basheer et al., 2021; Ben-Simchon et al., 2019)
Malvaviscus arboreus Cav.	Malvavisco	Flores	Salada fresca, geleia e xarope	(Kaisoon et al., 2011; Lim, 2014)
Sterculia lychnophora Hance	Noz-de-malva	Noz	Biscoitos	(Toan; Chi, 2022)

Atualmente, na região amazônica, do ponto de vista econômico, destaca-se o gênero *Theobroma* dentro da família Malvaceae. O gênero abriga 22 espécies, sendo nove delas nativas da região. O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), cujas sementes são utilizadas na fabricação do chocolate, é uma espécie notável contendo o alcaloide estimulante teobromina como constituinte ativo de seu fruto. As sementes do cacaueiro também são ricas em compostos fenólicos, incluindo as catequinas (flavan-3-óis), antocianinas e proantocianidinas, polifenóis com propriedades antioxidantes (Kim; Lee; Lee, 2011; Yañez et al., 2021). Entretanto, observa-se que outras espécies dentro desse gênero ainda carecem de estudos científicos sobre a sua composição, especialmente as PANC.

3.4 GÊNERO *Theobroma* spp.

Charles de L'Ecluse, o humanista, médico e botânico foi o primeiro a citar o cacau na literatura botânica como *Cacao fructus*; onde em 1737, o taxonomista sueco Carl von Linné (Linneu) descreveu-o como *Theobroma fructus*. Porém, em 1753, o próprio Linneu propôs o nome específico de *Theobroma cacao*, que permanece até hoje. Dessa forma, o nome científico do gênero *Theobroma*, com a tradução de '*Theo*' significando deuses e '*broma*' referindo-se a comida, é adequadamente interpretado como "*alimento dos deuses*" (Modeste et al., 2017; Souza et al., 2018).

Dentre as 22 espécies do gênero *Theobroma*, o cacau (*Theobroma cacao* L.) é o mais comercializado mundialmente. As sementes de *T. cacao* têm sido utilizadas, ao longo dos últimos séculos, como ingrediente na produção de chocolates e demais produtos alimentícios (Kongor et al., 2016). Ela é reconhecida por ser fonte de polifenóis, flavonoides, catequinas, procianidinas, aminoácidos, polipeptídeos e oligopeptídeos que estão relacionadas com efeitos psicoestimulantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos, antidiabéticos e antioxidantes da espécie (Aprotosoaie; Luca; Miron, 2016; Kim et al., 2014; León-Perez et al., 2019; Mar et al., 2024).

O cenário econômico global da cadeia do cacau é marcado por seu alto valor de mercado, projetando um crescimento significativo de US$ 106 bilhões, em 2017, para US$ 190 bilhões até 2026 (Voora; Bermúdez; Larrea, 2019). Esta expansão impacta positivamente a rentabilidade ao longo da cadeia produtiva, que tem como base a agricultura familiar. A produção mundial é predominantemente sustentada por pequenos agricultores da América Latina, África e Ásia, responsáveis pelo abastecimento do mercado internacional (Agência Agrária de Notícias, 2024).

O gênero *Theobroma* apresenta ampla distribuição nas regiões tropicais, ocorrendo desde a África Ocidental equatorial até as Américas e a Ásia. Sua maior concentração, entretanto, encontra-se nas áreas equatoriais da América do Sul, especialmente no Brasil. Além disso, o gênero também está presente nas Américas Central, Norte e nas Índias Ocidentais e em regiões tropicais da Ásia, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Ocorrência de *Theobroma* spp. em todo o mundo.



Fonte: www.gbif.org

Estudos de polpas do fruto, sementes e flores de algumas espécies do gênero *Theobroma* apresentam ações biológicas já descritas, como a ação antioxidante, anti-inflamatória e citotoxicidade, conforme observado na Tabela 2. A ação antioxidante, especialmente atribuída aos compostos fenólicos presentes, não apenas ressalta sua importância na preservação da integridade celular, mas também sugere o potencial desses elementos vegetais como fontes naturais de compostos bioativos, especialmente dos demais frutos do gênero que ainda são pouco conhecidos, como cacau-azul (*Theobroma sylvestre* Mart.), cupuí (*Theobroma subincanum* Mart.), cacau-de-mico (*Theobroma simiarum* Donn. Sm.), cacauí (*Theobroma speciosum* (L.) Willd) e cacaurana (*Theobroma microcarpum* Mart.) (Flores et al., 2018; Giorgetti; Negri; Rodrigues, 2007).

Tabela 2 - Espécies de *Theobroma* com estudos químicos, biológicos e farmacológicos.

Espécie	**Nome Popular**	**Parte da Planta**	**Extrato/Fração**	**Estudos farmacológicos**	**Referência**
Theobroma bicolor Humb. & Bonpl	Macambo	Sementes	Extratos aquoso e etanólico	Atividade antioxidante	(Torres et al., 2002)
Theobroma cacao L.	Cacau	Sementes e folhas	Extratos aquosos	Atividade antioxidante	(Osman; Nasarudin; Lee, 2004)

Theobroma cacao L.		Sementes	Extrato hidroalcóolico	Atividade anti-inflamatória	(Ramiro et al., 2005)
Theobroma grandiflorum Willd. ex Spreng.	Cupuaçú	Polpa e sementes	-	Atividade antioxidante	(Pugliese et al., 2013)
Theobroma mariae (Mart.) K. Schum.	Cacau-jacaré	Flores	Extrato hidroetanólico	Citotoxicidade	(Silva et al., 2025)
Theobroma speciosum Willd. ex Spreng.	Cacauí	Flores	Extrato aquoso	Atividade antioxidante	(Mar et al., 2021)
Theobroma subincanum Mart.	Cupuí	Sementes	Frações metanólicas	Atividade antioxidante	(Bruni et al., 2002)
Theobroma sylvestre Mart.	Cacau-azul	Casca, polpa e sementes	Extrato hidroetanólico	Citotoxicidade	(Fonseca Júnior et al., 2025)

Atualmente, o mercado de produtos relacionados ao chocolate demanda em larga escala da produção de *T. cacao*. Entretanto, a sustentabilidade de *T. cacao* é desafiada por alguns fatores, como as mudanças climáticas, pragas e doenças, além do desmatamento (Ingram et al., 2018). Portanto, alternativas na substituição ao cacau surgem ao conhecer o potencial dos frutos das demais espécies do gênero.

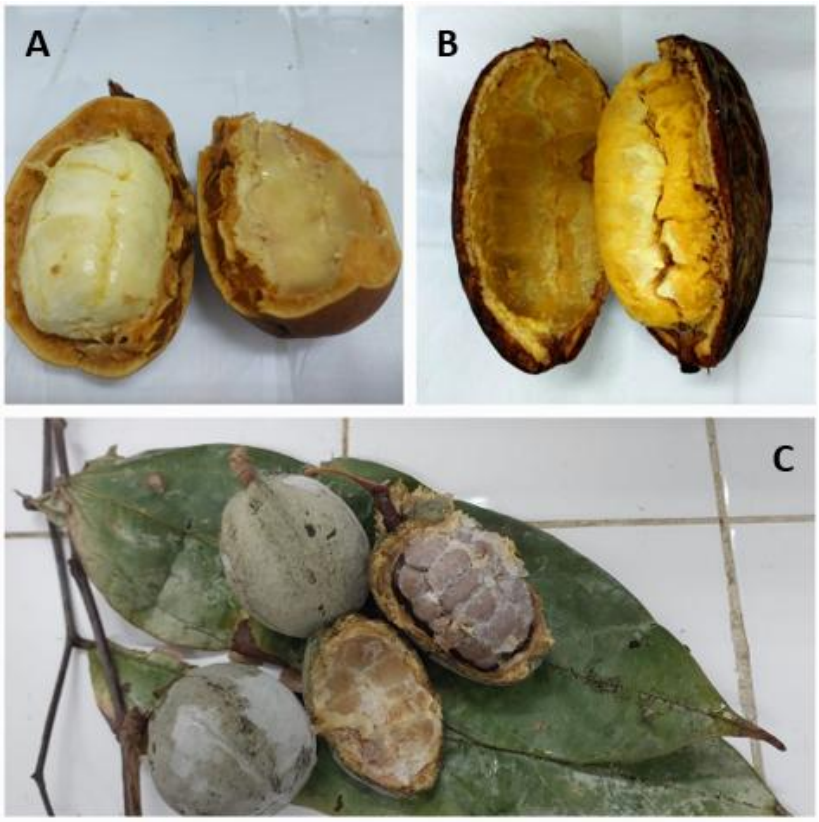
3.4.1 Frutos de *Theobroma* spp.

Os frutos de *Theobroma* spp. apresentam cheiro e sabor agradáveis e são utilizados na fabricação de sucos, gelatinas, sorvetes, licores, marmeladas e outros produtos na indústria de alimentos (González et al., 2016; Rogez et al., 2004).

As árvores de *Theobroma* spp. são penerifólias e caulifloras, isto é, seus frutos e flores brotam no tronco (Figueroa-Hernández et al., 2019). Os seus frutos são alongados

com ou sem sulcos na superfície (pericarpo) e coloração variada dependendo da espécie. O mesocarpo (polpa) geralmente é carnoso e adocicado, amarelo ou branco, com mais de 10 sementes (amêndoas) por fruto, conforme ilustrado na Figura 3. Mundialmente, as sementes torradas de *T. bicolor* e *T. grandiflorum* são largamente empregadas na produção de chocolate, em substituição ao *T. cacao*, e localmente estão presentes em doces e cosméticos, visto que suas composições químicas são afins (Motamayor et al., 2013).

Figura 3 - Mesocarpo e sementes de frutos de *Theobroma subincanum* (A), *Theobroma bicolor* (B) e *Theobroma sylvestre* (C).



Fonte: Própria (2023)

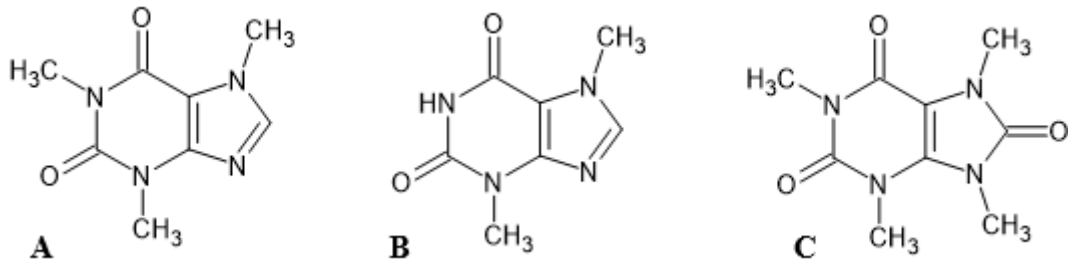
3.4.2 Composição Química de *Theobroma* spp.

A família Malvaceae contém várias classes de compostos, especialmente *Theobroma* spp., entre as quais estão alcaloides, ácidos orgânicos, flavonoides e seus derivados. Além das classes de compostos mencionadas, há muitos estudos relatando a presença de substâncias da classe dos fenilpropanoides e derivados, bem como demais compostos fenólicos, classe essa de valor considerável, visto que tem sido associada a

vários efeitos promotores da saúde, como a prevenção de diferentes tipos de câncer e doenças coronarianas (Perez-Vizcaino; Fraga, 2018).

Os alcaloides, oriundos do metabolismo especial (secundário) de vegetais, apresentam como função primária a proteção da espécie contra herbívoros e organismos patogênicos (Huang et al., 2021). Alguns alcaloides purínicos (pseudoalcaloides) (Figura 4) foram isolados de espécies do gênero *Theobroma* (Tabela 3). Dos diferentes tipos de pseudoalcaloides, *Theobroma* apresenta em sua composição as metilxantinas comuns como cafeína, teobromina e teacrina, encontrados especialmente em sementes e folhas de diferentes espécies do gênero. Os alcaloides purínicos são metabólitos secundários provenientes de nucleotídeos de purina (Crozier; Clifford; Ashihara, 2006) presentes em cerca de 100 espécies em 13 ordens do reino vegetal (Ashihara; Crozier, 1999), incluindo Malvales. Hammerstone Jr, Romanczyk Jr e Aitken (1994) evidenciaram o conteúdo de alcaloides purínicos por cromatografia líquida de alta eficiência, em sementes e folhas de onze espécies de *Theobroma*, e constataram que o ácido 1,3,7,9-tetrametilúrico (teacrina) foi o principal alcaloide purínico presente nas amostras. Traços de teofilina não foram detectadas nas amostras do estudo.

Figura 4 - Alcaloides purínicos encontrados em espécies de *Theobroma*: Cafeína (A), Teobromina (B) e Teacrina (C).



Os fenilpropanoides, obtidos a partir da desaminação da L-fenilalanina, são fitoquímicos não essenciais para a sobrevivência dos vegetais, sendo assim classificados como compostos secundários (JONES, 1984). Nos últimos anos, a atenção dada a classe deve-se às substâncias presentes que desempenham ação farmacológica como antioxidante (Vladimir-Knežević et al., 2012), filtro UV (Takshak; Agrawal, 2019), anti-inflamatório (Cunha et al., 2019), cicatrizante (Ambrosone et al., 2014) e agentes antifúngicos (Raut et al., 2014) e anticâncer (Gao; Gao; Zhu, 2019). O gênero *Theobroma* contém duas classes principais de fenilpropanoides, isto é, o ácido cinâmico e derivados de tocoferol (Tabela 3). Dois derivados comuns do ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico e

ácido cafeico, e dois derivados do ácido cinâmico contendo ácido quínico, ácido p-cumaroilquínico e ácido clorogênico, foram isolados das folhas de *T. cacao* por Jalal e Collin (1977). Em 2016, Tauchen e seu grupo caracterizaram as amostras por UHPLC-MS/MS detectando os mesmos constituintes em folhas, sementes e pericarpo de *T. bicolor*, *T. cacao* e *T. grandiflorum*. Em outro estudo, Bruni et al. (2002) isolaram quatro tipos de tocoferol, α, β, γ e δ tocoferol, das sementes de *Theobroma subincanum*. Febrianto e Zhu (2022) detectaram o derivado de ácido fenólico clovamida em grãos de *T. grandiflorum*, *T. bicolor* e *T. subincanum*.

Os flavonoides são uma importante classe de produtos naturais encontrados em frutas, legumes e algumas bebidas. Eles apresentam uma estrutura polifenólica e são conhecidos por serem sintetizados em locais específicos do vegetal e, principalmente, responsáveis pela cor e aroma de flores, a polinização e dispersão de sementes e esporos, além do desenvolvimento de algumas mudas (Griesbach, 2010). Os flavonoides da família Malvaceae abrangem flavonas, flavonóis e seus derivados (Tabela 3 e Figura 5). Os flavonóis simples como catequina e epicatequina foram encontrados em feijão de *T. cacao* por Quiroz-Reyes e Aguilar-Méndez, (2022) e sementes de *T. grandiflorum* por Oliveira, Rogero e Genovese (2015). Ramos-Escudero et al. (2021) isolaram a procianidina (proantocianidina) em feijão de *T. cacao* e Pugliese et al. (2013) obtiveram a flavona vitexina em sementes de *T. grandiflorum*. Os derivados glicosídeos de flavonas, como hipoletina, quercetina e isoscutelareína estão distribuídos em sementes e flores de espécies do gênero *Theobroma* (Febrianto; Zhu, 2022a; Mar et al., 2021; Pugliese et al., 2013). As estruturas desses constituintes estão presentes na Figura 5.

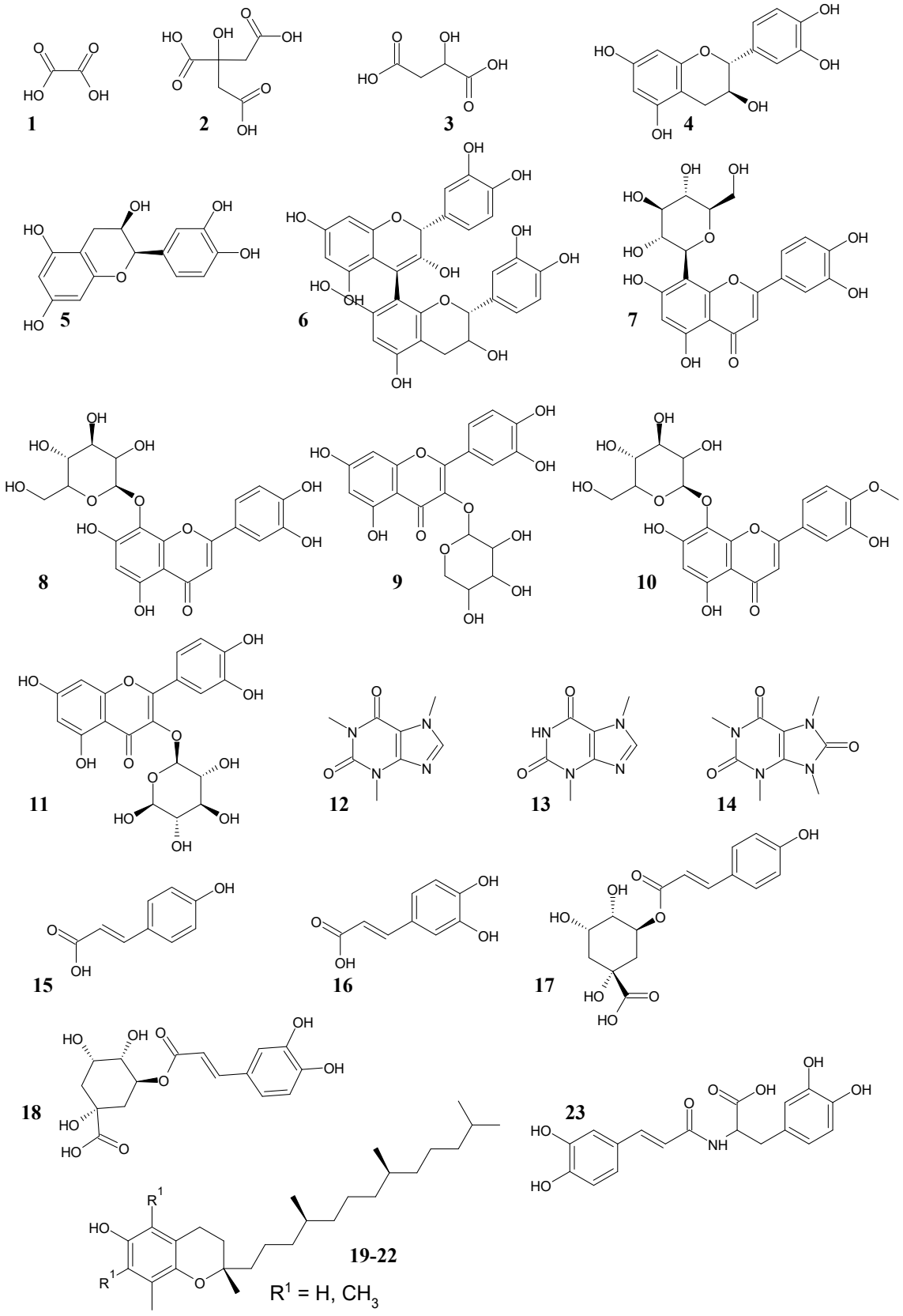
Tabela 3 - Compostos identificados em *Theobroma* spp.

Grupo	Compostos	Fonte (parte da planta)	Referências
Ácidos orgânicos	Ácido oxálico (**1**)	*T. cacao* (pericarpo) *T. bicolor* (pericarpo)	Pérez-Mora; Jorrin-Novo; Melgarejo (2018)
	Ácido cítrico (**2**)	*T. cacao* (pericarpo) *T. grandiflorum* (sementes; casca) *T. speciosum* (flores)	Pérez-Mora; Jorrin-Novo; Melgarejo (2018); Andrade et al. (2022); Mar et al. (2021)
	Ácido málico (**3**)	*T. bicolor* (pericarpo) *T. cacao* (pericarpo) *T. grandiflorum* (casca) *T. speciosum* (flores)	Pérez-Mora; Jorrin-Novo; Melgarejo (2018); Mar et al. (2021)
Flavonoides	Catequina (**4**)	*T. cacao* (feijões) *T. grandiflorum* (sementes)	Quiroz-Reyes e Aguilar-Méndez (2022); Andrade et al. (2022); Oliveira et al. (2015)
	Epicatequina (**5**)	*T. cacao* (feijões) *T. grandiflorum* (sementes)	Quiroz-Reyes e Aguilar-Méndez (2022); Andrade et al. (2022)
	Procianidina (**6**)	*T. cacao* (feijões)	Ramos-Escudero et al. (2021)
	Vitexina (apigenina-8-C-glucosídeo) (**7**)	*T. grandiflorum* (sementes)	Pugliese et al. (2013)
	Hipoletina 8-*O*-*β*-D-glucuronídeo (**8**)	*T. grandiflorum* (sementes) *T. subincanum* (sementes)	Pugliese et al. (2013); Febrianto e Zhu (2022)
	Quercetina 3-*O*-pentosídeo (**9**)	*T. grandiflorum* (sementes)	Pugliese et al. (2013)
	Isoscutelareína 8-*O*-*β*-D-glucuronídeo (**10**)	*T. grandiflorum* (sementes)	Pugliese et al. (2013)
	Quercetina 3-*O*-glicosídeo (**11**)	*T. speciosum* (flores)	Mar et al. (2021)
Alcaloides	Cafeína (**12**)	*T. angustifolium* (sementes) *T. bicolor* (sementes; folhas) *T. cacao* (sementes; folhas) *T. grandiflorum* (folhas)	Hammerstone (1994); Ashihara (1999); Marx e Maia (1991); Dozier; Kim e Russell (2020)

	Teobromina (**13**)	*T. mammosum* (folhas) *T. simiarum* (folhas) *T. speciosum* (folhas) *T. angustifolium* (sementes) *T. bicolor* (folhas) *T. cacao* (sementes; folhas) *T. grandiflorum* (sementes) *T. mammosum* (sementes) *T. mariae* (sementes) *T. speciosum* (sementes)	Hammerstone (1994); Marx e Maia (1991); Dozier; Kim e Russell (2020)
	Teacrina (**14**)	*T. angustifolium* (sementes) *T. bicolor* (sementes) *T. grandiflorum* (sementes) *T. mammosum* (sementes) *T. microcarpum* (sementes) *T. speciosum* (sementes) *T. subincanum* (sementes)	Hammerstone (1994); Marx e Maia (1991); Dozier; Kim e Russell (2020)
Compostos fenólicos (Fenilpropanoides)	Ácido *p*-cumárico (**15**)	*T. bicolor* (sementes; pericarpo) *T. cacao* (sementes; folhas; pericarpo) *T. grandiflorum* (sementes; folhas; pericarpo)	Jalal e Collin (1977); Tauchen et al. (2016)
	Ácido cafeico (**16**)	*T. bicolor* (sementes; pericarpo) *T. cacao* (sementes; folhas; pericarpo)	Jalal e Collin (1977); Tauchen et al. (2016)
	Ácido p-cumaroilquínico (**17**)	*T. grandiflorum* (folhas) *T. cacao* (folhas)	Jalal e Collin (1977)
	Ácido clorogênico (**18**)	*T. bicolor* (pericarpo)	Jalal e Collin (1977); Tauchen et al. (2016)

	T. cacao (folhas) *T. grandiflorum* (sementes; folhas; pericarpo)	
α-tocoferol (**19**)	*T. subincanum* (sementes)	Bruni et al. (2002)
β-tocoferol (**20**)	*T. subincanum* (sementes)	Bruni et al. (2002)
γ-tocoferol (**21**)	*T. subincanum* (sementes)	Bruni et al. (2002)
δ-tocoferol (**22**)	*T. subincanum* (sementes)	Bruni et al. (2002)
Clovamida (**23**)	*T. bicolor* (feijões) *T. grandiflorum* (feijões) *T. subincanum* (feijões)	Febrianto e Zhu (2022)

Figura 5 - Estruturas dos compostos identificados em *Theobroma* spp.



3.4.3 Composição Nutricional de *Theobroma* spp.

Em estudos acerca da composição nutricional do gênero *Theobroma*, as sementes de *T. cacao* (cacau) têm sido destaque ao longo dos últimos quinze anos (Afoakwa et al., 2011; Bertazzo et al., 2011). Bertazzo et al. (2011) determinaram que sua composição aproximada apresenta entre 32–39% de água, 30–32% de gordura, 10–15% de proteínas, 5–6% de polifenóis, 4–6% de amido, 4–6% de pentosanos, 2–3% de celulose, 2–3% de sacarose, 1–2% de teobromina, 1% de ácidos e 1% de cafeína. Pereira et al. (2017) observaram que a polpa branco-amarelada do cupuaçu (*T. grandiflorum*), assim como a casca, são ricas fontes de fibra e amido, destacando-se ainda pela presença de polissacarídeos complexos, como a pectina (Falcão et al., 2022; Salgado et al., 2011; Vriesmann; Silveira; Petkowicz, 2009). Contudo, pouco se sabe sobre a composição de polpas e frutos das demais espécies de *Theobroma*.

Entre os principais minerais presentes no gênero estão K e Mg, como macrominerais, e Fe, Cu, P e Zn (microminerais) (Oliveira; Genovese, 2013). Quanto a composição de lipídios, as sementes de *T. cacao*, por exemplo, apresentam 95% de triacilgliceróis, 2% de diacilgliceróis, < 1% de monoacilgliceróis, 1% de lipídios polares e 1% de ácidos graxos livres (como porcentagens de lipídios) (Biehl; Ziegleder, 2003). Os principais ácidos graxos predominantes na manteiga de cacau são saturados (esteárico; 18:0, 35% e palmítico; 16:0, 25%) e monoinsaturados (oleico; 18:1, 35%), sendo a gordura restante principalmente linoléico poli-insaturado (3%) (Bracco, 1994). Oliveira e Genovese (2013) constaram que a composição de ácido graxo presente na polpa de cupuaçu compreende em 34% de ácido esteárico e 25% de ácido palmítico, seguido dos demais poli-insaturados. Sendo assim, essa diversidade nutricional destaca o cacau, o cupuaçu e outras espécies do gênero *Theobroma* como fontes de macromoléculas e bioativos (potenciais ingredientes) valiosos para diversas indústrias, incluindo alimentícia, cosmética, farmacêutica, entre outras (Rocha; Silva; Rodrigues, 2024).

3.5 *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.

Conforme Ayovi (2021), a espécie *Theobroma bicolor* é conhecida popularmente como cacau branco, cacau-do-peru ou macambo (Figura 6), sendo largamente encontrada em florestas tropicais da América Central e do Sul. A espécie é de fácil adaptação local e sua polpa é naturalmente utilizada na produção de gelados pelo sabor agridoce característico e suas sementes são empregadas, quando torradas, na

produção de chocolate, além de alguns locais as utilizarem na produção de doces e cosméticos (Motamayor et al., 2013; Rosa et al., 2024).

Figura 6 - Fruto de *Theobroma bicolor*.



Fonte: Gonzales e Torres (2010)

Melgarejo et al. (2006) descrevem que o macambo é uma espécie nativa da América tropical. Sendo distribuída pela bacia amazônica, sua presença percorre desde o México até o Brasil, bem como países vizinhos, como o Peru, Equador, Colômbia e Bolívia.

Ayovi (2021) afirma que a espécie *T. bicolor* ainda é pouco difundida, com limitado conhecimento, o que desestimula o seu plantio em larga escala, sendo apenas cultivada em nível regional por processos de domesticação e tecnificação (Hernández; Hernández, 2012). Entretanto, alguns autores já apresentam alternativas de incentivo para seu uso na culinária.

Quinteros et al. (2018) desenvolveram estudos com o macambo gerando uma pasta alimentícia do fruto mediante a torrefação das sementes, a fim de realizar uma investigação sensorial acerca do produto alimentício, conforme as metodologias de produção. Semelhantemente, Díaz e Hernández (2020) desenvolveram uma cobertura de chocolate a partir do mesmo fruto, que redundou na constatação de teores de gordura e mineral semelhante ao do comercial. Contudo, Ayovi (2021) afirma que, comercialmente, o macambo é uma das espécies menos utilizadas do gênero *Theobroma* na gastronomia, isso ao se considerar o uso da *T. cacao*.

Rangel-Fajardo et al. (2012), em seus estudos, determinaram que as sementes de *T. bicolor* podem ser utilizadas para produzir manteigas com teor de gordura

semelhante ao do cacau, podendo ser cogitada como sua substituta, apesar de, segundo Ayovi (2021), não haver relatos da mesma ter sido utilizada em escala industrial.

3.6 *Theobroma subincanum* Mart.

A espécie *Theobroma subincanum* é uma pequena árvore subtropical presente nas florestas da América Central e do Sul (compreendendo desde a Venezuela, Guiana Francesa até a bacia amazônica), onde suas sementes são utilizadas pelos nativos para alimentação (consumidos em fruta seca e em polpa) e forragem. Comparada às demais espécies do gênero, *T. subincanum* possui ainda escassez de estudos químicos e farmacológicos (Moita, 2019).

Lira et al. (2020) destacam que a mesma é conhecida como cacau-silvestre, ou cupuí, e suas sementes (Figura 7) possuem maior tamanho, com tegumentos lenhosos e resistentes, sendo mais espessos que os de *T. cacao* (cacau), e menor importância econômica que este e o conhecido cupuaçu (*T. grandiflorum*). Contudo, o fruto é bastante apreciado pela população local. Eles são coletados para consumo *in natura* na forma de sucos e são comercializados em feiras regionais. As sementes (amêndoas) também são comestíveis e proporcionam um chocolate de razoável qualidade.

Figura 7 - Fruto de *Theobroma subincanum*.



Fonte: Fonseca Junior et al. (2026)

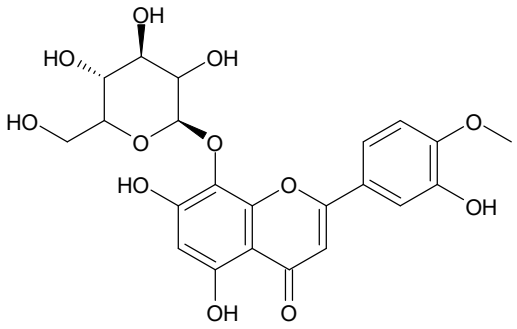
Embora o cupuí seja consumido como fruto, ainda há escassez de estudos sobre sua composição. Nesse contexto, torna-se necessária a realização de pesquisas voltadas à caracterização físico-química e à composição centesimal de seus frutos, complementando investigações como a de Moita (2019), que realizou um estudo de

metabolômica global das cascas e das sementes de *Theobroma grandiflorum* e *Theobroma cacao*.

Novas pesquisas voltadas aos estudos analíticos e quantitativos de *T. subincanum* podem ampliar o conhecimento sobre a espécie e favorecer seu aproveitamento no desenvolvimento de novos produtos, especialmente em razão de seu pH ácido e do moderado teor de sólidos solúveis. Entretanto, pouco é o seu destaque, já que, com valores de açúcares totais e proteínas similares aos de outras frutas, a espécie não apresenta um forte diferencial (Lira et al., 2020).

O estudo de Moita (2019) mostrou-se promissor ao identificar na espécie a presença de flavonoides glucoronídeos, como isoscutelareína-8-*O*-*β*-D-glucoronídeo (Figura 8), hipoleatina-8-*O*-*β*-D- glucoronídeo, hipoleatina 3”-metil éter 8-*O*-*β*-D-glucoronídeo e hipoleatina-8-*O*-*β*-D- glucoronídeo 3”-*O*-sulfato. A ação antioxidante desses compostos contra o radical livre DPPH e por peroxidação lipídica foi previamente relatada por Sotero et al. (2012) e Do et al. (2026).

Figura 8 - Estrutura da Isoscutelareína-8-*O*-*β*-D-glucoronídeo.



Moita (2019) descreveu o perfil espectrométrico de *T. subincanum*, comprovando uma semelhança com a *T. grandiflorum*. Assim, o trabalho de Moita (2019) agregou valor às cascas dos frutos de tal espécie, resíduos descartados e recorrentes na região amazônica.

3.7 *Theobroma sylvestre* Mart.

Entre as espécies do gênero *Theobroma*, poucas informações podem ser consolidadas em pesquisas publicadas a respeito da espécie *Theobroma sylvestre* Mart. (cacau-azul), sendo raramente atuais. Não foram encontradas as informações de dados fitoquímicos e estudos farmacológicos na literatura.

Faria, Lemes e Gribel (2001) informam que o fruto da espécie é popularmente conhecido como cacauí, também denominado aos frutos de outra espécie do mesmo gênero, *Theobroma speciosum* Willd, apresentando sabor característico e interesse econômico pelo consumo. Os autores buscaram compreender a variabilidade genética dessa espécie, a fim de fornecer subsídios para o incremento na produção de frutos.

Ouro, Antezana-Vera e Marenco (2015) desenvolveram estudos com a *T. sylvestre* determinando o efeito do teor de umidade da madeira dessa espécie na variação em diâmetro dos seus galhos. Os autores destacaram que a sua madeira possui alto valor econômico, sendo utilizada em construção civil, na produção de lâminas folheadas e móveis em geral.

O banco de dados do museu nacional de história natural dos Estados Unidos, EOL, dispõe que *T. sylvestre* é uma árvore nativa do Pantanal, Amazônia, Mata Atlântica e com forte presença nos estados Acre e Pará. Essa espécie, segundo o banco de dados, cresce, naturalmente, às margens do rio.

A carência de dados sobre o uso popular e a constituição química de *T. sylvestre* sublinha uma lacuna significativa na ciência. Portanto, justifica-se a necessidade de estudos fitoquímicos e farmacológicos para essa espécie, cujos achados inéditos possuem potencial para aplicação biotecnológica e geração de propriedade intelectual.

3.8 PATENTES DE *Theobroma* spp.

A análise dos depósitos de patentes diretamente associadas ao gênero *Theobroma* evidencia o interesse de indústrias e centros de Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) em diversas áreas. Os principais focos tecnológicos identificados incluem: tecnologia de alimentos, especialmente para produtos derivados do cacau; indústrias farmacêutica e cosmética; biotecnologia e engenharia genética; métodos de cultivo, como hibridização e polinização artificial; e o desenvolvimento de formulações para bebidas. Nota-se um destaque particular aos frutos cupuaçu (*T. grandiflorum*) e cacau (*T. cacao*), conforme observado na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise do panorama de Propriedade Intelectual para aplicações das espécies do gênero *Theobroma*.

Título	Aplicação	Número	País	Referência
Produtos alimentícios, ingredientes, processos e usos	A presente invenção prevê o uso do extrato ou polpa de plantas do gênero *Theobroma* (principalmente cacau) como ingrediente em produtos alimentícios, especialmente em produtos de confeitaria.	AU2018382579B2	Austrália	(Festring; Kuschel; Vieira, 2018)
Manteiga vegetal de triglicerídeos de cadeia média	A invenção situa-se no campo das necessidades humanas, mais especificamente de composições alimentares, e apresenta em sua composição triglicerídeos de cadeia média.	BR102019021218A2	Brasil	(Sabará; Dean Junior, 2019)
Formulações de chocolate com propriedades funcionais	A presente invenção refere-se a substâncias bioativas do cacau e a métodos para concentrar extrações. A invenção refere-se também a formulações, preparações farmacêuticas, preparações nutricionais e suplementos alimentares extraídos de materiais alimentares.	WO2007062206A2	OMPI (PCT)	(Martin, 2007)
Composição para a produção de manteiga de	O modelo de utilidade divulga a manteiga de cacau (*T. cacao*) e seu método de produção, que	PH22018000886U1	Filipinas	(Lobaton; Pabelona, 2018)

cacau (*Theobroma)*	utiliza o grão de cacau como principal componente do produto e mel, óleo vegetal e leite fresco com baixo teor de gordura como ingredientes.			
Extrato das cascas dos grãos de *T. cacao* para o controle da rosácea e da vermelhidão da pele.	A presente invenção refere-se, em particular, a um extrato de cascas de grãos de cacau ou a uma composição cosmética ou dermatológica que compreenda o referido extrato para a prevenção e/ou tratamento da rosácea.	CA3098361A1 FR3080767A1	Canadá França	(Aries; Poigny, 2019)

É crítica a ausência de informações quanto ao patenteamento de insumos agroflorestais desse gênero entre os países que abrangem a floresta amazônica, como Peru, Colômbia, Venezuela, Bolívia e Equador, com exceção do Brasil. Tal lacuna poderia impulsionar investimentos e a bioeconomia da região. Dentre as patentes relacionadas a *Theobroma* spp., apenas 26 (aproximadamente 86%) correspondem à tecnologia de alimentos, enquanto 13,7% estão relacionadas a outras áreas tecnológicas que utilizam as mesmas espécies, movimentando o mercado e os recursos financeiros associados a essa biodiversidade (Fonseca Júnior et al., 2025).

Considerando o potencial das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) de espécies amazônicas para a tecnologia de alimentos, o presente estudo visa contribuir com informações que viabilizem o aproveitamento das diferentes partes (cascas, polpas e sementes) dos frutos de macambo, cupuí e cacau-azul (espécies de *Theobroma*). Para isso, foram investigados os perfis de citotoxicidade dessas espécies, bem como realizada a caracterização de seus constituintes químicos.

Dessa forma, os capítulos a seguir apresentam estudos referentes às referidas espécies, abordando suas caracterizações químicas, composição centesimal e perfis de citotoxicidade.

.

4. REFERÊNCIAS

AFOAKWA, E. O.; QUAO, J.; BUDU, A. S.; TAKRAMA, J.; SAALIA, F. K. Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 7, p. 755-764, 2011. https://doi.org/10.3109/09637486.2011.581224.

AGÊNCIA AGRÁRIA DE NOTÍCIAS. **Incremento del precio del cacao beneficia a productores peruanos**. Lima: Agraria.pe, 2024. Disponível em: https://www.agraria.pe/noticias/incremento-del-precio-del-cacao-beneficia-a-productores-peru-34877. Acesso em: 1 mar. 2026.

AMBROSONE, L.; GUERRA, G.; CINELLI, M.; COSTA, G.; PACIELLO, F.; CICCO, F.; MASSA, S. Corneal epithelial wound healing promoted by verbascoside-based liposomal eyedrops. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014. https://doi.org/10.1155/2014/471642.

ANGELINO, D.; GODOS, J.; GHELFI, F.; TIERI, M.; TATTOLI, I.; LA VECCHIA, C.; CANIVELL, S.; MARTINI, D. Fruit and vegetable consumption and health outcomes: an umbrella review of observational studies. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 70, n. 6, p. 652-667, 2019. https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1571021.

APROTOSOAIE, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 73-91, 2016. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180.

ARIES, M. F.; POIGNY, S. **Extract of shells of *Theobroma cacao* beans for controlling rosacea and skin redness**. Canada. CA3098361A1. Depósito: 03 mai. 2019. Publicação: 31 nov. 2019. Disponível em: https://patents.google.com/patent/CA3098361A1/en?oq=CA3098361A1. Acesso em: 1 mar. 2026.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. **Advances in Botanical Research**, v. 30, p. 117-205, 1999. https://doi.org/10.1016/s0065-2296(08)60228-1.

AYOVI, L. M. **Fusión del cacao (*Theobroma cacao*) con cacao blanco (*Theobroma bicolor*) para la elaboración de bombones**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agronômica) – Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, 2021.

BARALDI, L. G.; GRILO, M. F.; LANDERT, M.; MARTINS, C. A. Beyond the family's cooking frequency: The influence of cooking techniques on vegetable and fruit consumption among the U.S. population. **Appetite**, v. 204, p. 107757, 2025. https://doi.org/10.1016/j.appet.2024.107757.

BARANIAK, J.; KANIA-DOBROWOLSKA, M. Multi-purpose utilization of kapok fiber and properties of *Ceiba pentandra* tree in various branches of industry. **Journal of Natural Fibers**, v. 20, n. 1, 2023. https://doi.org/10.1080/15440478.2023.2192542.

BASHEER, L.; BEN-SIMCHON, E.; COHEN, A.; SHELEF, O. From traditional food to functional food? Evaluation of Malvaceae species as novel food crops. **Agronomy**, v. 11, n. 7, p. 1294, 2021. https://doi.org/10.3390/agronomy11071294.

BAYER, C.; KUBITZKI, K. (ed.). **Flowering Plants · Dicotyledons**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2003. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07255-4.

BEN-SIMCHON, E.; SAPIR, E.; VAKNIN, Y.; SHELEF, O. Malvaceae spp. leaves as a novel crop for food. **International Journal of Agriculture, Forestry and Life Sciences**, v. 3, p. 279-286, 2019. Disponível em: https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/851712. Acesso em: 5 mar. 2026.

BERTAZZO, A.; COMAI, S.; BRUNATO, I.; ZANCATO, M.; COSTA, C. V. L. The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 93-96, 2011. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.110.

BEZERRA, J. A.; BRITO, M. M. Potencial nutricional e antioxidantes das plantas alimentícias não convencionais (PANCs) e o uso na alimentação: revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e369997159, 2020. https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7159.

BEZERRA, J. A.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; LAMARÃO, C. V.; STRINGHETA, P. C.; MARTINS, E.; CAMPELO, P. H. "Cupuaçu" (*Theobroma grandiflorum*): a brief review on chemical and technological potential of this Amazonian fruit. **Food Chemistry Advances**, v. 5, p. 100747, 2024. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100747.

BIEHL, B.; ZIEGLEDER, G. COCOA | Chemistry of Processing. *In*: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [S. l.]: Elsevier, 2003. p. 1436-1448. https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00261-3.

BRACCO, U. Effect of triglyceride structure on fat absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 1002S-1009S, 1994. https://doi.org/10.1093/ajcn/60.6.1002s.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; GUERRINI, A.; SCALIA, S.; POLI, F.; ROMAGNOLI, C. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. **Food Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 337-341, 2002. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00357-0.

CARRILLO-PERDOMO, E.; ALLER, A.; CRUZ-QUINTANA, S. M.; GIAMPIERI, F.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M. Andean berries from Ecuador: a review on botany, agronomy, chemistry and health potential. **Journal of Berry Research**, v. 5, n. 2, p. 49-69, 2015. https://doi.org/10.3233/JBR-140093.

CHAROENKIATKUL, S.; THIYAJAI, P.; JUDPRASONG, K. Nutrients and bioactive compounds in popular and indigenous durian (*Durio zibethinus* murr.). **Food Chemistry**, v. 193, p. 181-186, 2016. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.107.

CHEN, M. F. The joint moderating effect of health consciousness and healthy lifestyle on consumers' willingness to use functional foods in Taiwan. **Appetite**, v. 57, n. 1, p. 253-262, 2011. https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.05.305.

COSTA, L. D.; TRINDADE, R. P.; CARDOSO, P. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A.; OTERO, D. M. *Pachira aquatica* (Malvaceae): an unconventional food plant with food, technological, and nutritional potential to be explored. **Food Research International**, v. 164, p. 112354, 2023. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112354.

COSTA, M. P.; MONTEIRO, M. L. G.; FRASAO, B. S.; SILVA, J. L.; CONTE-JUNIOR, C. A. Consumer perception, health information, and instrumental parameters of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) goat milk yogurts. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 157-168, 2017. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11315.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites**: occurrence, structure and role in the human diet. [S. l.]: Blackwell Publishing, 2006. 372 p.

CRUZ, J. M. A.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H.; BEZERRA, J. de A. Amazonian fruits: a systematic review of the literature and critical analysis of its trends. **Food Bioscience**, v. 62, p. 105563, 2024. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105563.

CUNHA, F. V. M.; COELHO, G.; AZEVEDO, P. S. S.; SILVA, A. A.; OLIVEIRA, F. A.; NUNES, L. C. C. Systematic review and technological prospection: ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 29, n. 2, p. 73-83, 2019. https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1568410.

DÍAZ, R. O.; HERNÁNDEZ, M. S. *Theobroma*s de la Amazonia Colombiana: una alternativa saludable. **Información Tecnológica**, v. 31, n. 2, p. 3-10, 2020. https://doi.org/10.4067/s0718-07642020000200003.

DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E. B.; ROBERFROID, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, supl. 1, p. S1–S27, 1999. https://doi.org/10.1017/S0007114599000471

DO, T. H. T.; PHAN, V. H. N.; LE, T. K. A.; TRINH, T. T. T.; NGUYEN, T. T. H.; CHU, T. T. H. The hepatoprotective activity and chemical constituents of *Helicteres hirsuta* water extract. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, v. 18, p. 100747, 2026. https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2025.100747.

DOZIER, C. A.; KIM, D.; RUSSELL, D. H. Chemical residue evidence in Leon Plain pottery from the Toyah phase (1300–1650 CE) in the American Southern Plains. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 32, p. 102450, 2020. https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102450.

FALCÃO, L. S.; AMARAL, T. S.; BRASIL, G. B.; ALBUQUERQUE, P. M. Improvement of endoglucanase production by *Aspergillus brasiliensis* in solid-state fermentation using cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) residue as substrate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 4, p. 2859-2869, 2022. https://doi.org/10.1111/jam.15412.

FARIA, C. P.; LEMES, M. R.; GRIBEL, R. Transferibilidade de marcadores de DNA microssatélites entre espécie do gênero *Theobroma* (Sterculiaceae). *In*: **Jornada de**

Iniciação Científica do PIBIC/INPA, 10., 2001, Manaus. Anais [...]. Manaus: INPA, 2001.

FEBRIANTO, N. A.; ZHU, F. Comparison of bioactive components and flavor volatiles of diverse cocoa genotypes of *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum* and *Theobroma cacao*. **Food Research International**, v. 161, p. 111764, 2022. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111764.

FERREIRA, C. P.; LIMA, M. C.; SILVA, J. G.; PEIXOTO ARAUJO, N. M. Nutritional composition, phenolic compounds and biological activities of selected unconventional food plants. **Food Research International**, v. 191, p. 114643, 2024. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114643.

FESTRING, D.; KUSCHEL, B.; VIEIRA, J. B. **Foodstuff products, ingredients, processes and uses**. Depositante: Nestle SA. AU2018382579B2. Depósito: 11 dez. 2018. Disponível em: https://patents.google.com/patent/AU2018382579B2/en. Acesso em: 1 mar. 2026.

FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C.; MOTA-GUTIERREZ, J.; FERROCINO, I.; CACCIA, R.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, A.; RAYAS-DUARTE, P.; COCOLIN, L.; HIDALGO-MORALES, M. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, p. 41-50, 2019. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002.

FLORES, J. A.; KONRAD, O.; FLORES, C. R.; SCHRODER, N. T. Inventory data on Brazilian Amazon′s non-wood native biomass sources for bioenergy production. **Data in Brief**, v. 20, p. 1935-1941, 2018. https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.09.050.

FOLHARINI, Z. F.; ORLANDI, C. R.; MARTINI, M. C.; ZAMBIAZI, R. C.; CHIMELLO, A. M. Nutritional characterization of *Vasconcellea quercifolia* A.St-Hil.: potential for the development of functional food. **Food Science and Technology**, v. 39, suppl. 2, p. 432-438, 2019. https://doi.org/10.1590/fst.18018.

FONSECA JÚNIOR, E. Q.; ROCHA, D. Q.; OLIVEIRA, E. S. C.; SILVA, S. O.; SOUZA, F. C. A.; FURLANETO, G.; CRUZ, L. S.; AZEVEDO, L.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H.; BEZERRA, J. A. Chemical characterization, nutritional profile, and cytotoxicity potential of Amazonian *Theobroma sylvestre* Mart. fruits. **Food Bioscience**, v. 73, p. 107673, 2025. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107673.

FONSECA JÚNIOR, E. Q.; OLIVEIRA, E. S. C.; ROCHA, D. Q.; SILVA, S. O.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, F. C. A.; FURLANETO, G.; CONSENTINI, J. C. C.; AZEVEDO, L.; CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; MORAES, R. P.; BEZERRA, J. A. Nutritional and bioactive potential of *Theobroma subincanum* Mart.: a promising Amazonian fruit for the food industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 46, e585, 2026. https://doi.org/10.5327/fst.585

GAO, X. N.; GAO, E. J.; ZHU, M. C. Synthesis, crystal structure, DNA binding, and cytotoxicity of a Zn (II) complex constructed from phenylacetic acid. **Journal of Structural Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1180-1188, 2019. https://doi.org/10.1134/s0022476619070217.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system-A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 338–347, 2007. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.003.

GONZALES, A.; TORRES, G. **Cultivo de macambo *Theobroma bicolor* (Humb. & Bonpl.)**. Iquitos: Instituto de la Amazonía Peruana – IIAP, 2010.

GONZÁLEZ, A. A.; MONCADA, J.; IDARRAGA, A.; ROSENBERG, M.; CARDONA, C. A. Potential of the amazonian exotic fruit for biorefineries: The *Theobroma bicolor* (Makambo) case. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 58-67, 2016. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.015.

GRIESBACH, R. J. Biochemistry and genetics of flower color. *In*: **Plant Breeding Reviews**. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 89-114. https://doi.org/10.1002/9780470650301.ch4.

GUO, W.; WANG, H.; BAI, Y.; TAN, M. Global patent landscape of marine functional foods: technological trends, hotspots, and future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 169, p. 105555, 2026. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2026.105555.

GUTIÉRREZ-DOMINGO, T.; VIVAS, S. Mindful eating intervention for preventing obesity in youth: a narrative review of literature. **Nutrition Research**, v. 140, p. 116-134, 2025. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2025.07.001.

HABTEMARIAM, S. **Medicinal foods as potential therapies for type-2 diabetes and associated diseases**. London: Academic Press, Elsevier, 2019. https://doi.org/10.1016/c2018-0-02257-4.

HAMMERSTONE JR, J. F.; ROMANCZYK JR, L. J.; AITKEN, W. M. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1237-1240, 1994.

HERNÁNDEZ, C.; HERNÁNDEZ, M. S. Growth and development of the cupuaçu fruit (*Theobroma grandiflorum* [Willd. Ex Spreng.] Schum.) in the western colombian Amazon. **Agronomía Colombiana**, v. 30, n. 1, p. 95-102, 2012. Disponível em: http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v30n1/v30n1a13.pdf. Acesso em: 5 mar. 2026.

HUANG, J. P.; WANG, Y. J.; TIAN, T.; WANG, L.; YAN, Y.; HUANG, S. X. Tropane alkaloid biosynthesis: a centennial review. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 9, p. 1634-1658, 2021. https://doi.org/10.1039/d0np00076k.

INGRAM, V.; VAN RIJN, F.; WAARTS, Y.; GILHUIS, H. The impacts of cocoa sustainability initiatives in west Africa. **Sustainability**, v. 10, n. 11, p. 4249, 2018. https://doi.org/10.3390/su10114249.

IPIRANGA, A. C. S.; SOUZA, P. G.; FONSECA JÚNIOR, E. Q. Produção de cerveja artesanal estilo fruit wheat beer adicionada com cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e pitaia-rosa (*Hylocereus costaricensis*). **Brazilian Journal of Science**, v. 1, n. 3, p. 16–22, 2022. https://doi.org/10.14295/bjs.v1i3.33.

JALAL, M. A. F.; COLLIN, H. A. Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *Theobroma cacao*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 9, p. 1377-1380, 1977. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88786-5.

KAISOON, O.; SIRIAMORNPUN, S.; WEERAPREEYAKUL, N.; MEESO, N. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 2, p. 88-99, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.002.

KIM, J.; KIM, J.; SHIM, J.; LEE, C. Y.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 11, p. 1458-1472, 2014. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.641041.

KIM, J.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Cocoa (*Theobroma cacao*) seeds and phytochemicals in human health. *In*: **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. [S. l.]: Elsevier, 2011. p. 351-360. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375688-6.10042-8.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Levantamento de dados e divulgação do potencial das plantas alimentícias alternativas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 1-4, 2004. Disponível em: https://ppmac.org/sites/default/files/plantas_alimenticias.pdf. Acesso em: 5 mar. 2026.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil**: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum da Flora, 2014.

KONGOR, J. E.; HINNEH, M.; DE WALLE, D. V.; AFOAKWA, E. O.; BOECKX, P.; DEWETTINCK, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — a review. **Food Research International**, v. 82, p. 44-52, 2016. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012.

LE PÉCHON, T.; GIGORD, L. D. B. On the relevance of molecular tools for taxonomic revision in Malvales, Malvaceae s.l., and Dombeyoideae. *In*: **Molecular Plant Taxonomy**: methods and protocols, methods in molecular biology. New York: Business Media, 2014. p. 337-363. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_17.

LEÓN-PEREZ, D.; MEDINA, S.; LONDOÑO-LONDOÑO, J.; GARRIDO, I.; ESPINOSA-ALMANZA, C.; COLLADO-GONZÁLEZ, J.; FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phytoprostanes and phytofurans contents. **Food Chemistry**, v. 280, p. 231-239, 2019. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.072.

LIM, T. K. *Malvaviscus arboreus*. *In*: **Edible Medicinal and Non Medicinal Plants**. [S. l.]: Springer Netherlands, 2014. p. 405-408. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8748-2_29.

LIRA, M. M.; OLIVEIRA FILHO, J. G.; SOUSA, T. L.; COSTA, N. M.; LEMES, A. C.; FERNANDES, S. S.; EGEA, M. B. Selected plants producing mucilage: overview, composition, and their potential as functional ingredients in the development of plant-based foods. **Food Research International**, v. 169, p. 112822, 2023. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112822.

LIRA, N. R.; SANTOS, E. F.; SANTOS, D. N.; BEZERRA, P. G. F.; LIMA, D. E. S. Caracterização físico-química e centesimal do cupuí (*Theobroma subincanum* Mart.). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 15798-15813, 2020. https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-451.

LOBATON, A. M.; PABELONA, R. B. **Composition of making cacao (*Theobroma*) butter**. Philippines. PH22018000886U1. Depósito: 06 set. 2018. Publicação: 17 set. 2018. Disponível em: https://patents.google.com/patent/PH22018000886U1/en. Acesso em: 1 mar. 2026.

MAR, J. M.; FONSECA JÚNIOR, E. Q.; CORRÊA, R. F.; CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. A. *Theobroma* spp.: a review of it's chemical and innovation potential for the food industry. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100683, 2024. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100683.

MAR, J. M.; SILVA, L. S.; LIRA, A. C.; SILVA, F. M. A.; BEZERRA, J. A. Bioactive compounds-rich powders: influence of different carriers and drying techniques on the chemical stability of the *Hibiscus acetosella* extract. **Powder Technology**, v. 360, p. 383-391, 2020. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.10.062.

MAR, J. M.; SILVA, L. S.; MOREIRA, W. P.; COSTA, R. M. R.; SILVA, F. M. A.; BEZERRA, J. A. Edible flowers from *Theobroma speciosum*: aqueous extract rich in antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 356, p. 129723, 2021. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129723.

MARIUTTI, L. R. B.; REBELO, K. S.; BISCONSIN-JUNIOR, A.; MORAIS, J. S.; MAGNANI, M.; MALDONADE, I. R.; CAZARIN, C. B. B. The use of alternative food sources to improve health and guarantee access and food intake. **Food Research International**, v. 149, p. 110709, 2021. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110709.

MARTIN, M. Z. **Chocolate formulations with functional properties**. WO2007062206A2. Depósito: 24 nov. 2006. Publicação: 31 maio 2007. Disponível em: https://patents.google.com/patent/WO2007062206A2/en?oq=WO2007062206A2. Acesso em: 8 mar. 2026.

MARTINEVSKI, C. S.; OLIVEIRA, V. R.; RIOS, A. O.; FLORES, S. H.; VENZKE, J. G. Utilização de bertalha (*Anredera cordifolia* (Ten.) steenis) e ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) na elaboração de pães. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 1-6, 2013.

MARX, F.; MAIA, J. G. S. Purine alkaloids in seeds of *Theobroma* species from the Amazon. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 193, n. 5, p. 460-461, 1991.

MELGAREJO, L. M.; HERNANDEZ, M.; BARRERA, J. A.; CARRILLO, M. **Oferta y potencialidades de un banco de germoplasma del género *Theobroma* en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región amazónica**. Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI, 2006. Disponível em: https://repository.agrosavia.co/items/dd3fbeae-6356-4337-ad09-13c41107e9fe. Acesso em: 5 mar. 2026.

MENDONÇA, G. R.; CAMPOS, R. S.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. O.; PEREIRA, A. L. F. Effect of extract or infusion of leaves of the *Hibiscus sabdariffa* L. in the production and storage of the beverage blends with cupuassu: physico-chemical and sensory acceptance. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 6, p. 2395-2405, 2021. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04752-4.

MENDONCA, G. R.; PINTO, R. A.; PRAXEDES, É. A.; ABREU, V. K. G.; DUTRA, R. P.; PEREIRA, A. F.; PEREIRA, A. L. F. Kombucha based on unconventional parts of the *Hibiscus sabdariffa* L.: microbiological, physico-chemical, antioxidant activity, cytotoxicity and sensorial characteristics. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 34, p. 100804, 2023. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100804.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2-3, p. 181-188, 2003. https://doi.org/10.1016/s0260-8774(02)00247-9.

MILIÃO, G. L.; OLIVEIRA, A. P. H.; SOARES, L. S.; ARRUDA, T. R.; VIEIRA, É. N. R.; LEITE JUNIOR, B. R. C. Unconventional food plants: nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, p. 100124, 2022. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100124.

MODESTE, K. K.; ELIANE, M. T.; DAOUDA, K.; ADAMA, B. B.; PATRICK, O. K.; MODESTE, K. K. Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa [*Theobroma cacao* (L.)]. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 1, p. 25-31, 2017. https://doi.org/10.21475/ajcs.2017.11.01.pne174.

MOITA, I. S. **Caracterização química das cascas das sementes de espécies do gênero *Theobroma*.** 2019. 153 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

MOTAMAYOR, J. C.; MOCKAITIS, K.; SCHMUTZ, J.; HAIMINEN, N.; III, D. L.; CORNEJO, O.; KUHN, D. N. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. 53, 2013. https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r53.

OBAYOMI, O. V.; EDO, G. I.; DADA, A. O.; DOKOUHAKI, M. Advanced encapsulation technologies for functional foods: Enhancing stability, bioavailability, and controlled release of nutraceuticals and bioactives. **Applied Food Research**, v. 6, n. 1, p. 101622, 2026. https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101622.

OH, S.; KIM, D. Y. Characterization, antioxidant activities, and functional properties of mucilage extracted from *Corchorus olitorius* L. **Polymers**, v. 14, n. 12, p. 2488, 2022. https://doi.org/10.3390/polym14122488.

OLIVEIRA, A. C.; CRUZ, J. M. A.; MAR, J. M.; CORRÊA, R. F.; RODRIGUES, J. V.; MENDES, T. A.; BEZERRA, J. A. Abiu-do-Mato (*Pouteria caimito*, Sapotaceae): A promising Amazonian fruit with rich chemical composition, antioxidant potential, and cytotoxic safety. **Food Research International**, v. 205, p. 115984, 2025. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115984.

OLIVEIRA, I.; AQUINO, Y.; CAROCHO, M.; HELENO, S.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Characterization of newly developed protein soy-based burger formulations incorporated with dried unconventional food plants. **Food Chemistry**, v. 500, p. 147460, 2026. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.147460.

OLIVEIRA, T. B.; GENOVESE, M. I. Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-

induced diabetic rats. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 929-935, 2013. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.019.

OLIVEIRA, T. B.; ROGERO, M. M.; GENOVESE, M. I. Poliphenolic-rich extracts from cocoa (*Theobroma cacao* L.) and cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. K. Shum) liquors: a comparison of metabolic effects in high-fat fed rats. **PharmaNutrition**, v. 3, n. 2, p. 20-28, 2015. https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.01.002.

ORR, D. Cultivo e comercialização de flores comestíveis. **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**, v. 29, n. 30, p. 264, 2011.

OSMAN, H.; NASARUDIN, R.; LEE, S. L. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. **Food Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 41-46, 2004. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.026.

OURO, R. T.; ANTEZANA-VERA, S. A.; MARENCO, R. A. Variação em diâmetro da madeira em resposta às mudanças no teor de umidade em duas espécies da Amazônia Central. *In*: **Congresso de Iniciação Científica do INPA - CONIC**, 4., 2015, Manaus. Anais [...]. Manaus: INPA, 2015.

ÖZENOĞLU, A.; ERKUL, C.; ANUL, N.; ÖZÇELIKÇI, B.; AKSU, B. M. Relationship of attitudes for healthy nutrition with mindful eating, motivation to participate in physical activity, and academic success: a controlled study. **Nutrition**, v. 123, p. 112422, 2024. https://doi.org/10.1016/j.nut.2024.112422.

PASSOS, M. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) ocorrentes em Roraima. **Revista Eletrônica Científica Ensino Interdisciplinar**, v. 5, n. 14, p. 388-404, 2019. https://doi.org/10.21920/recei72019514388404.

PEREIRA, A. L. F.; FEITOSA, W. S. C.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. O.; CASTRO-GÓMEZ, R. H.; NARAIN, N.; GOMES, A. S. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603-611, 2017. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.055.

PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C. G. Research trends in flavonoids and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 646, p. 107-112, 2018. https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.022.

PINHEIRO, D. F.; MACIEL, G. M.; LIMA, N. P.; LIMA, N. F.; RIBEIRO, I. S.; HAMINIUK, C. W. I. Impact of fruit consumption on gut microbiota: Benefits, contaminants, and implications for human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 154, p. 104785, 2024. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104785.

PIRES, E. O.; DI GIOIA, F.; ROUPHAEL, Y.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Edible flowers as an emerging horticultural product: a review on sensorial properties, mineral and aroma profile. **Trends in Food Science & Technology**, v. 137, p. 31-54, 2023. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.05.007.

PIRES, T. C. S. P.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRA, J. C. M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Incorporation of natural colorants obtained from

edible flowers in yogurts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 668-675, 2018. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.013.

PUGLIESE, A. G.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; TRUCHADO, P.; GENOVESE, M. I. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2720-2728, 2013. https://doi.org/10.1021/jf304349u.

QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Analysis of volatile compounds of cacao maraco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.) fruit. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 3, p. 211-215, 2009. https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700150.

QUINTEROS, V.; QUINTEROS, A.; CHUMACERO, J.; CASTRO, P. Effect of temperature and toasting time on the acceptability of macambo food paste (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.). **Agroindustrial Science**, v. 8, n. 1, p. 27-31, 2018. https://doi.org/10.17268/agroind.science.2018.01.04.

QUIROZ-REYES, C. N.; AGUILAR-MÉNDEZ, M. Á. Continuous ultrasound and pulsed ultrasound: Selective extraction tools to obtain enriched antioxidants extracts from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 80, p. 103095, 2022. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103095.

RAMIRO, E.; FRANCH, À.; CASTELLOTE, C.; PÉREZ-CANO, F.; PERMANYER, J.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; CASTELL, M. Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8506-8511, 2005. https://doi.org/10.1021/jf0511042.

RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. A.; SOUZA, M. C. S.; FRUET, A. C.; DAMIÃO, M. C. F. C. B.; SILVA, F. M. A.; BATISTA, C. L. F.; LIMA, E. S.; LOURENÇO, S. C. Chemical characterization and antioxidant capacity of the araçá-pera (*Psidium acutangulum*): an exotic Amazon fruit. **Food Research International**, v. 75, p. 315-327, 2015. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.026.

RAMOS-ESCUDERO, F.; CASIMIRO-GONZALES, S.; FERNÁNDEZ-PRIOR, Á.; GONZÁLES-CASAMAYOR, J.; CULQUI-CASSIA, G.; MORALES-QUINTANA, L.; PAREDES-LOPEZ, O. Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 147, p. 111629, 2021. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111629.

RANGEL-FAJARDO, A.; ZAVALETA-MANCERA, H. A.; CÓRDOVA-TÉLLEZ, L.; LÓPEZ-ANDRADE, A. P. Anatomía e histoquímica de la semilla del cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo mexicano. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 35, n. 3, p. 189-197, 2012. Disponível em: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000300002. Acesso em: 5 mar. 2026.

RAUT, J. S.; SHINDE, R. B.; CHAUHAN, N. M.; KARUPPAYIL, S. M. Phenylpropanoids of plant origin as inhibitors of biofilm formation by *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1216-1225, 2014. https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02056.

ROCHA, F. A. T.; SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. C. Bacuri (*Platonia insignis* Mart.): nutritional values, volatile compounds, rheological properties, health benefits, and

potential products. **Food Chemistry**, v. 436, p. 137528, 2024. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137528.

RODRIGUES, H.; SPENCE, C. Looking to the future, by studying the history of edible flowers. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 34, p. 100805, 2023. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100805.

RODRIGUES, L. A. P.; NUNES, D. D. G.; HODEL, K. V. S.; VIANA, J. D.; SILVA, E. P.; SOARES, M. B. P. Exotic fruits patents trends: an overview based on technological prospection with a focus on Amazonian. **Heliyon**, v. 9, n. 12, p. e22060, 2023. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22060.

RODRIGUES, S.; OLIVEIRA SILVA, E.; BRITO, E. S. **Exotic Fruits**. [S. l.]: Academic Press, 2018. https://doi.org/10.1016/c2014-0-02888-2.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araça-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 4, p. 380-384, 2004. https://doi.org/10.1007/s00217-003-0853-6.

ROSA, L. A. B.; COHEN, M.; CAMPOS, W. Y. Y. Z.; RODRIGUES, M. C. M.; SOUSA, M. J.; AVILA, L. V. How does the circular economy address the sustainable development goals? Evidence from the Brazilian Legal Amazon. *In*: **Circular Economy and Sustainability**: Evidence from the Brazilian Legal Amazon. [S. l.]: Springer, 2024. p. 83-98. https://doi.org/10.1007/978-3-031-48079-9_5.

SABARÁ, U. M.; DEAN JUNIOR, C. A. **Manteiga vegetal de triglicerídeos de cadeia média**. Depositante: Sabará Químicos e Ingredientes S.A. BR102019021218A2. Depósito: 9 out. 2019. Publicação: 20 abr. 2021. Disponível em: https://patents.google.com/patent/BR102019021218A2/en?oq=BR102019021218A2. Acesso em: 1 mar. 2026.

SALGADO, J. M.; RODRIGUES, B. S.; DONADO-PESTANA, C. M.; SANTOS DIAS, C. T.; MORZELLE, M. C. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) peel as potential source of dietary fiber and phytochemicals in whole-bread preparations. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 4, p. 384-390, 2011. https://doi.org/10.1007/s11130-011-0254-0.

SAZIMA, I.; SAZIMA, M. A handful of beauty and services: Flower-visiting birds at two small urbanised sites in south-eastern Brazil and Australia. **Flora**, v. 296, p. 152151, 2022. https://doi.org/10.1016/j.flora.2022.152151.

SHARIFI-RAD, J.; MELGAR-LALANNE, G.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A. J.; CRUZ-MARTINS, N.; SALEHI, B. *Malva* species: insights on its chemical composition towards pharmacological applications. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 3, p. 546-567, 2020. https://doi.org/10.1002/ptr.6550.

SILVA, C. C. S.; MELO, A. S.; PINHEIRO, B. G.; ROCHA, F. E. C. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; MAIA, C. S. F.; FONTES-JUNIOR, E. A. Açaí juice (*Euterpe oleraceae*) prevents ethanol-induced motor impairments in adolescent female rats. **Journal of Functional Foods**, v. 108, p. 105728, 2023. https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105728.

SILVA, L. Y. S.; CAVALCANTE, D. N.; OLIVEIRA, E. S. C.; SALVADOR, A. M.; PEREIRA, Z. C.; CONSENTINI, J. C. C.; FURLANETO, G.; CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; AZEVEDO, L.; BEZERRA, J. A. *Theobroma mariae*: Bioactive compound-rich flowers. **Plants**, v. 14, n. 3, p. 377, 2025. https://doi.org/10.3390/plants14030377.

SILVA, L. Y. S.; RAMOS, A. S.; CAVALCANTE, D. N.; ARAÚJO, A. J. G.; COSTA, R. M. R.; SILVA, F. M. A.; BEZERRA, J. A. *Hibiscus acetosella*: an unconventional alternative edible flower rich in bioactive compounds. **Molecules**, v. 28, n. 12, p. 4819, 2023. https://doi.org/10.3390/molecules28124819.

SILVA, M. M.; LEMOS, T. D. O.; MARIA DO CARMO, P. R.; ARAUJO, A. M. S.; GOMES, A. M. M.; PEREIRA, A. L. F.; ANDRADE, D. D. S. Sweet-and-sour sauce of assai and unconventional food plants with functional properties: an innovation in fruit sauces. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 25, p. 100372, 2021. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100372.

SILVA, P. C. M.; GALLÃO, M. I.; ARRUDA, E. C. P. Comparative anatomical study of two Malvaceae species from a seasonally dry forest. **Flora**, v. 303, p. 152290, 2023. https://doi.org/10.1016/j.flora.2023.152290.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008. https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060.

SOLERI, D.; CLEVELAND, D. A. Tejate: *Theobroma cacao* and *T. bicolor* in a traditional beverage from oaxaca, Mexico. **Food and Foodways**, v. 15, n. 1-2, p. 107-118, 2007. https://doi.org/10.1080/07409710701260131.

SOTERO, V.; MEJÍA, K.; REBATTA, C.; MERINO, C. Avances en la evaluacion de la actividad antioxidante de diez especies de la familia Sterculiaceae. **Ciencia Amazónica**, v. 2, n. 2, p. 108, 2012. https://doi.org/10.22386/ca.v2i2.34.

SOUZA, E. L.; SANTOS, L. F. P.; BARRETO, G. A.; SOUZA-NETO, M. A.; ARAÚJO, M. C. P.; SILVA, A. C. S.; GARRUTI, D. S. Development and characterization of panettones enriched with bioactive compound powder produced from Shiraz grape by-product (*Vitis vinifera* L.) and arrowroot starch (*Maranta arundinaceae* L.). **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100220, 2023. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100220.

SOUZA, P. A.; MOREIRA, L. F.; SARMENTO, D. H. A.; COSTA, F. B. Cacao—*Theobroma cacao*. *In*: **Exotic Fruits**. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 69-76. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00010-1.

STEFANUCCI, A.; ZENGIN, G.; LLORENT-MARTINEZ, E. J.; DIMMITO, M. P.; DELLA VALLE, A.; PIERETTI, S.; MOLLICA, A. Chemical characterization, antioxidant properties and enzyme inhibition of Rutabaga root's pulp and peel (*Brassica napus* L.). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 7078-7086, 2020. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.07.013.

SZAKÁLY, Z.; SZENTE, V.; KÖVÉR, G.; POLERECZKI, Z.; SZIGETI, O. The influence of lifestyle on health behavior and preference for functional foods. **Appetite**, v. 58, n. 1, p. 406-413, 2012. https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.11.003.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 51-88, 2019. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002.

TAUCHEN, J.; BORTL, L.; HUML, L.; MIKASOVÁ, K.; DOSKOČIL, I.; MARSÍK, P.; TAUCHENOVÁ, L.; ČÍŽKOVÁ, J.; PRIBYL, J. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the peruvian amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 728-737, 2016. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.016.

TOAN, N. V.; CHI, N. N. Y. Nutritional evaluation of functional biscuits supplemented with Malva nuts (*Sterculia lychnophora*). **International Journal of Science and Research Management**, v. 10, n. 03, p. 64-81, 2022. https://doi.org/10.18535/ijsrm/v10i3.nd03.

TORRES, D. E. G.; ASSUNÇÃO, D.; MANCINI, P.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 5, p. 278-281, 2002. https://doi.org/10.1002/1438-9312(200205)104:5<278::aid-ejlt278>3.0.co;2-k.

VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S.; BLAŽEKOVIĆ, B.; ŠTEFAN, M. B.; BABAC, M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. *In*: **Phytochemicals**: a global perspective of their role in nutrition and health. [S. l.]: IntechOpen, 2012. Disponível em: https://www.intechopen.com/chapters/32901#. Acesso em: 1 jan. 2024.

VOORA, V.; BERMÚDEZ, S.; LARREA, C. **Global market report: cocoa**. Winnipeg: International Institute for Sustainable Development, 2019. Disponível em: https://www.iisd.org/system/files/publications/ssi-global-market-report-cocoa.pdf. Acesso em: 1 mar. 2026.

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Chemical and rheological properties of a starch-rich fraction from the pulp of the fruit cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 651-656, 2009. https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.12.011.

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 312-317, 2010. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.013.

YAÑEZ, O.; OSORIO, M. I.; ARECHE, C.; CASTELLANO, E. E.; SÁNCHEZ, S.; QUIROZ, J.; ALARCÓN-ZAPATA, P.; SIMIRGIOTIS, M. J.; MUÑOZ, L. J. *Theobroma cacao* L. compounds: theoretical study and molecular modeling as inhibitors of main SARS-CoV-2 protease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 111764, 2021. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111764.

ZHAO, L.; JIN, L.; PETRICK, J. L.; ZENG, H.; WANG, F.; TANG, L.; ZHANG, X. Specific botanical groups of fruit and vegetable consumption and liver cancer and chronic liver disease mortality: a prospective cohort study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 117, n. 2, p. 278-285, 2023. https://doi.org/10.1016/j.ajcnut.2022.12.004.

Capítulo I

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, PERFIL NUTRICIONAL E POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE DOS FRUTOS DE *Theobroma sylvestre* Mart. DA AMAZÔNIA.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, PERFIL NUTRICIONAL E POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE DOS FRUTOS DE *Theobroma sylvestre* Mart. DA AMAZÔNIA.

Edson Queiroz da Fonseca Júnior[1], Daniel de Queiroz Rocha[2], Edinilze Souza Coelho Oliveira[2], Samuel Oliveira da Silva[1,2], Francisca das Chagas do Amaral Souza[3], Gabriela Furlaneto[5], Laura da Silva Cruz[5], Luciana Azevedo[5]; Renilto Frota Correa[2], Edgar Aparecido Sanches[4], Pedro Henrique Campelo[6], Jaqueline de Araújo Bezerra[1,2]

[1]*Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[2]*Núcleo de Estudos em Ciência e Tecnologia da Amazônia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[3]*Laboratório de Análises Funcionais e Química de Alimentos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[4]*Laboratório de Polímeros Nanostruturados, Departamento de Física dos Materiais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[5]*Laboratório de Análises Nutricionais e Toxicológicas in vitro e in vivo, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.*
[6]*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.*

Resumo

Theobroma sylvestre Mart. (Malvaceae) é uma espécie nativa da região amazônica que permanece pouco estudada. Este artigo apresenta o perfil nutricional e a caracterização química das frações fenólicas obtidas dos frutos dessa espécie. A polpa apresentou parâmetros físico-químicos em conformidade com a legislação brasileira para o suco do cacau, evidenciando seu potencial para aplicações alimentícias. As análises por LC-HRMS e RMN de 1D/2D permitiram a identificação de 23 metabólitos, dentre esses estão os alcaloides purínicos teofilina (7), teobromina (8), teacrina (9) e cafeína (10). Além disso, diversos flavonoides foram identificados, como epicatequina (13), guaijaverina (15), quercitrina (16), miricitrina (17), astragalina (19) e kaempferol (20). As frações fenólicas demonstraram citotoxicidade moderada e efeito antiproliferativo frente às linhagens celulares tumorais (A549 e HCT-8) e endoteliais do tipo HUVEC, com valores

de IC_{50} variando entre 12,63 e 95,66 µg/mL. A fração das sementes apresentou maior atividade antiproliferativa, especialmente frente as células HUVEC (GI_{50} = 7,55 µg/mL). A presença de compostos bioativos nas frações pode estar associada ao efeito antiproliferativo observado frente a linhagens celulares analisadas, e reforça o potencial terapêutico da espécie. Este estudo estabelece bases sólidas para a continuidade do estudo químico e farmacológico de *T. sylvestre*.

Palavras-chave: Malvaceae; Cacau-azul; Compostos fenólicos; Perfil nutricional; Citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

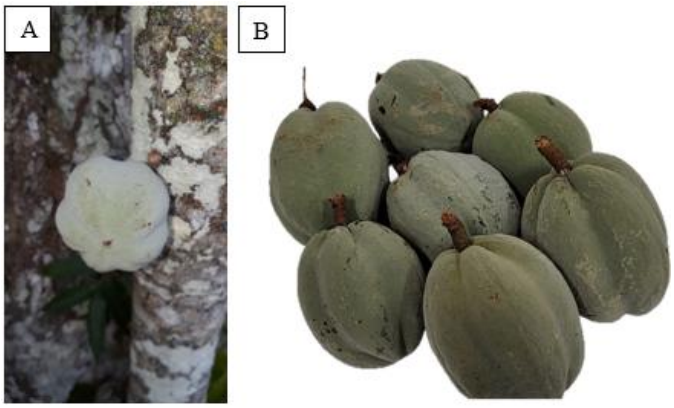
O gênero *Theobroma*, pertencente à família Malvaceae, compreende aproximadamente 200 gêneros e mais de 4000 espécies distribuídas em regiões tropicais com destaque para as Américas, África e Ásia (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2025). Dentro dessa família, diversas espécies possuem grande importância econômica no Brasil, como *Theobroma cacao* L. (cacau) e *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum. (cupuaçu). Essas plantas são nativas de regiões equatoriais da América do Sul e amplamente utilizadas nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (Velasquez-Vasconez et al., 2025; Zapata-Alvarez et al., 2024). Entre as espécies com aplicações promissoras destacam-se *T. grandiflorum*, *T. bicolor* e *T. subincanum*. A polpa do fruto de *T. grandiflorum*, notadamente rica em pectina, é amplamente empregada pela indústria alimentícia na produção de geleias, iogurtes e outros derivados (Bezerra et al., 2024; Pereira; Abreu; Rodrigues, 2018; Vriesmann; Silveira; Petkowicz, 2010). As polpas de *T. bicolor* e *T. subincanum* são utilizadas na formulação de sorvetes e licores, em razão da presença de compostos voláteis aromáticos e de componentes nutricionais com potencial para aplicações inovadoras na indústria de alimentos (Silva et al., 2024; Febrianto; Zhu, 2022; Lim, 2014). Além do seu valor econômico e nutricional, esse gênero tem despertado interesse científico em virtude do seu uso por populações locais do norte do Brasil. Um exemplo, é *T. cacao*, tradicionalmente utilizada por comunidades amazônicas no tratamento de distúrbios hepáticos e osteomusculares (Giorgetti et al., 2007). O reconhecimento do seu potencial terapêutico tem motivado a investigação de compostos bioativos presentes em seus extratos, incluindo ácidos fenólicos, terpenoides, procianidinas, flavonoides (livres e glicosilados), além de alcaloides e aminoácidos

(Nwonuma et al., 2023; Patil et al., 2022). Esses metabólitos têm sido associados a efeitos farmacológicos relevantes, como atividade antioxidante (Nwonuma et al., 2023; Patil et al., 2022) e ação citotóxica seletiva contra células tumorais (Patil et al., 2022). Nesse contexto, a fração fenólica extraída das flores da espécie *T. mariae* demonstrou atividade antiproliferativa em ensaios *in vitro* (Silva et al., 2025). Tal propriedade foi atribuída à presença de flavonoides como hiperosídeo, guaijaverina, astragalina, juglanina e kaempferol (Silva et al., 2025).

Apesar da diversidade e do potencial biotecnológico do gênero, *Theobroma sylvestre* Mart. (Figura 9), popularmente conhecida como "cacau-azul" permanece pouco estudada. Nativa da região amazônica, essa espécie ocorre em áreas de terra firme e nas margens de rios nos estados do Amazonas, Acre e Pará (Brazil) (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2025). As sementes de *T. sylvestre* são ricas em ácidos graxos e têm sido apontadas como uma potencial alternativa à manteiga de cacau (Gilabert-Escrivá et al., 2002). Embora espécies como *T. cacao*, *T. speciosum* e *T. subincanum* serem usadas na medicina tradicional por comunidades amazônicas (Giorgetti; Negri; Rodrigues, 2007), ainda não há registros na literatura científica do uso popular nem sobre a caracterização química de *T. sylvestre*. Esse fato evidencia uma lacuna relevante, que justifica a realização de estudos fitoquímicos e farmacológicos sobre a espécie.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar os principais constituintes químicos das frações obtidas a partir de extratos hidroetanólicos da casca, polpa e sementes dos frutos de *T. sylvestre*. Para tanto, foram empregadas técnicas analíticas avançadas, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com analisador de tempo de voo quadrupolo (HPLC-QToF /MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Além disso, os efeitos antiproliferativos e citotóxicos dessas frações foram avaliados em linhagens celulares cancerosas e normais por meio de ensaios *in vitro*.

Figura 9 - *Theobroma sylvestre* Mart.: (a) Fruto preso ao caule; (b) Frutos reunidos, destacando suas características morfológicas e coloração. Imagens registradas em Manaus, Amazonas - Brasil.



MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS, NORMAS E SOLVENTES

Metanol, acetonitrila e ácido fórmico grau HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água destilada foi purificada utilizando um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). A solução de referência de leucina-encefalina foi adquirida da Waters Co. (Manchester, Reino Unido). Padrões de referência de grau analítico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e utilizados para a preparação das curvas de calibração externa. Todos os outros reagentes e solventes empregados são de grau analítico e comercialmente disponíveis.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE FRUTAS

Frutos de *T. sylvestre* foram coletados em março de 2023 no campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil (coordenadas: 3°05′24,779″ S, 59°57′52,342″ O). Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM) sob o número de acesso 6056. Os componentes do fruto – casca, polpa e sementes – foram separados manualmente e posteriormente liofilizados. Os materiais secos foram extraídos utilizando uma solução hidroetanólica (etanol/água, 8:2 v/v; 20 mL) em banho ultrassônico (modelo SSBuc-6L, Mylabor, São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente por 30 min, repetido três vezes (Carrion et al., 2013). Os extratos resultantes foram concentrados por evaporação do solvente sob capela de exaustão à temperatura ambiente. Os rendimentos de extração dos

extratos hidroetanólicos foram de 14,17% para a casca, 53,78% para a polpa e 18,50% para as sementes. Os extratos concentrados foram desengordurados por partição líquido-líquido com hexano e, posteriormente, submetidos à extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Strata X (33 mm, Phenomenex, CA, EUA). Os cartuchos foram pré-condicionados com 1 mL de metanol, seguido de 1 mL de água ultrapura (H_2O UP). A eluição sequencial foi realizada com água e, em seguida, com metanol a 100%. Após a remoção do solvente, foram obtidas três frações fenólicas: PFPe (fração fenólica da casca), PFPu (fração fenólica da polpa) e PFS (fração fenólica das sementes). Essas frações foram analisadas por UPLC-QToF/MS e RMN para identificar e elucidar os principais compostos fenólicos da matriz.

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal dos componentes da fruta (casca, polpa e sementes) foi determinada utilizando os seguintes métodos padrão: teor de umidade por secagem em estufa a 105 °C; teor de cinzas por incineração a 550 °C; teor de lipídios por extração Soxhlet com hexano por 8 h; teor de proteínas pelo método clássico de Kjeldahl (Lutz, 2008) e teor de carboidratos conforme descrito por Ogunlaja et al. (2020). O valor energético total foi calculado utilizando a equação proposta por Palmeira et al. (2019).

Energia (kcal) = 4 × (g de proteínas + g de carboidratos) + 9 × (g de lipídios).

ANÁLISE UPLC-QToF/MS

A análise do perfil metabólico foi realizada utilizando um espectrômetro de massas Xevo® G2-XS QTof (Waters Corp., Manchester, Reino Unido) acoplado a um sistema UPLC Acquity H-Class, operado com o software MassLynx® (v4.1). A separação cromatográfica foi obtida em uma coluna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm d.i., tamanho de partícula de 1,7 μm) mantida a 40 ± 2 °C. A fase móvel consistiu em ácido fórmico a 0,1% em água (solvente A) e ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila (solvente B), com uma vazão de 0,3 mL/min. O programa de eluição em gradiente foi o seguinte (A:B, %): 0–15 min (98:2), 15–20 min (80:20), 20–25 min (60:40), 25–27 min (2:98), 27–27,1 min (98:2) e 27,1–30 min (98:2). O volume de injeção foi de 10 μL. A detecção por espectrometria de massa foi realizada no modo de ionização por eletrospray negativo (ESI^-), com uma faixa de varredura de massa de *m/z* 100–1500

e um tempo de varredura de 0,2 s. Os parâmetros da fonte ESI foram definidos da seguinte forma: tensão capilar, 3,0 kV; temperatura da fonte, 100 °C; temperatura de dessolvatação, 250 °C; tensão do cone, 30 V; fluxo de gás do cone, 50 L/h; e fluxo de gás de dessolvatação de 700 L/h. A aquisição de dados foi realizada no modo contínuo MSE, com varreduras de baixa energia a 6 eV e varreduras de alta energia com rampa de 20 a 35 eV ao longo de uma execução de 30 minutos. A leucina encefalina (*m/z* 554,2615 $[M-H]^-$ e *m/z* 556,2771 $[M+H]^+$) foi usada como referência de massa de bloqueio por meio do sistema LockSpray™.

ANÁLISE DE RMN

As análises de RMN de ^1H, ^1H – ^{13}C HSQC e ^1H – ^{13}C HMBC das frações fenólicas foram realizadas utilizando um espectrômetro de 11,7 T a 298,0 K (Bruker® Avance III, BBFO Plus SmartProbe™, Nova York, NY, EUA). Amostras da casca, polpa e sementes foram dissolvidas em 550 µL de CD_3OD contendo TMSP (pureza ≥99,0%) como referência interna (0,0 ppm). Os espectros foram processados e analisados utilizando o software TopSpin™ versão 4.1.3 (Bruker®) (SILVA et al., 2025).

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

As células foram cultivadas em meio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 Ham; Sigma, Alemanha), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina, a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2. Para avaliar os efeitos citotóxicos das frações fenólicas do cacau-azul, células A549 (adenocarcinoma pulmonar humano), HCT-8 (adenocarcinoma colorretal humano) e HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) foram semeadas em placas de 96 poços nas densidades de 5×10^3, 1×10^4 e 6×10^3 células por poço, respectivamente. Após 24 horas, as células foram tratadas com essas frações em várias concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) durante 48 horas.

Após o tratamento, adicionou-se solução de MTT (0,5 mg/mL) a cada poço e incubou-se por 4 h. Os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos em DMSO e a absorbância foi medida a 570 nm (Granato et al., 2022). Os parâmetros de citotoxicidade, incluindo IC_{50}, GI_{50} e LC_{50}, foram calculados utilizando métodos estabelecidos. O IC_{50} é definido como a concentração na qual o crescimento celular é inibido em 50%, onde (T/C)

× 100 = 50, sendo T e C o número de células tratadas e de controle, respectivamente, ao final do período de tratamento. O GI_{50} representa a concentração necessária para inibir o crescimento celular líquido em 50% em relação às células não tratadas e é calculado como $([T - T_0] / [C - T_0]) \times 100 = 50$, onde $T > T_0$ e T_0 é a contagem de células no tempo zero. A LC_{50} refere-se à concentração na qual ocorre uma perda líquida de 50% de células viáveis em comparação com o número inicial de células e é definida como $([T - T_0] / T_0) \times 100 = -50$, onde $T < T_0$. Além disso, o índice de seletividade (IS) foi determinado pela razão entre o valor de IC_{50} para células HUVEC e o valor de IC_{50} para células cancerígenas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey, foi utilizada para avaliar comparações múltiplas com um nível de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Minitab® versão 18.1 (State College, PA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A Tabela 5 apresenta os parâmetros físico-químicos, a composição centesimal (expressa em g/100 g de matéria seca) e o valor energético (kcal/100 g de matéria seca) das diferentes partes do *T. sylvestre* (casca, polpa e sementes). O pH e o teor de sólidos solúveis da polpa são consistentes com os valores relatados para a polpa de *T. cacao* (Borges et al., 2021), sugerindo similaridades nos perfis de acidez e doçura entre os frutos. Além disso, os parâmetros físico-químicos obtidos estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira vigente para o suco de cacau (Ministério da Agricultura, 2018), que define padrões de identidade e qualidade para reforçar o potencial terapêutico de produtos derivados do cacau, incluindo requisitos mínimos de sólidos solúveis e pH. Essa conformidade reforça o potencial de *T. sylvestre* para aplicações alimentares. A polpa pode ser usada na preparação de geleias, conservas e sucos, e também tem potencial para a produção de bebidas fermentadas (Duarte et al., 2010; Puerari; Magalhães; Schwan, 2012).

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos, composição proximal (g/100 g de matéria seca) e valor energético (kcal/100 g de matéria seca) da casca, polpa e semente de *T. sylvestre*.

Parâmetros	**Polpa**	**Semente**	**Casca**
pH	4,36 ± 0,11	-	-
Sólidos solúveis em °Brix	11,03 ± 0,75	-	-
Umidade	90,91 ± 0,45^{a}	63,32 ± 0,82^{c}	80,78 ± 0,73^{b}
Cinzas	0,51 ± 0,01^{b}	1,30 ± 0,02^{a}	1,19 ± 0,18^{a}
Lipídios	0,04 ± 0,00^{c}	0,52 ± 0,00^{a}	0,12 ± 0,00^{b}
Proteína	1,54 ± 0,31^{b}	5,91 ± 0,00^{a}	1,85 ± 0,03^{b}
Carboidratos	1,54 ± 0,14^{c}	28,94 ± 0,84^{a}	16,04 ± 0,51^{b}
Energia	34,48 ± 0,18^{c}	144,13 ± 3,38^{a}	72,67 ± 2,18^{b}

Nota: média ± desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

Em relação ao teor de umidade, a polpa apresentou o maior valor (90,91 ± 0,45%), seguida pela casca (80,78 ± 0,73%) e pelas sementes (63,32 ± 0,82%), com diferenças estatisticamente significativas entre elas ($p < 0,05$). Esses resultados indicam o alto teor de água na polpa, o que contribui para a textura suculenta da fruta. Quanto ao teor de cinzas, a casca e as sementes apresentaram os maiores valores, sugerindo uma maior concentração de minerais inorgânicos. A análise de cinzas é um indicador chave do teor mineral total, revelando a presença de elementos essenciais como cálcio, fósforo, ferro, potássio e magnésio – minerais que desempenham funções fisiológicas fundamentais, incluindo a saúde óssea, a função muscular e o transporte de oxigênio (Alzahrani et al., 2017).

As sementes do cacau-azul apresentaram os maiores teores de proteína (5,91 ± 0,00 g) e carboidrato (28,94 ± 0,84 g) em comparação com a polpa e a casca ($p < 0,05$). Esse perfil nutricional é consistente com o observado em outras espécies *de Theobroma*, como *T. cacao* (cacau), *T. bicolor* (macambo) e *T. grandiflorum* (cupuaçu), cujas sementes são conhecidas por serem ricas em compostos nutricionais – especialmente lipídios e carboidratos – enquanto a polpa tende a conter níveis mais elevados de açúcares solúveis e fibras alimentares (Benlloch-Tinoco et al., 2024). Estudos anteriores demonstraram que as sementes de *Theobroma* spp. são tradicionalmente valorizadas por seu alto teor energético e proteico, corroborando os resultados deste estudo, no qual as sementes do cacau-azul apresentaram o maior valor energético (144,13 ± 3,38 kcal) (Peixoto Araujo et al., 2021).

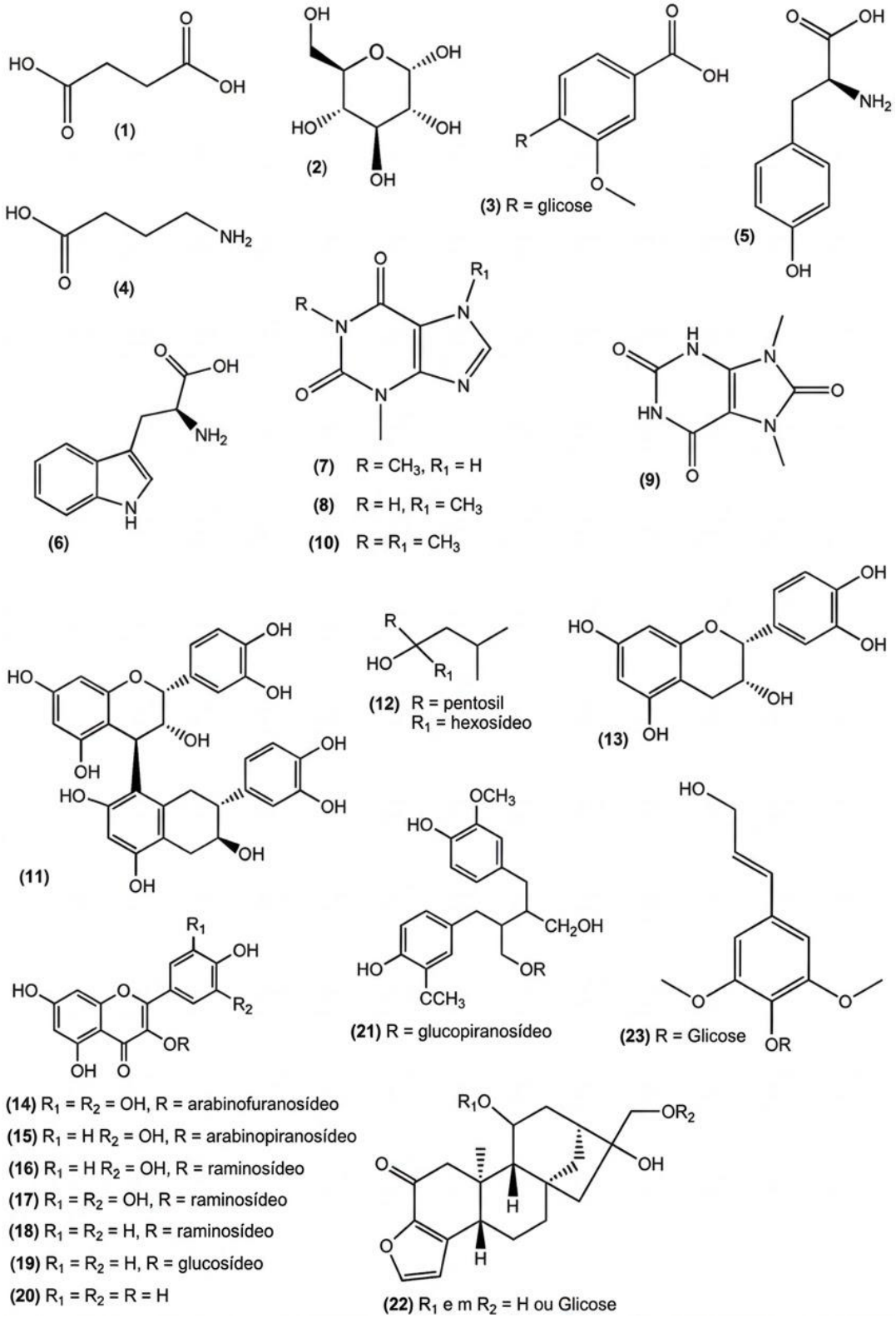
DESCRIÇÃO QUÍMICA QUALITATIVA

As frutas são reconhecidas por conterem diversos tipos de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos. Esses constituintes têm recebido crescente atenção devido aos seus benefícios para a saúde, principalmente relacionados às suas propriedades antioxidantes (Oliveira et al., 2025) e antitumorais (Saldarriaga et al., 2025). Dada a relevância desses compostos, as frações fenólicas da casca (PFPe), da polpa (PFPu) e das sementes (PFS) de *T. sylvestre* foram analisadas separadamente por LC-HRMS e RMN de ^{1}H, em combinação com experimentos bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC).

As análises por LC-MS foram essenciais para a identificação de dezenove compostos, confirmada por baixos erros de massa e padrões de fragmentação específicos (Tabela 6). O uso combinado de ambas as técnicas permitiu a identificação de 23 metabólitos, incluindo ácidos orgânicos, aminoácidos, alcaloides metilxantínicos, flavonoides livres e glicosilados, um lignano, um diterpeno, um álcool glicosilado e um fenilpropanóide (

Figura *10*). A presença de flavonoides e alcaloides em todas as três frações é consistente com os perfis fitoquímicos previamente relatados em espécies do mesmo gênero (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; Silva et al., 2024; Lo Coco et al., 2007; Silva et al., 2025).

Figura 10 - Estruturas químicas dos constituintes identificados nos frutos de *T. sylvestre* por análises de LC-HRMS e RMN.



Na região alifática do espectro de RMN de ^{1}H, o ácido succínico (1) foi identificado por um simpleto em δ_H 2,55, mostrando correlação direta com um carbono em δ_C 30,1 e correlação de longo alcance com um carbono em δ_C 175,1 (Caligiani et al., 2010). Um sinal de próton carbinólico em δ_H 5,09 (d, J = 3,7 Hz), característico da α-glicose (2), também foi observado em todas as frações (Silva et al., 2025). Além disso, o isômero 1 (3) do glicosídeo do ácido vanílico foi identificado pelo seu íon molecular em *m/z* 329,0881 $[M-H]^-$ (TR 6,3 min), que produziu um fragmento em *m/z* 167,0334 $[M-H]^-$, consistente com o ácido vanílico após a perda de uma unidade de hexose (162 Da) (Shang et al., 2022).

O aminoácido ácido γ-aminobutírico (GABA) (4) foi identificado por um tripleto em δ_H 2,26 (J = 7,3 Hz), mostrando correlação com um multipleto em δ_H 1,59 (Villalón-López et al., 2023). A tirosina (5) foi detectada nas frações de polpa e semente, com sinais de RMN de ^{1}H mais intensos na fração de semente. Dois dupletos em δ_H 6,75 (J = 8,8 Hz) e δ_H 7,09 (J = 8,8 Hz) foram observados, típicos de um anel aromático *p*-substituído com acoplamento *orto* (Caligiani et al., 2010). Além disso, o triptofano (6) foi detectado na fração da polpa, evidenciado por um simpleto em δ_H 7,32, correlacionando-se com carbonos em δ_C 108 e δ_C 27,8 (Kuhn et al., 2024). Os níveis de triptofano foram previamente quantificados em grãos de cacau de várias origens (Bertazzo et al., 2011a).

Os alcaloides metilxantínicos teofilina (7, TR 2,9 min) e teobromina (8, TR 3,4 min) são isômeros constitucionais com o mesmo valor de *m/z* de 181,07 $[M+H]^+$, mas exibem padrões de fragmentação distintos. A teofilina produz um fragmento em *m/z* 124,0386 devido à clivagem do anel imidazol (−57 Da), enquanto a teobromina produz um fragmento em *m/z* 138,0672 a partir da perda combinada de CO e CH_3 (−43 Da). A teacrina (9, TR 6,0 min) foi identificada pelo seu íon molecular em *m/z* 225,0969 $[M+H]^+$, com perdas características de um grupo metil (−15 Da) e $CO+CH_3$ (−43 Da). Um padrão de fragmentação semelhante (−43 Da) foi observado para a cafeína (10, TR 6,5 min). Os simpletos característicos de RMN de ^{1}H em δ_H 7,89 (teobromina) e δ_H 7,87 (cafeína) confirmaram suas identidades. Simpletos para teofilina e teacrina também foram observados; a teacrina foi encontrada nas frações da polpa e da semente, enquanto a teofilina apareceu em todas as frações analisadas. Os compostos 7 , 8 e 10 foram relatados em sementes de cacau e cupuaçu (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; Lo Coco et al., 2007) e são conhecidos por suas propriedades farmacológicas (Lo Coco et al., 2007).

O íon detectado em TR 7,3 min com *m/z* 577,1342 $[M-H]^-$ foi atribuído à procianidina B1 (11), previamente relatada em sementes de *T. cacao* (Caligiani et al.,

2010; Jean-Marie et al., 2022). O fragmento MS^2 em *m/z* 289,0684 resulta da clivagem da ligação interflavânica inferior, produzindo o monômero (epi)catequina (Rush et al., 2018). A fragmentação retro Diels-Alder (RDA) adicional gerou o íon em *m/z* 425,08 (−152 Da), seguida pela perda de água para produzir um fragmento em *m/z* 407,0764 (Oliveira et al., 2022).

O composto com *m/z* 381,1771 $[M-H]^-$ foi atribuído ao 3-metil-1-butanol pentosil-hexosídeo-1 (12), com um fragmento MS^2 dominante em *m/z* 249,1345 (100%) resultante da perda de pentose (−132 Da) (Wei et al., 2021). O composto com TR 8,0 min e *m/z* 289,0684 $[M-H]^-$ foi identificado como epicatequina (13), um flavan-3-ol amplamente distribuído. Os dados de RMN corroboraram essa identificação, com sinais em δ_H 6,65 (d, J = 8,0 Hz) e δ_H 6,84 (m) indicando um padrão de substituição orto/meta no anel B, típico de uma configuração 3′,4′-di-hidroxi.

Outros flavonoides glicosilados incluíram miricetina-3-*O*-arabinosídeo (14, *m/z* 449,0695), quercetina-3-arabinopiranosídeo (15, *m/z* 433,0777 $[M-H]^-$), quercetina-3-*O*-ramnosídeo (16, *m/z* 447,0907 $[M-H]^-$), miricetina-3-*O*-ramnosídeo (17, *m/z* 463,0872 $[M-H]^-$), kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (18, *m/z* 431,0968 $[M-H]^-$) e kaempferol-3-*O*-glicosídeo (19, *m/z* 447,0927 $[M-H]^-$). Todos os compostos apresentaram perda de açúcar e geração de íons aglicona em *m/z* 316 (miricetina), *m/z* 300 (quercetina) e *m/z* 285 (kaempferol). Além da clivagem glicosídica, a fragmentação por RDA do anel C foi observada nos compostos 15, 16 e 18, gerando fragmentos em *m/z* 255,0270 e *m/z* 255,0284. As atribuições de RMN de ^1H para os flavonoides 15 a 19 estão detalhadas na Tabela 6. Além disso, o composto em RT 19,1 min com *m/z* 285,0399 $[M-H]^-$ foi identificado como kaempferol (20), confirmado por sinais de RMN de ^1H: dois dupletos em δ_H 6,80 (J = 8,5 Hz) e δ_H 8,00 (J = 8,5 Hz), consistentes com um sistema AA'BB′ no anel B (Ren et al., 2012).

Além disso, o lignano secoisolariciresinol-9'-*O*-*β*-D-glucopiranosídeo (21, *m/z* 523,2147 $[M-H]^-$) foi detectado em todas as três frações, com suporte de sinais de RMN de ^1H em δ_H 6,58 (d, J = 1,8 Hz) e δ_H 6,65 (d, J = 8,0 Hz), correlacionando-se com δ_C 113,4 e δ_C 122,4, respectivamente (Crispim et al., 2025). Em PFPe, um glicosídeo diterpenoide furanoide (22, TR 12,3 min) foi identificado com um íon molecular em *m/z* 521,2033 $[M-H]^-$, e fragmentação em *m/z* 359,1468 devido à perda de hexose (−162 Da) (Xu et al., 2017). Em TR 16,3 min, o íon em *m/z* 371,1330 $[M-H]^-$ foi detectado nas frações de polpa e semente. O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais característicos da

siringina (23): δ_H 3,81 (m), δ_H 3,89 (s) e δ_H 6,36 (d, J = 5,5 Hz), correlacionando-se com δ_C 56,7, δ_C 62,7 e δ_C 130,8, respectivamente (Qian et al., 2024).

De modo geral, as análises combinadas de LC-HRMS e RMN 1D/2D foram eficazes para a identificação de metabólitos nas frações de *T. sylvestre*. Notavelmente, os compostos 12, 21, 22 e 23 não haviam sido relatados anteriormente em espécies de *Theobroma*.

Tabela 6 - Metabólitos identificados nas frações fenólicas dos frutos de *T. sylvestre* por LC-HRMS e espectroscopia de RMN 1D/2D. PFPe = fração fenólica da casca; PFPu = fração fenólica da polpa; PFS = fração fenólica das sementes.

Nº	**TR (min)**	**Íon Precursor $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)**	**Íons calculados $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)**	**Fragmentações $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)**	**Composto (Composição elementar, Erro de massa em ppm)**	**δ ^{1}H em ppm (*J*, Hz)**	**δ ^{13}C em ppm**	**Frações**	**Referências**
Ácidos orgânicos/Açúcares									
1	-	-	-	-	Ácido succínico ($C_4H_6O_4$)	2,55 (s)	30,1; 175,1	PFPe PFPu PFS	(Caligiani et al., 2010)
2	-	-	-	-	*α*-glucose ($C_6H_{12}O_6$)	5,09 (d, *J* = 3,7 Hz)	93,1; 73,8		(Silva et al., 2025)
3	6,3	329,0881	329,0873	167,0334 (50) 329,0881 (100) 108,0199 (10) 152,0107 (05)	Isômero 1 do glicosídeo do ácido vanílico ($C_{14}H_{18}O_9$, 2,4)	7,60 (m); 3,73 (s)	56,5; 125,7		(Ramos-escudero et al., 2024)
Aminoácidos									
4	-	-	-	-	Ácido *γ*-aminobutírico ($C_4H_9NO_2$)	1,59 (m) 2,26 (t, *J* = 7,3 Hz)	24,8; 35,6; 182,7	PFPe PFPu PFS	(Villalón-López et al., 2023)
5	-	-	-	-	Tirosina ($C_9H_{11}NO_3$)	6,75 (d, *J* = 8,8 Hz) 7,09 (d, *J* = 8,8 Hz)	116,0; 129,7; 133,4; 158,6	PFPe PFS	(Caligiani et al., 2010; Campelo et al., 2024)
6	3,9	203,0826	203,0821	116,9285(100) 142,0642 (10)	Triptofano ($C_{11}H_{12}N_2O_2$, 2,5)	6,91 (d, *J* = 8,3 Hz), 7,32 (sl) 7,55 (m)	111,3; 118,6; 125,2		(Bertazzo et al., 2011a; Kuhn et al., 2024)

Nº	TR (min)	Íon Precursor $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Íons calculados $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $M+H]^+$ (*m/z*)	Fragmentações $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Composto (Composição elementar, Erro de massa em ppm)	δ ^{1}H em ppm (*J*, Hz)	δ ^{13}C em ppm	Frações	Referências
Alcaloides									
7	2,9	181,0716 $[M+H]^+$	181,0726 $[M+H]^+$	124,0386 (100)	Teofilina ($C_7H_8N_4O_2$, - 5,5)	3,53 (s); 3,73 (s); 8,08 (s)	29,6; 32,2, 100,3; 138,0, 152,3; 153,7	PFPe PFPu PFS	(Villalón-López et al., 2023)
8	3,4	181,0727 $[M+H]^+$	181,0726 $[M+H]^+$	138,0672 (40) 110,0726 (20)	Teobromina ($C_7H_8N_4O_2$, 0,5)	7,89 (s)	-	PFPe PFPu PFS	(Choi et al., 2005)
9	6,0	225,0969 $[M+H]^+$	225,0988 $[M+H]^+$	153,0513(100) 210,0732 (70) 168,0766 (60)	Teacrina ($C_9H_{12}N_4O_3$, - 8,4)	3,23 (s); 3,44 (s); 3,56 (s); 3,66 (s)	28,5; 29,5; 30,9; 32,2; 100,3; 138,0; 152,3; 153,7	PFPu PFS	(Hammerstone JR; Romanczyk JR; Aitkent, 1994; Wang et al., 2010)
10	6,5	195,0891 $[M+H]^+$	195,0882 $[M+H]^+$	138,0672(100) 110,0726 (50)	Cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$, 4,6)	7,87 (s)	-		(Choi et al., 2005; Villalón-López et al., 2023)
Proantocianidina									
11	7,3	577,1342	577,1346	577,1342(100) 289,0684 (50) 407,0764 (35) 425,0843 (20)	Procianidina B1 ($C_{30}H_{26}O_{12}$, - 0,7)	-	-	PFPu PFS	(Oliveira et al., 2022)
Glicosídeo de álcool alifático									

Nº	TR (min)	Íon Precursor $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Íons calculados $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $M+H]^+$ (*m/z*)	Fragmentações $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Composto (Composição elementar, Erro de massa em ppm)	δ ^{1}H em ppm (*J*, Hz)	δ ^{13}C em ppm	Frações	Referências
12	9,4	381,1771	381,1761	249,1345 (100) 381,1755 (70) 382,1785 (10) 161,0451 (20) 101,0242 (10) 113,0239 (12)	3-Metil-1-butanol pentosil-hexosídeo-1 ($C_{16}H_{30}O_{10}$, 2,7)	-	-	PFPe PFPu PFS	(Wei et al., 2021)
Flavonoides									
13	8,0	289,0684	289,0712	289,0712 (100) 245,0808 (25) 203,0696 (40) 137,0240 (90) 125,0227 (80) 109,0293 (50)	Epicatequina ($C_{15}H_{14}O_6$, - 9,7)	3,77 (m); 5,94 (m); 6,65 (d, *J* = 8,0 Hz); 6,84 (m)	68,4; 96,9; 114,6, 119,4; 132,6; 147,5	PFPe PFPu PFS	(Davis et al., 1996)
14	10,4	449,0695	449,0720	316,0214(100) 317,0290 (20)	Miricetina-3-*O*-arabinosídeo ($C_{20}H_{18}O_{12}$, - 5,5)	-	-	PFPe PFS	
15	12,9	433,0777	433,0771	300,0277(100) 271,0245 (50) 433,0777 (30) 255,0270 (15)	Quercetina-3-*O*- -L-arabinopiranosídeo (Guaijaverina) ($C_{20}H_{18}O_{11}$, 1,4)	7,63 (m)	103,2; 121,8	PFPe PFPu PFS	(Oliveira et al., 2022; Silva et al., 2025)
16	13,9	447,0907	447,0927	300,0277 (100) 301,0331 (90) 271,0245 (45) 255,0284 (20)	Quercetina-3-*O*-raminosídeo (Quercitrina) ($C_{21}H_{20}O_{11}$, - 4,4)	0,91 (m); 5,34 (sl), 6,20 (d, *J* = 2,0 Hz); 6,38 (d, *J* = 2,0 Hz); 6,90 (d, *J* = 8,2	16,2; 93,4; 98,6, 102,3; 116,5; 115,6, 121,6	PFPe PFPu PFS	(Oliveira et al., 2021)

Nº	TR (min)	Íon Precursor $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Íons calculados $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Fragmentações $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Composto (Composição elementar, Erro de massa em ppm)	δ ^{1}H em ppm (*J*, Hz)	δ ^{13}C em ppm	Frações	Referências
						Hz); 7,30 (dd, *J* = 8,2; 2,0 Hz); 7,33 (d, *J* = 2,0 Hz)			
17	15,5	463,0872	463,0877	316,0214 (80) 271,0245 (12)	Miricetina-3-*O*-rhamnosídeo (Miricitrina) ($C_{21}H_{20}O_{12}$, - 1,1)	5,33 (sl); 6,94 (sl)	102,3; 109,5; 145,4	PFPe PFS	(Oliveira et al., 2021)
18	15,8	431,0968	431,0978	284,0313(100) 285,0403 (45) 255,0284 (25)	Kaempferol-3-*O*-rhamnosídeo (Afzelina) ($C_{21}H_{20}O_{10}$, - 2,3)	0,90 (m); 5,37 (sl), 6,20 (d, *J* = 2,0 Hz); 6,39 (d, *J* = 2,0 Hz); 6,93 (d, *J* = 8,8 Hz); 7,77 (d, *J* = 8,8 Hz)	16,3; 93,4; 98,6, 102,2; 115,2; 130,6	PFPe	(Oliveira et al., 2021)
19	16,4	447,0907	447,0927	285,0365 (20)	Kaempferol-3-*O*-glicosídeo (Astragalina) ($C_{21}H_{20}O_{11}$, - 4,5)	6,83 (d, *J* = 8,8 Hz); 8,06 (d, *J* = 8,8 Hz); 6,36 (m)	115,4		(Ren et al., 2012; Silva et al., 2025)
20	19,1	285,0375	285,0399	133,0302 (100) 151,0047 (30) 217,0491 (20)	Kaempferol ($C_{15}H_{10}O_6$, - 8,4)	6,80 (d, *J* = 8,5 Hz); 8,00 (d, *J* = 8,5 Hz); 6,17 (d, *J* = 2,3 Hz); 6,33 (m)	115,4	PFPe PFPu PFS	(Ren et al., 2012)
Lignana									

Nº	TR (min)	Íon Precursor $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Íons calculados $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Fragmentações $[M-H]^-$ (*m/z*)/ $[M+H]^+$ (*m/z*)	Composto (Composição elementar, Erro de massa em ppm)	δ ^{1}H em ppm (*J*, Hz)	δ ^{13}C em ppm	Frações	Referências
21	13,9	523,2147	523,2178	361,1668 (100)	(−)-Secoisolariciresinol-9'-*O*-*β*-D-glucopiranosídeo ($C_{26}H_{36}O_{11}$, -5,9)	3,84 (m); 4,26 (d, *J* = 8,0 Hz); 6,65 (d, *J* = 8,0 Hz); 6,58 (d, *J* = 1,8 Hz)	62,5; 104,6; 113,4; 122,4; 144,2	PFPe PFPu PFS	(Crispim et al., 2025)
Glicosídeo diterpênico									
22	12,3	521,2033	521,2017	521,2033 (100) 359,1468 (40) 344,1263 (10) 341,1371 (5)	Glicosídeo diterpênico furanoide ($C_{26}H_{33}O_{11}$, 3,1)	-	-	PFPe	(Xu et al., 2017)
Glicosídeo fenilpropanoide									
23	16,3	371,1330	371,1342	209,0804 (100) 371,1330 (50) 165,0902 (10)	Siringina ($C_{17}H_{24}O_9$, -3,23)	3,81 (m); 3,89 (s); 6,36 (d, *J* = 5,5 Hz)	56,7; 62,7; 130,8	PFPu PFS	(Qian et al., 2024)

ENSAIO CITOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO

As frações fenólicas da casca, polpa e sementes do fruto de *T. sylvestre* foram avaliadas quanto à sua atividade contra células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar humano (A549), células de carcinoma colorretal humano (HCT-8) e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). De acordo com a classificação de citotoxicidade proposta por Anywar et al. (2022) e pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI), compostos com valores de $IC_{50} \leq 20$ µg/mL são considerados altamente citotóxicos, aqueles entre 21 e 200 µg/mL moderadamente citotóxicos e aqueles entre 201 e 500 µg/mL fracamente citotóxicos. A avaliação de acordo com esses critérios revelou que as amostras exibiram um perfil predominantemente citotóxico moderado em todas as linhagens celulares avaliadas, tanto saudáveis quanto cancerosas, com valores de IC_{50} variando de 12,63 a 95,66 µg/mL (Figura 11). Em relação ao índice de seletividade (IS), os extratos de *T. sylvestre* apresentaram baixa seletividade geral, visto que valores de IS acima de 3 são indicativos de citotoxicidade preferencial em relação às células tumorais. Notavelmente, a fração de sementes apresentou seletividade relativamente maior em relação às células normais (por exemplo, HUVEC), com valores de IS na faixa de 0,5, sugerindo aumento da citotoxicidade em relação às células não tumorais (GRANATO et al., 2022) (Tabela 7).

Além disso, as frações demonstraram atividade antiproliferativa relevante, particularmente a fração da semente, que apresentou o menor valor de GI_{50} contra células HUVEC (7,55 µg/mL). Em contraste, as frações da casca (GI_{50} = 30,4 µg/mL) e da polpa (GI_{50} = 26,7 µg/mL) foram mais eficazes contra células cancerígenas HCT-8.

Dentro da família Malvaceae, a espécie *Sida santaremnensis* H. Monteiro também demonstrou atividade antiproliferativa significativa, atribuída à presença do flavonóide kaempferol (20) (Marques et al., 2021), um composto investigado como agente terapêutico para carcinoma hepatocelular devido aos seus efeitos antitumorais bem documentados (Guo et al., 2016; Huang et al., 2013). No presente estudo, o kaempferol foi identificado em todas as três frações do fruto de *T. sylvestre*, corroborando os efeitos citotóxicos observados nas linhagens celulares testadas. Este mesmo constituinte bioativo foi previamente identificado na fração fenólica das flores de *T. mariae*, que também exibiram atividade antiproliferativa contra linhagens celulares normais (HUVEC) e tumorais (HepG2) (SILVA et al., 2025). Outro flavonóide relevante, a astragalina (19), um derivado glicosilado do kaempferol, também tem sido amplamente reconhecido por

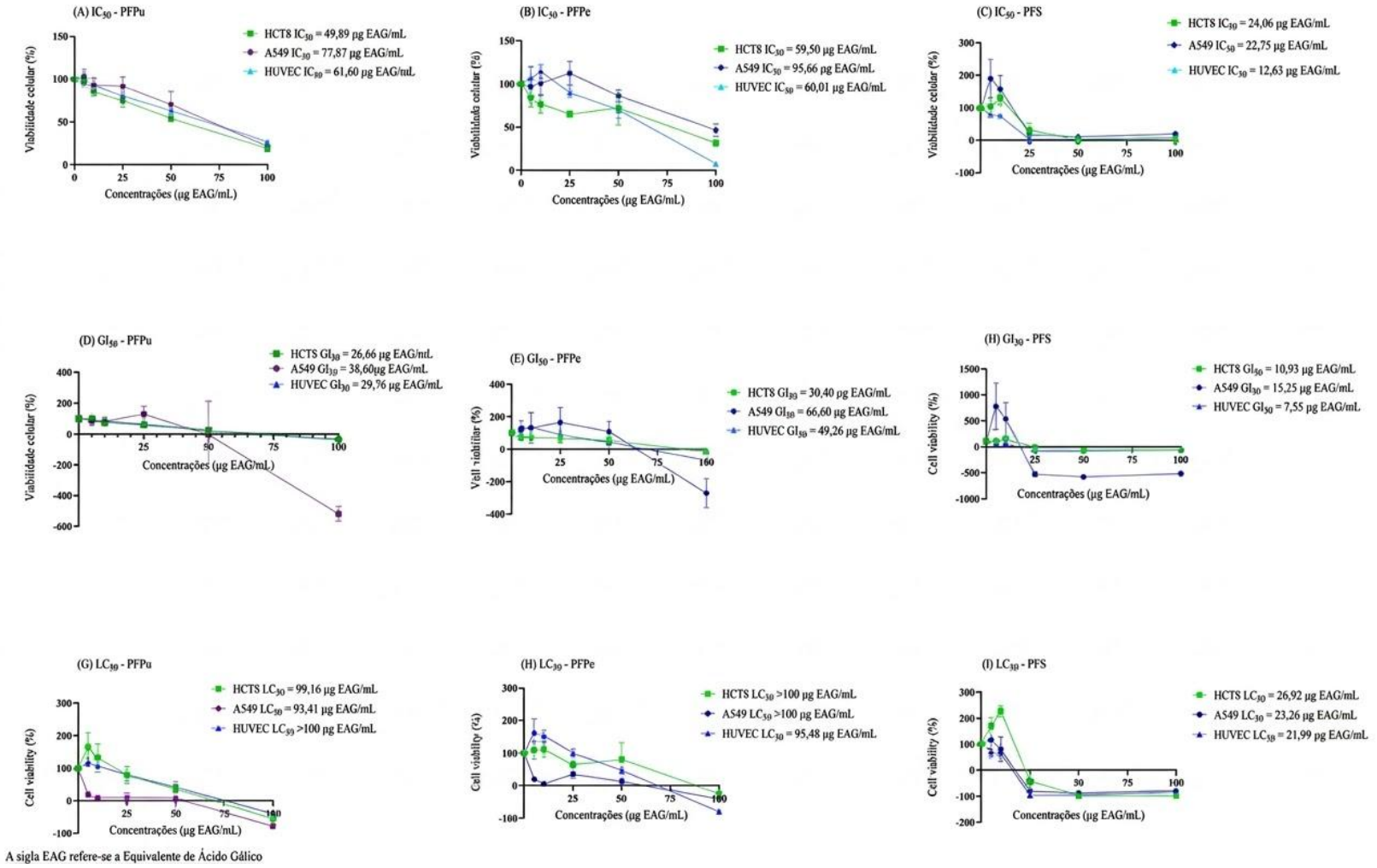
suas propriedades anticancerígenas. Estudos demonstraram que a astragalina inibe significativamente a proliferação de linhagens de células de carcinoma hepatocelular (HepG2, Huh-7 e H22) em ensaios *in vitro* (Li et al., 2017). O polifenol procianidina B1 (11), identificado nas frações da polpa e da semente de *T. sylvestre*, tem sido associado a uma notável atividade antitumoral. Estudos recentes demonstraram que a administração oral de procianidina B1 em modelos murinos (15 mg/kg) inibiu significativamente o crescimento tumoral em células HepG2, atingindo uma taxa de inibição tumoral de aproximadamente 60% sem causar efeitos metabólicos adversos (Na et al., 2020). Outro flavonóide, a miricitrina (17), detectada nas frações da casca e da semente de *T. sylvestre*, demonstrou efeitos antiproliferativos significativos, inibindo a angiogênese induzida por VEGF em células endoteliais vasculares e reduzindo o crescimento tumoral *in vivo* em modelos de xenoenxerto de glioblastoma U251 (Hu et al., 2020). Portanto, o perfil químico do fruto de *T. sylvestre*, devido particularmente a presença de compostos bioativos como o kaempferol, a astragalina, a procianidina B1 e a miricitrina, pode estar diretamente associado aos efeitos celulares observados. Essas descobertas abrem novas perspectivas para futuras investigações sobre o potencial terapêutico dessa espécie amazônica.

Tabela 7 - IC_{50} e Índice de Seletividade (IS) dos extratos PFPe, PFPu e PFS.

Amostras	IC_{50} (µg EAG/mL)			IS	
	HUVEC	A549	HCT-8	HUVEC/A549	HUVEC/HCT-8
PFPe	60,01	95,66	59,50	0,62	1,01
PFPu	61,60	77,87	49,89	0,79	1,23
PFS	12,63	22,75	24,06	0,55	0,52

Nota: A IC_{50} é definida como a concentração de um agente que reduz o crescimento celular em 50%, calculada quando (T/C) × 100 = 50, onde T é a contagem de células no momento do tratamento e C é a contagem de células controle no mesmo momento. O índice de seletividade (IS) é determinado dividindo-se o valor de IC_{50} para células HUVEC pelo valor de IC_{50} para células cancerígenas. PFPe (Fração Fenólica da Casca); PFPu (Fração Fenólica da Polpa) e PFS (Fração Fenólica das Sementes).

Figura 11 - A avaliação da citotoxicidade de PFPe (Fração Fenólica da Casca), PFPu (Fração Fenólica da Polpa) e PFS (Fração Fenólica das Sementes) foi realizada nas linhagens celulares A549, HCT-8 e HUVEC. (A, D e G) IC_{50}: concentração do agente que reduz o crescimento celular em 50%. (B, E e H) GI_{50}: concentração do agente que diminui o crescimento em 50% em comparação com as células não tratadas. (C, F e I) LC_{50}: concentração do agente que causa uma redução líquida de 50% das células em relação à contagem inicial de células no início do tratamento.



A sigla EAG refere-se a Equivalente de Ácido Gálico

CONCLUSÃO

Um total de vinte e três compostos foram identificados nas frações fenólicas de *T. sylvestre*, incluindo alcaloides metilxantínicos e flavonoides livres e glicosilados, previamente relatados em outras espécies de *Theobroma*. Notavelmente, quatro metabólitos adicionais são relatados aqui pela primeira vez no gênero: 3-metil-1-butanol pentosil-hexosídeo-1, secoisolariciresinol-9′-*O*-*β*-D-glucopiranosídeo, um glicosídeo diterpenoide furanoide, e siringina. Essa descoberta sugere características químicas únicas de *T. sylvestre*. Além disso, as amostras exibiram citotoxicidade moderada e efeitos antiproliferativos relevantes contra linhagens de células endoteliais (HUVEC) e cancerígenas (A549 e HCT-8). Esses efeitos são atribuídos à presença de compostos bioativos como o kaempferol, a astragalina, a procianidina B1 e a miricitrina, reforçando o potencial terapêutico dessa espécie amazônica. Em conjunto, essas descobertas ampliam significativamente o conhecimento fitoquímico de *T. sylvestre*. Elas também fornecem uma base sólida para futuros estudos focados na quantificação de compostos bioativos e na avaliação de propriedades funcionais, contribuindo, em última análise, para suas potenciais aplicações farmacológicas, nutracêuticas e biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

ALZAHRANI, H. R.; KUMAKLI, H.; AMPIAH, E.; MEHARI, T.; THORNTON, A. J.; BABYAK, C. M.; FAKAYODE, S. O. Determination of macro, essential trace elements, toxic heavy metal concentrations, crude oil extracts and ash composition from Saudi Arabian fruits and vegetables having medicinal values. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 906–913, 2017. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.012.

ANYWAR, G. U.; KAKUDIDI, E.; ORYEM-ORIGA, H.; SCHUBERT, A.; JASSOY, C. Cytotoxicity of medicinal plant species used by traditional healers in treating people suffering from HIV/AIDS in Uganda. **Frontiers in Toxicology**, v. 4, p. 1-15, 2022. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.832780.

BALCÁZAR-ZUMAETA, C. R.; CASTRO-ALAYO, E. M.; CAYO-COLCA, I. S.; IDROGO-VÁSQUEZ, G.; MUÑOZ-ASTECKER, L. D. Metabolomics during the spontaneous fermentation in cocoa (*Theobroma cacao* L.): An exploraty review. **Food Research International**, v. 163, p. 112190, 2023. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112190.

BENLLOCH-TINOCO, M.; NUÑEZ RAMÍREZ, J. M.; GARCÍA, P.; GENTILE, P.; GIRÓN-HERNÁNDEZ, J. *Theobroma* genus: Exploring the therapeutic potential of *T. grandiflorum* and *T. bicolor* in biomedicine. **Food Bioscience**, v. 61, p. 104755, 2024. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104755.

BERTAZZO, A.; COMAI, S.; BRUNATO, I.; ZANCATO, M.; COSTA, C. V. L. The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 93–96, 2011. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.110.

BEZERRA, J. A.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; LAMARÃO, C. V.; STRINGHETA, P. C.; MARTINS, E.; CAMPELO, P. H. "Cupuaçu" (*Theobroma grandiflorum*): a brief review on chemical and technological potential of this Amazonian fruit. **Food Chemistry Advances**, v. 5, p. 100747, 2024. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100747.

BORGES, E. M. E. S.; SILVA, F. L. H.; FERREIRA, A. L. O.; MEDEIROS, L. L. Cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) as a substrate in the preparation of potentially probiotic. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e01101119002, 2021. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19002.

CALIGIANI, A.; ACQUOTTI, D.; CIRLINI, M.; PALLA, G. ^{1}H NMR study of fermented cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12105–12111, 2010. https://doi.org/10.1021/jf102985w.

CAMPELO, M. S.; CÂMARA NETO, J. F.; MAGALHÃES, H. C. R.; ALVES FILHO, E. G.; ZOCOLO, G. J.; LEAL, L. K. A. M.; RIBEIRO, M. E. N. P. GC/MS and 2D NMR-based approach to evaluate the chemical profile of hydroalcoholic extract from *Agaricus blazei* Murill and its anti-inflammatory effect on human neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 322, p. 117676, 2024. https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117676.

CARRION, L. L.; RAMOS, D. F.; MARTINS, D.; OSÓRIO, M. I. C.; CURSINO, L. D. Antimycobacterial activity of Brazilian Amazon plants extracts. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 4, p. 479–485, 2013.

CHOI, Y. H.; SERTIC, S.; KIM, H. K.; WILSON, E. G.; MICHOPOULOS, F.; LEFEBER, A. W. M.; ERKELENS, C.; KRICUN, S. D. P.; VERPOORTE, R. Classification of Ilex species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1237–1245, 2005. https://doi.org/10.1021/jf0486141.

CRISPIM, M.; SILVA, T. C.; LIMA, A. S.; CRUZ, L. S.; BENTO, N. A.; CRUZ, T. M.; STELLE, Y.; MAR, J. M.; ROCHA, D. Q.; BEZERRA, J. A.; AZEVEDO, L. From traditional Amazon use to food applications: *Tapirira guianensis* seed extracts as a triad of antiproliferative effect, oxidative defense, and antimalarial activity. **Foods**, v. 14, n. 3, p. 467, 2025. https://doi.org/10.3390/foods14030467.

DAVIS, A. L.; CAI, Y.; DAVIES, A. P.; LEWIS, J. R. ^{1}H and ^{13}C NMR assignments of some green tea polyphenols. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 34, n. 11, p. 887–890, 1996. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199611)34:11<887::AID-OMR995>3.0.CO;2-U.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A.; SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiroba, jaboticaba and umbu. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1564–1572, 2010. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.010.

FEBRIANTO, N. A.; ZHU, F. Comparison of bioactive components and flavor volatiles of diverse cocoa genotypes of *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum* and *Theobroma cacao*. **Food Research International**, v. 161, p. 111764, 2022. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111764.

GILABERT-ESCRIVÁ, M. V.; GONÇALVES, L. A. G.; SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 13, p. 1425–1431, 2002. https://doi.org/10.1002/jsfa.1107.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system-A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 338–347, 2007. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.003.

GRANATO, D.; RESHAMWALA, D.; KORPINEN, R.; AZEVEDO, L.; CARMO, M. A. V.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; WEN, M.; ZHANG, L.; MARJOMÄKI, V.; KILPELÄINEN, P. From the forest to the plate – Hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. **Food Chemistry**, v. 381, p. 132284, 2022. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132284.

GUO, H.; REN, F.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; YANG, R.; XIE, B.; LI, Z.; HU, Z.; DUAN, Z.; ZHANG, J. Kaempferol induces apoptosis in HepG2 cells via activation of the endoplasmic reticulum stress pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 3, p. 2791–2800, 2016. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4845.

HAMMERSTONE JR, J. F.; ROMANCZYK JR, L. J.; AITKENT, W. M. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1237–1240, 1994. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)94827-1.

HU, Z.; ZHAO, G.; GOU, W.; CHENG, H. Myricitrin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells and mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110726, 2020. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110726.

HUANG, W.-W.; TSAI, S.-C.; PENG, S.-F.; LIN, M.-W.; CHIANG, J.-H.; CHIU, Y.-J.; FUSHIYA, S.; TSENG, M. T.; YANG, J.-S. Kaempferol induces autophagy through AMPK and AKT signaling molecules and causes G2/M arrest via downregulation of CDK1/cyclin B in SK-HEP-1 human hepatic cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 6, p. 2069–2077, 2013. https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1909.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Malvaceae in flora e funga do Brasil**. Rio de Janeiro, [n.d.]. Disponível em: https://floradobrasil.jbrj.gov.br/. Acesso em: 5 mar. 2026.

JEAN-MARIE, E.; JIANG, W.; BEREAU, D.; ROBINSON, J. C. *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: Botany, composition and pharmacological activities of pods and seeds. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 3966, 2022. https://doi.org/10.3390/foods11243966.

KUHN, L. T.; WEBER, S.; BARGON, J.; PARELLA, T.; PÉREZ-TRUJILLO, M. Hyperpolarization-enhanced NMR spectroscopy of unaltered biofluids using photo-

CIDNP. **Analytical Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 102–109, 2024. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03215.

LI, W.; HAO, J.; ZHANG, L.; CHENG, Z.; DENG, X.; SHU, G. Astragalin reduces hexokinase 2 through increasing miR-125b to inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 29, p. 5961–5972, 2017. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02120.

LIM, T. K. *Malvaviscus arboreus*. *In*: **Edible Medicinal and Non Medicinal Plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 405–408. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8748-2_29.

LO COCO, F.; LANUZZA, F.; MICALI, G.; CAPPELLANO, G. Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in by-products of cupuacu and cacao seeds by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 45, n. 5, p. 273–275, 2007. https://doi.org/10.1093/chromsci/45.5.273.

LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

MARQUES, A. E. F.; MONTEIRO, T. M.; SANTOS, C. R. B.; PIUZEVAN, M. R.; SOUZA, M. D. F. V.; MORORÓ, G. T.; ALVES, M. M. M.; CARVALHO, F. A. A.; ARCANJO, D. D. R.; GONÇALVES, J. C. R.; COSTA, D. A. Flavonoides isolados de *Sida santaremnensis* H. Monteiro ("Guanxuma") e avaliação das atividades biológicas. **Ciência e Natura**, v. 43, p. e58, 2021. https://doi.org/10.5902/2179460x64361.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Brasil). **Instrução Normativa nº 37, de 1º de outubro de 2018**. Brasília, DF: MAPA, 2018.

NA, W.; MA, B.; SHI, S.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; ZHAN, Y.; AN, H. Procyanidin B1, a novel and specific inhibitor of Kv10.1 channel, suppresses the evolution of hepatoma. **Biochemical Pharmacology**, v. 178, p. 114089, 2020. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114089.

NWONUMA, C. O.; ABDURRAHMAN, J. E.; ROTIMI, D. E.; EVBUOMWAN, I. O.; LELE, K. C.; ALEJOLOWO, O. O.; EZEA, S. C.; ASOGWA, N. T.; OLUDIPE, E. O. *Theobroma cacao* fortified-feed ameliorates potassium bromate-induced oxidative damage in male Wistar rat. **Toxicology Reports**, v. 10, p. 269–280, 2023. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.02.007.

OGUNLAJA, O. O.; MOODLEY, R.; BAIJNATH, H.; JONNALAGADDA, S. B. Elemental distribution and health risk assessment of the edible fruits of two *Ficus* species, *Ficus sycomorus* L. and *Ficus burtt-davyi* Hutch. **Biological Trace Element Research**, v. 198, n. 1, p. 303–314, 2020. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02048-4.

OLIVEIRA, A. C.; CRUZ, J. M. A.; MAR, J. M.; ARAÚJO, A. J. G.; COSTA, R. M. R.; SILVA, F. M. A.; BEZERRA, J. A. Abiu-do-Mato (*Pouteria caimito*, Sapotaceae): A promising Amazonian fruit with rich chemical composition, antioxidant potential, and cytotoxic safety. **Food Research International**, v. 205, p. 115984, 2025. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115984.

OLIVEIRA, E. S. C.; ACHO, L. D. R.; SILVA, B. J. P.; MORALES-GAMBA, R. D.; PONTES, F. L. D.; ROSÁRIO, A. S.; BEZERRA, J. A.; CAMPOS, F. R.; BARCELLOS,

J. F. M.; LIMA, E. S.; MACHADO, M. B. Hypoglycemic effect and toxicity of the dry extract of *Eugenia biflora* (L.) DC. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 293, p. 115276, 2022. https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115276.

OLIVEIRA, E. S. C.; PONTES, F. L. D.; ACHO, L. D. R.; ROSÁRIO, A. S.; SILVA, B. J. P.; BEZERRA, J. A.; CAMPOS, F. R.; LIMA, E. S.; MACHADO, M. B. qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 201, p. 114109, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114109.

PALMEIRA, L.; PEREIRA, C.; DIAS, M. I.; ABREU, R. M. V.; CORRÊA, R. C. G.; PIRES, T. C. S. P.; ALVES, M. J.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutritional, chemical and bioactive profiles of different parts of a Portuguese common fig (*Ficus carica* L.) variety. **Food Research International**, v. 126, p. 108572, 2019. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108572.

PATIL, P. P.; PATIL, V. S.; KHANAL, P.; DARASAGUPPE, H. R.; CHARLA, R.; BHATKANDE, A.; PATIL, B. M.; ROY, S. Network pharmacology and *in vitro* testing of *Theobroma cacao* extract's antioxidative activity and its effects on cancer cell survival. **PLoS ONE**, v. 17, n. 4, p. 1–24, 2022. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259757.

PEIXOTO ARAUJO, N. M.; ARRUDA, H. S.; MARQUES, D. R. P.; OLIVEIRA, W. Q.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: a review. **Food Research International**, v. 147, p. 110520, 2021. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110520.

PEREIRA, A. L. F.; ABREU, V. K. G.; RODRIGUES, S. Cupuassu — *Theobroma grandiflorum*. *In*: **Exotic Fruits**. [S. l.]: Academic Press, 2018. p. 159–162. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00021-6.

PUERARI, C.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based kefir beverages: microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 634–640, 2012. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005.

QIAN, Q.; PAN, J.; YANG, J.; WANG, R.; LUO, K.; WU, Z.; MA, S.; WANG, Y.; LI, M.; GAO, Y. Syringin: a naturally occurring compound with medicinal properties. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1–18, 2024. https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1435524.

RAMOS-ESCUDERO, F.; ROJAS-GARCÍA, A.; CÁDIZ-GURREA, M. L.; SEGURA-CARRETERO, A. High potential extracts from cocoa byproducts through sonotrode optimal extraction and a comprehensive characterization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 106, p. 106887, 2024. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106887.

REN, G.; HOU, J.; FANG, Q.; SUN, H.; LIU, X.; ZHANG, L.; WANG, P. G. Synthesis of flavonol 3-O-glycoside by UGT78D1. **Glycoconjugate Journal**, v. 29, p. 425–432, 2012. https://doi.org/10.1007/s10719-012-9410-5.

RUSH, M. D.; RUE, E. A.; WONG, A.; KOWALSKI, P.; GLINSKI, J. A.; VAN BREEMEN, R. B. Rapid determination of procyanidins using MALDI-ToF/ToF mass

spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 43, p. 11355–11361, 2018. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04258.

SALDARRIAGA, S.; RODRÍGUEZ-SALAZAR, C. A.; RECALDE-REYES, D. P.; BELTRÁN, G. M. P.; ÁLVAREZ, L. N. C.; ORTÍZ, Y. L. S. Phenolic composition, antioxidant, and anti-proliferative activities against human colorectal cancer cells of Amazonian fruits copoazú (*Theobroma grandiflorum*) and buriti (*Mauritia flexuosa*). **Molecules**, v. 30, n. 6, p. 1–17, 2025. https://doi.org/10.3390/molecules30061250.

SHANG, Y.-F.; ZHANG, T.-H.; THAKUR, K.; ZHANG, J.-G.; CESPEDES-ACUÑA, C. L. A.; WEI, Z.-J. HPLC-MS/MS targeting analysis of phenolics metabolism and antioxidant activity of extractions from *Lycium barbarum* and its meal using different methods. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e71022, 2022. https://doi.org/10.1590/fst.71022.

SILVA, C. V. A.; SALIMO, Z. M.; SOUZA, T. A.; REYES, D. E.; BASSICHETO, M. C.; MEDEIROS, L. S.; SARTIM, M. A.; CARVALHO, J. C.; GONÇALVES, J. F. C.; MONTEIRO, W. M.; TAVARES, J. F.; MELO, G. C.; SILVA, F. M. A.; BATAGLION, G. A.; KOOLEN, H. H. F. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): a multifunctional amazonian fruit with extensive benefits. **Food Research International**, v. 192, p. 114729, 2024. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114729.

SILVA, L. Y. S.; CAVALCANTE, D. N.; OLIVEIRA, E. S. C.; SALVADOR, A. M.; PEREIRA, Z. C.; CONSENTINI, J. C. C.; FURLANETO, G.; CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; AZEVEDO, L.; BEZERRA, J. A. *Theobroma mariae*: Bioactive compound-rich flowers. **Plants**, v. 14, n. 3, p. 377, 2025. https://doi.org/10.3390/plants14030377.

VELASQUEZ-VASCONEZ, P. A.; CASTRO-ZAMBRANO, M. I.; RODRÍGUEZ-CABAL, H. A.; CASTRO, D.; ARBELAEZ, L.; ZAMBRANO, J. C. Exploring *Theobroma grandiflorum* diversity to improve sustainability in smallholdings across Caquetá, Colombia. **Italian Journal of Agronomy**, v. 20, n. 2, p. 100034, 2025. https://doi.org/10.1016/j.ijagro.2025.100034.

VILLALÓN-LÓPEZ, D. N.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, M.; ORTIZ-MORENO, A.; CEBALLOS, G.; ZEPEDA-VALLEJO, G.; VALADEZ-CARMONA, L. ^{1}H NMR-based metabolomics of cacao pod husk: profile comparison of three drying treatments. **Exploration of Foods and Foodomics**, v. 1, p. 101–104, 2023. https://doi.org/10.37349/eff.2023.00009.

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 312–317, 2010. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.013.

WANG, Y.; YANG, X.; ZHENG, X.; LI, J.; YE, C.; SONG, X. Theacrine, a purine alkaloid with anti-inflammatory and analgesic activities. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 627–631, 2010. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.03.008.

WEI, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, X. K.; DUAN, C. Q.; PAN, Q. H. Comparative analysis of glycosidic aroma compound profiling in three *Vitis vinifera* varieties by using ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 694979, 2021. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.694979.

XU, L.-L.; GUO, F.-X.; CHI, S.-S.; WANG, Z.-J.; JIANG, Y.-Y.; LIU, B.; ZHANG, J.-Y. Rapid screening and identification of diterpenoids in *Tinospora sinensis* based on high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 1–17, 2017. https://doi.org/10.3390/molecules22060912.

ZAPATA-ALVAREZ, A.; BEDOYA-VERGARA, C.; PORRAS-BARRIENTOS, L. D.; ROJAS-MORA, J. M.; RODRÍGUEZ-CABAL, H. A.; GIL-GARZON, M. A.; MARTINEZ-ALVAREZ, O. L.; OCAMPO-ARANGO, C. M.; ARDILA-CASTAÑEDA, M. P.; MONSALVE-F, Z. I. Molecular, biochemical, and sensorial characterization of cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans: A methodological pathway for the identification of new regional materials with outstanding profiles. **Heliyon**, v. 10, n. 3, p. e24544, 2024. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24544.

Capítulo II

POTENCIAL NUTRICIONAL E BIOATIVO DE *Theobroma subincanum* Mart.: UM FRUTO AMAZÔNICO PROMISSOR PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

POTENCIAL NUTRICIONAL E BIOATIVO DE *Theobroma subincanum* Mart.: UM FRUTO AMAZÔNICO PROMISSOR PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

Edson Queiroz da Fonseca Júnior[1,2], Daniel de Queiroz Rocha[2], Edinilze Souza Coelho Oliveira[2], Samuel Oliveira da Silva[1,2], Andreza Cavalcante de Oliveira[1,2], Francisca das Chagas do Amaral Souza[3], Gabriela Furlaneto[5], Julia Carvalho Cardoso Consentini[5], Luciana Azevedo[5]; Edgar Aparecido Sanches[4], Pedro Henrique Campelo[6], Railma Pereira Moraes[7], Jaqueline de Araújo Bezerra[1,8]

[1]*Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[2]*Núcleo de Estudos em Ciência e Tecnologia da Amazônia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[3]*Laboratório de Análises Funcionais e Química de Alimentos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[4]*Laboratório de Polímeros Nanostruturados, Departamento de Física dos Materiais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[5]*Laboratório de Análises Nutricionais e Toxicológicas in vitro e in vivo, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.*
[6]*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.*
[7]*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[8]*Coordenação de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.*

Resumo

Theobroma subincanum (cupuí) é uma espécie amazônica com reconhecido potencial nutricional e bioativo, embora sua composição química e propriedades biológicas permaneçam pouco exploradas. Este estudo caracterizou os constituintes químicos e avaliou os efeitos citotóxicos de extratos hidroalcoólicos obtidos da casca, polpa e sementes dos frutos de *T. subincanum*. Os extratos foram analisados por UPLC-QToF/MS e RMN, e suas atividades citotóxica e antiproliferativa foram avaliadas em linhagens

celulares cancerígenas (A549, HCT-8) e normais (HUVEC). As sementes apresentaram os maiores teores de proteínas, carboidratos e valor energético, enquanto a polpa e a casca foram ricas em ácidos graxos, como os ácidos palmítico e oleico. Os compostos teacrina, epicatequina, clovamida e luteolina foram identificados nos extratos. Os ensaios de citotoxicidade indicaram atividade moderada do extrato da polpa contra todas as linhagens celulares testadas (IC_{50}: 12,29–22,80 μg/mL), com maior seletividade para as células cancerígenas (IS > 1). No geral, os resultados destacam a relevância nutricional das sementes e o potencial bioativo da polpa, sugerindo aplicações promissoras na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Malvaceae; Citotoxicidade; Frações Fenólicas; RMN; Análise Nutricional.

INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica representa um reservatório inestimável de diversidade biológica, notável por sua ampla variedade de frutos comestíveis de sabores distintos, bem como por numerosas plantas alimentícias e medicinais não convencionais. Embora tradicionalmente consumidas por populações ribeirinhas e locais, muitas dessas espécies permanecem pouco exploradas tanto pela ciência quanto pela indústria (Cruz et al., 2025). Dentro dessa rica biodiversidade, espécies do gênero *Theobroma* (Malvaceae), como o cacau (*Theobroma cacao* L.) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.), destacam-se por suas reconhecidas aplicações nos setores alimentício, cosmético e farmacêutico. No processamento do cacau, por exemplo, as amêndoas geram um subproduto semelhante a um mel, rico em açúcares redutores, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, que contribuem para seu potencial antioxidante e perfil nutricional e físico-químico distintivo, ressaltando sua aplicabilidade na indústria alimentícia (Rocha et al., 2025; Silva et al., 2014). Por outro lado, as sementes de cupuaçu, devido ao seu alto teor lipídico, são exploradas comercialmente para a produção de manteiga e licores, reforçando seu potencial como substituto de derivados de cacau nas indústrias de confeitaria e chocolate (Benlloch-Tinoco et al., 2024; Bezerra et al., 2024a).

As Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) têm surgido como recursos promissores para a indústria alimentar do século XXI, oferecendo fontes alternativas de nutrientes, compostos bioativos e ingredientes naturais com potenciais

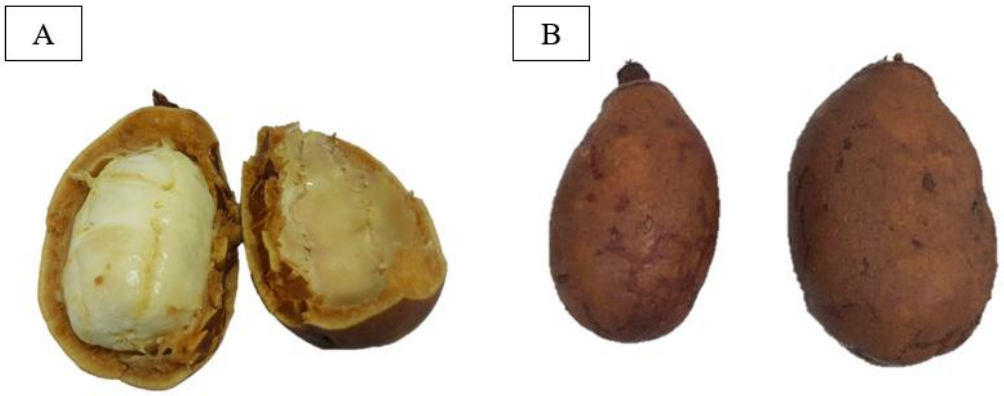
aplicações nas formulações alimentícia, farmacêutica e cosmética (Ferreira et al., 2024). Essas plantas possuem uma ou mais partes comestíveis, como folhas, raízes, frutos ou flores, e podem ser silvestres ou cultivadas, nativas ou exóticas. Elas estão tipicamente ausentes das dietas convencionais, muitas vezes devido ao limitado conhecimento dos consumidores ou a hábitos culturais (Milião et al., 2022). Entre as espécies menos conhecidas do gênero *Theobroma*, *Theobroma sylvestre* recentemente ganhou atenção por seu potencial nutricional e farmacológico e é atualmente classificada como uma PANC (Kinupp; Lorenzi, 2014; Mar et al., 2024). Estudos revelaram a presença de ácidos orgânicos, aminoácidos, alcaloides purínicos, proantocianidinas, flavonoides e terpenoides glicosilados nesta espécie, bem como atividade antiproliferativa associada a esses metabólitos (Fonseca Júnior et al., 2025).

De modo semelhante, outra espécie amazônica pouco explorada é *Theobroma subincanum* Mart., comumente conhecida como "cupuí" ou "macambillo". Esta espécie é nativa da América do Sul e está distribuída em países como Peru, Colômbia, Venezuela e nas regiões norte do Brasil (Amazonas, Acre e Rondônia). Os frutos (Figura 12) possuem formato elipsoide, medindo aproximadamente 7–11 cm de comprimento e 5–6 cm de diâmetro. Eles têm um pericarpo espesso e resistente coberto com um indumento similar ao do verdadeiro cupuaçu. As numerosas sementes são oblongas, com cerca de 2–2,5 cm de comprimento, e são envoltas por uma polpa branco-amarelada, doce e inodora (Lira et al., 2020). Embora menos explorada comercialmente que o cacau e o cupuaçu, este fruto é muito apreciado por comunidades locais e consumido *in natura* ou utilizado em sucos, refrescos, sorvetes, licores e vinhos, devido à sua polpa amarelada comestível (Figura 12A) com sabor distintivo e acidez pronunciada (Lim, 2014; Lira et al., 2020; Martini et al., 2008). As sementes de *T. subincanum* contêm tocoferóis, ácidos graxos e esterois distribuídos em suas partes (embrião, tegumento e endosperma), destacando seu potencial como alternativa ao *T. cacao* na produção de chocolates e produtos de confeitaria (Bruni et al., 2002). Além do seu valor nutricional, a espécie tem atraído atenção científica devido ao seu potencial como fonte de compostos bioativos (Febrianto; Zhu, 2022). No entanto, suas características físico-químicas, composição centesimal, perfil químico e atividades biológicas permanecem pouco caracterizados.

Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a composição química e os efeitos citotóxicos de extratos obtidos da casca, polpa e sementes dos frutos de *T. subincanum*. Os extratos foram analisados por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Quadrupolo e Tempo de Voo (UPLC-

QToF/MS) e por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os efeitos citotóxicos e antiproliferativos dos extratos foram avaliados em linhagens de células cancerígenas, bem como em células saudáveis, para avaliar a seletividade.

Figura 12 - *Theobroma subincanum* Mart.: (A) Pericarpo do fruto; (B) Frutos maduros de cupuí, destacando suas características morfológicas e fenotípicas. Imagens capturadas em Manaus, Amazonas – Brasil.



MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS, NORMAS E SOLVENTES

Metanol, acetonitrila e ácido fórmico de grau HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água destilada foi purificada utilizando um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). A solução de referência de leucina encefalina foi adquirida da Waters Co. (Manchester, Reino Unido). Padrões de referência de grau analítico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e utilizados para preparar as curvas de calibração externa. Todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico e comercialmente disponíveis.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE FRUTAS

Frutos de *T. subincanum* Mart. foram coletados em fevereiro de 2023 próximo a Manaus, Amazonas, Brasil (Ramal da Boa Esperança, BR-174; 2°45'14.93"S, 60°2'22.47"W, SISGEN: A0B6BFD). Casca, polpa e sementes foram liofilizadas e extraídas com etanol/água (8:2, v/v) utilizando banho ultrassônico à temperatura ambiente por 30 min, repetido três vezes. Os extratos foram concentrados em condições ambiente, rendendo 14,14%, 46,34% e 8,72% para casca, polpa e semente,

respectivamente. As amostras foram desengorduradas com hexano e posteriormente fracionadas em cartuchos de SPE Strata X (Phenomenex, CA, EUA), eluídos sequencialmente com água e metanol 100%, resultando em extratos enriquecidos em compostos fenólicos da casca (ECC), polpa (EPC) e semente (ESC). Esses extratos foram usados para análises de UPLC-QToF/MS e RMN.

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal das partes do fruto de *T. subincanum* (casca, polpa e sementes) foi avaliada utilizando métodos analíticos padrão. O teor de umidade foi determinado por secagem em estufa a 105 °C, cinzas por incineração a 550 °C, lipídios por extração Soxhlet com hexano por 8 h, e proteínas pelo método clássico de Kjeldahl (Lutz, 2008). O teor de carboidratos foi estimado seguindo o procedimento de Ogunlaja et al. (2020). O valor energético total foi calculado usando a equação (Palmeira et al., 2019):

Energia (kcal) = 4 × (g de proteínas + g de carboidratos) + 9 × (g de lipídios).

ANÁLISE POR GC-MS

Aproximadamente 10 mg das frações lipídicas (extratos em hexano) foram dissolvidos em 0,25 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e misturados com 500 µL de NaOH 0,1 M em metanol. A mistura foi aquecida a 60 °C por 30 min para formar ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs), e a reação foi interrompida com 0,2 mL de água destilada. Os FAMEs foram extraídos três vezes com 1 mL de hexano de grau GC, seguido de agitação vigorosa por 1 min. A fase superior foi coletada e o processo de extração foi repetido mais duas vezes utilizando hexano. Após a mistura, a solução de FAME em hexano foi deixada em repouso por 30 min. Uma alíquota de 1 µL foi analisada por GC-MS (Shimadzu Nexis GC2030 - GCMS-QP2020 NX) com injetor split–splitless. A separação foi realizada em uma coluna SH-RTx-5Sil-MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) usando hélio como gás de arraste (pressão inicial 51,2 kPa). O programa de temperatura iniciou a 40 °C, aumentou a 3 °C/min até 210 °C, e foi mantido por 5 min, para um tempo total de corrida de 60:09 min. Os ácidos graxos foram identificados usando as bibliotecas WILEY 275 e NIST 3.0. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados são relatados como área relativa média do pico ± desvio padrão (Oliveira et al., 2025).

ANÁLISE POR UPLC-QToF/MS

A caracterização de metabólitos dos extratos foi conduzida usando um espectrômetro de massas Xevo® G2-XS QTof (Waters Corp., Manchester, Reino Unido) acoplado a um sistema UPLC Acquity H-Class, operado com o software MassLynx® (v4.1). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm d.i., tamanho de partícula 1,7 µm) mantida a 40 ± 2 °C. A fase móvel consistiu em ácido fórmico 0,1% em água (solvente A) e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (solvente B), entregue a uma vazão de 0,3 mL/min. O programa de eluição gradiente foi o seguinte (A:B, %): 0–15 min (98:2), 15–20 min (80:20), 20–25 min (60:40), 25–27 min (2:98), 27–27,1 min (98:2), e 27,1–30 min (98:2). O volume de injeção foi de 10 µL. A detecção espectrométrica de massas foi realizada nos modos de ionização por electrospray negativo e positivo (ESI^- e ESI^+), usando uma faixa de varredura de massa de *m/z* 100 – 1500 e um tempo de varredura de 0,2 s. Os parâmetros da fonte ESI foram definidos da seguinte forma: voltagem do capilar, 3,0 kV; temperatura da fonte, 100 °C; temperatura de dessolvatação, 250 °C; voltagem do cone, 30 V; fluxo de gás do cone, 50 L/h; e fluxo de gás de dessolvatação, 700 L/h. Os dados foram adquiridos no modo contínuo MSE, com varreduras de baixa energia a 6 eV e varreduras de alta energia variando de 20 a 35 eV ao longo da corrida de 30 min. Leucina encefalina (*m/z* 554,2615 $[M-H]^-$ e *m/z* 556,2771 $[M+H]^+$) foi usada como referência de massa de bloqueio através do sistema LockSpray™.

ANÁLISE DE RMN

Extratos de *T. subincanum* (casca, polpa e sementes) foram analisados por RMN (^1H, ^1H – ^{13}C HSQC e ^1H – ^{13}C HMBC) em um espectrômetro de 11,7 T (Bruker® Avance III HD 500, 500 MHz para ^1H e 125,8 MHz para ^{13}C, BBFO Plus SmartProbe™, Nova York, NY, EUA) a 298,0 K. As amostras foram dissolvidas em 550 µL de CD_3OD contendo ácido trimetilsililpropanóico (TMSP) (pureza ≥ 99,0%) como referência interna (0,0 ppm). Os espectros foram processados e analisados usando o software TopSpin™ versão 4.1.3 (Bruker®).

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O potencial citotóxico das diferentes partes do fruto de *T. subincanum* foi avaliado usando o ensaio colorimétrico de MTT, seguindo as condições experimentais e os procedimentos metodológicos descritos por de Lima et al. (2024). As linhagens celulares humanas A549 (adenocarcinoma de pulmão), HCT-8 (adenocarcinoma colorretal) e HUVEC (endoteliais de veia umbilical) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil) e usadas nos ensaios *in vitro*. O reagente MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenilbrometo de tetrazólio) é um composto amarelo que é reduzido enzimaticamente por desidrogenases mitocondriais para formar cristais de formazam azul insolúvel em células metabolicamente ativas (Geirnaert et al., 2017). As células foram cultivadas em meio DMEM Ham-F12 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 100 µg/mL de penicilina, e semeadas em placas de 96 poços (100 µL por poço) nas densidades de 1×10^4 células/poço para HCT-8 e 6×10^3 células/poço para HUVEC e A549. Após a adesão celular, as culturas foram expostas por 48 h a concentrações seriadas (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) dos extratos do fruto de *T. subincanum*. Subsequentemente, a solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada a cada poço, seguida de incubação por mais 4 h a 37 °C. Os cristais de formazam resultantes foram solubilizados em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), e a absorbância foi medida a 570 nm. Os valores de IC_{50} (concentração inibitória que reduz a viabilidade celular em 50%), GI_{50} (concentração de inibição de crescimento que suprime a proliferação em 50%) e LC_{50} (concentração letal resultando em 50% de morte celular) foram determinados de acordo com os procedimentos de Carmo et al. (2018, 2019). O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre o valor de IC_{50} para a linhagem não tumoral HUVEC e o IC_{50} para cada linhagem de células cancerígenas. De acordo com Carmo et al. (2019), valores de IS maiores que 3 indicam alto grau de seletividade para células tumorais.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o Minitab® versão 18.1 (State College, PA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A Tabela 8 apresenta os parâmetros físico-químicos da polpa, casca e sementes liofilizadas de *T. subincanum*, destacando seu potencial nutricional. O alto teor de umidade da polpa (83,61 g/100 g) contribui para a textura suculenta do fruto, semelhante à observada em frutos de manga, cacau e cacau-azul (Fonseca Júnior et al., 2025; Nguyen et al., 2025). A casca e as sementes apresentaram os maiores teores de cinzas, sugerindo uma maior concentração de minerais inorgânicos. Em matrizes alimentares, as cinzas representam principalmente o resíduo inorgânico remanescente após a combustão completa, consistindo principalmente de elementos como cálcio, fósforo, potássio e traço de minerais. Esses elementos desempenham funções fisiológicas essenciais, incluindo formação óssea, contração muscular e transporte de oxigênio (Alzahrani et al., 2017). Esses achados indicam que a casca e as sementes podem servir como fontes potenciais de minerais dietéticos, contribuindo para o valor nutricional e aplicações em alimentos funcionais (Edo et al., 2023).

As sementes do cupuí apresentaram os maiores teores de proteínas (10,88 ± 0,59 g) e carboidratos (75,01 ± 0,68 g) em comparação com a polpa e a casca ($p < 0,05$). Esse padrão nutricional está alinhado com o de outras espécies de *Theobroma*, incluindo *T. cacao* (cacau), *T. bicolor* (macambo), *T. grandiflorum* (cupuaçu) e *T. sylvestre* (cacau-azul), cujas sementes são tipicamente ricas em lipídios e carboidratos, enquanto a polpa contém maiores níveis de açúcares solúveis e fibras (Benlloch-Tinoco et al., 2024; Fonseca Júnior et al., 2025).

O alto conteúdo energético das sementes (360,69 ± 0,36 kcal) reforça seu potencial como ingredientes em alimentos densos em energia ou formulações funcionais. Estudos anteriores mostraram que sementes de *Theobroma* são tradicionalmente reconhecidas por seu alto conteúdo energético e proteico, corroborando os presentes achados (Araujo et al., 2021). É importante ressaltar que a composição do fruto pode variar dependendo da sazonalidade, região de coleta e métodos de processamento, sugerindo que mais estudos sobre vitaminas, frações de fibra e perfis lipídicos detalhados são necessários para caracterizar totalmente o potencial nutricional e funcional de *T. subincanum*.

Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos, composição centesimal (g/100 g de matéria seca) e energia (kcal/100 g de matéria seca) da polpa, semente e casca de *T. subincanum* (cupuí).

Parâmetros	Polpa	Semente	Casca
pH	3,47 ± 0,06	-	-
°Brix	14,43 ± 0,40	-	-
Umidade	83,61 ± 0,20^{a}	8,76 ± 0,13^{c}	76,37 ± 0,52^{b}
Cinzas	0,55 ± 0,01^{c}	3,45 ± 0,04^{a}	1,16 ± 0,04^{b}
Lipídios	0,05 ± 0,00^{b}	1,90 ± 0,00^{a}	0,04 ± 0,00^{c}
Proteínas	1,20 ± 0,31^{c}	10,88 ± 0,59^{a}	4,47 ± 0,22^{b}
Carboidratos	14,58 ± 0,20^{c}	75,01 ± 0,68^{a}	17,96 ± 0,69^{b}
Energia	63,59 ± 0,79^{c}	360,69 ± 0,36^{a}	90,06 ± 1,92^{b}

Nota: média ± desvio padrão. Letras idênticas, na mesma linha, indicam que não há diferença estatisticamente significativa, de acordo com o teste de Tukey.

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS

Os perfis de ácidos graxos esterificados da polpa, semente e casca de *T. subincanum* foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), permitindo a identificação de cinco compostos principais. Os resultados são expressos como áreas relativas dos picos (%).

A polpa apresentou a maior proporção de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) totais (91,68%), seguida pela casca (71,23%) e pelas sementes (47,58%). Em todas as partes do fruto, foram detectados ácidos palmítico, linoleico e esteárico, com predomínio do ácido palmítico na casca (24,43%) e na polpa (15,34%). Este achado sugere que esses tecidos podem servir como fontes potenciais de ácidos graxos saturados. Perfis semelhantes foram relatados para *T. subincanum* do Equador (Bruni et al., 2000).

O ácido linoleico, um ácido graxo poli-insaturado essencial conhecido por seus efeitos anti-inflamatórios e cardioprotetores, também foi identificado na casca, apoiando ainda mais sua relevância nutricional e medicinal. O ácido elaídico (um ácido graxo *trans*) foi detectado na polpa (46,75%) e na casca (12,44%), mas esteve ausente nas sementes, indicando que estas últimas podem ser mais adequadas para consumo direto. Resultados comparáveis foram relatados por Bruni et al. (2002). Dado que a alta ingestão de ácidos graxos *trans* está associada ao risco cardiovascular (Mozaffarian et al., 2006), sua presença na polpa deve ser cuidadosamente considerada no desenvolvimento de produtos alimentícios. Em contraste, as sementes, livres de ácido elaídico, parecem mais adequadas para consumo direto ou uso em formulações alimentares. Esses resultados enfatizam a importância de uma análise detalhada do perfil lipídico dos

extratos do fruto de *T. subincanum*, tanto para destacar seu potencial nutricional e bioativo quanto para garantir a segurança em aplicações alimentícias e nutracêuticas.

DESCRIÇÃO QUÍMICA

O perfil químico dos extratos do fruto de *T. subincanum* foi caracterizado por LC-HRMS e espectroscopia de RMN uni e bidimensional (^{1}H, HSQC e HMBC), permitindo a identificação de seis constituintes (Tabela 9) respaldados pela comparação com dados da literatura.

Triptofano (1) foi detectado exclusivamente no extrato da polpa (EPC), com sinais característicos em δ_H 7,18 (s, H-8) e δ_H 7,35 (sl, H-6). No espectro HSQC, esses prótons correlacionaram-se com carbonos em δ_C 108,3 (C-7) e δ_C 111,2 (C-6), respectivamente. A ocorrência deste aminoácido, tanto na forma livre quanto ligado a proteínas, foi previamente relatada em grãos de cacau de diferentes origens (Bertazzo et al., 2011a) e nos frutos de *T. sylvestre* (Fonseca Júnior et al., 2025).

Além disso, Teacrina (2), um alcaloide purínico relatado em espécies de *Theobroma* e *Herrania* (Fonseca Júnior et al., 2025; Hammerstone JR; Romanczyk JR; Aitkent, 1994), foi identificada tanto nos extratos da casca (ECC) quanto da polpa (EPC). O íon molecular em *m/z* 225,0980 $[M+H]^+$ e os fragmentos em *m/z* 210,0756 e 168,0771 são típicos de xantinas metiladas. Sinais de prótons metílicos em δ_H 3,23 – δ_H 3,66, correlacionando-se com carbonos em δ_C 28,2 – δ_C 31,7 ppm, juntamente com correlações HMBC para C-2 (δ_C 152,2) e C-4 (δ_C 136,5), confirmaram a estrutura.

O espectro de MS da epicatequina (*m/z* 289,0731 $[M–H]^–$) exibiu íons fragmentos típicos em *m/z* 245,0157, confirmando a clivagem retro Diels-Alder do esqueleto flavan-3-ol. No espectro de RMN de ^{1}H, dupletos em δ_H 5,92 (J = 2,3 Hz) e δ_H 5,84 (J = 2,3 Hz) do anel A, e em δ_H 6,80 (J = 8,0 Hz) do anel B, corroboraram sua identificação (Huang et al., 2021). Epicatequina (3) foi previamente relatada nos grãos de *T. grandiflorum*, *T. bicolor* e *T. subincanum* (Febrianto; Zhu, 2022).

Da mesma forma, clovamida (4) e hipolaetina-8-*O*-*β*-D-glucuronídeo 3"-*O*-sulfato (5) foram detectados nos extratos da semente e da polpa de *T. subincanum*, e também foram relatados nos grãos de *T. grandiflorum*, *T. bicolor* e *T. subincanum* (Febrianto; Zhu, 2022), reforçando a similaridade química entre membros deste gênero. A flavona luteolina (6) foi identificada pelo seu íon molecular em *m/z* 285,0462 $[M–H]^–$ (Sánchez-Rabaneda et al., 2003). *T. cacao* também é caracterizado pela presença de

luteolina (Benlloch-Tinoco et al., 2024), a qual tem sido associada com atividades antioxidante e anti-inflamatória (Tian et al., 2021).

Coletivamente, estes achados destacam que *T. subincanum* é uma fonte promissora de compostos fenólicos antioxidantes, apoiando seu potencial uso no desenvolvimento de alimentos funcionais e formulações nutracêuticas.

Tabela 9 - Compostos identificados nos extratos de *T. subincanum* por UPLC-QToF/MS e RMN. ECC: casca, EPC: polpa, ESC: semente.

Nº	TR (min)	Compostos (Fórmula molecular)	Íon Precursor (*m/z*) $[M-H]^-/[M+H]^+$	Fragmentações (*m/z*)	δ ^{1}H em ppm (*J*, Hz)	δ ^{13}C em ppm	Amostras	Referências
Aminoácido								
1	4,48	Triptofano ($C_{11}H_{12}N_2O_2$)	205,0961 $[M+H]^+$	146,0588 188,0700 118,0628	7,18 (s, H-8); 7,35 (sl, H-6)	108,3 (C-7); 111,2 (C-6); 127,8 (C-2)	EPC	(Fonseca Júnior et al., 2025)
Alcaloide								
2	5,93	Teacrina ($C_9H_{12}N_4O_3$)	225,0980 $[M+H]^+$	210,0756 168,0771 153,0536	3,44 (s, 3H); 3,56 (s, 3H,); 3,23 (s, 3H); 3,66 (s, 3H)	152,2 (C-2); 136,5 (C-4); 99,0 (C-5); 153,5 (C-6); 150,5 (C-8); 29,2 (CH_3-1); 30,6 (CH_3-3); 28,2 (CH_3-7); 31,7 (CH_3-9)	ECC EPC	(Hammerstone Jr; Romanczyk Jr; Aitken, 1994; Wang et al., 2010)
Fenilpropanoide								
3	9,57	Clovamida ($C_{18}H_{17}NO_7$)	358,0969 $[M-H]^-$	254,9837 222,0416 178,0534 135,0459	–	–	ESC EPC	(Barros et al., 2016; Febrianto; Zhu, 2022)
Flavonoides								
4	7,84	Epicatequina ($C_{15}H_{14}O_6$)	289,0731 $[M-H]^-$	245,0157	5,92 (d, *J* = 2,3 Hz, H-6); 5,89 (d, *J* = 2,3 Hz, H-8); 6,80 (d, *J* = 8,0 Hz, H-5')	95,2 (C-6); 94,7 (C-8); 115,5 (C-5')	ESC	(Febrianto; Zhu, 2022b; Huang et al., 2021)
5	11,51	Hipolaetina-8-*O*-*β*-D-glucuronídeo 3"-*O*-sulfato ($C_{21}H_{18}O_{16}S$)	557,0275 $[M-H]^-$	301,0389 254,9837 175,0255	–	–	ESC EPC	(Febrianto; Zhu, 2022b; Moita, 2019)
6	17,36	Luteolina ($C_{15}H_{10}O_6$)	285,0462 $[M-H]^-$	254,9837 175,0285 133,0315	–	–	ESC EPC	(Sánchez-Rabaneda et al., 2003)

EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS

Os extratos obtidos da polpa, sementes e casca dos frutos de *T. subincanum* foram avaliados quanto à citotoxicidade contra células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão (A549), células de carcinoma de cólon humano (HCT-8) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). De acordo com a classificação de citotoxicidade proposta por Anywar et al. (2022) e pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI), os extratos da semente e da casca não apresentaram atividade citotóxica contra nenhuma das linhagens celulares testadas, incluindo células saudáveis e cancerígenas, com valores de IC_{50} acima de 100 μg/mL (Figura 13). Esta ausência de citotoxicidade indica que essas frações são seguras e adequadas para potenciais aplicações alimentícias ou nutracêuticas. Em contraste, o extrato da polpa exibiu citotoxicidade moderada tanto para células cancerígenas (A549 e HCT-8) quanto para células saudáveis (HUVEC), com valores de IC_{50} variando de 12,29 a 22,80 μg/mL. Embora os valores do Índice de Seletividade (IS) estejam abaixo do limiar de três, indicando baixa seletividade para células tumorais, o extrato da polpa mostrou atividade ligeiramente maior contra linhagens de células cancerígenas em comparação com células endoteliais normais (IS > 1) (Granato et al., 2022) (Tabela 10). Esses achados sugerem que, embora a polpa exiba bioatividade moderada, os extratos da semente e da casca demonstram perfis promissores de biocompatibilidade e segurança, reforçando seu potencial como ingredientes funcionais ou fontes de compostos bioativos em formulações alimentares.

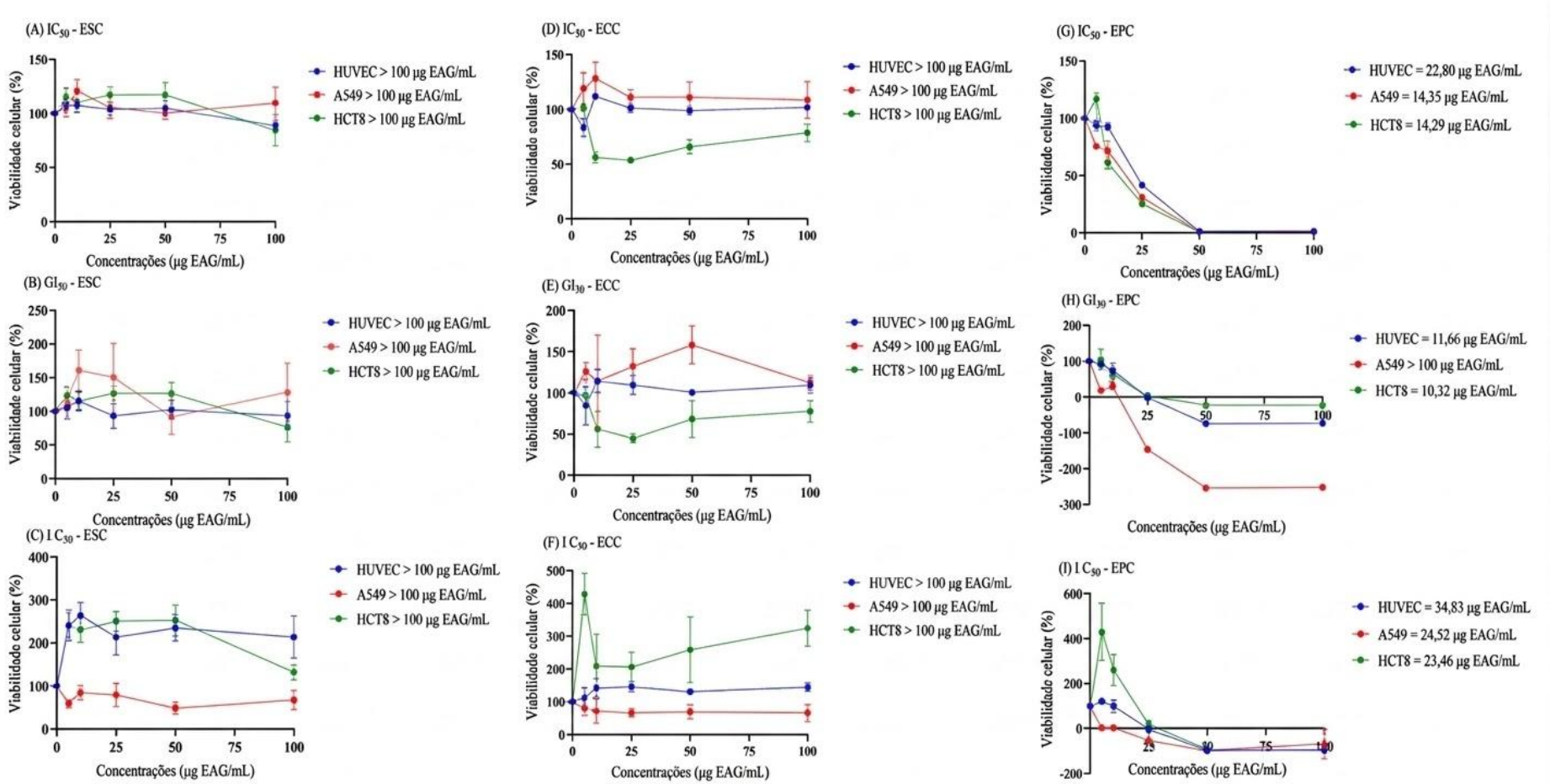
Em comparação com a casca e as sementes, a polpa do cupuí apresentou a maior capacidade de inibir o crescimento celular, com valores de GI_{50} variando de 10,32 a 11,66 μg/mL, efeito também relatado para outra espécie do gênero, *T. sylvestre* (Fonseca Júnior et al., 2025). Notavelmente, foi a única fração do fruto a exercer efeito letal na concentração de 23,46 μg/mL em ambas as linhagens celulares, saudáveis e cancerígenas. No presente estudo, a clovamida foi identificada no extrato da polpa de *T. subincanum*, um composto amplamente associado a atividades antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, antiplaquetária e anticancerígena (Kolodziejczyk-Czepas, 2024). A luteolina, também detectada, demonstrou inibir o crescimento de tumores prostáticos humanos (Pratheeshkumar et al., 2012). Esses achados indicam o potencial da polpa de *T. subincanum* como fonte de compostos bioativos para aplicações alimentícias.

Tabela 10 - IC_{50} e Índice de Seletividade (IS) dos extratos ESC (Extrato da Semente de Cupuí); ECC (Extrato da Casca de Cupuí) e EPC (Extrato da Polpa de Cupuí).

Amostras	IC_{50} (μg EAG/mL)			IS	
	HUVEC	A549	HCT-8	HUVEC/A549	HUVEC/HCT-8
ESC	>100	>100	>100	1	1
ECC	>100	>100	>100	1	1
EPC	22,80	14,35	14,29	1,59	1,60

Nota: A IC_{50} representa a concentração de um agente necessário para diminuir o crescimento celular em 50%, determinada quando (T/C) × 100 = 50. Aqui, T é a contagem de células no momento do tratamento, e C é a contagem de células no grupo controle no mesmo momento. O índice de seletividade (IS) é calculado comparando a IC_{50} em células HUVEC saudáveis com a IC_{50} em células cancerígenas, oferecendo uma visão sobre o potencial do agente em atingir seletivamente células cancerígenas em detrimento das saudáveis.

Figura 13 - Avaliação da citotoxicidade do ESC (Extrato da Semente de Cupuí); ECC (Extrato da Casca de Cupuí) e EPC (Extrato da Polpa de Cupuí) foi realizada nas linhagens celulares A549, HCT-8 e HUVEC. (A, D e G) IC_{50}: a concentração do agente que reduz o crescimento celular em 50%. (B, E e H) GI_{50}: a concentração do agente que diminui o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas. (C, F e I) LC_{50}: a concentração do agente que causa uma redução líquida de 50% das células em relação à contagem inicial de células no início do tratamento.



CONCLUSÃO

O estudo conclui que as diferentes partes do fruto de *Theobroma subincanum* apresentam perfis químicos e biológicos distintos. As sementes destacam-se pelo alto valor nutricional, sendo ricas em proteínas e carboidratos, o que as torna um ingrediente promissor para a indústria alimentícia. A casca e a polpa são fontes de ácidos graxos e compostos fenólicos, como teacrina e epicatequina. Do ponto de vista biológico, a polpa foi a única parte que apresentou atividade citotóxica significativa, embora com baixa seletividade entre células cancerígenas e normais, indicando a necessidade de mais estudos para garantir sua aplicação segura. A presença de ácido elaídico na polpa também merece atenção em pesquisas futuras. Em conjunto, os resultados destacam o potencial de *T. subincanum* como fonte de nutrientes e compostos bioativos, reforçando a importância da exploração da biodiversidade amazônica para aplicações alimentícias e tecnológicas.

REFERÊNCIAS

ALZAHRANI, H. R.; KUMAKLI, H.; AMPIAH, E.; MEHARI, T.; THORNTON, A. J.; BABYAK, C. M.; FAKAYODE, S. O. Determination of macro, essential trace elements, toxic heavy metal concentrations, crude oil extracts and ash composition from Saudi Arabian fruits and vegetables having medicinal values. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 906–913, 2017. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.012.

ANYWAR, G. U.; KAKUDIDI, E.; ORYEM-ORIGA, H.; SCHUBERT, A.; JASSOY, C. Cytotoxicity of medicinal plant species used by traditional healers in treating people suffering from HIV/AIDS in Uganda. **Frontiers in Toxicology**, v. 4, 2022. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.832780.

ARAUJO, N. M. P.; ARRUDA, H. S.; MARQUES, D. R. P.; OLIVEIRA, W. Q.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: A review. **Food Research International**, v. 147, p. 110520, 2021. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110520.

BARROS, H. R. M.; GARCÍA-VILLALBA, R.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GENOVESE, M. I. Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 477–489, 2016. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.009.

BENLLOCH-TINOCO, M.; NUÑEZ RAMÍREZ, J. M.; GARCÍA, P.; GENTILE, P.; GIRÓN-HERNÁNDEZ, J. *Theobroma* genus: Exploring the therapeutic potential of *T. grandiflorum* and *T. bicolor* in biomedicine. **Food Bioscience**, v. 61, p. 104755, 2024. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104755.

BERTAZZO, A.; COMAI, S.; BRUNATO, I.; ZANCATO, M.; COSTA, C. V. L. The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 93–96, 2011. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.110.

BEZERRA, J. A.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; LAMARÃO, C. V.; STRINGHETA, P. C.; MARTINS, E.; CAMPELO, P. H. "Cupuaçu" (*Theobroma grandiflorum*): a brief review on chemical and technological potential of this Amazonian fruit. **Food Chemistry Advances**, v. 5, p. 100747, 2024. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100747.

BRUNI, R.; BIANCHINI, E.; BETTARELLO, L.; SACCHETTI, G. Lipid composition of wild ecuadorian *Theobroma subincanum* Mart. seeds and comparison with two varieties of *Theobroma cacao* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 691–694, 2000. https://doi.org/10.1021/jf991015n.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; GUERRINI, A.; SCALIA, S.; POLI, F.; ROMAGNOLI, C.; MUZZOLI, M.; SACCHETTI, G. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. **Food Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 337–341, 2002. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00357-0.

CARMO, M. A. V.; FIDELIS, M.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; CASTRO-GAMERO, A. M.; MYODA, T.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Hydroalcoholic *Myrciaria dubia* (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, v. 125, p. 108551, 2019. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108551.

CARMO, M. A. V.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, v. 24, p. 26–35, 2018. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.10.013.

CRUZ, J. M. A.; CORRÊA, R. F.; KINUPP, V. F.; PEREIRA, M. F.; NEVES, K. O. G.; RODRIGUES, J.; VENTURA, B. M. L.; MENDES, T. A. O.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H.; BEZERRA, J. A. Amazon fig (*Ficus subapiculata*): an unconventional food plant with technological potential for the food industry. **Food Chemistry: X**, v. 29, p. 102699, 2025. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102699.

EDO, G. I.; SAMUEL, P. O.; OLONI, G. O.; EZEKIEL, G. O.; ONOHARIGHO, F. O.; OGHENEGUEKE, O.; NWACHUKWU, S. C.; RAPHEAL, O. A.; AJOKPAOGHENE, M. O.; OKOLIE, M. C.; AJAKAYE, R. S.; NDUDI, W.; IGBODO, P. C. Review on the biological and bioactive components of nutrition. **Natural Resources For Human Health**, v. 3, n. 4, p. 426–448, 2023. https://doi.org/10.1002/jsfa.13570.

FEBRIANTO, N. A.; ZHU, F. Comparison of bioactive components and flavor volatiles of diverse cocoa genotypes of *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum* and *Theobroma cacao*. **Food Research International**, v. 161, p. 111764, 2022. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111764.

FERREIRA, C. P.; LIMA, M. C.; SILVA, J. G.; PEIXOTO ARAUJO, N. M. Nutritional composition, phenolic compounds and biological activities of selected unconventional food plants. **Food Research International**, v. 191, p. 114643, 2024. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114643.

FONSECA JÚNIOR, E. Q.; ROCHA, D. Q.; OLIVEIRA, E. S. C.; SILVA, S. O.; SOUZA, F. C. A.; FURLANETO, G.; CRUZ, L. S.; AZEVEDO, L.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H.; BEZERRA, J. A. Chemical characterization, nutritional profile, and cytotoxicity potential of Amazonian *Theobroma sylvestre* Mart. fruits. **Food Bioscience**, v. 73, p. 107673, 2025. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107673.

GEIRNAERT, A.; CALATAYUD, M.; GROOTAERT, C.; LAUKENS, D.; DEVRIESE, S.; SMAGGHE, G.; VOS, M.; BOON, N.; VAN DE WIELE, T. Butyrate-producing bacteria supplemented *in vitro* to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11450, 2017. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11734-8.

GRANATO, D.; RESHAMWALA, D.; KORPINEN, R.; AZEVEDO, L.; CARMO, M. A. V.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; WEN, M.; ZHANG, L.; MARJOMÄKI, V.; KILPELÄINEN, P. From the forest to the plate – Hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. **Food Chemistry**, v. 381, p. 132284, 2022. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132284.

HAMMERSTONE JR, J. F.; ROMANCZYK JR, L. J.; AITKEN, W. M. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1237–1240, 1994. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)94827-1.

HUANG, H.; HO, C.; CHANG, G.; SHIA, W.; LAI, C. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of chemical constitutes in bioactive extract from the root nodule of *Vaccinium emarginatum*. **Pharmaceuticals**, v. 14, p. 1098, 2021. https://doi.org/10.3390/ph14111098.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil**: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. São Paulo: Instituto Plantarum da Flora, 2014.

KOLODZIEJCZYK-CZEPAS, J. Clovamide and its derivatives—Bioactive components of *Theobroma cacao* and other plants in the context of human health. **Foods**, v. 13, n. 7, p. 1118, 2024. https://doi.org/10.3390/foods13071118.

LIM, T. K. *Malvaviscus arboreus*. *In*: **Edible Medicinal and Non Medicinal Plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 405–408. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8748-2_29.

LIMA, A. S.; MALTAROLLO, V. G.; CARMO, M. A. V.; PINHEIRO, L. C.; CRUZ, T. M.; BARROS, F. A. R.; PAP, N.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Blackcurrant press cake by-product: Increased chemical bioaccessibility and reduced antioxidant protection after *in vitro* simulation of gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 182, 2024. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114099.

LIRA, N. R.; SANTOS, E. F.; SANTOS, D. N.; BEZERRA, P. G. F.; LIMA, D. E. S. Physical-chemical and centesimal characterization of cupuí (*Theobroma subincanum* mart.). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 15798–15813, 2020. https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-451.

LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

MAR, J. M.; FONSECA JÚNIOR, E. Q.; CORRÊA, R. F.; CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. A. *Theobroma* spp.: a review of it's chemical and innovation potential for the food industry. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100683, 2024. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100683.

MARTINI, M. H.; LENCI, C. G.; FIGUEIRA, A.; TAVARES, D. Q. Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 135–146, 2008. https://doi.org/10.1590/s0100-84042008000100013.

MILIÃO, G. L.; OLIVEIRA, A. P. H.; SOARES, L. S.; ARRUDA, T. R.; VIEIRA, É. N. R.; LEITE JUNIOR, B. R. C. Unconventional food plants: nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, p. 100124, 2022. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100124.

MOITA, I. S. **Caracterização química das cascas das sementes de espécies do gênero *Theobroma*.** 2019. 153 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

MOZAFFARIAN, D.; KATAN, M. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Trans fatty acids and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 15, p. 1601–1613, 2006. https://doi.org/10.1056/nejmra054035.

NGUYEN, V.-L.; TRAN, M.-T.; NGUYEN-THI, T.-D.; NGUYEN, M.-A.; LE, M.-T.; NGUYEN, T.-M.; NGUYEN, Q.-D. Valorization of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husks as a fruit pulp substitute in mango jam formulations: effects on jam qualities during storage and sensory discrimination. **Sustainable Food Technology**, v. 3, n. 1, p. 333–342, 2025. https://doi.org/10.1039/d4fb00331d.

OGUNLAJA, O. O.; MOODLEY, R.; BAIJNATH, H.; JONNALAGADDA, S. B. Elemental distribution and health risk assessment of the edible fruits of two *Ficus* species, *Ficus sycomorus* L. and *Ficus burtt-davyi* Hutch. **Biological Trace Element Research**, v. 198, n. 1, p. 303–314, 2020. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02048-4.

OLIVEIRA, A. C.; CRUZ, J. M. A.; MAR, J. M.; CORRÊA, R. F.; RODRIGUES, J. V. S.; MENDES, T. A. O.; AGUIAR, J. P. L.; SOUZA, F. C. A.; NEVES, K. O. G.; SANTOS, A. D. C.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H.; OLIVEIRA, L. M.; BEZERRA, J. A. Abiu-do-Mato (*Pouteria caimito*, Sapotaceae): A promising Amazonian fruit with rich chemical composition, antioxidant potential, and cytotoxic safety. **Food Research International**, v. 205, p. 115984, 2025. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115984.

PALMEIRA, L.; PEREIRA, C.; DIAS, M. I.; ABREU, R. M. V.; CORRÊA, R. C. G.; PIRES, T. C. S. P.; ALVES, M. J.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutritional, chemical and bioactive profiles of different parts of a Portuguese common fig (*Ficus carica* L.) variety. **Food Research International**, v. 126, p. 108572, 2019. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108572.

PRATHEESHKUMAR, P.; SON, Y. O.; BUDHRAJA, A.; WANG, X.; DING, S.; WANG, L.; HITRON, A.; LEE, J. C.; KIM, D.; DIVYA, S. P.; CHEN, G.; ZHANG, Z.; LUO, J.; SHI, X. Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52279, 2012. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052279.

ROCHA, G. H. A. M.; ALMEIDA, M. C.; SILVA, L. L. P.; FLORES, I. S.; CASTIGLIONI, G. L.; OLIVEIRA, T. F.; PEREIRA, J. Food-related properties and composition of cocoa honey (*Theobroma cacao* L.): an integrated investigation. **Food Research International**, v. 202, p. 115694, 2025. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115694.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; OLGA, J.; CASALS, I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Liquid chromatographic / electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p. 35–42, 2003. https://doi.org/10.1002/jms.395.

SILVA, E. N.; RAMOS, D. C.; MENEZEZ, L. M.; SOUZA, A. O.; LANNES, S. C. S.; SILVA, M. V. Nutritional value and antioxidant capacity of "cocoa honey" (*Theobroma cacao* L.). **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 755–759, 2014. https://doi.org/10.1590/1678-457x.6447.

TIAN, C.; LIU, X.; CHANG, Y.; WANG, R.; LV, T.; CUI, C.; LIU, M. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 257–264, 2021. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.022.

WANG, Y.; YANG, X.; ZHENG, X.; LI, J.; YE, C.; SONG, X. Theacrine, a purine alkaloid with anti-inflammatory and analgesic activities. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 627–631, 2010. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.03.008.

Capítulo III

MACAMBO (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.): COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PERFIL NUTRICIONAL E POTENCIAL CITOTÓXICO DOS FRUTOS.

MACAMBO (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.): COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PERFIL NUTRICIONAL E POTENCIAL CITOTÓXICO DOS FRUTOS.

Edson Queiroz da Fonseca Júnior[1,2], Daniel de Queiroz Rocha[2], Edinilze Souza Coelho Oliveira[2], Samuel Oliveira da Silva[1,2], Andreza Cavalcante de Oliveira[1,2], Francisca das Chagas do Amaral Souza[3], Livya Maria Vidal Souza dos Santos[5], Julia Carvalho Cardoso Consentini[5], Luciana Azevedo[5]; Edgar Aparecido Sanches[4], Pedro Henrique Campelo[6], Railma Pereira Moraes[7], Jaqueline de Araújo Bezerra[1,8]

[1]*Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[2]*Núcleo de Estudos em Ciência e Tecnologia da Amazônia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[3]*Laboratório de Análises Funcionais e Química de Alimentos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[4]*Laboratório de Polímeros Nanostruturados, Departamento de Física dos Materiais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[5]*Laboratório de Análises Nutricionais e Toxicológicas in vitro e in vivo, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.*
[6]*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.*
[7]*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.*
[8]*Coordenação de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.*

Resumo

Theobroma bicolor Humb. & Bonpl. (Malvaceae), conhecido popularmente como macambo, é uma espécie amazônica nativa com expressivo potencial econômico e nutricional, embora ainda classificada como uma Planta Alimentícia Não Convencional (PANC). Assim, este trabalho apresenta a composição centesimal, o perfil de ácidos graxos e a caracterização química dos extratos de casca, polpa e sementes de seus frutos. A análise nutricional revelou que as sementes possuem alta densidade energética (377,40 kcal/100 g) e elevado teor de carboidratos (60,76 %), enquanto a polpa apresentou

conformidade para aplicações em produtos de baixa caloria. O perfil lipídico, determinado por CG-MS, indicou o predomínio de ácidos graxos saturados, com destaque para o estearato de metila (41,38 %) nas sementes. Por meio de análises de RMN 1D/2D, foram identificados metabólitos fundamentais, incluindo o ácido oleico (1), o aminoácido triptofano (3) e os alcaloides purínicos teofilina (4) e teobromina (5). Nos ensaios biológicos, as frações da casca e sementes exibiram citotoxicidade moderada frente às linhagens tumorais A549 e HCT-8 e endoteliais HUVEC, com valores de IC_{50} variando entre 28, 24 e 191,10 µg EAG/mL. O extrato da casca demonstrou alta seletividade (IS > 3) contra a linhagem de adenocarcinoma colorretal (HCT-8). Os resultados colaboram o potencial funcional de alimento de *T. bicolor*, fornecendo subsídios para seu aproveitamento integral pelas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: Malvaceae; Citotoxicidade; PANC; RMN; Composição centesimal.

INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica, que ocupa aproximadamente 50% do território brasileiro, representa um bioma de relevância global não apenas por sua extensão, mas também por sua excepcional biodiversidade. Este patrimônio natural abriga uma vasta riqueza de famílias botânicas frutíferas, amplamente apreciadas e utilizadas por comunidades locais e ribeirinhas (Cruz et al., 2024). Dentre essas famílias, destaca-se a Malvaceae, que engloba cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies, com aproximadamente 80 gêneros e 400 espécies presentes no Brasil (Souza; Lorenzi, 2005; Yoshitome et al., 2008). Os gêneros *Pachira* e *Theobroma*, incluídos em Malvaceae, compreendem espécies tipicamente encontradas em áreas próximas a rios na região amazônica e possuem importância significativa para exploração pela indústria local (Costa et al., 2023; Santos et al., 2025). No entanto, ambos os gêneros também incluem espécies ainda pouco conhecidas ou subutilizadas na dieta diária da população. Estas são denominadas Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), definidas como espécies que, apesar de possuírem uma ou mais partes comestíveis e potencial para incorporação na dieta, não são cultivadas ou comercializadas em larga escala (Milião et al., 2022).

O gênero *Theobroma* (Malvaceae s.l.) possui distribuição natural em florestas tropicais de terras baixas da região Neotropical, estendendo-se da bacia amazônica ao sul do México (aproximadamente de 15°S a 18°N de latitude). Compreende 22 espécies, das

quais 11 são endêmicas do bioma amazônico: *T. bicolor*, *T. canumanense*, *T. cacao*, *T. camargonum*, *T. glaucum*, *T. grandiflorum*, *T. microcarpum*, *T. obovatum*, *T. speciosum*, *T. subincanum* e *T. sylvestre* (Mar et al., 2021). Todas estas produzem frutos comestíveis, caracterizados por aromas e sabores distintivos, sendo algumas utilizadas como matéria-prima na produção de sucos, geleias, sorvetes, licores, compotas e outros produtos derivados (González et al., 2016; Ipiranga; Souza; Fonseca Júnior, 2022; Rogez et al., 2004). Dentre a classe dos fitoquímicos, os principais compostos bioativos identificados no gênero incluem polifenóis (catequinas, antocianidinas e proantocianidinas), alcaloides purínicos (metilxantinas) e fenilpropanoides (ácidos orgânicos simples e tocoferóis), presentes desde as folhas até os frutos do gênero (Cuatrecasas, 1964; Sitarek et al., 2024). O principal componente das sementes de espécies como *T. cacao* e *T. grandiflorum* são lipídios, predominantemente compostos por triacilgliceróis (TAG). Os principais ácidos graxos que constituem esses lipídios são os ácidos palmítico e esteárico (Bezerra et al., 2024b; Kobi et al., 2024).

A família Malvaceae tem sido alvo de diversos estudos sobre suas propriedades biológicas, com ênfase em aplicações medicinais. Destacam-se atividades como anti-inflamatória e antidepressiva com *Hibiscus asper* (Foyet et al., 2011), ação antioxidante com *Sida linifolia* (Nwankwo et al., 2023), anticancerígena, entre outras relatadas em investigações recentes (Andújar et al., 2012; Sitarek et al., 2024). No gênero *Theobroma*, o cacau (*Theobroma cacao* L.) apresenta efeitos antioxidantes e atividades antifúngicas contra patógenos como *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (Andriana et al., 2025; Desvita et al., 2022). Cascas e sementes da espécie não convencional *Theobroma bicolor* (macambo) demonstram alta capacidade antioxidante, com valores de 96.943,78 μmol TE/100 g e 10,40 mg EAG/g de polifenóis totais no cotilédone, além de ampla ação antimicrobiana, inibindo até 88,89% do crescimento de *E. coli* e 48,26% de *Salmonella* spp. em concentrações de 75% (Rojas Uribe et al., 2025). Estes achados evidenciam o potencial bioativo desta espécie para aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, justificando novas pesquisas sobre suas propriedades (Mar et al., 2024).

A espécie amazônica nativa, *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. (Figura 14), é conhecida regionalmente como "macambo", "pataste", "bacau" ou "cacau-do-peru". Ocorre em territórios tropicais da América do Sul, incluindo Bolívia, Brasil (Amazonas, Acre e Rondônia), Equador, Colômbia e Peru, sendo também cultivada no México (América do Norte) (Benlloch-Tinoco et al., 2024). Seus frutos são de formato oval, com comprimento de 25–35 cm e diâmetro de 12–15 cm. Cada fruto contém, em média, 40

sementes envoltas por uma polpa esbranquiçada ou amarelada, com odor característico e sabor agridoce, rica em proteínas e fibras (solúveis e insolúveis). As sementes de macambo produzem uma manteiga de alta qualidade, abundante em gorduras — com 42,0% de ácido graxo C18:1 (ácido oleico) — semelhante à do cacau (*Theobroma cacao* L.). Este perfil sugere seu potencial como substituto nas indústrias de cosméticos e confeitaria, particularmente na produção de chocolate (Benlloch-Tinoco et al., 2024; González et al., 2016; Torres et al., 2002).

Figura 14 - *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. (macambo): (A) Pericarpo do fruto aberto, mostrando a cavidade interna; (B) Fruto maduro inteiro, evidenciando suas características morfológicas externas. Material registrado em Manaus, Amazonas – Brasil.



Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar os principais constituintes químicos dos extratos hidroetanólicos da casca, polpa e sementes dos frutos de macambo (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.). Para tal, foram empregadas técnicas analíticas avançadas, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas quadrupolo tempo-de-voo (CLAE-QTOF/EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Adicionalmente, foram avaliados os efeitos antiproliferativos e citotóxicos destas frações em linhagens celulares cancerígenas e normais por meio de ensaios *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Metanol, acetonitrila e ácido fórmico grau HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água destilada foi purificada utilizando sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). A solução de referência de leucina encefalina foi adquirida da Waters Co. (Manchester, Reino Unido). Padrões de referência grau analítico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e utilizados para preparar as curvas de calibração externa. Todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico e comercialmente disponíveis.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DO FRUTO

Os frutos de *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. foram coletados em Benjamin Constant (Amazonas, Brasil) em dezembro de 2022 (coordenadas: 4°22′41,96″ S, 70°02′43,63″ O, SISGEN: A0B6BFD). Os componentes do fruto (casca, polpa e sementes) do macambo foram submetidos à liofilização (liofilizador modelo SL-404, Solab) por 72 horas a 233,15 K e −93.325,7 Pa. Os extratos foram preparados conforme metodologia proposta por Carrion et al. (2013). Os materiais liofilizados foram extraídos com solução hidroetanólica (20 mL) na proporção de 8:2 (etanol:água, v/v) em banho ultrassônico (modelo SSBuc-6L, Mylabor, São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente por 30 minutos, sendo este procedimento repetido três vezes. Os extratos resultantes foram concentrados por evaporação do solvente em capela de exaustão à temperatura ambiente. Os rendimentos de extração dos extratos hidroetanólicos obtidos foram de 5,38% para a casca, 47,63% para a polpa e 5,71% para as sementes.

Estes extratos foram submetidos à extração em fase sólida (SPE) para remoção de açúcares das amostras e obtenção de frações ricas em compostos fenólicos, utilizando cartuchos SPE (Strata X, 33 µm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Estes foram inicialmente pré-condicionados por eluição com 1 mL de metanol, seguido por 1 mL de água ultrapura. As amostras foram inicialmente submetidas a partição líquido-líquido com hexano para remoção de lipídios presentes. Subsequentemente, os extratos hidroetanólicos foram aplicados aos cartuchos SPE. A eluição foi realizada sequencialmente com água (fase aquosa) e depois com metanol 100% (fase orgânica). A fração final foi coletada em vial e evaporada à temperatura ambiente; esta fração,

identificada como fração fenólica, foi submetida à análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massas tandem por tempo de voo (UPLC-QToF/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN).

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FRUTO

A composição centesimal das diferentes partes do fruto de *Theobroma bicolor* (casca, polpa e sementes) foi determinada segundo métodos padrão: umidade por secagem em estufa (105 °C) até peso constante; cinzas por incineração em mufla (550 °C) por 5 h; lipídios por extração com hexano por 8 h em extrator Soxhlet; proteínas pelo método clássico de Kjeldahl (Lutz, 2008) e teor de carboidratos determinado por diferença conforme descrito por Ogunlaja et al. (2020). O valor energético total das amostras foi calculado pela equação: Energia (kcal) = 4 × (g de proteína + g de carboidratos) + 9 × (g de lipídios) (Palmeira et al., 2019).

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

As frações lipídicas (em hexano) (10 mg) da casca, polpa e sementes de *T. bicolor* foram combinadas com 0,25 mL de clorofórmio/metanol (2:1; v/v) e 500 µL de NaOH 0,1 M em metanol. Esta mistura foi aquecida a 60 °C por 30 minutos, seguida da adição de 0,2 mL de água destilada ao final da reação. Os ésteres metílicos de ácidos graxos resultantes foram extraídos adicionando-se 1 mL de hexano, seguido de agitação em vórtex por um minuto. Após agitação e separação de fases, a fase sobrenadante foi analisada utilizando Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS) (Nexis GC2030, GCMS-QP2020 NX, Shimadzu), conforme descrito na metodologia de Vasquez et al. (2021), com adaptações.

ANÁLISE DE RMN

Frações fenólicas de *T. bicolor* foram analisadas por RMN (^{1}H, $^{1}H–^{13}C$ HSQC e $^{1}H–^{13}C$ HMBC) em espectrômetro de 11,7 T (Bruker® Avance III HD 500, 13 MHz para ^{1}H e 125,8 MHz para ^{13}C, BBFO Plus SmartProbe™, Nova York, NY, EUA) a 298,0 K. Amostras da casca, polpa e sementes foram dissolvidas em 550 µL de CD_3OD contendo ácido trimetilsililpropanóico (TMSP) (pureza ≥99,0%) como referência interna

(0,0 ppm). Os espectros foram processados e analisados utilizando o software TopSpin™ versão 4.1.3 (Bruker®).

ANÁLISE POR UPLC-QToF/MS

O perfil metabólico das frações foi realizado utilizando espectrômetro de massas Xevo® G2-XS QTof (Waters Corp., Manchester, Reino Unido) acoplado a um sistema UPLC Acquity H-Class, operado com software MassLynx® (v4.1). A separação cromatográfica foi alcançada em coluna de fase reversa Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm d.i., tamanho de partícula 1,7 μm) mantida a 40 ± 2 °C. A fase móvel consistiu de ácido fórmico 0,1% em água (solvente A) e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (solvente B), com fluxo de 0,3 mL/min. O programa de eluição gradiente foi o seguinte (A:B, %): 0–15 min (98:2), 15–20 min (80:20), 20–25 min (60:40), 25–27 min (2:98), 27–27,1 min (98:2) e 27,1–30 min (98:2). O volume de injeção foi de 10 μL. A detecção espectrométrica de massas foi realizada no modo de ionização por eletrospray negativo (ESI^-), com faixa de varredura de massas de m/z 100–1500 e tempo de varredura de 0,2 s. Os parâmetros da fonte ESI foram configurados da seguinte forma: voltagem do capilar, 3,0 kV; temperatura da fonte, 100 °C; temperatura de dessolvatação, 250 °C; voltagem do cone, 30 V; fluxo de gás no cone, 50 L/h; e fluxo de gás de dessolvatação, 700 L/h. A aquisição de dados foi conduzida em modo contínuo MSE continuum, com varreduras de baixa energia a 6 eV e varreduras de alta energia com rampa de 20 a 35 eV durante 30 min. Leucina encefalina (m/z 554,2615 $[M-H]^-$ e m/z 556,2771 $[M+H]^+$) foi utilizada como referência de lock mass através do sistema LockSpray™.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade das partes do fruto de *T. bicolor* foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico do reagente MTT, seguindo as condições e procedimentos metodológicos previamente adotados por Lima et al. (2024). Células A549 (adenocarcinoma pulmonar humano), HCT-8 (adenocarcinoma colorretal humano) e HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana) foram utilizadas nos experimentos *in vitro*, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil). O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é uma solução amarela convertida em cristais azuis de formazan pela atividade mitocondrial (Geirnaert

et al., 2017). As células foram cultivadas em meio DMEM Ham-F12, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 100 µg/mL de penicilina, e então plaqueadas em placas de 96 poços com 100 µL/poço de meio de cultura nas densidades de 1×10^4 células/poço (HCT-8) e 6×10^3 células/poço (HUVEC e A549). Após adesão, as células foram tratadas por 48 h com concentrações seriadas de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL dos extratos do fruto de *T. bicolor*. Subsequentemente, o reagente MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado a cada poço, e as placas foram incubadas por mais 4 h a 37°C. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (100 µL), e a absorbância foi medida a 570 nm. A IC_{50} (concentração inibitória - concentração do agente que inibe 50% da viabilidade celular), GI_{50} (concentração de inibição do crescimento - concentração do agente que inibe o crescimento em 50%) e LC_{50} (concentração letal - concentração do agente que resulta em 50% de perda celular) foram determinadas segundo o método descrito por Carmo et al. (2018) e Carmo et al. (2019). Além disso, o índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão IC_{50} (linhagem celular HUVEC) / IC_{50} (linhagem celular cancerígena). O IS indica a seletividade das amostras para as linhagens celulares testadas, e, de acordo com Carmo et al. (2019), valores de IS superiores a 3 são considerados indicativos de alta seletividade.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) de um fator, seguida pelo teste post hoc de Tukey, foi utilizada para avaliar comparações múltiplas a um nível de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Minitab® versão 18.1 (State College, PA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FRUTO *T. bicolor*

A Tabela 11 apresenta a composição centesimal das diferentes partes do fruto *T. bicolor* e mostra variações significativas que influenciam seu potencial de aplicação na indústria de alimentos (Anokhi Chandrababu et al., 2024). A polpa destaca-se pelo seu alto teor de umidade (88,09 ± 0,22 g), característica que contribui para sua menor

densidade energética, uma vez que parte da energia é consumida no processo de mudança de fase (43,22 ± 0,88 kcal/100 g) (Marinho et al., 2025). Além disso, contém 6,93% de carboidratos e apenas uma quantidade reduzida de gordura, reforçando seu perfil nutricional leve. O teor de proteínas (3,74 ± 0,08 g) destaca o potencial da polpa para aplicação em produtos de baixa caloria, e seu pH levemente ácido (5,40 ± 0,36) e valor de 12,40 °Brix indicam sabor suave e estágio adequado de maturação do fruto (Sadiq et al., 2022).

A casca exibe maior teor de carboidratos (34,59 ± 0,42 g) e fornece 149,90 ± 1,70 kcal/100 g em comparação com a polpa, sugerindo seu potencial como ingrediente fibroso em formulações alimentícias destinadas ao aumento da ingestão de carboidratos e minerais (Mwagandi Chimbevo; Essuman, 2019).

As sementes, por sua vez, apresentam os menores níveis de umidade (12,73 ± 0,00 g) e o maior teor de carboidratos (60,76 ± 0,28 g) em comparação com a polpa e casca ($p < 0,05$), resultando em maior densidade energética (377,40 ± 0,47 kcal/100 g). Este perfil nutricional evidencia que as sementes representam uma fonte concentrada de energia, favorecendo seu uso na produção de formulações ricas em carboidratos (Olosunde; Akpanmkpuk; David, 2022). O teor de cinzas (3,60 ± 0,12 g) indica que as sementes possuem maior conteúdo mineral (Ribeiro et al., 2019). Estes fatores conferem às sementes valor significativo em produtos que buscam maior teor energético e mineral, contribuindo para a diversificação e aproveitamento integral do fruto na indústria de alimentos (Osei et al., 2023).

Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos, composição centesimal (g/100 g de matéria seca) e energia (kcal/100 g de matéria seca) da polpa, semente e casca de *T. bicolor* (macambo).

Parâmetros	**Polpa**	**Semente**	**Casca**
pH	5,40 ± 0,36	-	-
°Brix	12,40 ± 0,17	-	-
Umidade	$88,09 \pm 0,22^{a}$	$12,73 \pm 0,00^{b}$	$61,49 \pm 0,40^{c}$
Cinzas	$1,17 \pm 0,00^{b}$	$3,60 \pm 0,12^{a}$	$1,09 \pm 0,02^{c}$
Lipídios	$0,06 \pm 0,00^{b}$	$8,54 \pm 0,01^{a}$	$0,04 \pm 0,00^{c}$
Proteínas	$3,74 \pm 0,08^{b}$	$14,35 \pm 0,16^{a}$	$2,78 \pm 0,00^{c}$
Carboidratos	$6,93 \pm 0,14^{c}$	$60,76 \pm 0,28^{a}$	$34,59 \pm 0,42^{b}$
Energia	$43,22 \pm 0,88^{c}$	$377,40 \pm 0,47^{a}$	$149,90 \pm 1,70^{b}$

Nota: média ± desvio padrão. Letras diferentes atribuídas aos valores na mesma linha indicam diferença significativa segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS DE *T. bicolor*

Os perfis de ácidos graxos esterificados das frações lipídicas da polpa, semente e casca de *Theobroma bicolor* foram determinados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), após derivatização para formação de ésteres metílicos e etílicos. A identificação foi realizada com base nos tempos de retenção e na comparação dos espectros de massas com dados da literatura. Os resultados são apresentados como áreas relativas dos picos (%).

Foram identificados seis principais derivados de ácidos graxos: palmitato de metila, palmitato de etila, palmitato de isopropila, estearato de metila, linoleato de etila e araquidato de metila. De modo geral, observou-se predominância de ácidos graxos saturados nas diferentes partes do fruto.

Na polpa, destacaram-se os derivados do ácido palmítico, particularmente palmitato de etila (5,05%) e palmitato de isopropila (3,98%), além de palmitato de metila (1,09%), indicando que o ácido palmítico constitui um dos principais componentes lipídicos desse tecido.

A fração lipídica da semente apresentou forte predominância de estearato de metila (41,38%), evidenciando o ácido esteárico como principal ácido graxo dessa matriz. Também foi detectado araquidato de metila (5,14%), reforçando a presença de ácidos graxos saturados de cadeia longa na semente. Esse perfil sugere maior estabilidade oxidativa do óleo da semente, característica relevante para aplicações tecnológicas e alimentícias.

Na casca, foram identificados palmitato de etila (5,00%) e palmitato de isopropila (3,09%), além de linoleato de etila (1,25%). A presença do derivado do ácido linoleico, um ácido graxo poli-insaturado essencial, confere potencial interesse nutricional à casca, embora em menor proporção quando comparado aos saturados.

De maneira geral, o perfil lipídico de *T. bicolor* revela predomínio de ácidos graxos saturados, especialmente palmítico e esteárico, com contribuição secundária de ácido linoleico. A elevada proporção de ácido esteárico nas sementes pode representar uma característica tecnológica importante, uma vez que este ácido graxo está associado à maior estabilidade térmica e oxidativa. Esses resultados destacam a importância da caracterização detalhada das frações lipídicas de *T. bicolor*, tanto para avaliação de seu potencial nutricional quanto para possíveis aplicações na indústria de alimentos e produtos funcionais.

DESCRIÇÃO QUÍMICA QUALITATIVA

O perfil químico dos extratos de *T. bicolor* foi investigado por RMN unidimensional e bidimensional (^{1}H, COSY, HSQC e HMBC), permitindo a atribuição estrutural de cinco metabólitos com base na análise dos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento e correlações heteronucleares, bem como por comparação com dados da literatura para compostos previamente descritos para espécies vegetais do gênero *Theobroma*.

A presença de um ácido graxo de cadeia longa foi inferida a partir do espectro de RMN de ^{1}H, que exibiu multiplicidade em δ_H 0,90 atribuídos aos grupos metílicos terminais; um sinal intenso em δ_H 1,28 correspondente aos metilenos da cadeia alifática, além de um sinal em δ_H 2,26 (t, J = 7,3 Hz) característico do metileno α-carbonílico. Adicionalmente, observaram-se sinais olefínicos em δ_H 5,34, indicativos da presença de insaturação na cadeia. No mapa de correlação HSQC foram observados carbonos metílicos e metilênicos distribuídos entre δ_C 13,0 a δ_C 33,9 ppm, consistentes com uma cadeia alifática longa. Também, os prótons olefínicos em δ_H 5,34 apresentaram correlação direta com o carbono em 129,5 ppm compatíveis com os carbonos C-9 e C-10 de um ácido graxo monoinsaturado. O conjunto dos dados espectroscópicos é compatível com um ácido graxo C18:1, consistente com ácido oleico (1), previamente descrito para espécies do gênero *Theobroma* (Benlloch-Tinoco et al., 2024; Ruksilp, 2020).

Adicionalmente, no espectro de RMN de ^{1}H foi observado um simpleto em δ_H 8,43, o qual apresentou correlação direta no mapa HSQC com o carbono em δ_C 168,0 ppm, compatível com um carbono formil. O padrão espectral observado é consistente com ácido fórmico (2), conforme descrito na literatura (Halleraker, Barth, 2020).

O espectro de RMN de ^{1}H revelou sinais característicos de um aminoácido aromático. Observou-se um multipleto em δ_H 3,85 atribuído ao próton do carbono α (H-α), bem como sinais em δ_H 3,13 correspondentes ao grupo metileno β (H-β), adjacente ao sistema aromático. Já na região aromática, foram identificados sinais em δ_H 7,05 e 7,69 (d, J = 7,8 Hz), compatíveis com prótons orto-acoplados do sistema indólico. No mapa de correlação HSQC, observou-se o carbono carbonílico em 173,0 ppm, além de sinais em δ_C 55,2 e 27,0 ppm atribuídos aos carbonos C-α e C-β, respectivamente. Os sinais aromáticos distribuídos entre δ_C 112,3 e 138,4 ppm corroboram a presença de um núcleo indólico. O conjunto dos dados espectroscópicos é consistente com triptofano (3), aminoácido aromático amplamente distribuído em tecidos vegetais (Ye et al., 1993).

Os espectros de RMN de ^{1}H evidenciaram a presença de alcaloides purínicos derivados do núcleo xantínico. Para o composto (4), observou-se um simpleto em δ_H 7,93, atribuído ao H-8 do anel xantínico. No mapa de correlação HSQC foram identificados sinais em δ_C 27,0 e 28,0 ppm, compatíveis com grupos N-metil, além de sinal em δ_C 140,0 ppm atribuído ao carbono C-8. O conjunto dos dados é consistente com teofilina (1,3-dimetilxantina, 4), conforme descrito na literatura (Hamdani, Amane, Duhayon, 2019). Para o composto (**5**), o espectro de RMN de ^{1}H revelou um simpleto em δ_H 7,86 correspondente ao H-8 e um simpleto em δ_H 3,95 (3H) atribuído a um grupo *N*-metil. No mapa de correlação HSQC foram observados sinais em δ 32,6 ppm (*N*-CH_3), 107,8 ppm (C-5) e 142,8 ppm (C-8), compatíveis com teobromina (3,7-dimetilxantina, 5) (Younis et al., 2025). As diferenças nos deslocamentos químicos dos carbonos do anel xantínico e dos grupos metil sustentam atribuições compatíveis com teofilina e teobromina previamente descritas na literatura para o gênero *Theobroma* (Fonseca Júnior et al., 2025).

Tabela 12 - Metabólitos identificados em extratos de *T. bicolor* (macambo) por 1D e 2D RMN. ECM: casca, EPM: polpa, ESM: semente.

Nº	Compostos (Fórmula molecular)	δ ^{1}H em ppm (*J*, Hz)	δ ^{13}C em ppm	Amostras	Referências
Ácido graxo					
1	Ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$) (C18:1)	0,90 (m, H-17, H-18); 1,28 (m, H-14; H-16); 1,59 (m, H-3); 2,0 (m, H-8); 2,26 (t, *J*=7,3 Hz, H-2); 5,34 (m, H-10)	13,0 (C-18); 21,7 (C-17); 24,7 (C-3); 26,6 (C-8); 29,3 (C-14); 31,5 (C-16); 33,9 (C-2); 129,5 (C-10); 178,2 (C=O)	ESM EPM	(Ruksilp, 2020)
Ácido orgânico					
2	Ácido fórmico (CH_2O_2)	8,44 (s)	168,0	ESM	(Halleraker, Barth, 2020)
Aminoácido					
3	Triptofano ($C_{11}H_{12}N_2O_2$)	3,13 (m, β); 3,85 (m, α); 7,05 (d, *J* =7,8 Hz, H-4); 7,69 (d, *J* =7,8 Hz, H-6),	27,0 (C-β); 55,2 (C-α); 112,3 (C-3); 118,0 (C-6); 119,0 (C-4); 123,0 (C-5); 128,5 (C-7); 138,4 (C-2), 173,0 (C=O)	ESM EPM ECM	(Ye et al., 1993)
Alcaloides					
4	Teofilina ($C_7H_8N_4O_2$)	7,93 (s, H-8)	27,0 (CH_3-1); 28,0 (CH_3-3); 140,0 (C-8)	ESM EPM ECM	(Hamdani, Amane, Duhayon, 2019)
5	Teobromina ($C_7H_8N_4O_2$)	3,95 (s, 3H); 7,86 (s, H-8)	32,6 (CH_3-7); 107,8 (C-5); 142,8 (C-8)	ESM EPM ECM	(Younis et al., 2025)

ENSAIO CITOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE *T. bicolor*

Amostras da casca, polpa e sementes do fruto de *T. bicolor* foram avaliadas quanto à sua atividade contra células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar humano (A549), células de carcinoma colorretal humano (HCT-8) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). De acordo com a classificação de citotoxicidade proposta por Anywar et al. (2022) e pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI), compostos com valores de $IC_{50} \leq 20$ µg/mL são considerados altamente citotóxicos, aqueles entre 21 e 200 µg/mL moderadamente citotóxicos, e aqueles entre 201 e 500 µg/mL fracamente citotóxicos. A avaliação baseada nestes critérios revelou que a casca e a semente do macambo exibiram perfil moderadamente citotóxico em todas as linhagens celulares avaliadas, tanto saudáveis quanto cancerígenas, com valores de IC_{50} variando de 28,24 a 191,10 µg/mL (Figura 15). Em relação ao índice de seletividade (IS), o extrato da casca de *T. bicolor* apresentou alta seletividade (IS > 3), indicativo de citotoxicidade preferencial contra a linhagem tumoral de adenocarcinoma colorretal ileocecal humano em comparação com as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). As demais amostras geralmente exibiram baixa seletividade em relação às células tumorais. Notavelmente, a fração da polpa mostrou seletividade relativamente maior para células normais (ex., HUVEC), com valores de IS em torno de 0,92, sugerindo citotoxicidade aumentada em relação às células não tumorais (Granato et al., 2022) (Tabela 13).

Tabela 13 - IC_{50} e Índice de Seletividade (IS) dos extratos ESM, EPM e ECM.

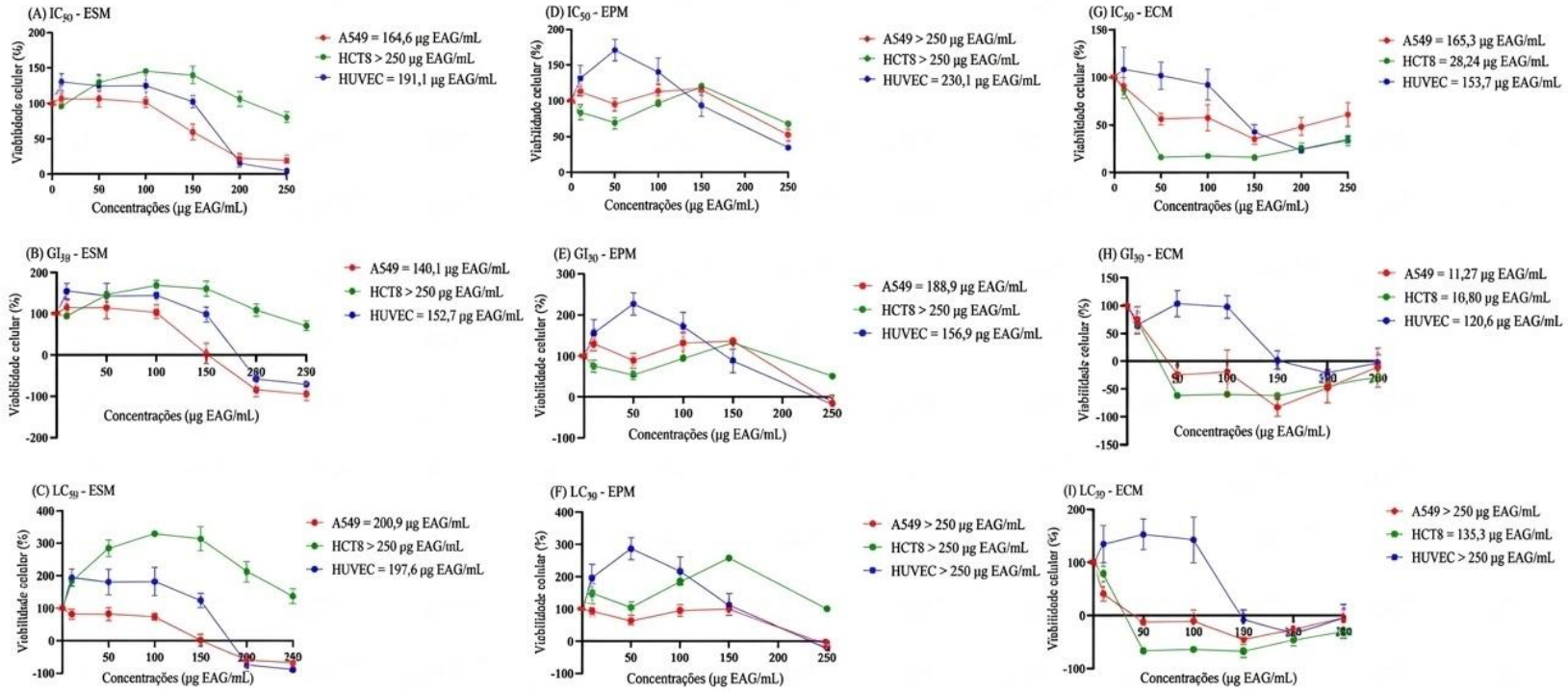
Amostras	IC_{50} (µg EAG/mL)			IS	
	HUVEC	A549	HCT-8	HUVEC/A549	HUVEC/HCT-8
ESM	191,1	164,6	>250	1,16	0,76
EPM	230	>250	>250	0,92	0,92
ECM	153,7	165,3	28,24	0,93	5,44

Nota: IC_{50} representa a concentração de um agente necessária para diminuir o crescimento celular em 50%, determinada quando (T/C) × 100 = 50. Aqui, T é a contagem de células no momento do tratamento, e C é a contagem de células no grupo controle no mesmo momento. O índice de seletividade (IS) é calculado comparando a IC_{50} em células HUVEC saudáveis com a IC_{50} em células cancerígenas, oferecendo percepção sobre o potencial do agente em atingir seletivamente células cancerígenas em detrimento das

saudáveis. ESM (Extrato da Semente de Macambo); ECM (Extrato da Casca de Macambo) e EPM (Extrato da Polpa de Macambo).

A casca do macambo apresentou a maior capacidade de inibir o crescimento celular em comparação com a polpa e a semente, exibindo valores de GI_{50} entre 10,80 e 11,27 µg/mL nas linhagens celulares cancerígenas. Este comportamento também foi relatado para outra espécie do gênero, *T. sylvestre* (Fonseca Júnior et al., 2025). Foi a única amostra do fruto capaz de induzir efeito letal em concentrações de 135,3 µg/mL na linhagem de carcinoma colorretal. Estes resultados destacam o potencial da fração fenólica dos frutos de *T. bicolor*, apontando para promissoras perspectivas de futuras aplicações na indústria de alimentos.

Figura 15 - Avaliação da citotoxicidade do ESM (Extrato da Semente do Macambo); ECM (Extrato da Casca do Macambo) e EPC (Extrato da Polpa do Macambo) foi realizada nas linhagens celulares A549, HCT-8 e HUVEC. (A, D e G) IC_{50}: a concentração do agente que reduz o crescimento celular em 50%. (B, E e H) GI_{50}: a concentração do agente que diminui o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas. (C, F e I) LC_{50}: a concentração do agente que causa uma redução líquida de 50% das células em relação à contagem inicial de células no início do tratamento.



CONCLUSÃO

O estudo das frações de *Theobroma bicolor* demonstra que esta espécie amazônica é promissora para as indústrias alimentícia e farmacêutica. A composição centesimal revelou que as sementes são fontes energéticas concentradas (377,40 kcal/100 g), ricas em carboidratos e minerais, enquanto a polpa apresenta perfil nutricional leve e adequado para produtos de baixa caloria. A caracterização por CG-MS e RMN 1D/2D identificou constituintes de alto valor biológico e tecnológico, com destaque para a predominância de ácidos graxos saturados nas sementes (estearato de metila, 41,38%), sugerindo estabilidade oxidativa superior para aplicações em cosméticos e gorduras vegetais. A presença dos alcaloides teofilina e teobromina, aliada ao aminoácido triptofano e ao ácido oleico, reforça o valor fitoterapêutico da espécie. No âmbito biológico, as frações de casca e sementes exibiram citotoxicidade moderada frente a linhagens tumorais, com a casca apresentando alta seletividade (IS > 3) contra o adenocarcinoma colorretal (HCT-8). Sendo assim, os resultados ratificam que o aproveitamento integral de *T. bicolor* é uma estratégia viável para a valorização da biodiversidade amazônica, estabelecendo bases sólidas para o desenvolvimento de novos produtos funcionais e o avanço de investigações sobre seus compostos antitumorais.

CONCLUSÃO GERAL

A partir da pesquisa realizada com os frutos das espécies *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum* e *Theobroma sylvestre* verificou-se a composição centesimal, o perfil químico, bem como a citotoxicidade das partes dos frutos, que são de grande interesse à indústria de alimentos.

A caracterização físico-química e a composição centesimal das diferentes partes dos frutos demonstraram que as espécies *T. bicolor*, *T. subincanum* e *T. sylvestre* apresentam perfis nutricionais relevantes e comparáveis aos de outras espécies do gênero, incluindo o *T. cacao*. Em todas as espécies, a polpa apresentou elevado teor de umidade, associado à textura suculenta e à aplicação em produtos como sucos, polpas e derivados fermentados. Em contraste, as sementes destacaram-se pelo alto teor de carboidratos, proteínas e valor energético, indicando serem fontes concentradas de nutrientes e promissora para formulações de maior densidade energética. A casca, por sua vez, exibiu teores relevantes de cinzas e carboidratos, sugerindo elevada concentração de minerais e potencial aproveitamento como ingrediente rico em fibras e micronutrientes. Esses resultados reforçam a possibilidade de aproveitamento integral dos frutos, contribuindo para estratégias de valorização de espécies alimentícias não convencionais.

A análise da fração lipídica revelou diferenças importantes entre as espécies e entre as diferentes partes do fruto. Em *T. subincanum*, foram identificados os ácidos graxos palmítico, linoleico e esteárico, além da presença do ácido elaídico na polpa e casca, indicando a necessidade de atenção quanto ao seu uso em formulações alimentícias. As sementes, por outro lado, não apresentaram esse ácido graxo *trans*, reforçando seu potencial para aplicações alimentares mais seguras. Em *T. bicolor*, observou-se predominância de ácidos graxos saturados, especialmente derivados dos ácidos palmítico e esteárico, com destaque para o elevado teor de estearato de metila nas sementes, o que sugere maior estabilidade oxidativa do óleo.

A investigação fitoquímica das três espécies revelou um conjunto de metabólitos secundários pertencentes a diferentes classes químicas. Nas espécies analisadas, foram identificados aminoácidos, alcaloides metilxantínicos, flavonoides, compostos fenólicos, lignanas e outros metabólitos especializados. Entre os constituintes destacam-se os alcaloides teobromina, teofilina, cafeína e teacrina, amplamente associados ao gênero *Theobroma*. Foram identificados, também, os flavonoides epicatequina, quercetina, miricetina, kaempferol, luteolina e seus derivados glicosilados,

além de compostos fenólicos como procianidinas e clovamida. Observou-se que alguns metabólitos em *T. sylvestre* não haviam sido previamente relatados para espécies do gênero, ampliando o conhecimento químico em Malvaceae. Essa diversidade estrutural reforça o potencial dessas espécies como fontes de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e funcionais.

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram perfis distintos para as diferentes partes dos frutos. Em *T. sylvestre*, as frações fenólicas exibiram atividade citotóxica predominantemente moderada em diferentes linhagens celulares, sugerindo a presença de compostos bioativos capazes de interferir na proliferação celular. Em *T. subincanum*, os extratos de sementes e casca não apresentaram citotoxicidade significativa, indicando biocompatibilidade e potencial aplicação em produtos alimentícios ou nutracêuticos, enquanto a polpa demonstrou atividade moderada. Já em *T. bicolor*, a casca apresentou maior capacidade de inibição do crescimento celular e demonstrou seletividade relevante para células tumorais em comparação às células normais. Esses resultados sugerem que a citotoxicidade observada pode estar associada à presença de flavonoides e outros compostos fenólicos identificados nas análises químicas, evidenciando o potencial dessas espécies como fontes de moléculas bioativas.

Em decorrência disso, este estudo demonstra que *T. bicolor*, *T. subincanum* e *T. sylvestre* — plantas alimentícias não convencionais (PANC) — apresentam características nutricionais, químicas e biológicas que reforçam seu potencial para aproveitamento pela indústria de alimentos. Tais espécies configuram-se como alternativas promissoras ou complementares ao *T. cacao*, bem como para o desenvolvimento de alimentos funcionais, ingredientes nutracêuticos e novos produtos do gênero *Theobroma*. Assim, o aproveitamento dessas espécies pode contribuir para a valorização da biodiversidade amazônica, o estímulo a cadeias produtivas sustentáveis e a inovação tecnológica na indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

ANDRIANA, Y.; ABDURRAHMAN, M. F.; HARYANTI, P.; PANGESTUTI, R.; KURNIANTO, D.; SEFRIENDA, A. R.; APRIYATI, E.; WUNGKANA, J.; INDRIATI, A.; LITAAY, C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) for phenolics and antioxidant activity from cocoa (*Theobroma cacao*) leaves and phytochemical profiling using GC-MS and LC-HRMS. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 65, p. 103557, 2025. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103557.

ANDÚJAR, I.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; RÍOS, J. L. Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–23, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/906252.

ANOKHI CHANDRABABU, K.; PARVATHY, U.; MEENU, B.; BINSI, P. K. Unveiling the nutritional treasure trove: A comparative analysis of two Azolla species for potential food applications. **Food and Humanity**, v. 3, p. 100444, 2024. https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100444.

ANYWAR, G. U.; KAKUDIDI, E.; ORYEM-ORIGA, H.; SCHUBERT, A.; JASSOY, C. Cytotoxicity of medicinal plant species used by traditional healers in treating people suffering from HIV/AIDS in Uganda. **Frontiers in Toxicology**, v. 4, 2022. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.832780.

BENLLOCH-TINOCO, M.; NUÑEZ RAMÍREZ, J. M.; GARCÍA, P.; GENTILE, P.; GIRÓN-HERNÁNDEZ, J. *Theobroma* genus: Exploring the therapeutic potential of *T. grandiflorum* and *T. bicolor* in biomedicine. **Food Bioscience**, v. 61, p. 104755, 2024. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104755.

BEZERRA, J. A.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; LAMARÃO, C. V.; STRINGHETA, P. C.; MARTINS, E.; CAMPELO, P. H. "Cupuaçu" (*Theobroma grandiflorum*): a brief review on chemical and technological potential of this Amazonian fruit. **Food Chemistry Advances**, v. 5, p. 100747, 2024. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100747.

CARMO, M. A. V.; FIDELIS, M.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; CASTRO-GAMERO, A. M.; MYODA, T.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Hydroalcoholic *Myrciaria dubia* (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, v. 125, p. 108551, 2019. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108551.

CARMO, M. A. V.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, v. 24, p. 26–35, 2018. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.10.013.

CARRION, L. L.; RAMOS, D. F.; MARTINS, D.; OSÓRIO, M. I. C.; CURSINO, L. D. Antimycobacterial activity of Brazilian Amazon plants extracts. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 4, p. 479–485, 2013.

COSTA, L. D.; TRINDADE, R. P.; CARDOSO, P. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A.; OTERO, D. M. *Pachira aquatica* (Malvaceae): an unconventional food plant with food, technological, and nutritional potential to be explored. **Food Research International**, v. 164, p. 112354, 2023. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112354.

CRUZ, J. M. A.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H.; BEZERRA, J. de A. Amazonian fruits: a systematic review of the literature and critical analysis of its trends. **Food Bioscience**, v. 62, p. 105563, 2024. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105563.

CUATRECASAS, J. Cacao and its Allies: A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *In*: SMITH, A. C. (ed.). **Systematic Plant Studies**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1964. v. 35, n. 6, p. 379–607. (Contributions from the United States National Herbarium).

DESVITA, H.; FAISAL, M.; MAHIDIN; SUHENDRAYATNA. Antimicrobial potential of wood vinegar from cocoa pod shells (*Theobroma cacao* L.) against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. **Materials Today: Proceedings**, v. 63, p. S210–S213, 2022. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.02.410.

FONSECA JÚNIOR, E. Q.; ROCHA, D. Q.; OLIVEIRA, E. S. C.; SILVA, S. O.; SOUZA, F. C. A.; FURLANETO, G.; CRUZ, L. S.; AZEVEDO, L.; CORRÊA, R. F.; SANCHES, E. A.; CAMPELO, P. H.; BEZERRA, J. A. Chemical characterization, nutritional profile, and cytotoxicity potential of Amazonian *Theobroma sylvestre* Mart. fruits. **Food Bioscience**, v. 73, p. 107673, 2025. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107673.

FOYET, H. S.; HRITCU, L.; CIOBICA, A.; STEFAN, M.; KAMTCHOUING, P.; COJOCARU, D. Methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 773–779, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.011.

GEIRNAERT, A.; CALATAYUD, M.; GROOTAERT, C.; LAUKENS, D.; DEVRIESE, S.; SMAGGHE, G.; DE VOS, M.; BOON, N.; VAN DE WIELE, T. Butyrate-producing bacteria supplemented *in vitro* to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11450, 2017. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11734-8.

GONZÁLEZ, A. A.; MONCADA, J.; IDARRAGA, A.; ROSENBERG, M.; CARDONA, C. A. Potential of the amazonian exotic fruit for biorefineries: The *Theobroma bicolor* (Makambo) case. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 58–67, 2016. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.015.

GRANATO, D.; RESHAMWALA, D.; KORPINEN, R.; AZEVEDO, L.; CARMO, M. A. V.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; WEN, M.; ZHANG, L.; MARJOMÄKI, V.; KILPELÄINEN, P. From the forest to the plate – Hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. **Food Chemistry**, v. 381, p. 132284, 2022. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132284.

HALLERAKER, H. V.; BARTH, T. Quantitative NMR analysis of the aqueous phase from hydrothermal liquefaction of lignin. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 151, p. 104919, 2020. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2020.104919.

HAMDANI, H. E.; AMANE, M. E.; DUHAYON, C. Preparation, spectral, structural, thermal and anticancer molecular docking studies of bis-(theophyllinato)-tetraaquocobalt

(II) complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 1190, p. 125–134, 2019. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.063.

IPIRANGA, A. C. S.; SOUZA, P. G.; FONSECA JÚNIOR, E. Q. Produção de cerveja artesanal estilo fruit wheat beer adicionada com cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e pitaia-rosa (*Hylocereus costaricensis*). **Brazilian Journal of Science**, v. 1, n. 3, p. 16–22, 2022. https://doi.org/10.14295/bjs.v1i3.33.

KOBI, H. B.; FERNANDES, R. B. A.; SENNA, D. S.; BORGES, L. L. R.; VIDIGAL, M. C. T. R.; MARROCOS, P. C. L.; FREITAS, V. V.; SOUZA, M. S.; CASTRO, G. A. D.; FERNANDES, S. A.; FERRAZ, K. C. R.; STRINGHETA, P. C. Metabolic profile of fatty acids, phenolic compounds, and methylxanthines of cocoa kernels (*Theobroma cacao* L.) from different cultivars produced in cabruca and full sun farming systems. **Food Research International**, v. 197, p. 115198, 2024. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115198.

LIMA, A. S.; MALTAROLLO, V. G.; CARMO, M. A. V.; PINHEIRO, L. C.; CRUZ, T. M.; BARROS, F. A. R.; PAP, N.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Blackcurrant press cake by-product: Increased chemical bioaccessibility and reduced antioxidant protection after *in vitro* simulation of gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 182, 2024. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114099.

LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

MAR, J. M.; FONSECA JÚNIOR, E. Q.; CORRÊA, R. F.; CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. A. *Theobroma* spp.: a review of it's chemical and innovation potential for the food industry. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100683, 2024. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100683.

MAR, J. M.; SILVA, L. S.; MOREIRA, W. P.; BIONDO, M. M.; PONTES, F. L. D.; CAMPOS, F. R.; KINUPP, V. F.; CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. A. Edible flowers from *Theobroma speciosum*: aqueous extract rich in antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 356, 2021. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129723.

MARINHO, V. S.; NASCIMENTO, L. N.; LIMA, B. R.; AGUIAR, J. P. L.; SOUZA, F. C. A. Physicochemical characterization, pectin extraction and analysis of volatile compounds of *Alibertia sorbilis* Ducke using ultrasound: Potential for new products in the bioeconomy of the Amazon. **Food and Humanity**, v. 4, p. 100529, 2025. https://doi.org/10.1016/j.foohum.2025.100529.

MILIÃO, G. L.; OLIVEIRA, A. P. H.; SOARES, L. S.; ARRUDA, T. R.; VIEIRA, É. N. R.; LEITE JUNIOR, B. R. C. Unconventional food plants: Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, p. 100124, 2022. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100124.

MWAGANDI CHIMBEVO, L.; ESSUMAN, S. Preliminary screening of nutraceutical potential of fruit pulp, peel and seeds from *Annona Squamosa* (L.) and *Annona Muricata* (L.) growing in coast region of Kenya. **American Journal of BioScience**, v. 7, n. 3, p. 58, 2019. https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20190703.11.

NWANKWO, N. E.; OKEKE, E. S.; NWORAH, F. N.; EZEAKO, E. C. Phytochemical composition and potential anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of leaf extracts of *Sida linifolia* L. (Malvaceae). **Journal of Herbal Medicine**, v. 38, p. 100630, 2023. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100630.

OGUNLAJA, O. O.; MOODLEY, R.; BAIJNATH, H.; JONNALAGADDA, S. B. Elemental distribution and health risk assessment of the edible fruits of two *Ficus* species, *Ficus sycomorus* L. and *Ficus burtt-davyi* Hutch. **Biological Trace Element Research**, v. 198, n. 1, p. 303–314, 2020. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02048-4.

OLOSUNDE, W. A.; AKPANMKPUK, S. N.; DAVID, G. A. Investigating the effects of moisture content on the composition of soursop seeds for industrial uses. **European Journal of Engineering and Technology Research**, v. 7, n. 6, p. 143–147, 2022. https://doi.org/10.24018/ejeng.2022.7.6.2941.

OSEI, P. A.; KPODO, F. M.; TETTEY, C. O.; DZAH, C. S.; AGBENORHEVI, J. K.; HUNKPE, G.; NANGA, S. Proximate composition, phenolic, and antioxidant properties of soursop fruit parts. **CyTA - Journal of Food**, v. 21, n. 1, p. 475–480, 2023. https://doi.org/10.1080/19476337.2023.2227250.

PALMEIRA, L.; PEREIRA, C.; DIAS, M. I.; ABREU, R. M. V.; CORRÊA, R. C. G.; PIRES, T. C. S. P.; ALVES, M. J.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutritional, chemical and bioactive profiles of different parts of a portuguese common fig (*Ficus carica* L.) variety. **Food Research International**, v. 126, p. 108572, 2019. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108572.

RIBEIRO, L. O.; VIANA, E. S.; GODOY, R. L. O.; FREITAS, S. C.; FREITAS, S. P.; MATTA, V. M. Nutrients and bioactive compounds of pulp, peel and seed from umbu fruit. **Ciência Rural**, v. 49, n. 4, 2019. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180806.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araça-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 4, p. 380–384, 2004. https://doi.org/10.1007/s00217-003-0853-6.

ROJAS URIBE, L. S.; BONES CHOEZ, M. N.; CEDEÑO MOREIRA, Á. V.; VÁSQUEZ CORTEZ, L. H.; PLUA MONTIEL, J. A.; RADICE, M. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de polifenoles de semillas de macambo (*Theobroma bicolor*). **Biotecnia**, v. 27, p. e2672, 2025. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v27.2672.

RUKSILP, T. Fatty acids and an ester from the leaves of *Millettia utilis* Dunn. **Naresuan University Journal: Science and Technology**, v. 28, n. 3, 2020. https://doi.org/10.14456/nujst.2020.26.

SADIQ, I. S.; SAMINU, M. Y.; ZAINAB, L.; ADELEYE, A. O.; SANNI, L. E.; DANDALMA, Z. A. Proximate analysis and phytochemical screening of watermelon (*Citrullus lanatus*) pulp, peels and seeds. **Dutse Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 7, n. 4a, p. 174–182, 2022. https://doi.org/10.4314/dujopas.v7i4a.18.

SANTOS, L. M.; ROSELINO, M. N.; ALVES, J. C.; VIANA, S. N. A.; REQUIÃO, E. R.; FERRO, J. M. R. B. S.; SOUZA, C. O.; RIBEIRO, C. D. F. Production and

characterization of kombucha-like beverage by cocoa (*Theobroma cacao*) by-product as raw material. **Future Foods**, v. 11, p. 100528, 2025. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100528.

SITAREK, P.; MERECZ-SADOWSKA, A.; SIKORA, J.; OSICKA, W.; ŚPIEWAK, I.; PICOT, L.; KOWALCZYK, T. Exploring the therapeutic potential of *Theobroma cacao* L.: insights from *in vitro*, *in vivo*, and nanoparticle studies on anti-inflammatory and anticancer effects. **Antioxidants**, v. 13, n. 11, p. 1376, 2024. https://doi.org/10.3390/antiox13111376.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. Disponível em: http://www.plantarum.com.br. Acesso em: 1 mar. 2026.

TORRES, D. E. G.; ASSUNÇÃO, D.; MANCINI, P.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 5, p. 278–281, 2002. https://doi.org/10.1002/1438-9312(200205)104:5<278::aid-ejlt278>3.0.co;2-k.

VASQUEZ, W. V.; HERNÁNDEZ, D. M.; DEL HIERRO, J. N.; MARTIN, D.; CANO, M. P.; FORNARI, T. Supercritical carbon dioxide extraction of oil and minor lipid compounds of cake byproduct from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) beverage production. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 171, p. 105188, 2021. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105188.

YE, C.; FU, R.; HU, J.; HOU, L.; DING, S. Carbon-13 chemical shift anisotropies of solid amino acids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 31, n. 8, p. 699–704, 1993. https://doi.org/10.1002/mrc.1260310802.

YOSHITOME, M. Y.; FERNANDO, M.; SOUZA, P.; KARSBURG, V. Characterization of mitotic chromosomes and meiotic index of *Theobroma speciosum* (L) wild. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 6, n. 1, p. 21–28, 2008.

YOUNIS, A. M.; ATTIA, G.; SALEH, M. M.; IBRAHIM, M. A.; HEGAZY, M. E. F.; PARE, P. W.; IBRAHIM, A. R. S. The use of the white biotechnology toolkit to edit natural purines for studying their anticancer activity via mTOR pathway. **Bioorganic Chemistry**, v. 159, p. 108391, 2025. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2025.108391.

APÊNDICE

MATERIAL SUPLEMENTAR

Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D de *T. sylvestre* (cacau-azul)

Figure S1A

Regiões ampliadas dos espectros de RMN de ^{1}H (0,0 – 3,0 ppm) das frações fenólicas da casca (PFPe), polpa (PFPu) e sementes (PFS) (500,13 MHz, CD_3OD).

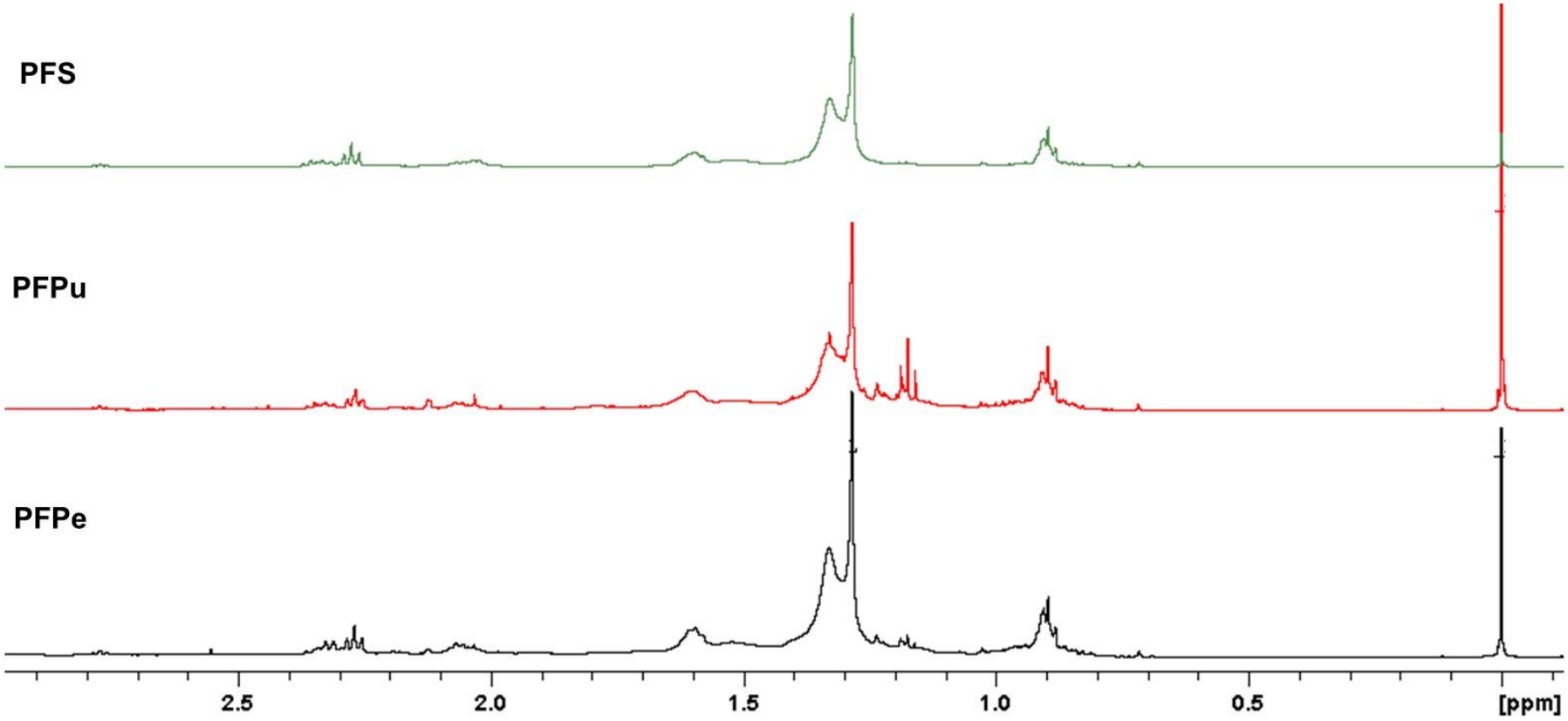


Figure S1B

Regiões ampliadas dos espectros de RMN de ^{1}H (3,4 – 4,5 ppm) das frações fenólicas da casca (PFPe), polpa (PFPu) e sementes (PFS) (500,13 MHz, CD_3OD).

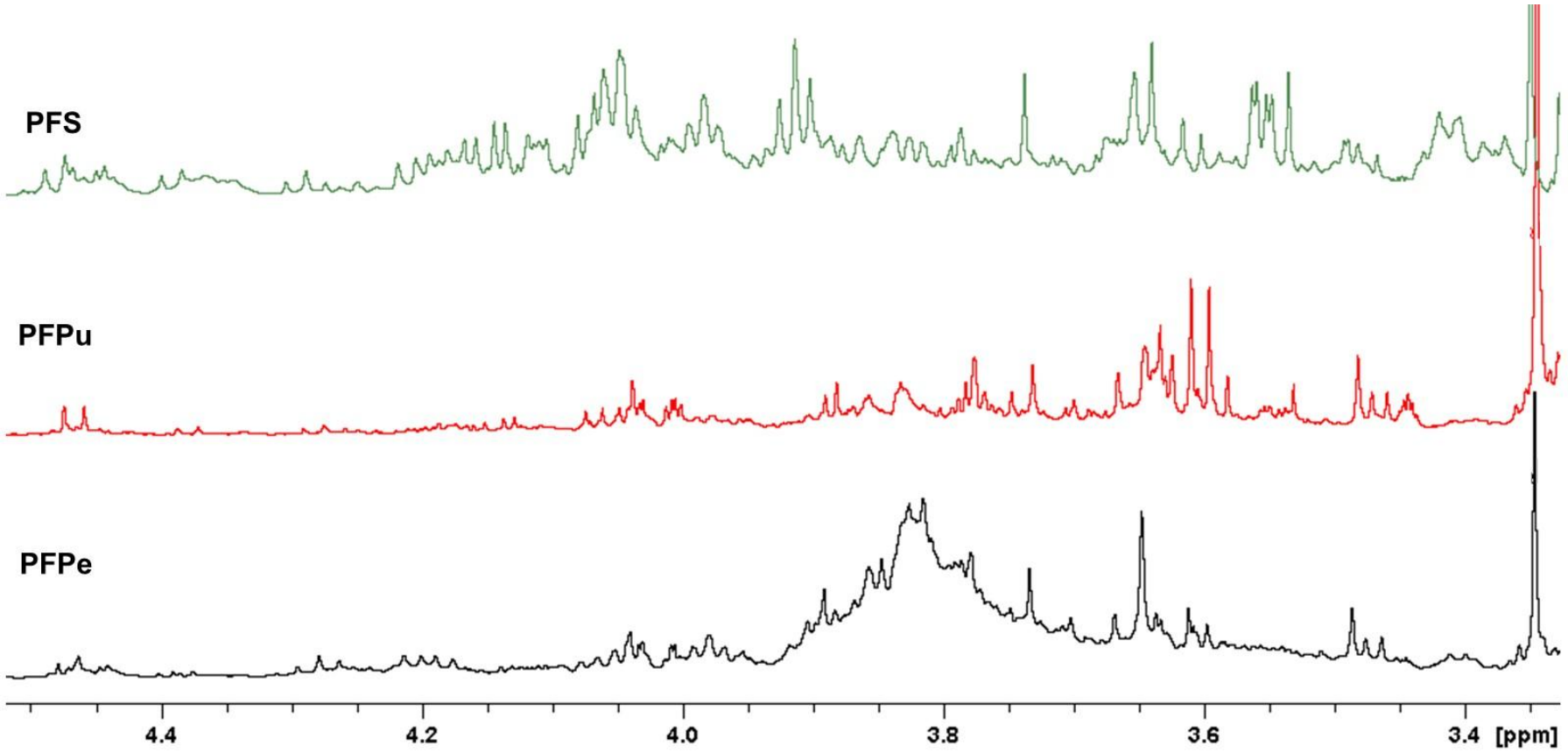


Figure S1C

Regiões ampliadas dos espectros de RMN de ^{1}H (5,0 – 6,5 ppm) das frações fenólicas da casca (PFPe), polpa (PFPu) e sementes (PFS) (500,13 MHz, CD_3OD).

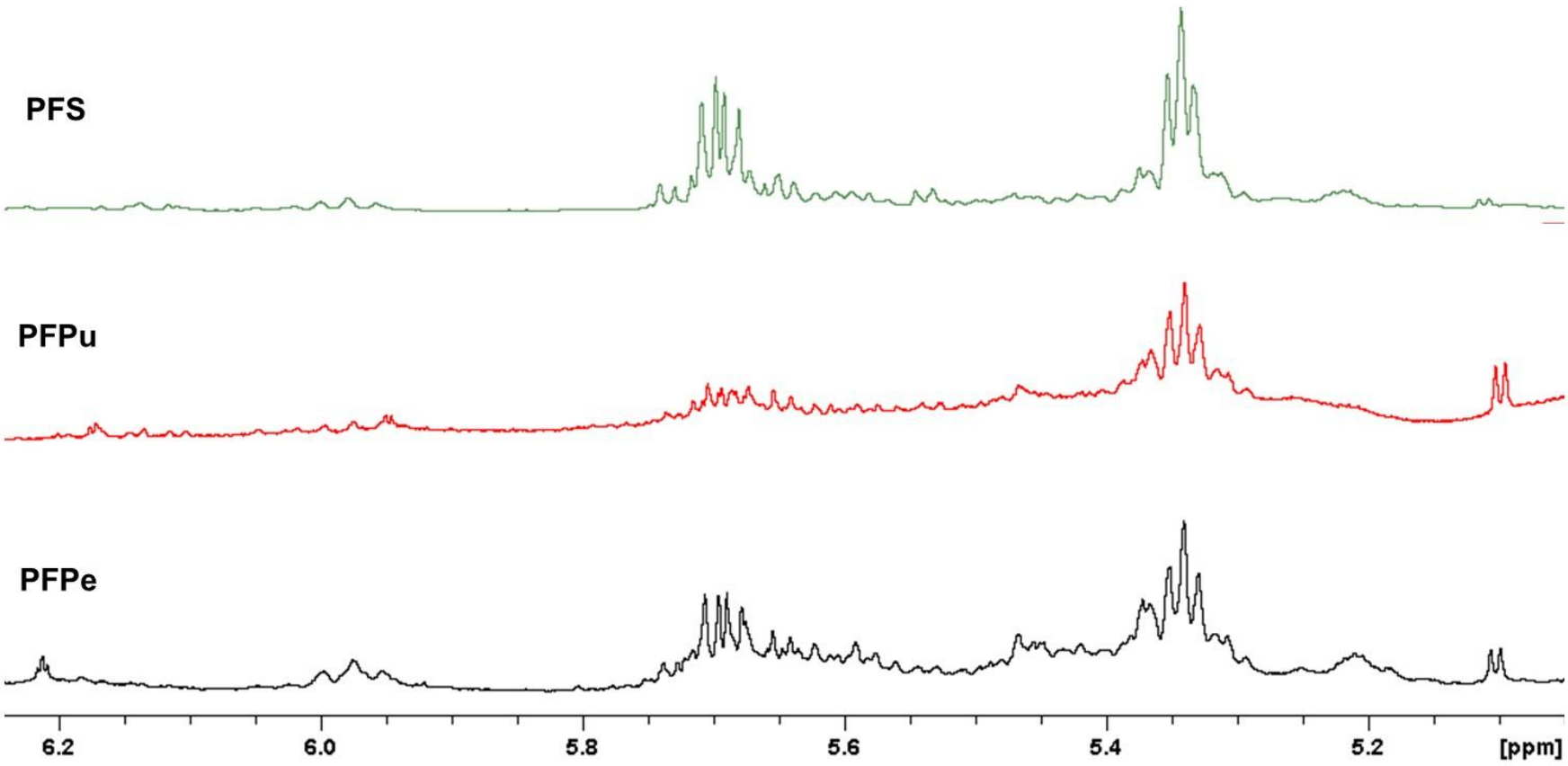


Figure S1D

Regiões ampliadas dos espectros de RMN de ^{1}H (6,2 – 8,5 ppm) das frações fenólicas da casca (PFPe), polpa (PFPu) e sementes (PFS) (500,13 MHz, CD_3OD).

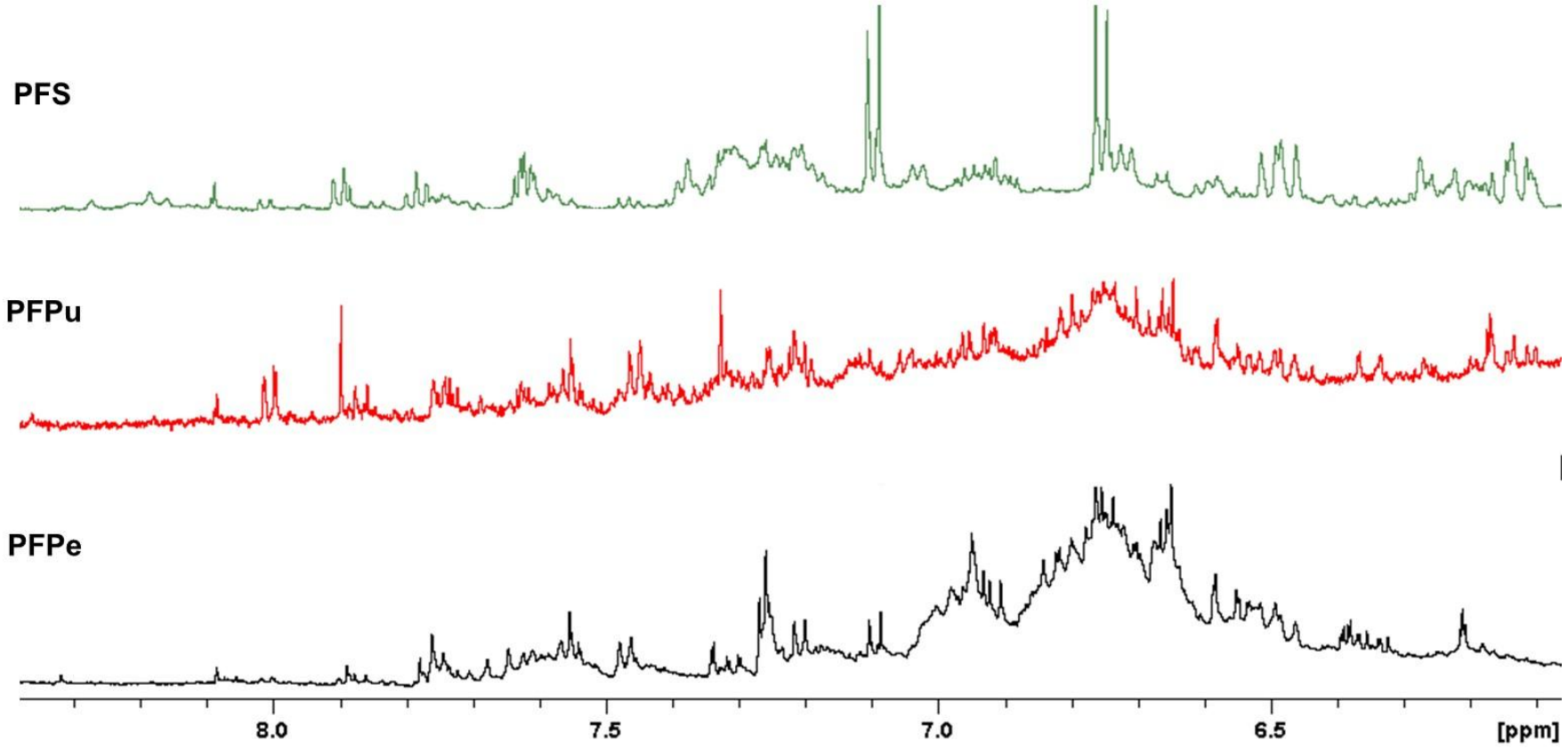


Figure S2

Espectro COSY ^{1}H-^{1}H das frações fenólicas da casca (PFPe) (11,74 T, CD_3OD).

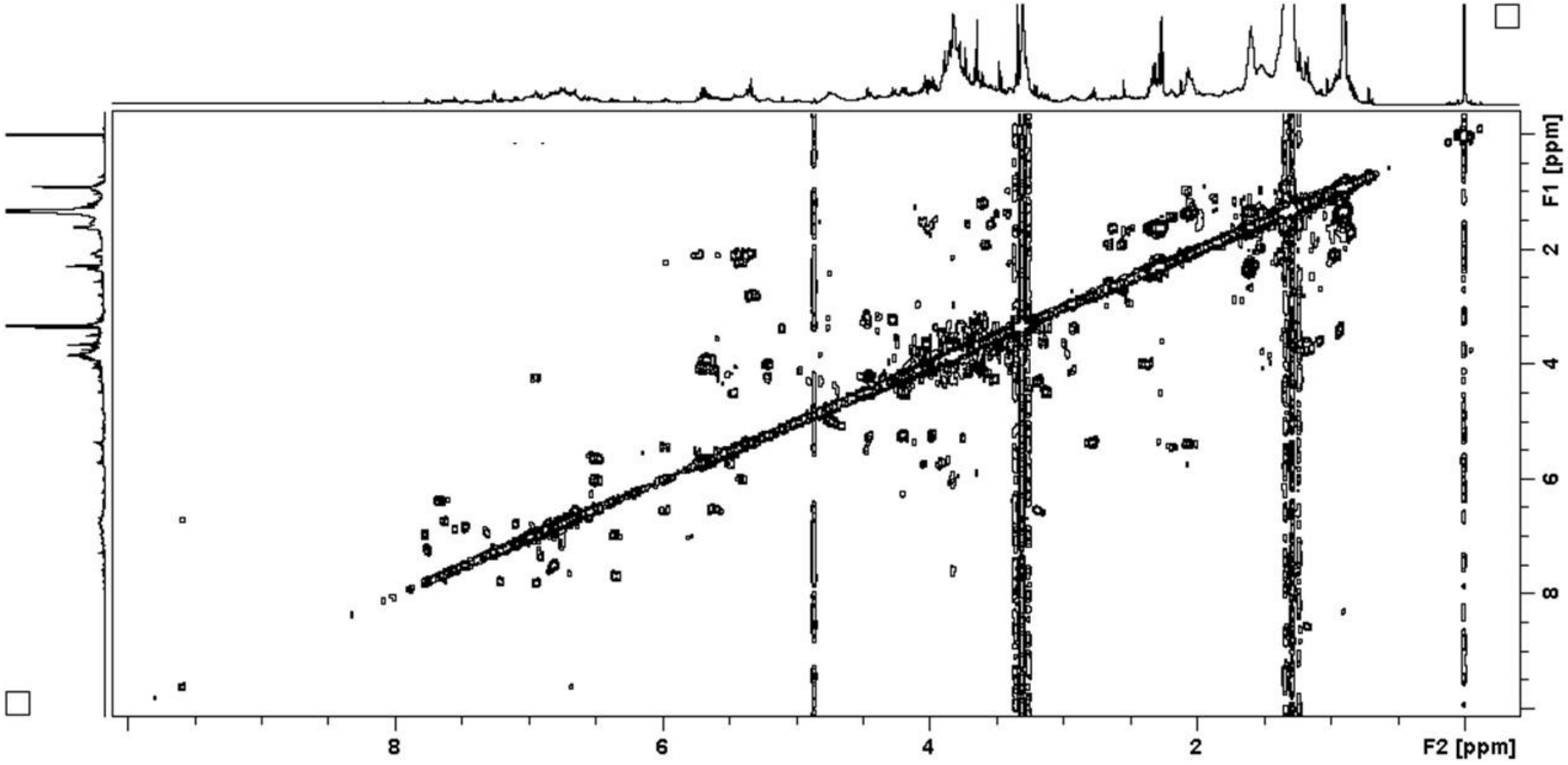


Figure S3

Espectro COSY ^{1}H-^{1}H das frações fenólicas da polpa (PFPu) (11,74 T, CD_3OD).

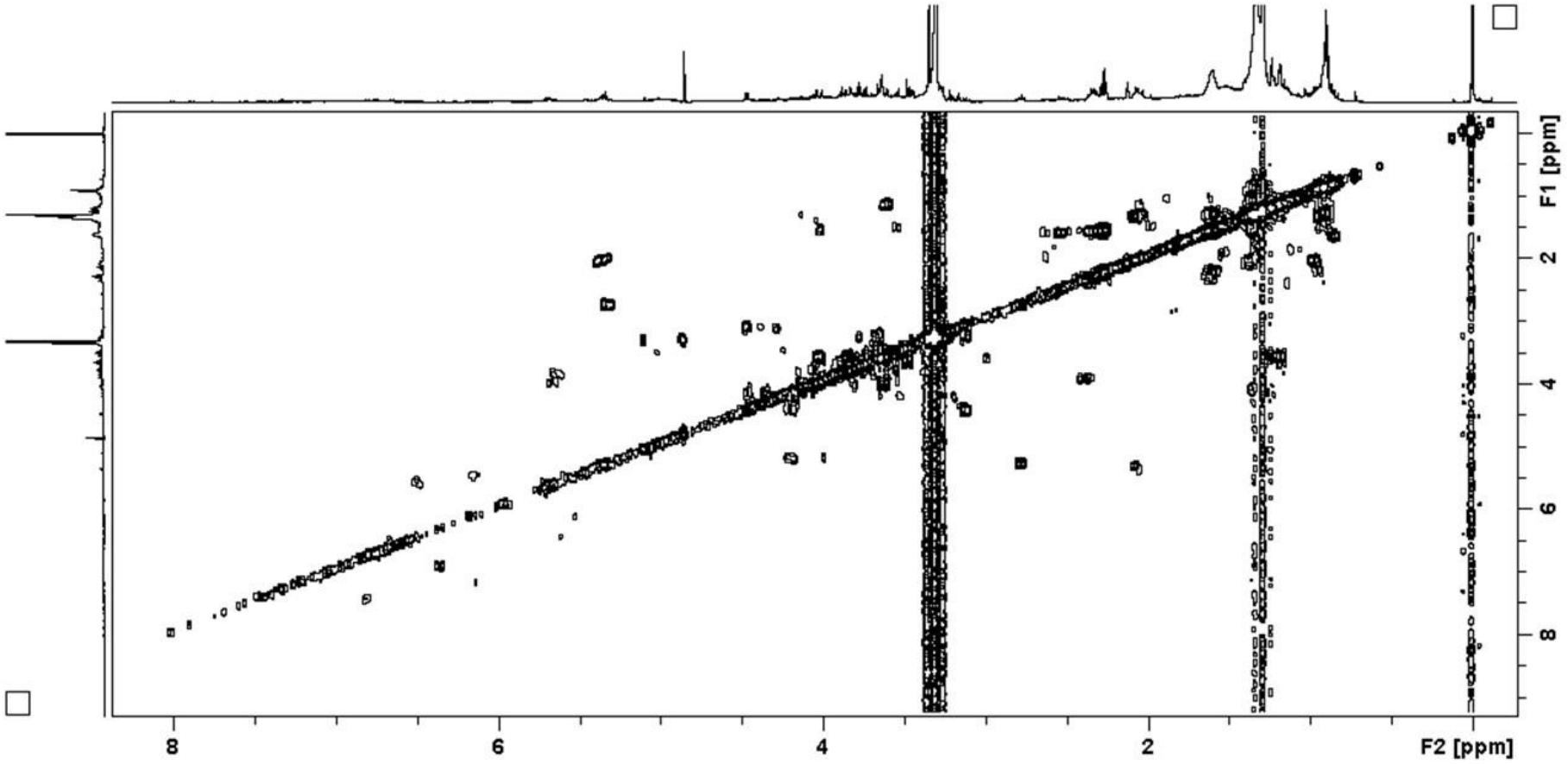


Figure S4

Espectro COSY ^{1}H-^{1}H das frações fenólicas das sementes (PFS) (11,74 T, CD_3OD).

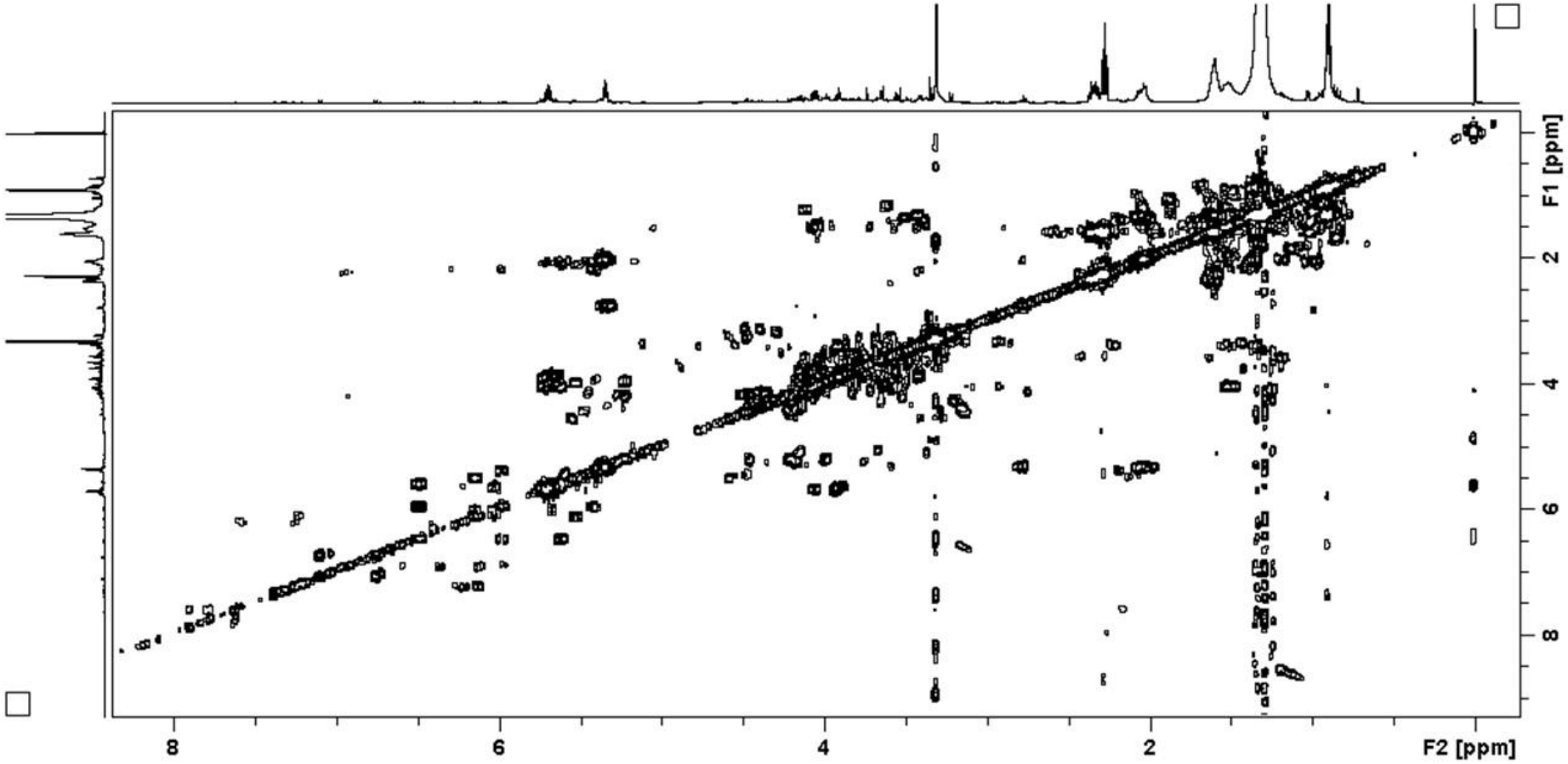


Figure S5

Espectro HSQC ^{1}H-^{13}C das frações fenólicas da casca (PFPe) (11,74 T, CD_3OD).

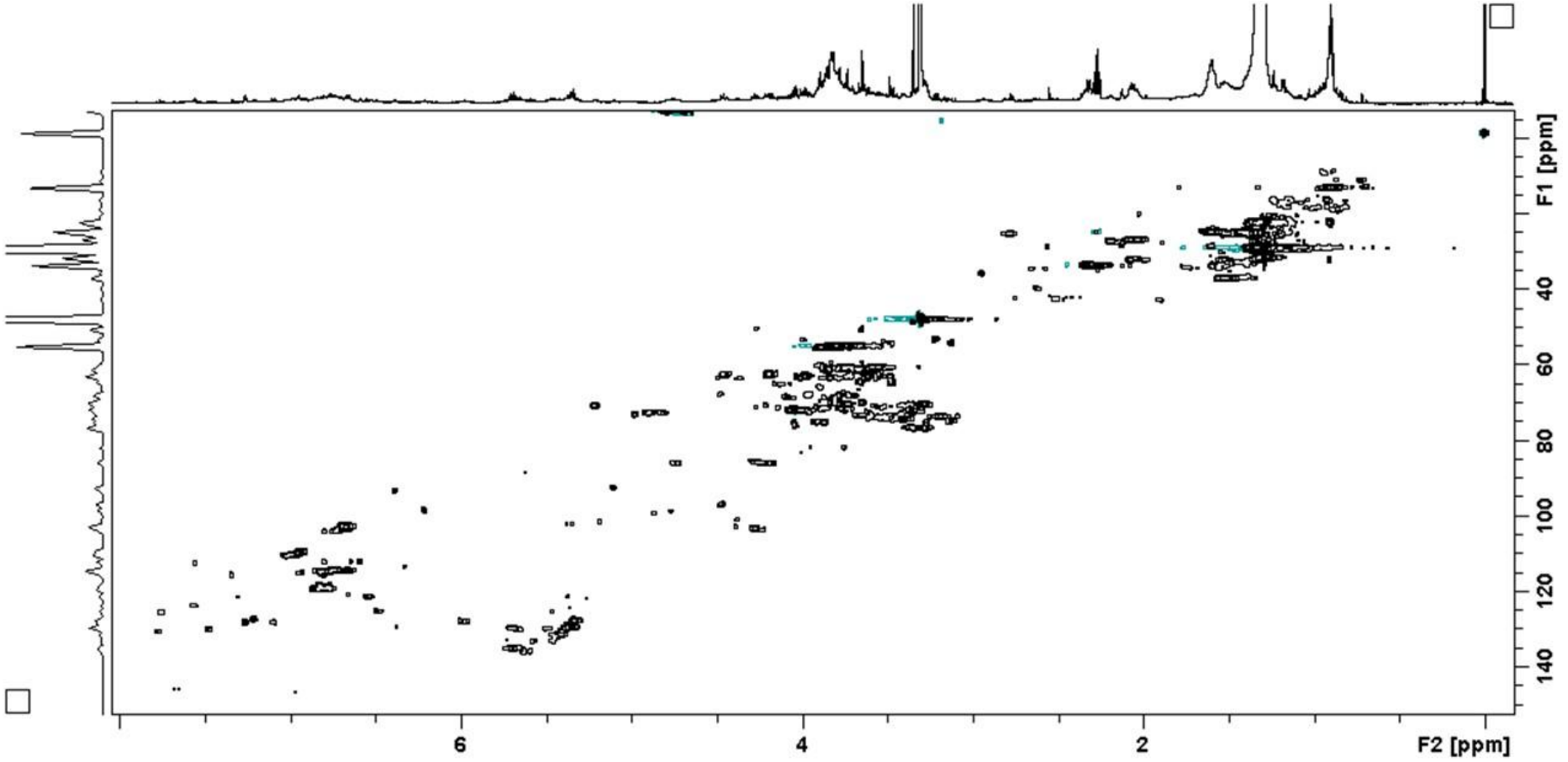


Figure S6

Espectro HSQC ^{1}H-^{13}C das frações fenólicas da polpa (PFPu) (11,74 T, CD_3OD).

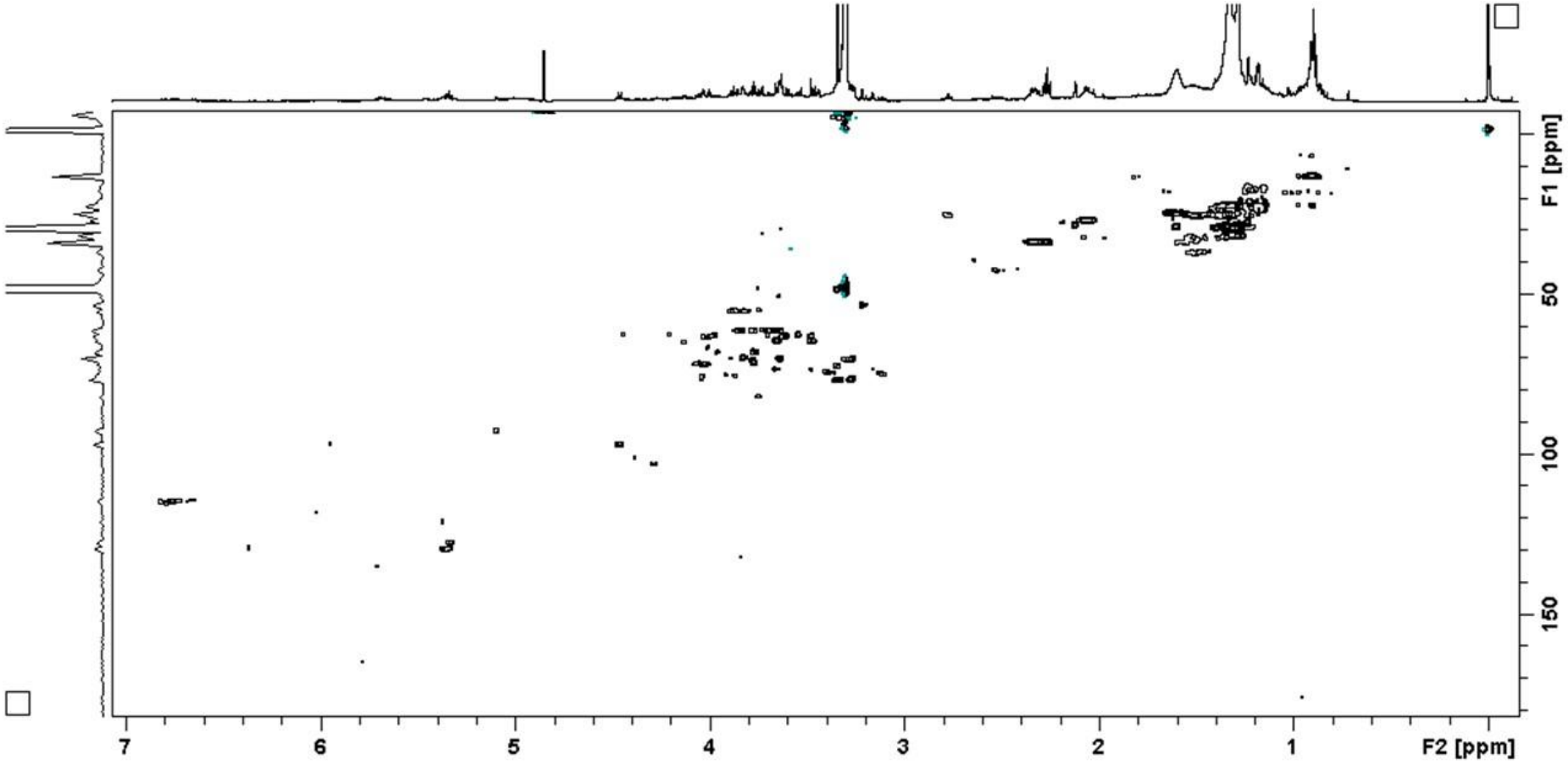


Figure S7

Espectro HSQC ^{1}H-^{13}C das frações fenólicas das sementes (PFS) (11,74 T, CD_3OD).

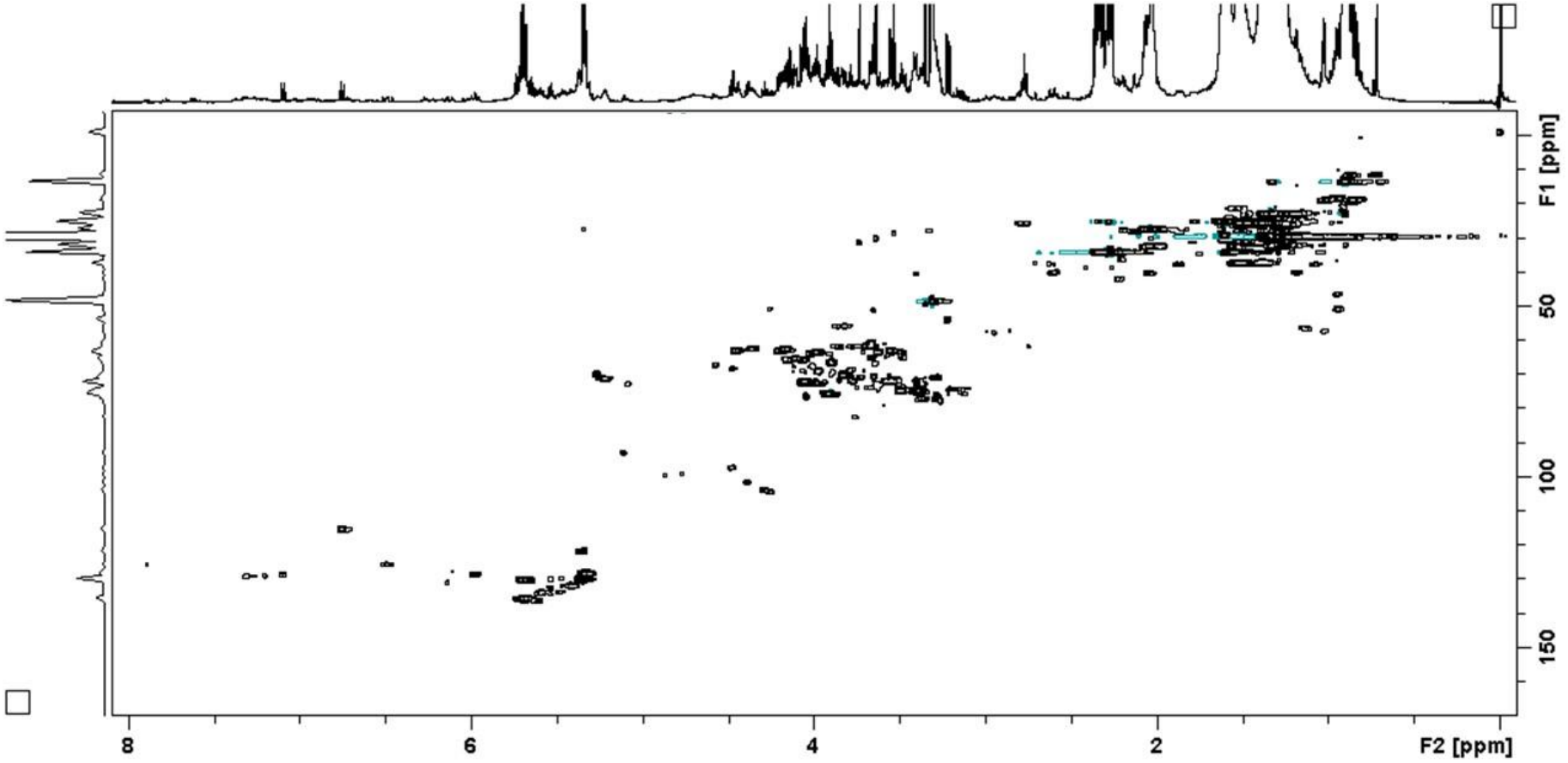


Figure S8

Espectro HMBC ^{1}H-^{13}C das frações fenólicas da casca (PFPe) (11,74 T, CD_3OD).

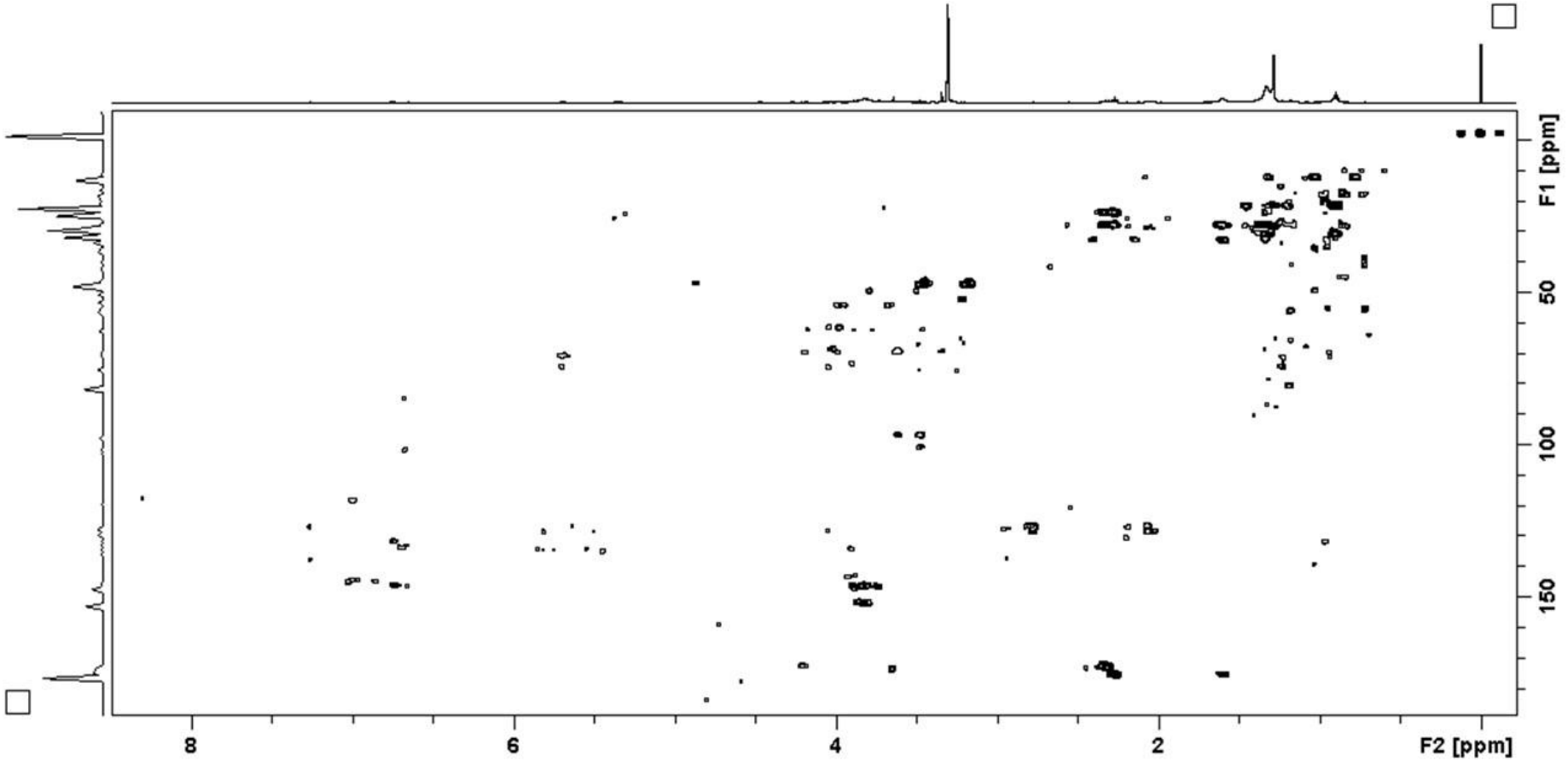


Figure S9

Espectro HMBC ^{1}H-^{13}C das frações fenólicas da polpa (PFPu) (11,74 T, CD_3OD).

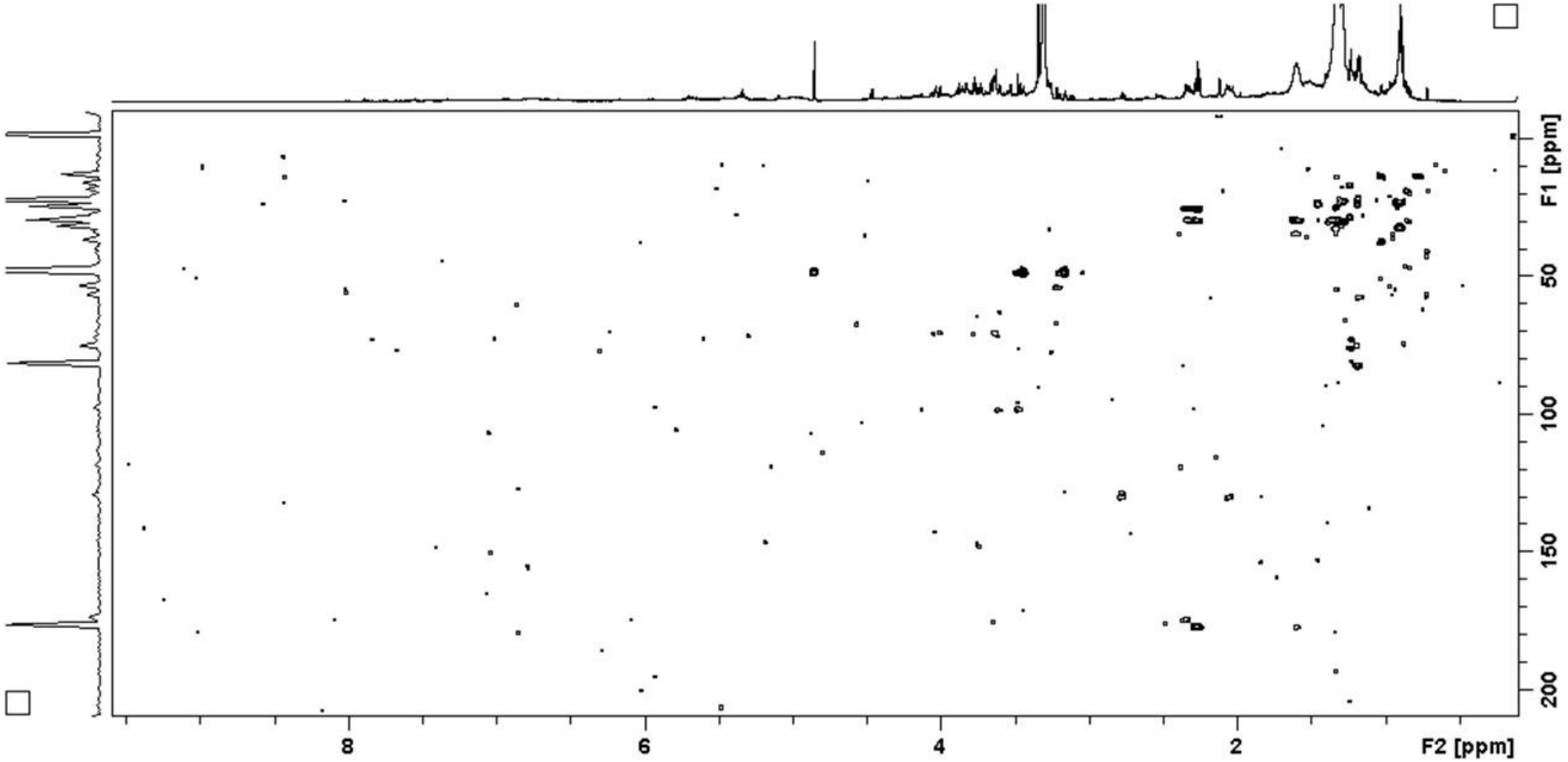
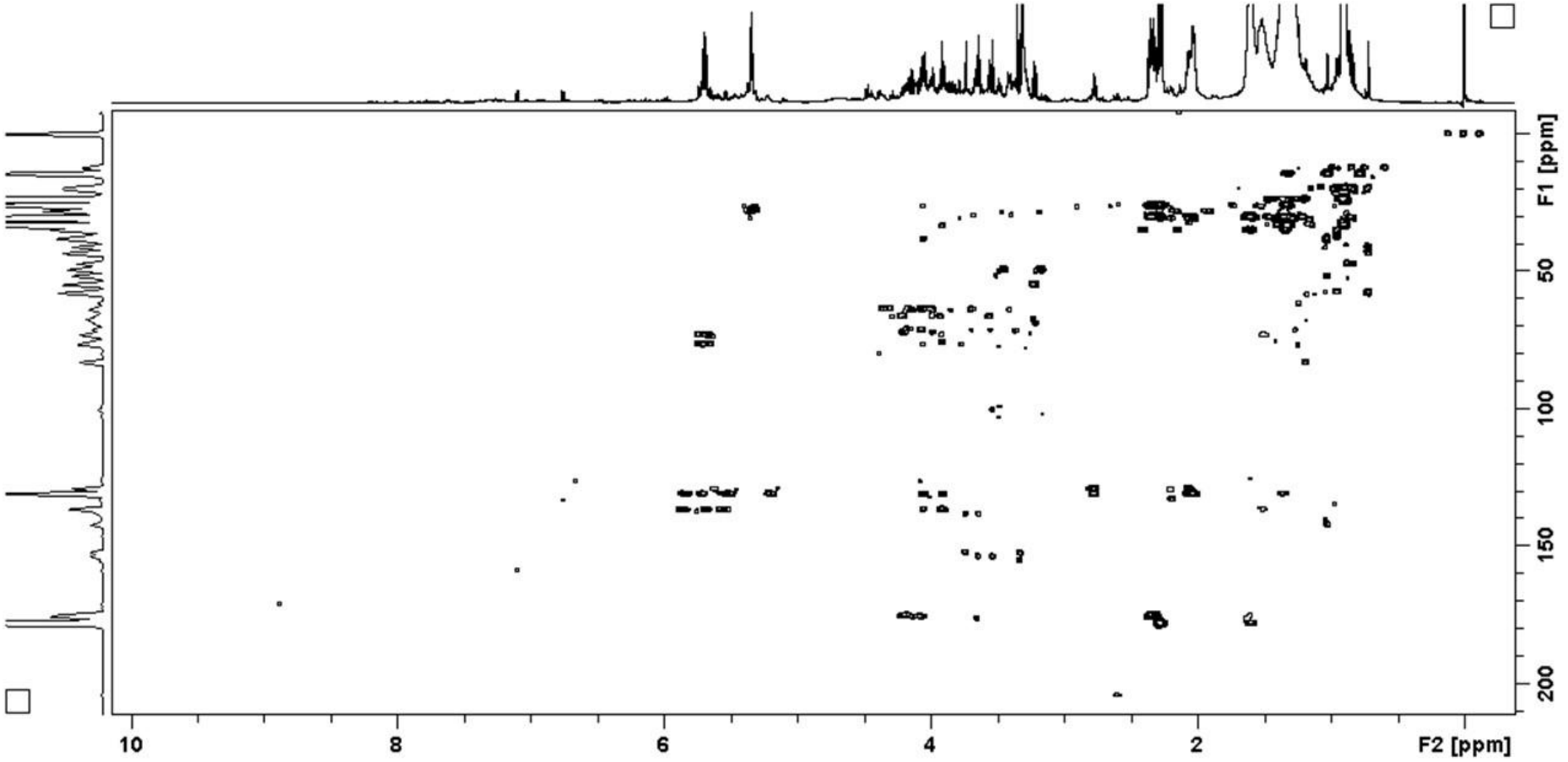


Figure S10

Espectro HMBC ^{1}H-^{13}C das frações fenólicas das sementes (PFS) (11,74 T, CD_3OD).



Food Chemistry Advances 4 (2024) 100683

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry Advances

journal homepage: www.elsevier.com/locate/focha

Theobroma spp.: A review of it's chemical and innovation potential for the food industry

Josiana Moreira Mar [a,b], Edson Queiroz da Fonseca Júnior [b,c], Renilto Frota Corrêa [b], Pedro Henrique Campelo [d], Edgar Aparecido Sanches [e], Jaqueline de Araújo Bezerra [a,b,*]

[a] Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus 69067-005, Brazil
[b] Analytical Center of the Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas (IFAM), Campus Manaus Centro, Manaus 69020-120, AM, Brazil
[c] Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Amazonas, (UFAM), Manaus 69067-005, Brazil
[d] Department of Food Technology, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa 36570-900, MG, Brazil
[e] Laboratory of Nanostructured Polymers (NANOPOL), Materials Physics Department, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus 69067-005, AM, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Antioxidant
Phenolic compounds
Flavonoids
Cocoa

ABSTRACT

Nowadays, Brazil is considered one of the countries that still has a great biodiversity of fauna and flora, and within this wide diversity, the Malvaceae family stands out, presenting 243 genera and 4,300 species. In this family, the genus *Theobroma.* Is highlighted for the economic value of multiple applicability in food, nutritional, medicinal and craft sectors. Due to its importance, the major objective of this review was to compile the main articles of the last 10 years on the *Theobroma* spp. based on chemical, biological and pharmacological properties, as well as applications and patents of functional products. Of the 20 species of the genus *Theobroma* spp. reported in experimental studies, it was observed that its chemical composition is rich in phenolic acids, such as p-coumaric acids, caffeic and chlorogenic, as well as flavonols (catechin and epicatechin), flavones and derivatives such as hypoletin. Thus, this study shows the technological prospection based on the worldwide patent landscape.

1. Introduction

The Amazon rainforest has one of the highest rates of biodiversity in the world. It is a gene pool for many animal and plant species and an endless source of variability for endemic species, including *Theobroma* spp., a prominent genus of the Malvaceae family, formerly called Sterculiaceae. *Theobroma* spp. is distributed in the rainforests of the southern hemisphere, from Mexico to the southern Amazon rainforest (Giustina et al., 2014).

The Malvaceae family, presents species that are part of the list of medicinal plants and, therefore, with relevance for chemical and pharmacological studies. This family contains 246 genera and more than 4225 species distributed worldwide, specifically in tropical and temperate regions, and in Brazil there are approximately 80 genera and 400 species found (Giustina et al., 2014; Mar et al., 2021; Pérez-Mora et al., 2018).

The *Theobroma* genus has 20 species, which 9 are native to the Amazon region. These species are a vital resource for indigenous communities in Latin America and other communities in countries with a tropical climate distributed across different continents such as Asia and Africa. It is part of the human and animal diet in the Amazon, with potential interest in the agro-industrial sector (Motamayor et al., 2013).

Theobroma spp. fruits have a pleasant smell and taste, it also has multiple uses in the manufacture of juices, jellies, ice cream, liqueurs, marmalades and other products. Although they are cultivated only at a regional level, some species such as *T. bicolor* Bonpl. (macambo or bacao) and *T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum (cupuaçu or cupu) are in the process of domestication and technification (Pérez-Mora et al., 2018).

The antioxidant activity and phenolic composition of the pulp juice of *T. cacao L., T. bicolor* and *T. grandiflorum* were described by Pérez-Mora et al. (2018), studies of cupuaçu pulp and seeds were reported by Pugliese et al. (2013) and according to Oliveira and Genovese (2013) the same activity has been discussed in composition of cocoa liquors.

The seeds of *T. cacao, T. bicolor* e *T. grandiflorum* are used in all of the world in the production of chocolate (roasted seeds), applied in sweets and cosmetics. It is important to emphasize that the close relatives of

* Corresponding author.
E-mail address: jaqueline.araujo@ifam.edu.br (J.A. Bezerra).

https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100683
Received 8 February 2024; Received in revised form 19 March 2024; Accepted 22 March 2024
Available online 27 March 2024
2772-753X/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

cocoa, from other *Theobroma* species, can be used in genetic improvement programs, as a source of genes related to the desired phenotypes, highlighting their disease resistance, drought tolerance, high protein content and other agronomic characteristics along with its economic interest (Motamayor et al., 2013).

An interesting and promising example of *T. speciosum* Willd. ex Spreng, a species native to the Amazon region, is popularly known as cocoaí, still little widespread in Brazil, despite its traditional areas of occurrence. It has agronomic importance for presenting a possible source of resistance genes for other species of the genus, in genetic improvement and great potential to produce derived foods for human consumption, it can also be found throughout the humid tropics and among the species of the genus (Colli-Silva & Pirani, 2020).

The efficient use of these species requires a detailed knowledge of their biology, especially from a genetic and molecular point of view; however, till this date, only a few studies have been published about this topic. A substantial equivalence analysis between commercial cacao and its wild relatives is needed as a preliminary step before validating, producing and commercializing Amazonian *Theobroma* species as a food alternative. This result will improve consumer confidence and acceptance, opening new markets interested in exotic fruits, avoiding problems of illicit crops (non-standard), encouraging good practices with applied technologies and increasing the income of family farmers or indigenous producers (Pérez-Mora et al., 2018).

In the southern hemisphere of Latin America, studies involving the fruits of *Theobroma* species are limited, mainly regarding their chemical composition and biological activities. The *T. cacao* widely used in the food industry, are rich in polyphenols and methylxanthines, which are related to the blockade of adenosine receptors, central nervous system stimulants, and beneficial effects on the cardiovascular system (Franco et al., 2013).

Tauchen et al. (2016) demonstrated the antiproliferative activity of *T. bicolor* seed in relation to cancer cells Hep-G2 (hepatocellular carcinoma) and HT-29 (colon carcinoma). Chemical and biological data of *T. angustifolium* DC, *T. mammosum* Cuatrec. & J. León, *Herrania mariae* (Mart.) Goudot, *T. microcarpum* Mart., *T. simiarum* Donn. Sm., *T. speciosum* Willd. Ex Spreng. and *T. guianense* (Aubl.) J.F. Gmel. are still scarce. The development of foods with functional properties is a growing field aiming to attend the new demands of the consumer market. Therefore, the insertion of new ingredients plays an important role in the composition of foods, as it exerts a great influence on the characteristics, adding value to the final product (for example, color, flavor, rheological properties, water and oil retention capacity), stimulating the productive chain of the species, the cultivation and generating employment and income for the human communities of rural producers (Silva et al., 2014).

Several studies have shown that peels, bagasse and seeds of *Theobroma* fruits are good sources of food nutrients and phytochemicals bioactives, including phenolic compounds, carotenoids and others. These co-products are promising sources of alternative food ingredients in the various branches of the food, pharmaceutical and other industries (Kababie-Ameo et al., 2022).

This review represents an updated and comprehensive compilation of articles published in the last 10 years on the genus *Theobroma* spp. The main objective was to show the chemical composition, as well as the chemical, biological and pharmacological properties, including the applications in patents of the species, belonging to this genus, to arouse the interest of researchers and entrepreneurs for the development of new functional products and processes of industrial production.

2. Research strategy and eligibility criteria

This review was searched in Scopus, Capes Periodics, Google Database and PubMed. The search was performed using the terms "*Theobroma* AND caffeine OR theobromine OR theophylline OR products OR nutritional OR chemical OR antibacterial OR activity", considering title, abstract and keywords. The search for data on chemical composition, constituents and biological activities of species of the genus *Theobroma* were realized in Scopus and PubMed. The keywords consisted of "*Theobroma* AND alkaloids OR organic acids OR flavonoids OR phenolic compounds OR biological OR activity", evaluating titles and abstracts. All of the articles resulting from the researched selection were read in their entirety, based on the adopted criteria. Following the steps: the elaboration of a tool with the following information: author, date, species, main constituents, quantification and identification of constituents and also biological activities. 30 articles were gathered for this selection of chemical composition. Published articles were considered from 2012 to May 2022. The selected articles reported the chemical composition and properties of *Theobroma* fruits, totalizing 56 articles.

Have been performed an analysis of 500 patents contained in the patent databases: GOOGLE PATENTS, USTPO and ESPACENET, using the Booleans: "Fruits of *Theobroma*" AND "Food Technology" AND "Functional Food" AND "Biotechnological application" AND "Medicinal Application". Patents (30) were selected using as an evaluative criterion fruits of *Theobroma* and their applications in the fields of Food Technology, Functional Foods, Biotechnological Application and Medicinal Application. The search was performed on November 28, 2022.

3. Chemical composition of *Theobroma* (malvaceae) species

The Malvaceae family comprises several classes of chemical compounds. In the case of phytochemical studies of this family, the present compounds, especially of the genus *Theobroma*, are alkaloids, organic acids, flavonoids and their derivations. Besides the classes of compounds mentioned, the family also has many studies with substances from the class of phenylpropanoids and derivatives, as well as many phenolic compounds, a class of considerable value since they have been associated with various health-promoting effects, such as prevention of different types of cancer and coronary heart disease (Perez-Vizcaino & Fraga, 2018).

The chemical composition of the genus *Theobroma* has high levels of fat consisting of stearic, oleic, palmitic and linoleic fatty acids, in varying amounts. Sterols, fibers, minerals and methylxanthine compounds such as theobromine, theophylline and caffeine were relevant in its composition, being also known for their rich polyphenol contents (Jean-Marie et al., 2021).

The main compounds quantified were alkaloids from the flour of the *T. cacao* species, with theobromine, caffeine and the two main catechins being found. The fruit peel had the highest theobromine content (10.21 μg /g), while the seed had the highest content of caffeine, epicatechin and catechin (1.11 μg/g, 3.40 μg/g e 3.09 mg/g), respectively.

Signs of organic acids were attributed to citric and malic acids, the phenolic compounds to protocatechuic acid, quercetin, quercetin pentoside and quercetin-3-*O*-glucoside (Mar et al., 2021), quercetin being reported in *T. cacao* (Sánchez-Rabaneda et al., 2003).

Caffeine, theobromine and theophylline occur naturally in a wide variety of foods and beverages such as coffee, cocoa, tea, yerba mate as well as energy drinks and are widely consumed throughout the world (Martínez-lópez et al., 2014).

Caffeine and theobromine are considered biomarkers for caffeinated beverages (Dozier et al., 2020). Although considerable amounts of caffeine and theobromine can be consumed from dietary sources (coffee, tea, cola drinks and chocolate), it is believed that only relatively small amounts of theophylline are ingested from the same sources. Theophylline occurs naturally in tea and in trace amounts in cocoa and coffee beans. Theobromine levels have been reported to represent only 0.15 %−0.46 % in different types of chocolate (Monteiro et al., 2016).

3.1. Alkaloids (methylxanthines)

Alkaloids, derived from the special (secondary) metabolism of plants, have as their primary function the protection of the species

against herbivores and pathogenic organisms (Huang et al., 2021). Some alkaloids (Fig. 1) were isolated from species of the genus *Theobroma* (Table 1). Of the different types of alkaloids, the *Theobroma* genus presents in its composition common purine alkaloids such as caffeine, theobromine and theocrine, found especially in seeds and leaves of different species of the genus. Purine alkaloids are secondary metabolites derived from purine nucleotides. Present in about 100 species in 13 orders of the plant kingdom (Ashihara & Crozier, 1999), including Malvales. Hammerstone et al. (1994) described the content of purine alkaloids by high performance liquid chromatography in seeds and leaves of eleven species of *Theobroma*, and showed that 1,3,7,9-tetramethyluric acid (theacrine) was the main purine alkaloid present in the samples. The authors have not detected the presence of theophylline in the studied samples.

3.2. Phenylpropanoids

Phenylpropanoids, obtained from the deamination of L-phenylalanine, are non-essential phytochemicals for the survival of plants, thus being classified as secondary compounds. In recent years, the attention given to the class is due to the substances present that carry out medicinal action as an antioxidant (Vladimir-Knežević et al., 2012), UV filter (Takshak & Agrawal, 2019), anti-inflammatory agents (Cunha et al., 2019), healing (Ambrosone et al., 2014), antibacterial and anticancer (Gao et al., 2019).

The genus *Theobroma* (Malvaceae) has two major classes of phenyl propanoids, such as cinnamic acid and to coopherol derivatives (Table 1). Two common cinnamic acid derivatives, p-coumaric acid and caffeic acid, and two cinnamic acid derivatives containing quinic acid, p-coumaroylquinic acid and chlorogenic acid, were isolated from *T. cacao* leaf by Jalal and Collin (1977). The study from Tauchen et al. (2016) characterized the samples by UHPLC-MS/MS detecting the same constituents in leaves, seeds and pericarp of *T. bicolor, T. cacao* and *T. grandiflorum*. In another study, Bruni et al. (2002) isolated four types of tocopherol, α, β, γ and tocopherol δ, from the seed of *T. subincanum*. Febrianto and Zhu (2022) detected the derivative of the phenolic acid Clovamide in samples of *T. grandiflorum, T. bicolor* and *T. subincanum*.

3.3. Flavonoids

Flavonoids are an important class of natural products found in fruits, vegetables and some beverages. They have a polyphenolic structure and are known to be synthesized in specific locations in the plant and are mainly responsible for the color and aroma of the flowers, pollination and dispersal of seeds and spores, besides the development of some seedlings (Griesbach, 2010). Flavonoids from the Malvaceae family include flavones, flavonols and their derivatives (Table 1). Simple flavonols such as catechin and epicatechin have been found in *T. cacao* grains by Quiroz-Reyes and Aguilar-Méndez (2022) and seeds of *T. grandiflorum* by De Oliveira et al. (2015). Ramos-Escudero et al. (2021) isolated procytian (proanthocyanidin) in *T. cacao* beans and Pugliese et al. (2013) flavone vitexin obtained from *T. grandiflorum* seeds. Flavone glycosides, such as hypoletin, quercetin and isoscutelarein are distributed in seeds and flowers of species of the *Theobroma* genus (Febrianto & Zhu, 2022a; Mar et al., 2021; Pugliese et al., 2013).

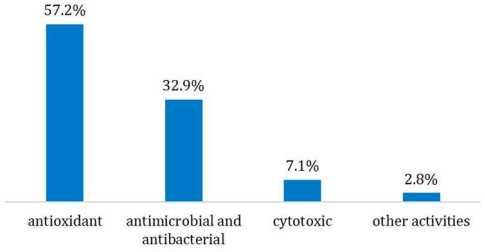


Fig. 1. Properties reported in studies of *Theobroma* spp.

4. Antioxidant activity of the genus *Theobroma*

The FRAP from the grain flour exhibited a weak reducing power relative to the pod bark, but the total phenolic content (111.05 mg GAE/g flour) was higher than that reported for cocoa pod bark flour (5.4 a 16.6 mg GAE/g flour). Furthermore, the DPPH content reported for wheat flours varied between 4 and 5 μmol equivalents of Trolox/g, lower value than cocoa residue flours (46 and 87 μmol equivalents of Trolox/g) and cocoa bark flours, respectively (Vargas-arana et al., 2022).

Lee et al. (2003) investigated the total phenolic and flavonoid concentration of cocoa, black tea, green tea, and red wine. The phenolic and flavonoid content of the cocoa per serving was 611 mg of gallic acid equivalents (GAE) and 564 mg of epicatechin equivalents (ECE), respectively. As a result, the highest amount of phenolic and flavonoid content was detected in cocoa as compared to black tea (124 mg GAE and 34 mg ECE), green tea (165 mg GAE and 47 mg ECE), and red wine (340 mg GAE and 163 mg ECE). Moreover, ABTS and DPPH radical scavenging activity assays indicated the highest antioxidant activity in cocoa.

Comparing the antioxidant potential of *T. cacao* species from French Guiana and Brazil, French-Guyanese seeds showed DPPH activity equivalent to two mixtures of Brazilian cacao hybrids capable of 324.06 ± 51.7 and 363.3 ± 120.1 μmol TE/g of dry matter, respectively. For the ORAC essay, Guyana showed a higher capacity when compared to seeds of the *T. cacao* species from Africa Forastero (303 ± 5 μmol TE/g dry matter). In the analysis of total polyphenols, for cupuaçu pulp, the values varied from 27.9 ± 1 mg EAG/100 g to 32.5 ± 1 mg EAG/100 g (Jean-Marie et al., 2021).

In the literature, *Theobroma* species have represented a great pharmacological potential (Fig. 1), having as main activities described the antioxidant potential (57.2 %), antimicrobial activity (18.1 %), antibacterial activity (14.8 %), cytotoxic activity (7.1 %) and hematic, antiobesity and cytoprotective activity (2.8 %). This demonstrates the importance of gender-related studies for the development of future products.

5. Chemical, biological and pharmacological properties

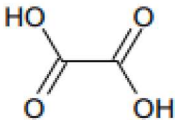
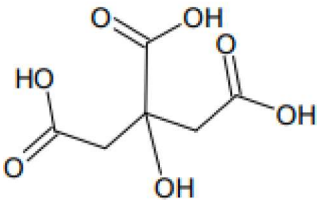
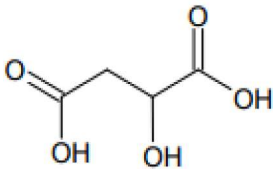
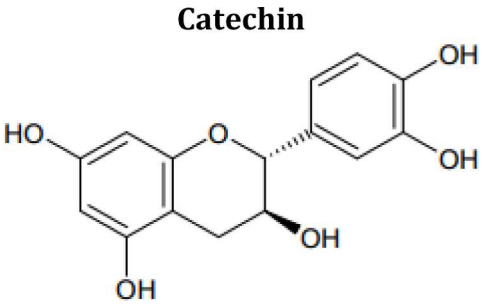
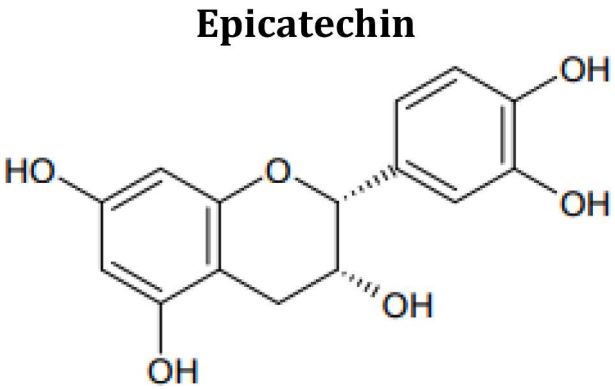
5.1. Food applications

Grains from *T. grandiflorum, T. bicolor*, and *T. subincanum* species showed high potential as alternatives for functional food ingredients, in addition to their flavoring potential. *T. bicolor* samples with their white color may be suitable for the development of products resembling chocolate with a shiny appearance (Febrianto & Zhu, 2022b). Substantial equivalence studies were conducted on three *Theobroma* spp., *cacao, bicolor*, and *grandiflorum* through analysis of chemical composition and protein profile of fruits (pulp juice and seeds). Principal component analysis of sugar content, organic acid, and phenol in pulp juice revealed equivalence among the three species, with differences in some compounds leading to distinct organoleptic properties (Pérez-mora et al., 2018).

To preserve the compounds and their activity, cupuaçu pulp was subjected to spray drying using blends of inulin/maltodextrin as wall materials, under simulated intestinal fluid conditions, resulting in the release of 76.7 % of the ascorbic acid present in the species. These findings indicate the great potential of cupuaçu microencapsulates as a strategy to enhance the value of Amazonian fruits (Acosta-Vega et al., 2023). Research on the addition of cupuassu pulp and flour has contributed to improving the physicochemical and sensory characteristics of fermented dairy beverages, potentially increasing their nutritional value (Gutiérrez-Álzate et al., 2023).

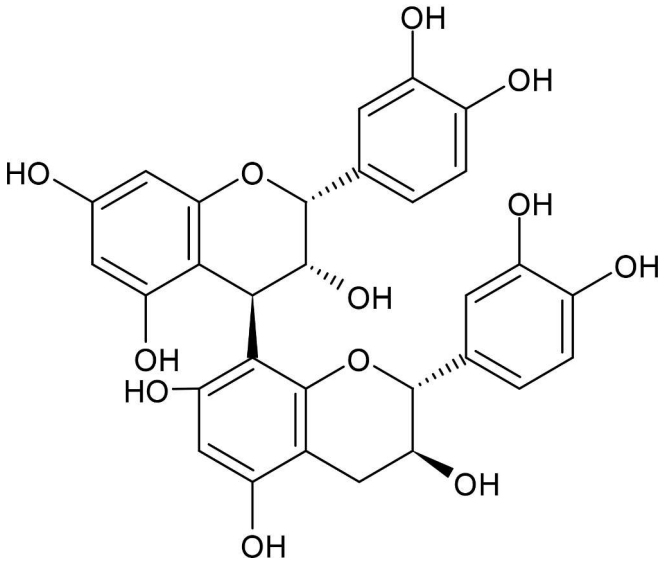
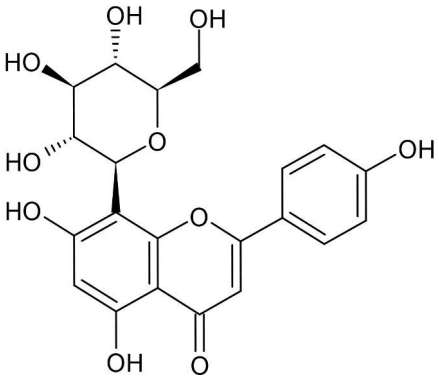
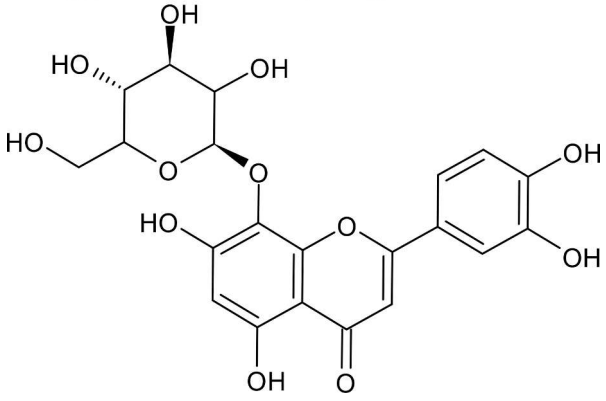
A fermentation process of cupuaçu juice (*T. grandiflorum*) using the

Table 1
. Summary of common bioactive compounds identified in *Theobroma* spp.

Chemical class	Compound name	Source (Plant Part)	Analytical method	Reference
Organic acids	**Oxalic acid** 	*T. cacao* (pericarp)	HPLC-PDA	(Pérez-Mora, Jorrin-Novo & Marina, 2018)
	Citric acid 	*T. bicolor* (pericarp) *T. cacao* (pericarp) *T. grandiflorum* (seeds; bark) *T. speciosum* (flowers)	HPLC-PDA ^{1}H NMR	(Pérez-Mora, Jorrin-Novo & Marina, 2018); (Mar et al., 2021); (Andrade et al., 2022)
	Malic acid 	*T. bicolor* (pericarp) *T. cacao* (pericarp) *T. grandiflorum* (bark) *T. speciosum* (flowers)	HPLC-PDA ^{1}H NMR	(Mar et al., 2021); (Pérez-Mora, Jorrin-Novo & Marina, 2018); (Andrade et al., 2022)
Flavonoids	**Catechin** 	*T. cacao* (beans) *T. grandiflorum* (seeds)	HPLC-DAD UFLC-DAD	(Oliveira & Genovese, 2013); (Quiroz-Reyes & Aguilar-Méndez, 2022); (Andrade et al., 2022)
	Epicatechin 	*T. cacao* (beans) *T. grandiflorum* (seeds)	HPLC-DAD; UFLC-DAD	(Quiroz-Reyes & Aguilar-Méndez, 2022); (Andrade et al., 2022)

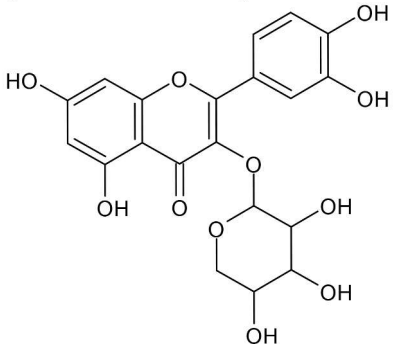
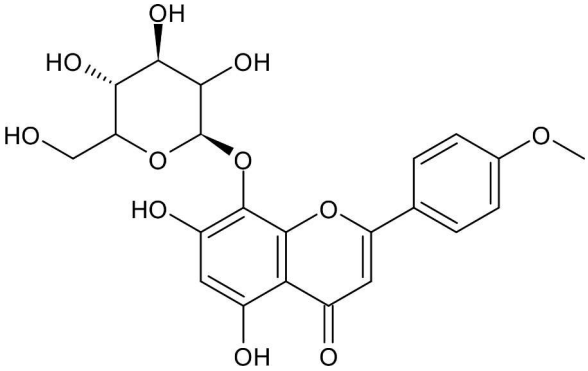
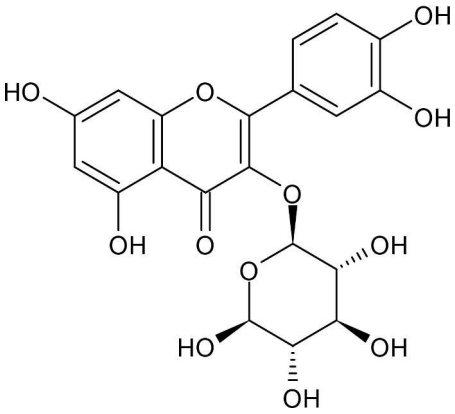
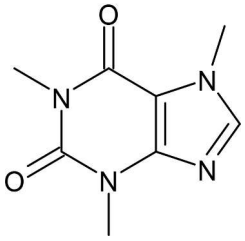
(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Chemical class	Compound name	Source (Plant Part)	Analytical method	Reference
	Procyanidin 	*T. cacao* (beans)	HPLC-DAD	(Ramos-Escudero et al., 2021)
	Vitexin (apigenin-8-C-glucoside) 	*T. grandiflorum* (seeds)	HPLC-DAD/MS	(Pugliese et al., 2013)
	Hypolaetin 8-*O*-β-D glucuronide 	*T. grandiflorum* (seeds) *T. subincanum* (seeds)	HPLC-DAD/MS	(Pugliese et al., 2013); (Febrianto & Zhu, 2022)

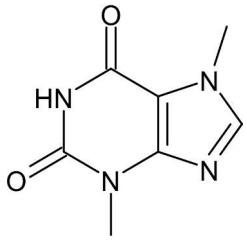
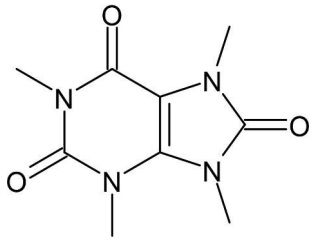
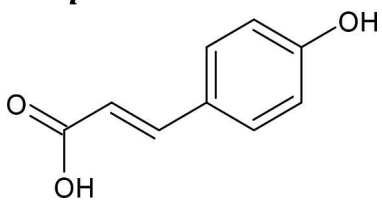
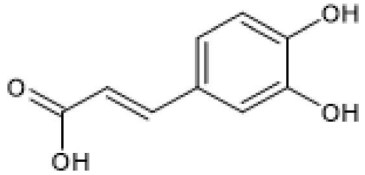
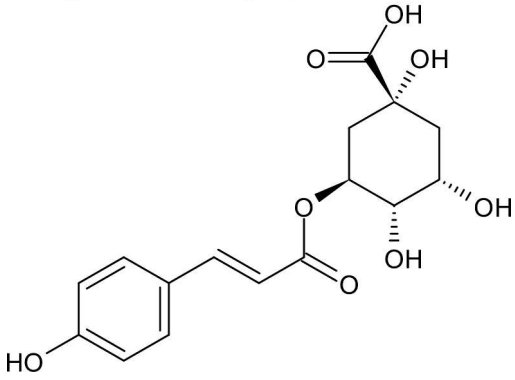
(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Chemical class	Compound name	Source (Plant Part)	Analytical method	Reference
	Quercetin 3-*O*-pentoside 	*T. grandiflorum* (seeds)	HPLC-DAD/MS	(Pugliese et al., 2013)
	Isoscutelarein 8-*O*-β-D-glucuronide 	*T. grandiflorum* (seeds)	HPLC-DAD/MS	(Pugliese et al., 2013)
	Quercetin 3-*O*-glucoside 	*T. speciosum* (flowers)	^{1}H NMR	(Mar et al., 2021)
Alkaloids	**Caffeine** 	*T. angustifolium* (seeds) *T. bicolor* (seeds; leaves) *T. cacao* (seeds; leaves) *T. grandiflorum* (leaves) *T. mammosum* (leaves) *T. simiarum* (leaves) *T. speciosum* (leaves)	GC–MS; HPLC; HPLC-MS	(Hammerstone, Romanczyk & Aitkent, 1994); (Pereira-caro et al. 2013); (Marx & Maia, 1991); (Dozier, Kim & Russell, 2020)

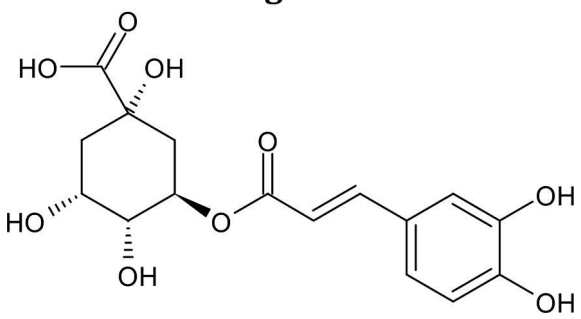
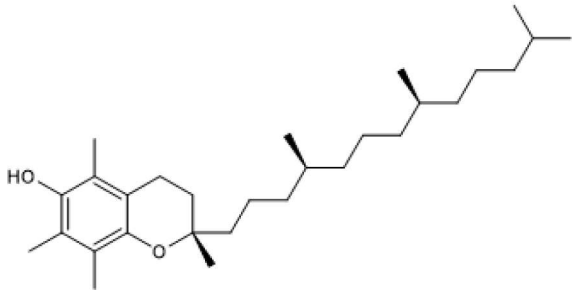
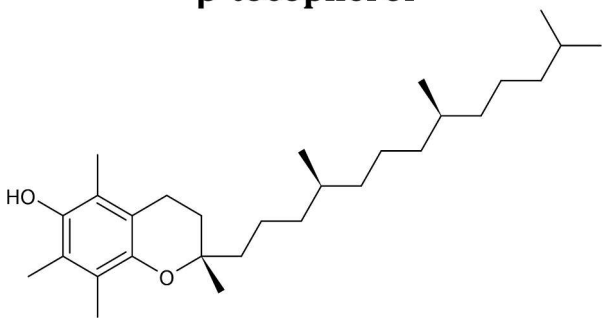
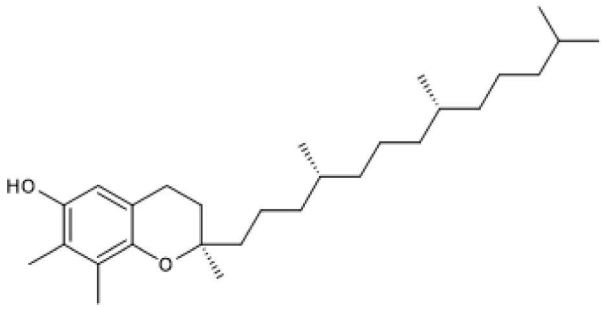
(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Chemical class	Compound name	Source (Plant Part)	Analytical method	Reference
	Theobromine 	*T. angustifolium* (seeds) *T. bicolor* (leaves) *T. cacao* (seeds; leaves) *T. grandiflorum* (seeds) *T. mammosum* (seeds) *T. mariae* (seeds) *T. speciosum* (seeds)	HPLC-MS	(Hammerstone, Romanczyk & Aitkent, 1994); (Marx & Maia, 1991); (Dozier, Kim & Russell, 2020)
	Theacrine 	*T. angustifolium* (seeds) *T. bicolor* (seeds) *T. grandiflorum* (seeds) *T. mammosum* (seeds) *T. microcarpum* (seeds) *T. speciosum* (seeds) *T. subincanum* (seeds)	HPLC-MS	(Hammerstone, Romanczyk & Aitkent, 1994); (Marx & Maia, 1991); (Dozier, Kim & Russell, 2020)
Phenolic compounds (Phenylpropanoids)	***p*-coumaric acid** 	*T. bicolor* (seeds; pericarp) *T. cacao* (seeds; leaves; pericarp) *T. grandiflorum* (seeds; leaves; pericarp)	MS/MS	(Tauchen et al., 2016)
	Caffeic acid 	*T. bicolor* (seeds; pericarp) *T. cacao* (seeds; leaves; pericarp) *T. grandiflorum* (leaves)	MS/MS	(Tauchen et al., 2016); (Jala & Collin, 1977)
	***p*-coumaroylquinic acid** 	*T. cacao* (leaves)	MS/MS	(Jala & Collin, 1977)

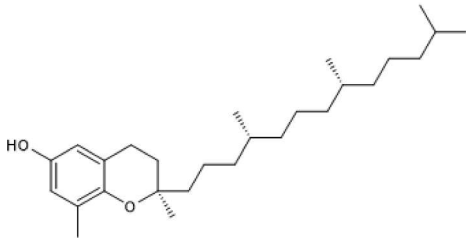
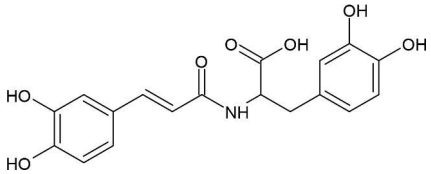
(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Chemical class	Compound name	Source (Plant Part)	Analytical method	Reference
	Chlorogenic acid 	*T. bicolor* (pericarp) *T. cacao* (leaves) *T. grandiflorum* (seeds; leaves; pericarp)	MS/MS	(Jala & Collin, 1977); (Tauchen et al., 2016)
	α-tocopherol 	*T. subincanum* (seeds)	HPLC-UV/ vis	(Bruni et al., 2002)
	β-tocopherol 	*T. subincanum* (seeds)	HPLC-UV/ vis	(Bruni et al., 2002)
	γ-tocopherol 	*T. subincanum* (seeds)	HPLC-UV/ vis	(Bruni et al., 2002)

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Chemical class	Compound name	Source (Plant Part)	Analytical method	Reference
	δ-tocopherol 	*T. subincanum* (seeds)	HPLC-UV/vis	(Bruni et al., 2002)
	Clovamide 	*T. bicolor* (beans) *T. grandiflorum* (beans) *T. subincanum* (beans)	HPLC-DAD/MS	(Febrianto & Zhu, 2022)

probiotic bacterium *Lactiplantibacillus plantarum* Lp62 resulted in increased phenolic content, flavonoids, and antioxidant potential. The fermentation enhanced the functional properties of cupuaçu juice, making it an effective vehicle for delivering the probiotic bacterium L. plantarum Lp62 (Lúcia et al., 2017). The study investigated the impact of ultrasound-assisted homogenization (US) and arabic gum (GA) on the colloidal stability of cupuaçu juice. The results showed that increasing energy density and GA concentration resulted in higher juice viscosity, reducing sedimentation. This increase in energy density was attributed to greater vitamin C bioavailability in the cupuaçu juice serum. It is concluded that the use of US and GA may be a promising strategy for the food industry to maintain the physicochemical properties of cupuaçu juice during storage (Silva et al., 2019).

An investigation into the analysis of the complex composition of cocoa beans during fermentation stages provided crucial insights into assessing their quality and nutritional attributes. Besides contributing to the development of flavor precursors, the results suggest that fermenting cocoa beans to the optimal point reduces the risk of heavy metal contamination and positively enhances the bioavailability of essential minerals for human nutrition (Millena et al., 2023). As alterations in protein composition during cocoa seed ripening and maturation, along with potential modifications during post-harvest processing (fermentation, drying, and roasting), have been investigated. These studies have revealed a significant reservoir of potential bioactive compounds derived from the protein components, which could be utilized in food functionalization (Rawel et al., 2019).

A study was conducted to determine the profile of bioactive compounds in cocoa residues, including mucilage and bean husks, and to assess their antioxidant activity in two varieties. The results indicated the presence of bioactive compounds in the external parts of the fruits, such as bean husks, pod husks, mucilage, and placenta, which are considered byproducts. These cocoa residues showed potential to be used as functional ingredients in various applications in the food industry (Llerena et al., 2023). The iced tea derived from cocoa almond husks offers a cost-effective and environmentally friendly way to boost antioxidant consumption. The powder is rich in dietary fiber (37.5 %), lipids (19.7 %), proteins (14.6 %), and contains 25.7 mg of gallic acid equivalents per gram. Retaining 85.3 % of the phenolics, the preferred formulation comprises 30 g of powder mixed with 1 liter of water (Lopes et al., 2021).

Enhancing local diets with nutritionally rich ingredients can have a significantly positive impact on the health status of local populations. By introducing foods that are sources of essential nutrients such as vitamins, minerals, and antioxidants, people can improve their overall health, strengthen their immune systems, and reduce the risk of nutritional deficiencies and diet-related diseases. This not only promotes individual well-being but also contributes to the sustainable development of communities by increasing productivity, reducing healthcare costs, and enhancing overall quality of life.

5.2. Applications medicinal

The use of the *Theobroma* genus as food has been widely proposed for a long time, as this is common for byproducts of food processing. The *T. cacao* seed bark, for example, has considerable amounts of proteins, minerals and vitamins that makes it an interesting and inexpensive material for human and animal food. (Table 2) (Rojo-Poveda et al., 2020).

Despite the presence of theobromine, studies have revealed positive effects when using diets fortified with the right amount of bark from the seed of *T. cacao* for poultry, rabbits, ruminants or pigs.

It is widely accepted that oxidative stress is involved in the development and/or secondary pathology of several human diseases. Several studies show evidence that the regular consumption of plant-based foods is associated with a lower risk of incidence of these (Ponce-Sánchez et al., 2021). It is believed that the beneficial health effect of plant-based foods can be mainly credited to the number of phenolic compounds and their ability to promote the antioxidant effect. Currently, antioxidant activity is mostly examined in common food plants such as fruits and vegetables. However, recent studies indicate that other categories of plants, such as medicinal plants, also have significant antioxidant efficacy (Tauchen et al., 2016).

An investigation of *T. cacao* by-products for the extraction of bioactive compounds using subcritical water revealed that the extracts contained levels of total proteins, total phenols, and total flavonoids. The antiradical activity against DPPH radicals (IC_{50} ~ 11–13 μg/mL) and ABTS radicals (IC_{50} ~ 7–9 μg/mL), as well as the total antioxidant activity (~14–20 mg EAK/100 g DE), indicated suitability for formulating a functional cosmetic product (Švarc-Gajić et al., 2023).

The antidiabetic capacity was assessed, revealing that among sixteen Brazilian native fruits and six commercial frozen pulps, cupuassu fruit exhibited the most robust inhibition of α-amylase activity (De Souza Schmidt Gonçalves et al., 2010). Recently, the impact of the daily consumption of cupuassu liquor, derived from fermented seeds, on oxidative stress and lipid profile in rats with streptozotocin-induced diabetes was examined. The findings indicated that supplementing with cupuassu

Table 2
Form of consumption of parts of *Theobroma* species.

BOTANICAL NAME	PART(S) TESTED	WAY OF CONSUMPTION	REFERENCE
T. bicolor	Pericarp, Aril, seed	Pulp is eaten fresh, seeds are consumed roasted	(Tauchen et al., 2016)
T. cacao	Leaf, pericarp, Aril, seed	Pulp is eaten fresh, seeds are consumed roasted; leaves used as infusion/decoction	(Tauchen et al., 2016)
	Bark, pulp and seed	Nanoparticles (Ag nps) using silver nitrate and extracts of different parts of *T. cacao*: the husk (h-Ag nps), pulp (p-Ag nps), and seed (s-Ag nps)	(Thatikayala et al. 2019)
	Bark e seed	Assessment of the antibiofilm potential of hydroalcoholic extracts from *T. cacao* (cacao) waste	(Binartha, Kardinal, and Widyarman 2021)
	Cocoa bean	Proposing the elaboration of chocolate cake with substitution of wheat flour by cocoa bean shell powder (csp).	(Nogueira et al. 2022)
	Bean	Cocoa tea made from the husk of the cocoa bean	(Rojo-poveda et al., 2020)
	Leaf, pericarp, Aril, seed	The use of cocoa on diabetic neuropathy.	(Kababie-Ameo et al., 2022)
	Fruit	Cacau liqueurs	(Nascimento et al. 2014)
	Fruit	Cacau liqueurs	(Melo Neto et al. 2020)
T. grandiflorum	Leaf, pericarp, aril	Pulp is eaten fresh, seeds are consumed roasted; leaves used as Infusion/decoction	(Tauchen et al., 2016)
	Fruit juice pulps	Cytotoxicity and antimicrobial potential of methanolic extracts of *T. grandiflorum* (cupuaçu) against clinical isolates of uropathogenic *E. coli.*	(Chen et al. 2015)
	Pulp	Fruit pulp flours as complementary antioxidants, prebiotics, immunomodulators and dietary anti-inflammatories	(Curimbaba et al., 2020)
	Seed	Microencapsulated extract of cupuaçu seed by-product	(Nascimento et al. 2014)
	Fruit	Formulation of phytosomes containing cocoa pod extract, in the preparation of facial serum	(Priani et al. 2019)
	Bark	Microencapsulated cocoa bark phenolic extracts for bakery products	(Grassia et al. 2021)
	Fruit	Cupuaçu fermented drinks	(Rosa et al. 2020)
	Pulp	Goat's milk yogurt made with cupuaçu pulp	(Costa et al. 2017)
	Fruit	Cocoa honey obtained from the fruit	(Nascimento et al. 2014)
	Fruit	Cupuaçu liqueurs	(Nascimento et al. 2014)

liquor led to decreased plasma triacylglycerol levels, elevated HDL cholesterol levels, and enhanced plasma antioxidant capacity (T. B. De Oliveira & Genovese, 2013). Persistent consumption of a phenolic-rich extract derived from cupuassu liquor, in the context of a high-fat diet, resulted in diminished lipid peroxidation, heightened plasma antioxidant capacity, and enhanced glucose tolerance (K. de De Oliveira et al., 2015).

Several clinical studies have also demonstrated the cardioprotective effects of cocoa oral supplementation, preventing chronic cardiovascular events, reducing blood pressure, improving endothelial dysfunction, suppressing the formation of atherosclerotic lesions, and inhibiting atherosclerosis (Sesso et al., 2022).

The genus *Theobroma* features species abundant in secondary metabolites, with a notable presence of phenolic compounds, among which theobromine stands out as an example (Meng et al., 2024). The theobromine alkaloid showed the ability to stimulate the formation of apatite, which increases the crystallinity of tooth enamel, making it more resistant to acid dissociation. Due to its promising results when added to other types of materials, the addition of theobromine to glass ionomer cements (GIC) could enhance its anti-cariogenic effects without altering the mechanical properties of the material (Badrie et al., 2015). Moreover, there is growing evidence indicating that theobromine might have the ability to promote bone growth. In vitro studies have shown that theobromine can enhance the osteogenic capacity of human mesenchymal stem cells (hMSCs) and accelerate skeletal development in rats (Clough et al., 2017).

Theobromine has also exhibited neuroprotective properties, demonstrating its capacity to prevent neuronal damage and improve motor memory and cognitive regulatory functions. Due to its low incidence of side effects and minimal harm to the human body at suitable doses, theobromine and its derivatives hold potential as effective agents for preventing brain-related disorders, offering significant prospects in the medical field (Meng et al., 2024). Theobromine has shown the ability to enhance memory in the hippocampus, influencing the activity of hippocampal neurons and protecting them from harm by regulating adenosine receptors (Valada et al., 2022). In a study conducted by Wen et al. (2021), the impact of theobromine on a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mouse model was investigated. The findings showed that theobromine resulted in decreases in body weight and liver weight, along with improvements in liver morphology.

However, it is important to note that further research is needed to fully understand the effects of theobromine on human health and to determine the optimal doses to achieve benefits without adverse effects.

5.3. Antibacterial activity and anticariogenic effects

The silver nanoparticles (AgN) Pssynthesized from extracts of leaves and pods of cocoa plants showed smaller particle sizes and higher purity in the range of 10–100 nm. This indicates that the cocoa leaf extract has richer phenolic compounds than the pod extract, resulting in a different rate of nucleation and growth of the AgNPs, resulting in antibacterial activity against *E. coli,* with zone of inhibition of 21 mm in a concentration of 0.15 g/mL of the aqueous extract (Efavi et al., 2022).

Biological and antioxidant activities of aqueous extracts of cocoa pod barks revealed that ethyl acetate extracts were active against *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Candida albicans*, which had the concentration of 0,01 mg/mL, the inhibition diameters were (6.62 ± 0.10), (6.52 ± 0.02) and (11.72 ± 0.36) mm, respectively (Wheni et al., 2021).

The cocoa bean husk is one of the main by-products of chocolate manufacturing and has several compounds with biofunctionality. It can function as an antibacterial agent, and its action is mainly reported against *Streptococcus mutans* (Campos-Vega et al., 2018). *T. cacao* pod shell extract of both variants (yellow and purple) showed good antioxidant activity and antidiabetic activity with IC_{50} as of 41.3 and 44.5 μg/mL for the DPPH assay and 41.6 and 27.7 μg/mL for the inhibitory assay of α-glucosidase, respectively. Meanwhile, for the antibacterial test, the pod shell of *T. cacao* of both variants also had the most active extracts with MIC (minimum inhibitory concentration) from 0.62 mg/mL against *S. aureus* (Wheni et al., 2021).

Active compounds derived from plants could be used as substitutes for pharmaceuticals to control diseases caused by microorganisms. The antibacterial potential of the hydroalcoholic extract of the leaves of the fruits from *T. cacao* species was evaluated on gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* and gram-negative bacteria *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa.* The results obtained for gram-negative bacteria, antibacterial potential was observed only in *Pseudomonas aeruginosa* in all its concentrations (Luiz et al., 2016).

The 30 % aqueous extract of *T. cacao* was highly efficient against the broad spectrum of clinical isolates of gram-negative and gram-positive bacteria (*Klebsiella pneumoniae, Proteus meirabilis, Proteus vulgaris, Salmonella typhimurium, S. typhi, Staphylococcus aureus, S. epidermidis, S. saprophytics* and *Streptococcus pyogenes*), with more effective behavior than the commercially available antibiotic ciprofloxacin, in addition to a high inhibition against adherents and biofilm formation (Wheni et al., 2021).

The cocoa shell (*T. cacao* L.) has antioxidant and antimicrobial activity with potential as a natural food preservative, but in the use of cocoa husk extract it presented a disadvantage due to its short shelf life and limited application in food, so one of the efforts that can be made is to encapsulate the extract, this study concluded that encapsulated extract of cocoa husk using 20 % maltodextrin showed the highest antioxidant and antimicrobial activity compared to other treatments, having a concentration of 30 %; 40 %; 50 % and 60 %, but for the treatment of 20 % and 30 % there is no difference. Ethanol extracts from fruit peels can be made into encapsulated forms which are very likely to be used as natural preservatives (Hasanuddin et al., 2019). In addition to that, the plant extract of *T. cacao* alone or combined with conventional antibiotics showed benefits in the treatment of infections involving multidrug-resistant bacteria (Silva et al., 2014).

5.4. Centesimal composition

Theobroma bicolor is widely distributed in the neotropical region with great potential for economic use. The seeds, as well as the flowers of *T. bicolor*, have a high nutritional value. Seed nutrients are high in protein, fat, carbohydrates and fiber, as well as copper, magnesium, manganese, potassium and zinc (Ponce-Sánchez et al., 2021). When reviewing the use of the species, the pulp and grains of the species *T. bicolor* are mainly used for the preparation of sweets (marzipan, nougat and marshmallow), chocolate (mixture of patashte and cocoa seeds), beverages such as atole, pozol, powder and popo, and in a smaller extent, they are consumed as fresh fruits (Parada-Berríos et al., 2022).

Theobroma cacao is considered a super food due to its high nutrient content and proven health benefits, its beans are high in carbohydrates (31 %), protein (11 %), fat (54 %), fiber (16 %) and minerals (Shahanas et al., 2019). The knowledge of bioactive compounds in cocoa and cocoa products suggests that they can be considered as part of healthy nutritional foods and health promoters. It provides a wide variety of valuable food products and has potential health benefits (Campos-Vega et al., 2018).

The cocoa beans contain over 300 volatile compounds, most of which are responsible for their distinctive aroma and flavor. The cocoa flavor is characterized by aliphatic esters, polyphenols, aromatic carbonyls and theobromine, which are primarily responsible for preventing rancidity in cocoa butter. A review of the composition of 1 g of powdered cocoa bean showed that it contains 3 % mineral elements (i.e. Copper [0.04 mg], Iron [0.14 mg], Manganese [0.04 mg], Magnesium [4.99 mg], Phosphorus [7.34 mg], Zinc [0.07 mg], Potassium [15.24 mg], Calcium [1.28 mg] and Selenium [0.14 µg], respectively), 5 % amino acids (i.e. Valine [11.77 mg], Isoleucine [7.60 mg], Tryptophan [2.93 mg], Threonine [7.76 mg], Leucine [11.90 mg], Lysine [9.83 mg] and Histidine [3.40 mg], respectively) (i.e. Carbohydrate [0.28 g], Total dietary fiber [0.37 g], Protein [0.20 g], and Total lipid fat [0.14 g], respectively), and < 1 % vitamins (i.e. Vitamin B2 [0.002 mg] and Niacin [0.02 mg], respectively) (Etaware, 2021).

The contents of the metals K, Mg, P and Ca found in the aqueous extracts of the species of *T. speciosum* constituted the following values, 115 ± 2 µg mL^{-1}, 18.4 ± 0.2 µg mL^{-1}, 7.0 ± 0.0 µg mL^{-1}, 3.1 ± 0.1 µg mL^{-1}. The flowers aqueous extract represents a new promising food source rich in antioxidant compounds (Mar et al., 2021).

The cupuaçu pulp is considered the most important part, it is consumed for its flavor, color and pleasant aroma, offering potential for the manufacture of derivative products, both industrially and handcrafted (Etaware, 2021). Both the pulp and the aroma extracted from it can be used as an input for the preparation of various products, such as alcoholic and non-alcoholic beverages, among others, which has attracted scientific interest over the last few years due to its bioactive compounds (Vriesmann & Oliveira, 2009). From the study realized with the pulp of the *T. grandiflorum* species, were obtained values of calcium content (13 mg/100 g), phosphor (21 mg/100 g), iron (0.5 mg/100 g), potassium (331 mg/100 g), sodium (3 mg/100 g), manganese (18 mg/100 g) and zinc (0.3 mg/100 g) (Ramos et al., 2022).

6. *Theobroma* spp. products

Among the by-products resulting from the processing of the *Theobroma* spp. are the seeds and bark, while in the cosmetics industry the residues are used empirically as fertilizer or are discarded. The residues generated in processing are not properly treated, with no use of seeds or peels, with seeds equivalent to 25 % of the weight of the fruit (Alba et al., 2021).

Cocoa pulp has a physical-chemical composition that enables the development of products such as nectars, liqueurs, jellies, vinegars, among others (Puerari et al., 2012). Cocoa honey is a regional name for the transparent liquid extracted from the pulp that surrounds the seed before the cocoa fermentation process, composed of water, fermentable sugars (10–18 %), non-volatile acids (0,77–1.52 % of citric acid) and pectin (0.9–2.5 %) (Alba et al., 2021). When we pay attention to the losses of cocoa byproducts and market demands, there is a need to develop products that can be included in human food (Freitas, 2017). Cupuaçu nectar was microbiologically safe, as well as with potential for commercialization, since they obtained similar results in sensory acceptance. This nectar formulation has high antioxidant capacity and high vitamin C contente (Freitas, 2017).

Obtaining flour of good physical quality in relation to its physical characteristics with good pH values, water content, titratable acidity, total sugar content and with high yield through the residues of the frozen cupuaçu fruit pulp, led to the use of the waste generated by the industrialization of the fruit, which could be an alternative for minimizing waste and controlling environmental wear (Puerari et al., 2012). The flours produced from co-products of the frozen cupuassu fruit pulp industry have considerable phenolic contents and expressive constituents of antioxidant capacity, have technological functional potential, and can be considered as possible raw materials for obtaining extracts rich in antioxidants or for extracting natural antioxidants in the food and pharmaceutical industries (Curimbaba et al., 2020).

The alcoholic formulation of 40 % of *T. cacao*, in which pH analysis data, titratable and fixed acidity, vitamin C, total and reducing sugars and alcohol content were obtained, remained stable during the commercial stability analysis period, with reductions being observed significant, but small, in the physical chemical parameters analyzed at time zero (0) to 90 days, proving to be a good alternative in the food industry (Alba et al., 2021). Regarding the physicochemical analyses, for the sparkling product of *T. grandiflorium*, it generated a product with more attractive sensory characteristics and with a higher nutritional quality (higher protein and carbohydrate content) (Curimbaba et al., 2020).

7. Patents of *Theobroma* spp .

The evaluation of patent deposits directly related to the *Theobroma* genus, proved the interest in research and development - R&D of products and processes correlated with their applications by countries, which sought individual protection, by country or Wold Intellectual Property Organization - WIPO through the Patent Cooperation Treaty – PCT described below: **Brazil** with 2 patents, **WIPO (PCT)** with 7 patents, **United States** with 7 patents, **Japan** with 2 patents, **Australia** with 1 patent, **South Korea** with 3 patents, **Canada** with 6 patents, **France** with 2 patents, **Philippines** with 1 patent, **European Patent Office** with

1 patent, **Romania** with 1 patent and **Russia** with 1 patent, however, there were deposits with double protection, for the same patent as an example between WIPO (PCT) and the country of origin or protection in two countries simultaneously, as described below: **WIPO (PCT)** and **Australia** with 1 patent, **Canada** and **France** with 1 patent in common, and **WIPO (PCT)** and **Canada** with 2 separate patents.

Of the evaluated application areas of the 30 patents involving the genus *Theobroma*; 26/30 patents were in the area of Food Technology, BR112013001959B1, US7521238B2, BR102019021218A2, WO2007062206A2, US20220338519A1, JP2003088372A, US11077162B2, (WO2019/153046Al, AU2019216877A1), US10543242B2, (WO2021074316A1, CA3154121A1), (WO2020225056A1, CA3135952A1), CA3056180A1, PH22018000886U1, WO2014018822A2, CA3056038A1, KR100923538B1, EP2934561B1, JP2008195652A, KR101139376B1, US20060134230A1, US20210046135A1, US20210236572A1, RO128712A2, CA2600301A1, WO2008134648A2 and RU2479313C2, which correspond approximately (86.66 %); 22/30 patents went to Functional Foods, BR112013001959B1, BR102019021218A2, WO2007062206A2, US20220338519A1, JP2003088372A, US11077162B2, (WO2019/153046Al, AU2019216877A1), KR101361186B1, PH22018000886U1, WO2014018822A2, CA3056038A1, KR100923538B1, EP2934561B1, JP2008195652A, KR101139376B1, US20060134230A1, US20210046135A1, US20210236572A1, RO128712A2, CA2600301A1, WO2008134648A2 and RU2479313C2, roughly corresponding (73.33 %); 10/30 patents apply to the area of Biotechnology, BR112013001959B1, US7521238B2, JP2003088372A, KR100923538B1, EP2934561B1, KR101139376B1, FR2904542A1, US20210236572A1, WO2008134648A2 and RU2479313C2, that correspond approximately (33.33 %) and 20/30 patents have Medicinal Application, BR112013001959B1, WO2007062206A2, US20220338519A1, JP2003088372A, US11077162B2, (WO2019/153046Al, AU2019216877A1), KR101361186B1, US10543242B2, (CA3098361A1, FR3080767A1), WO2016046375A1, KR100923538B1, EP2934561B1, JP2008195652A, KR101139376B1, FR2904542A1, US20210046135A1, US20210236572A1, RO128712A2, WO2008134648A2 and RU2479313C2, roughly corresponding (66.66 %). However, of the 30 patents analyzed and their respective applications, patents with multiple applications stand out, in ascending order: 5/30 patents have only 1 following field of application: (CA3098361A1, FR3080767A1), WO2016046375A1, (WO2021074316A1, CA3154121A1), (WO2020225056A1, CA3135952A1) and CA3056180A1, which correspond to 16.66 %, 10/30 patents that have 2 fields of application such as: US7521238B2, BR102019021218A2, KR101361186B1, US10543242B2, PH22018000886U1, WO2014018822A2, CA3056038A1, US20060134230A1, FR2904542A1 and CA2600301A1, that express 33,33 %, 7/30 patents present 3 fields of application in the sequence: WO2007062206A2, US20220338519A1, US11077162B2, (WO2019/153046Al, AU2019216877A1), JP2008195652A, US20210046135A1 and RO128712A2, that provided 23.33 % and 8/30 patents demonstrated 4 fields of application such as: BR112013001959B1, JP2003088372A, KR100923538B1, EP2934561B1, KR101139376B1, US20210236572A1, WO2008134648A2 and RU2479313C2, corresponding to 26.66 % of the total number of patents selected.

The analysis of the thirty selected patents related to the application of *Theobroma* fruits allowed us to observe that industrial interest in the area of food technology represented 86.66 % of the patents, followed by functional foods with 73.33 %, followed by medicinal application with 66.66 % and in the area of biotechnology with 33.33 %. Demonstrating the power and diversity of markets, involving these products or processes applied to industries with multiple applications, always looking for innovative products to improve the quality of life of human beings (Fig. 2; Table 3).

For the evaluation of the technological complexity required to obtain the results proposed in the patents, these were classified as: Low, Medium and High Technology. The results obtained showed relative classification equivalence. With 10/30 patents classified as Low

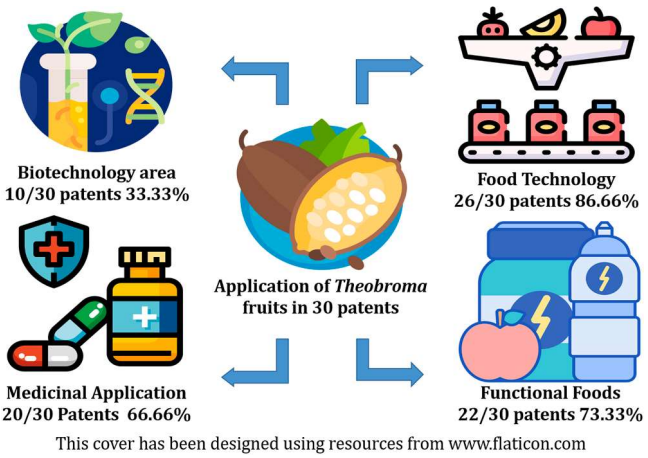


Fig. 2. Areas with potential industrial application for the fruits of *Theobroma*, of the thirty patents evaluated.

Technology, (WO2019/153046Al, AU2019216877A1), KR101361186B1, (CA3098361A1, FR3080767A1), (WO2021074316A1, CA3154121A1), (WO2020225056A1, CA3135952A1), CA3056180A1, PH22018000886U1, CA3056038A1, US20060134230A1 and CA2600301A1, corresponding to 30 %, 9/30 patents were classified as Medium Technology, US7521238B2, BR102019021218A2, WO2007062206A2, US20220338519A1, US11077162B2, WO2014018822A2, JP2008195652A, US20210046135A1 and RO128712A2, representing 33.33 % and 11/30 patents, by distinction, classified as High Technology, BR112013001959B1, JP2003088372A, US10543242B2, WO2016046375A1, KR100923538B1, EP2934561B1, KR101139376B1, FR2904542A1, US20210236572A1, WO2008134648A2 and RU2479313C2, providing 36.66 % of the total number of carefully analyzed patents.

The correlation between the added value in a patented product is directly related to its technological complexity, the greater or higher complexity is expected to be more concerned about protecting that invention, however it was observed that of the patents evaluated, the holders of these deposits preferred to protect the patents of *Theobroma* fruits with high technology aggregated in collective protections (Offices or treaties involving several countries eg: PCT with 152 countries) or individual by country, inventions with medium complexity for technologies derived from *Theobroma* fruits, accompanied the line of protection of high complexity, thus opting for collective and individual protection by country. However, for patents on inventions using the fruits of *Theobroma*, with low technological complexity, applicants opted for double protection (between countries or between the country of origin and a patent office), or for simple protection by country. The only country that overvalued the research of products and processes that evolved into patents derived from the fruits of *Theobroma*, regardless of the technological complexity, was the United States of America, with 2 high patents, 4 medium and 1 low, totaling 7 patents out of the 30 evaluated, this indicates how much the American market values the products and processes derived from the fruits of *Theobroma,* stimulating the heating of the market, in the areas of food technology, functional foods, biotechnology and medicinal application, with important technological innovations for the human societies (Fig. 3).

8. Conclusion

The fruits of the *Theobroma* genus have great potential in the food, pharmaceutical and cosmetic industries, as they have a high antioxidant and antimicrobial potential. The fruits have a high nutritional content and have antibacterial and anticariogenic properties. In the last 10 years, only two (*T. cacao* and *T. grandiflorum*) species were more explored in terms of chemistry and their chemical and biological properties. As a perspective, there is potential to study other promising

Table 3
Evaluation of patents related to the fruits of *Theobroma* and its applications.

Patent title	Application	Patent number	Country	Reference
Use of succinate dehydrogenase inhibitors and/or respiratory chain complex iii inhibitors to improve the ratio of harmful microorganisms to beneficial	The present invention refers to the use of succinate dehydrogenase inhibitors and/or complex iii inhibitors to control undesirable pathogenic fungi	BR112013001959B1	Brazil	(Fought et al., 2011)
Tissue culture medium for Macadamia and *T. cacao*	The present invention provides a method and a culture medium for the production of food biomass by directly culturing seed kernel tissue, or seed cotyledonary differentiated tissue.	US7521238B2	United States	(Atehortua et al., 2011)
Medium chain triglyceride vegetable butter	The invention is situated in the field of human needs, more specifically of food compositions and presents in its composition medium chain triglycerides	BR102019021218A2	Brazil	(Sabará; Dean, 2019)
Chocolate formulations with functional properties	This invention is directed to bioactive substances from cacao and methods for concentrating extractions. The invention is also directed to formulations, pharmaceuticals preparations, nutritional preparations, and dietary supplements extracted from food materials.	WO2007062206A2	WIPO (PCT)	(Martin, 2006)
Oral supplements containing enriched phenolic compound extracts combined with organic acid sodium salts, creatines and/or creatine salts	When taken together in an oral supplement, the particular phenolic compound(s) found in such extracts and in other genera containing significant quantities of total phenols are believed to enhance the activity of the phosphocreatine salts in a synergistic manner and result in enhancement of physical activity as well as provide recovery from inflammation.	US20220338519A1	United States	(Daugherty; Tempesta, 2022)
Theobromine synthase and gene for coding the synthase	The present invention refers to the theobromine synthase, DNA or RNA encoding the enzyme, and D. A method of producing caffeine and theobromine or a precursor thereof, using the microorganism, plant or a cell or tissue cultivated thereof. Refers to a method of variation of the amount of precursor.	JP2003088372A	Japan	(Mizuno et al., 2003)
Preparation of protective plants of the heart to prevent and improve coronary heart disease	The present invention provides a new natural plant preparation that can prevent and control various risk factors for coronary heart disease, including vascular inflammatory processes that cause cardiovascular events	US11077162B2	United States	(Shandong University of Technology, 2021)
Formulation and method of use	This invention relates to formulations for the promotion of gastrointestinal health and methods of treatment and/or use thereof. The formulations are useful for a variety of applications, such as modulating a subject's gut microbiome and/or the treatment of diseases, disorders or conditions characterised, at least in part by poor gastrointestinal health, including inflammatory bowel disease (IBD)	WO2019/153046Al AU2019216877A1	WIPO (PCT) Australia	(Legge, 2019)
Novel cosmetic and/or pharmaceutical compositions and applications thereof	The present invention comprises the compositions of extracts of Polynia species and extracts of *Theobroma* species, or extracts of Salix species and zinc sulfate as active ingredients, methods to prepare these compositions, and cosmetic and/ or pharmaceutical uses of these compositions.	KR101361186B1	South Korea	(Ulmann et al., 2007)
Composition for the treatment of joint conditions	The present invention is related to a composition for improving the health status of various joints in the human body. The composition may be used to treat osteoarthritis, rheumatic joint disease, joint swelling, pain, hallux valgus, traumatic conditions of the joints including sprains, strains, post-surgical recovery, bone edema, and speed up the recovery of athletes post-injury.	US10543242B2	United States	(Stancioiu; Catanas, 2014)
Extract of shells of *T. cacao* beans for controlling rosacea and skin redness	The present invention relates in particular to an extract of cocoa bean shells or a cosmetic or dermatological composition comprising said extract for preventing and / or treating rosacea.	CA3098361A1 FR3080767A1	Canada France	(Áries et al., 2019)
T. cacao extract for use in the treatment or prevention of receptor tyrosine kinases related disorders	The present invention relates to the treatment or prevention of receptor tyrosine kinases-related disorders. More particularly, the present invention concerns a *T. cacao* extract for use in the treatment of receptor tyrosine kinases related disorders and a pharmaceutical composition comprising such extract.	WO2016046375A1	WIPO (PCT)	(Legeai-Mallet; Carretero, 2016)
Chocolate products, ingredients, processes and uses	The present invention provides a new composition obtainable from a plant in the *Theobroma* genus and the use of that composition as an ingredient in a chocolate product.	WO2021074316A1 CA3154121A1	WIPO (PCT) Canada	(Abu-Hardan, 2019)
Foodstuff and beverage products, ingredients, processes and uses	The present invention provides the use of a composition obtainable from the pulp of a plant in the *Theobroma* genus or an extract of said pulp, as an ingredient in a foodstuff product.	WO2020225056A1 CA3135952A1	WIPO (PCT) Canada	(Dupas-Langlet, 2019)

(*continued on next page*)

Table 3 (*continued*)

Patent title	Application	Patent number	Country	Reference
Chocolate products, ingredients, processes and uses	The present invention refers to the field of new chocolate products, new ingredients for use in such products and uses of the new ingredients. In addition, it refers to the compositions of tropicalizing agents based on fat, their methods of preparation, chocolate tropicalization methods.	CA3056180A1	Canada	(Festring et al., 2019)
Composition of making cacao (*Theobroma*) butter	The utility model disseminates cocoa butter (*T. cacao*) and its production method, which employs cocoa bean as the main component of the product and honey, vegetable oil and fresh milk with low fat content as ingredients.	PH22018000886U1	Philippines	(Lobaton; Pabelona, 2018)
Methods for increasing the production of phenolic compounds from *T. cacao*	Described here are methods to increase the production of phenolic compounds from *T. cacao*. For example, the devices and methods described increase the production of phenolic compounds from cocoa plants with industrial and economic value.	WO2014018822A2	WIPO (PCT)	(Cuero Rengifo, 2014)
Foodstuff products, ingredients, processes and uses	The present invention provides the use of a composition obtained from pulp of a plant of the genus *Theobroma*, preferably cocoa pulp, or a pulp extract of a plant of the genus *Theobroma*, preferably cocoa pulp, as an ingredient in a food, preferably a confectionery product.	CA3056038A1	Canada	(Vieira et al., 2018)
Angiotensin-I converting enzyme inhibitor, Manufacturing process thereof, and Functional foods containing the same	The object of the present invention is to provide angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor derived from natural products having high safety and high activity as a food, a preparation method thereof, and a food and drink containing the same.	KR100923538B1	South Korea	(Maeda et al., 2009)
Composition comprising raphanus, *Theobroma* and *Passiflora* for treating opioid and alcohol abuse	A pharmaceutical composition for use in the treatment of opioid abuse, opioid dependence, alcohol abuse and / or alcohol dependence, and / or for use in the treatment of symptoms of opioid and / or alcohol withdrawal, wherein the pharmaceutical composition.	EP2934561B1	European Patent Office	(Qadan, 2012)
Colitis inhibitor comprising *T. cacao* ingredient	The present invention relates to an inhibitor and method for suppressing colitis. A colitis inhibitor and food comprise a ingredient *T. cacao* or a cocoa polyphenol derived from *T. cacao*.	JP2008195652A	Japan	(Matsuyama et al., 2008)
Anti-influenza viral drug and, viral-infection suppression products and foods comprising the same	The present invention provides a high inhibiting effect against flu virus infection and provides an anti-influenza virus agent with no side effects and contained in functional foods. Influenza anti-virus agents and infection inhibitors present in the mixture of foods containing orange (*Citrus spp.*), cat's nail (*Uncaria tomentosa*), cocoa (*T. cacao*) and others.	KR101139376B1	South Korea	(Shimizu et al., 2011)
Weight loss composition and formulation	This invention discloses a new and unique combination of *Dahurian angelica* Root extract, *Polygonum multiflorum* extract, *T. cacao* extract, *Yerba mate* extract, Oolong tea extract, Kohki Tea extract, *Horse chesnut* extract, and *Ligustrum lucidum* extract useful as a dietary supplement for increasing weight loss in humans.	US20060134230A1	United States	(Abraham, 2006)
Use of herbal extract obtained e.g. from i.e. *T. cacao* and/or at least another active agent e.g. to enhance augmentation of melanin synthesis in melanocytes of epidermis and to improve natural skin pigmentation	The invention refers to the use in a cosmetic composition or for the preparation of a pharmaceutical composition, of an effective amount of cocoa extract (*T. cacao* L.); and contains the extract or composition intended to promote increased melanin synthesis in the melanocytes of the epidermis or capillary bulb, with a view to giving it a tanned appearance, or to prepare the skin for exposure to the sun, or for therapeutic purposes, to repigmentthe depigmented skin, for example in the case of vitiligo, or to pigment the hair.	FR2904542A1	France	(Claude Dal, 2011)
Synergistic herbal compositions for the treatment of obesity and overweight	The invention relates to synergistic herbal composition comprising combination of first ingredient selected from the extracts, fractions, phytochemicals and mixtures thereof derived from *T. cacao* and a second ingredient selected from the extracts, fractions, phytochemicals and mixtures thereof derived from *Citrus aurantifolia* and optionally containing at least one ingredient selected from pharmaceutically.	US20210046135A1	United States	(Gokaraju et al., 2021)
Synergistic herbal compositions for testosterone boosting	The invention relates to synergistic herbal compositions comprising at least one ingredient selected from the extracts and fractions derived from *Punica granatum* and at least one ingredient selected	US20210236572A1	United States	(Gokaraju G.R.; et al.; 2018)

(*continued on next page*)

Table 3 (*continued*)

Patent title	Application	Patent number	Country	Reference
	from the extracts and fractions derived from *T. cacao* for improving testosterone levels in humans.			
Method for treating rheumatism	The invention refers to a method of treatment of rheumatism. According to the invention, the method consists of administering 4 to 5 g of cocoa powder dissolved in cold water, associated with 250 ml of cowberry tea, administered concomitantly vitamin C to support the immune system, and can apply anti-infection treatment and possibly vitamin and mineral supplements, as appropriate.	RO128712A2	Romania	(Scurtu S.I.; 2010)
Compositions and methods for increasing metabolism, thermogenesis and/or muscular definition	Compositions and Methods for Increasing Metabolism, Thermogenesis and/or Muscular Definition Field of the Invention The present invention relates to compositions and methods for increasing a person's natural metabolic rate, increasing thermogenesis or decreasing water retention.	CA2600301A1	Canada	(Heuer M. A.; 2005)
Cocoa ingredients having enhanced levels of stilbene compounds and methods of producing them	The invention provides methods of making food products and ingredients having enhanced levels of natural stilbene compounds, such as resveratrol. Chocolate liquor, cocoa powders, and cocoa extracts having enhanced levels of resveratrol prepared from cacao beans are disclosed.	WO2008134648A2	WIPO (PCT)	(Hurst W. J.; et al.; 2008)
Method of treating and preventing respiratory diseases involving administration of cholecalciferol	The present invention provides treatment, prevention and relief of respiratory symptoms ensured by the combined application of cholecalciferol and said excipients. The excipient is specified in a group consisting of tea extract, vitamin A, probiotics, vitamin C, Andrographis extract, 1-tryptophan, *Allium sativum, T. grandiflorum*, coenzyme Q10, acai berry, grapes, guarana and others	RU2479313C2	Russia	(Clymer J. W. & Ranney P. J.; 2006)

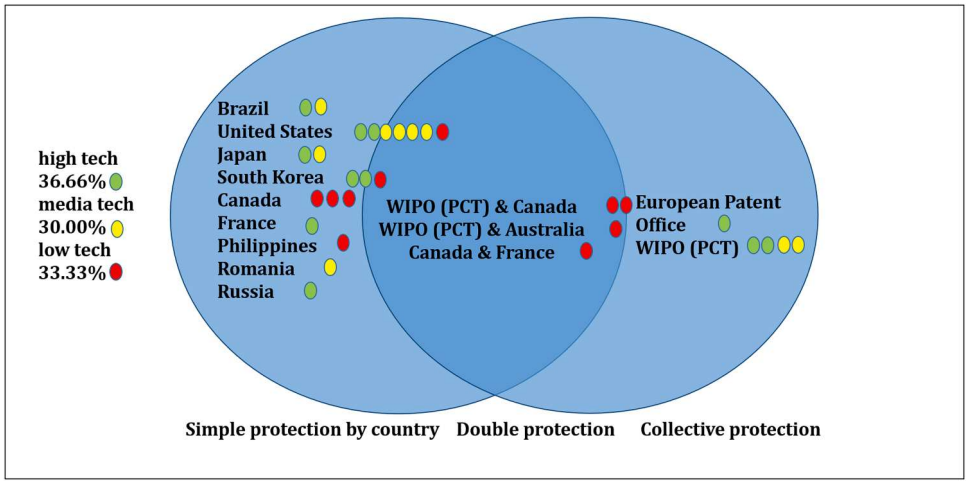


Fig. 3. Relationship technological complexity and patent protection of products derived from the fruits of the genus *Theobroma* in the thirty patentes evaluated.

species of bioactive compounds in their different plant parts for further industrial application. This review intends to stimulate new studies to evaluate the biological and nutritional potential of different plant parts of the genus *Theobroma*, aiming the promotion of human health.

CRediT authorship contribution statement

Josiana Moreira Mar: Writing – original draft, Investigation, Conceptualization. **Edson Queiroz da Fonseca Júnior:** Writing – original draft, Investigation, Conceptualization. **Renilto Frota Corrêa:** Writing – original draft, Investigation. **Pedro Henrique Campelo:** Writing – review & editing. **Edgar Aparecido Sanches:** Writing – review & editing. **Jaqueline de Araújo Bezerra:** Writing – review & editing, Conceptualization, Project administration, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM (Process number 01.02.016301.03335/2021–56, Edital n. 010/2021- CT&I áreas

prioritárias, Edital n. 013/2022–Produtividade-CT&I), CAPES Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG) Pós-Doutorado Estratégico - PPGBIOTEC – UFAM, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq (Process number 311522/2020–3) for financial support, fellowships and Analytical Center at IFAM-CMC for the infrastructure.

References

Švarc-Gajić, J., Brezo-Borjan, T., Dzedik, V., Rodrigues, F., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2023). ESG approach in the valorization of cocoa (*Theobroma cacao*) by-products by subcritical water: Application in the cosmetic industry. *Sustainable Chemistry and Pharmacy, 31*(11), Article 100908.

Acosta-Vega, L., Martínez-Suárez, J. F., Sánchez-Garzón, F. S., Hernández-Carrión, M., & Nerio, L. S. (2023). Optimization of the encapsulation process of Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp by spray drying as an alternative for the valorization of Amazonian fruits. *Lwt, 184*(2).

Alba, K., Nguyen, P. T. M., & Kontogiorgos, V. (2021). Sustainable polysaccharides from *Malvaceae* family: Structure and functionality. *Food Hydrocolloids, 118*(1), Article 106749.

Ambrosone, L., Guerra, G., Cinelli, M., Filippelli, M., Mosca, M., Vizzarri, F., Giorgio, D., & Costagliola, C. (2014). Corneal epithelial wound healing promoted by verbascoside-based liposomal eyedrops. *BioMed Research International, 4*(8), 1–8.

Andrade, J.K.S., Barros, R.G.C., Pereira, U.C., Gualberto, N.C., de Oliveira, C.S., Shanmugam, S., & Narain, N. (2022). α-Amylase inhibition, cytotoxicity and influence of the in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds in the peel and seed of Theobroma grandiflorum. Food Chemistry, 373 (October 2021).

Ashihara, H., & Crozier, A. (1999). Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Advances in Botanical Research, 30*(1), 117–205.

Badrie, N., Bekele, F., Sikora, E., & Sikora, M. (2015). Cocoa agronomy, quality, nutritional, and health aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55*(5), 620–659.

Bruni, R., Medici, A., Guerrini, A., Scalia, S., Poli, F., Romagnoli, C., Muzzoli, M., & Sacchetti, G. (2002). Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (*Sterculiaceae*) seeds. *Food Chemistry, 77*(3), 337–341.

Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology, 81*(1), 172–184.

Clough, B. H., Ylostalo, J., Browder, E., McNeill, E. P., Bartosh, T. J., Rawls, H. R., Nakamoto, T., & Gregory, C. A. (2017). Theobromine upregulates osteogenesis by human mesenchymal stem cells in vitro and accelerates bone development in rats. *Calcified Tissue International, 100*(3), 298–310.

Colli-Silva, M., & Pirani, J. R. (2020). Estimating bioregions and undercollected areas in South America by revisiting Byttnerioideae, Helicteroideae and Sterculioideae (*Malvaceae*) occurrence data. *Flora (Ankara, Turkey), 271*(1), Article 151688.

Cunha, F. V. M., Coelho, A. G., Azevedo, P. S., da, S., da Silva, A. A., Oliveira, F., de, A., & Nunes, L. C. C. (2019). Systematic review and technological prospection: Ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions. *Expert Opinion on Therapeutic Patents, 29*(2), 73–83.

Curimbaba, T. F. S., Almeida-Junior, L. D., Chagas, A. S., Quaglio, A. E. V., Herculano, A. M., & Di Stasi, L. C. (2020). Prebiotic, antioxidant and anti-inflammatory properties of edible Amazon fruits. *Food Bioscience, 36*(10), Article 100599.

de Oliveira, T. B., & Genovese, M. I. (2013). Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Research International, 51*(2), 929–935.

De Souza Schmidt Gonçalves, A. E., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010). Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(8), 4666–4674.

Dozier, C. A., Kim, D., & Russell, D. H. (2020). Chemical residue evidence in Leon Plain pottery from the Toyah phase (1300–1650 CE) in the American Southern Plains. *Journal of Archaeological Science, 32*(1), Article 102450.

Efavi, J. K., Nyankson, E., Kyeremeh, K., Manu, G. P., Asare, K., & Yeboah, N. (2022). Monodispersed AgNPs synthesized from the nanofactories of *Theobroma cacao* (Cocoa) leaves and pod husk and their antimicrobial activity. *International Journal of Biomaterials, 1*(9), Article 4106558.

Etaware, P. M. (2021). Molecular sciences the effects of the phytochemistry of cocoa on the food chemistry of chocolate (s) and how disease resistance in cocoa can be improved using CRISPR/Cas9 technology. *Food Chemistry: Molecular Sciences, 3*(1), Article 100043.

Febrianto, N. A., & Zhu, F. (2022). Comparison of bioactive components and flavor volatiles of diverse cocoa genotypes of *Theobroma grandiflorum, Theobroma bicolor, Theobroma subincanum* and *Theobroma cacao*. *Food Research International, 161*(3), Article 111764.

Franco, R., Oñatibia-Astibia, A., & Martínez-Pinilla, E. (2013). Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients, 5*(10), 4159–4173.

Freitas, E. C. (2017). Phenolic compounds and screening of the antioxidant capacity of *Theobroma grandiflorum* dehydrated coproducts. *Revista Virtual de Química, 9*(6), 2193–2203.

Gao, X. N., Gao, E. J., & Zhu, M. C. (2019). Synthesis, crystal structure, DNA binding, and cytotoxicity of a Zn(II) complex constructed from phenylacetic acid. *Journal of Structural Chemistry, 60*(7), 1180–1188.

Giustina, L. D., Luz, L. N., Vieira, F. S., Rossi, F. S., Soares-Lopes, C. R. A., Pereira, T. N. S., & Rossi, A. A. B. (2014). Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (*Malvaceae*). *Genetics and Molecular Research, 13*(2), 3510–3519.

Griesbach, R. J. (2010). Biochemistry and genetics of flower color. In *Plant Breeding Reviews, 25* pp. 89–114). John Wiley & Sons, Inc.

Gutiérrez-Álzate, K., Rosario, I. L. S., de Jesus, R. L. C., Maciel, L. F., Santos, S. A., de Souza, C. O., Vieira, C. P., Cavalheiro, C. P., & Costa, M. P.da (2023). Physicochemical, rheological, and nutritional quality of artisanal fermented milk beverages with cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp and flour. *Foods (Basel, Switzerland), 12*(11), Article 12112217.

Hammerstone, J. F., Romanczyk, L. J., & Martin Aitken, W. (1994). Purine alkaloid distribution with *Herrania* and *Theobroma*. *Phytochemistry, 35*(5), 1237–1240.

Hasanuddin, A., Anwar, K., Mappatoba, M., & Hafsah. (2019). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extracts of cocoa husk (*Theobroma cacao* L.) with maltodextrine in various concentration. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 255*, Article 012017.

Huang, J. P., Wang, Y. J., Tian, T., Wang, L., Yan, Y., & Huang, S. X. (2021). Tropane alkaloid biosynthesis: A centennial review. *Royal Society of Chemistry, 38*(9), 1634–1658.

Jalal, M. A. F., & Collin, H. A. (1977). Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *Theobroma cacao*. *Phytochemistry, 16*(9), 1377–1380.

Jean-Marie, E., Bereau, D., Robinson, J.-C., Poucheret, P., Guzman, C., Boudard, F., & Robinson, J.-C. (2021). Antioxidative and immunomodulatory potential of the endemic French Guiana wild cocoa "Guiana. *Foods (Basel, Switzerland), 10*(3), 522.

Kababie-Ameo, R., Rabadán-Chávez, G. M., Vázquez-Manjarrez, N., & Gutiérrez-Salmeán, G. (2022). Potential applications of cocoa (*Theobroma cacao*) on diabetic neuropathy: Mini-review. *Frontiers in Bioscience-Landmark, 27*(2), 057.

Lúcia, A., Pereira, F., Corrêa, S., Kelly, V., Abreu, G., De Oliveira, T., Faria, W., Narain, N., & Rodrigues, S (2017). Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandi* florum) beverage. *Food Research International Journal, 100*(5), 603–611.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, A. C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(1), 7292–7295.

Llerena, W., Samaniego, I., Vallejo, C., Arreaga, A., Zhunio, B., Coronel, Z., Quiroz, J., Angós, I., & Carrillo, W. (2023). Profile of bioactive components of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by-products from ecuador and evaluation of their antioxidant activity. *Foods (Basel, Switzerland), 12*(13), 1–18.

Lopes, S. M. D. A., Martins, M. V., Souza, V. B.de, & Tulini, F. L (2021). Evaluation of the nutritional composition of cocoa bean shell waste (*Theobroma cacao*) and application in the production of a phenolic-rich iced tea. *Journal of Culinary Science & Technology, 21*(5), 818–828.

Luiz, S., Rochelle, D. A., Cássia, J. De, Sardi, O., Almeida, I., Câmara, L., Galvão, D. C., Goldoni, J., Matias, S., Alencar, D., & Luiz, P (2016). The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens. *Industrial Crops & Products, 87*(1), 150–160.

Mar, J. M., da Silva, L. S., Moreira, W. P., Biondo, M. M., Pontes, F. L. D., Campos, F. R., Kinupp, V. F., Campelo, P. H., Sanches, E. A., Bezerra, J., & de, A. (2021). Edible flowers from *Theobroma speciosum*: Aqueous extract rich in antioxidant compounds. *Food Chemistry, 356*(5), Article 129723.

Martínez-lópez, S., Sarriá, B., Gómez-juaristi, M., Goya, L., Mateos, R., & Bravo-clemente, L. (2014). Theobromine, caffeine and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *FRIN, 63*(1), 446–455.

Marx, F., & Maia, J. G. S. (1991). Purine alkaloids in seeds of Theobroma species from the Amazon. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung, 193*(5), 460–461.

Meng, X., Zhou, J., Zhao, C., & Gan, R. (2024). Health benefits and molecular mechanisms. *Journal of Functional Foods, 115*(3), 1–27.

Millena, C. G., Balonzo, A. R. R., Rentoy, J. R., Ruivivar, S. S., & Bobiles, S. C. (2023). Effect of fermentation stages on the nutritional and mineral bioavailability of cacao beans (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Food Composition and Analysis, 115*(9), Article 104886.

Monteiro, J. P., Alves, M. G., Oliveira, P. F., & Silva, B. M. (2016). Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules (Basel, Switzerland), 21*(8), 974.

Motamayor, J. C., Mockaitis, K., Schmutz, J., Haiminen, N., III, D. L., Cornejo, O., Findley, S. D., Zheng, P., Utro, F., Royaert, S., Saski, C., Jenkins, J., Podicheti, R., Zhao, M., Scheffler, B. E., Stack, J. C., Feltus, F. A., Mustiga, G. M., Amores, F., … Kuhn, D. N. (2013). The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biology, 14*(6), r53.

Oliveira, T. B. De, & Genovese, M. I. (2013). Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandi florum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetic rats. *FRIN, 51*(2), 929–935.

Oliveira, K. De, North, S., Beck, B., & Hopp, J. (2015a). Promoting collaboration and cultural competence for physician assistant and physical therapist students: A cross-cultural decentralized interprofessional education model. *Journal of Educational Evaluation for Health Professions, 12*(1), 1–20.

de Oliveira, T. B., Rogero, M. M., & Genovese, M. I (2015b). Poliphenolic-rich extracts from cocoa (*Theobroma cacao* L.) and cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. K. Shum) liquors: A comparison of metabolic effects in high-fat fed rats. *PharmaNutrition, 3*(2), 20–28.

Pérez-Mora, W., Jorrin-Novo, J. V., & Melgarejo, L. M. (2018). Substantial equivalence analysis in fruits from three *Theobroma* species through chemical composition and protein profiling. *Food Chemistry, 240*(1), 496–504.

Parada-Berríos, F. A., Vásquez-Osegueda, E. A., Lovo-Lara, L. M., Arias-de-Linares, A. Y., & Molina-Escalante, M. O. (2022). Rescate de patashte (*Theobroma bicolor* Humb & Bonpl.) y cushta (*Theobroma angustifolium*) dos especies promisorias en peligro de extinción en El Salvador. *Revista Minerva, 2*(1), 109–121.

Perez-Vizcaino, F., & Fraga, C. G. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 646*(1), 107–112.

Ponce-Sánchez, J., Zurita-Benavides, M. G., & Peñuela, M. C. (2021). Reproductive ecology of white cacao (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.) in Ecuador, western Amazonia: Floral visitors and the impact of fungus and mistletoe on fruit production. *Brazilian Journal of Botany, 44*(1), 479–489.

Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International, 48*(2), 634–640.

Pugliese, A. G., Tomas-Barberan, F. A., Truchado, P., & Genovese, M. I. (2013). Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*(11), 2720–2728.

Quiroz-Reyes, C. N., & Aguilar-Méndez, M.Á. (2022). Continuous ultrasound and pulsed ultrasound: Selective extraction tools to obtain enriched antioxidants extracts from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 80*(1), Article 103095.

Ramos, S. N. M., Glezer, J. W., Garcia, A.de O., Behrens, J. H., & Efraim, P (2022). Cupuassu from bean to bar: Sensory and hedonic characterization of a chocolate-like product. *Food Research International, 155*(1), Article 111039.

Ramos-Escudero, F., Casimiro-Gonzales, S., Fernández-Prior, Á., Cancino Chávez, K., Gómez-Mendoza, J., Fuente-Carmelino, L.de.la, & Muñoz, A. M. (2021). Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *LWT, 147*(1), Article 111629.

Rawel, H. M., Huschek, G., Sagu, S. T., & Homann, T. (2019). Cocoa bean proteins-Characterization, changes and modifications due to ripening and post-harvest processing. *Nutrients, 11*(2), 428.

Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa bean shell—A by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients, 12*(4), 1123.

Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry, 38*(1), 35–42.

Sesso, H. D., Manson, J. E., Aragaki, A. K., Rist, P. M., Johnson, L. G., Friedenberg, G., Copeland, T., Clar, A., Mora, S., Moorthy, M. V., Sarkissian, A., Carrick, W. R., Anderson, G. L., Manson, J. E., Sesso, H. D., Rist, P. M., Lagerstrom, S. R., Bassuk, S. S., Wang, L., … Stern, L. (2022). Effect of cocoa flavanol supplementation for the prevention of cardiovascular disease events: The cocoa supplement and multivitamin outcomes study (cosmos) randomized clinical trial. *American Journal of Clinical Nutrition, 115*(6), 1490–1500.

Shahanas, E., Panjikkaran, S. T., Aneena, E. R., Sharon, C. L., & Remya, P. R. (2019). Health benefits of bioactive compounds from cocoa (*Theobroma cacao*). *Agricultural Reviews, 40*(2), 143–149.

Silva, E. N.da, Ramos, D.da C., Menezes, L. M., Souza, A. O.de, Lannes, S. C.da S., & da Silva, M.v. (2014). Nutritional value and antioxidant capacity of "cocoa honey" (*Theobroma cacao* L.). *Food Science and Technology, 34*(4), 755–759.

Silva, L. F. R.da, Gomes, A.da. S., Castro, D. R. G., Souza, F.das. C.do. A., Mar, J. M., Laiane Souza da Silva, E. A. S., Bezerra, J.de. A., Bakry, A. M., & Campelo, P. H (2019). Ultrasound-assisted homogenization and gum Arabic combined to physicochemical quality of cupuaçu juice. *Journal Food Processing Preservation, 43*(9), e14072.

Takshak, S., & Agrawal, S. B. (2019). Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 193*(1), 51–88.

Tauchen, J., Bortl, L., Huml, L., Miksatkova, P., Doskocil, I., Marsik, P., Villegas, P. P. P., Flores, Y. B., Damme, P. Van, Lojka, B., Havlik, J., Lapcik, O., & Kokoska, L (2016). Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia, 26*(6), 728–737.

Valada, P., Alçada-Morais, S., Cunha, R. A., & Lopes, J. P. (2022). Theobromine targets adenosine receptors to control hippocampal neuronal function and damage. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(18), 10510.

Vargas-arana, G., Merino-zegarra, C., Tang, M., Pertino, M. W., & Simirgiotis, M. J. (2022). UHPLC – MS characterization, and antioxidant and nutritional analysis of cocoa waste flours from the Peruvian Amazon. *Antioxidants (Basel), 21*(11), 1–14.

Vladimir-Knežević, S., Blaženković, B., Štefan, M. B., & Babac, M. (2012). Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. *Phytochemicals as Nutraceuticals, 23*(1), 155–180.

Vriesmann, L. C., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2009). Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. *Carbohydrate Polymers, 77*(1), 72–79.

Wen, H., Li, L., Zhan, L., Zuo, Y., Li, K., Qiu, M., Li, H., Sun, W., & Xu, E. (2021). Hypoxic postconditioning promotes mitophagy against transient global cerebral ischemia via PINK1/Parkin-induced mitochondrial ubiquitination in adult rats. *Cell Death and Disease, 12*(7), 630.

Wheni, A., Purnami, M., Windarsih, A., Kumar, D., Suzuki, T., & Katayama, T. (2021). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology In vitro studies of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of *Theobroma cacao, Anonna muricata* and *Clitoria ternatea*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 33*(4), Article 101995.

Food Bioscience 73 (2025) 107673

Contents lists available at ScienceDirect

Food Bioscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbio

Chemical characterization, nutritional profile, and cytotoxicity potential of Amazonian *Theobroma sylvestre* Mart. fruits

Edson Queiroz da Fonseca Júnior [a], Daniel de Queiroz Rocha [b], Edinilze Souza Coelho Oliveira [b], Samuel Oliveira da Silva [a,b], Francisca das Chagas do Amaral Souza [c], Gabriela Furlaneto [d], Laura da Silva Cruz [d], Luciana Azevedo [d], Renilto Frota Corrêa [b], Edgar Aparecido Sanches [e], Pedro Henrique Campelo [f], Jaqueline de Araújo Bezerra [a,b,*]

[a] Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil
[b] Amazon Science and Technology Studies Center, Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas, Manaus, Brazil
[c] Laboratory of Functional Analysis and Food Chemistry (LFQA), National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil
[d] Laboratory of nutritional and toxicological analyses in vitro and in vivo (LANTIN), Federal University of Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil
[e] Laboratory of Nanostructured Polymers, Materials Physics Department, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil
[f] Department of Food Technology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Malvaceae
Cacau-azul
Phenolic compounds
Nutritional profile
Citotoxicity

ABSTRACT

Theobroma sylvestre Mart. (Malvaceae) is a native species of the Amazon region that remains poorly studied. This paper presents the nutritional profile and chemical characterization of the phenolic fractions obtained from the fruits of this species. The pulp exhibited physicochemical parameters in accordance with Brazilian regulations for cocoa juice, highlighting its potential for food applications. Analyses by LC-HRMS and 1D/2D NMR enabled the identification of 23 metabolites, including the alkaloids theophylline (**7**), theobromine (**8**), theacrine (**9**), and caffeine (**10**). In addition, several flavonoids were identified, such as epicatechin (**13**), guaijaverin (**15**), quercitrin (**16**), myricitrin (**17**), astragalin (**19**), and kaempferol (**20**). These fractions demonstrated moderate cytotoxicity and antiproliferative activity against tumor cell lines (A549 and HCT-8) and endothelial HUVEC cells, with IC_{50} values ranging from 12.63 to 95.66 μg/mL. The seed fraction showed the highest antiproliferative activity, particularly against HUVEC cells (GI_{50} = 7.55 μg/mL). The presence of bioactive compounds in the samples may be associated with the observed antiproliferative effects against the tested cell lines and reinforces the therapeutic potential of the species. This study provides a solid foundation for further chemical and pharmacological investigation of *T. sylvestre*.

1. Introduction

The genus *Theobroma*, belonging to the family Malvaceae, comprises approximately 200 genera and over 4000 species distributed across tropical regions, particularly in the Americas, Africa, and Asia Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Within this family, several species hold significant economic importance in Brazil, such as *Theobroma cacao* L. (cacao) and *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum. (cupuaçu). These plants are native to equatorial regions of South America and are widely utilized in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries (Velasquez-Vasconez et al., 2025; Zapata-Alvarez et al., 2024). Among the species with promising applications are *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, and *T. subincanum*. The fruit pulp of *T. grandiflorum*, notably rich in pectin, is widely used by the food industry in the production of jams, yogurts, and other derivatives (Bezerra et al., 2024; Pereira et al., 2018; Vriesmann et al., 2010). The pulps of *T. bicolor* and *T. subincanum* are employed in the formulation of ice creams and liqueurs due to the presence of aromatic volatile compounds and nutritional components with potential for innovative food industry applications (da Silva et al., 2024; Febrianto & Zhu, 2022; Lim, 2014).

Beyond its economic and nutritional value, this genus has attracted scientific interest due to its traditional use by local populations in

* Corresponding author. Amazon Science and Technology Studies Center, Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas, Manaus, Brazil.
E-mail address: jaqueline.araujo@ifam.edu.br (J. de Araújo Bezerra).

https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107673
Received 11 June 2025; Received in revised form 15 July 2025; Accepted 26 September 2025
Available online 27 September 2025
2212-4292/© 2025 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

northern Brazil. For example, *T. cacao* is traditionally used by Amazonian communities to treat hepatic and musculoskeletal disorders (Giorgetti et al., 2007). The recognition of its therapeutic potential has motivated the investigation of bioactive compounds present in its extracts, including phenolic acids, terpenoids, procyanidins, flavonoids (both free and glycosylated), as well as alkaloids and amino acids (Nwonuma et al., 2023; Patil et al., 2022). These metabolites have been associated with relevant pharmacological effects, such as antioxidant activity (Nwonuma et al., 2023; Patil et al., 2022) and selective cytotoxicity against tumor cells (Patil et al., 2022). In this context, the phenolic fraction extracted from the flowers of *T. mariae* demonstrated antiproliferative activity in *in vitro* assays. This property was attributed to the presence of flavonoids such as hyperoside, guaijaverin, astragalin, juglanin, and kaempferol (Silva et al., 2025).

Despite the diversity and biotechnological potential of the genus, *Theobroma sylvestre* (Fig. 1), popularly known as "blue cacao," remains poorly studied. Native to the Amazon region, this species occurs in terra firme areas and along riverbanks in the Brazilian states of Amazonas, Acre, and Pará Jardim Botânico do Rio de Janeiro. The seeds of *T. sylvestre* are rich in fatty acids and have been suggested as a potential alternative to cocoa butter (Gilabert-Escrivá et al., 2002). While species such as *T. cacao*, *T. speciosum*, and *T. subincanum* are used in traditional medicine by Amazonian communities (Giorgetti et al., 2007), here are no scientific records of popular use or chemical characterization for *T. sylvestre*. This highlights a significant knowledge gap that justifies the need for phytochemical and pharmacological investigations of the species.

Given this context, the present study aimed to identify the main chemical constituents of the fractions obtained from hydroethanolic extracts of the bark, pulp, and seeds of *T. sylvestre* fruits. To this end, advanced analytical techniques were employed, including High-Performance Liquid Chromatography coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (HPLC-QTOF/MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. In addition, the antiproliferative and cytotoxic effects of these fractions were evaluated against cancerous and normal cell lines through *in vitro* assays.

2. Materials and methods

2.1. Materials, standards and solventes

HPLC-grade methanol, acetonitrile, and formic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled water was purified using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The leucine enkephalin reference solution was purchased from Waters Co. (Manchester, UK). Analytical-grade reference standards were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used for the preparation of external calibration curves. All other reagents and solvents were of analytical grade and commercially available.

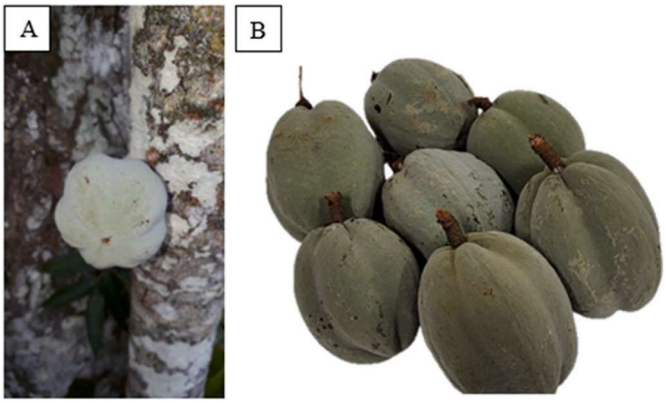


Fig. 1. *Theobroma sylvestre*: (a) Fruit attached to the stem; (b) Clustered fruits, highlighting their morphological characteristics and coloration. Images taken in Manaus, Amazonas – Brazil.

2.2. Collection and preparation of fruit samples

Fruits of *T. sylvestre* were collected in March 2023 on the campus of the Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brazil (coordinates: 3°05′24.779″ S, 59°57′52.342″ W). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Federal University of Amazonas (HUAM) under accession number 6056. The fruit components – peel, pulp, and seeds – were manually separated and subsequently lyophilized. Dried materials were extracted using a hydroethanolic solution (ethanol/water, 8:2 v/v; 20 mL) in an ultrasonic bath (model SSBuc-6L, Mylabor, São Paulo, Brazil) at room temperature for 30 min, repeated three times (Carrion et al., 2013). The resulting extracts were concentrated by solvent evaporation under a fume hood at ambient temperature. Extraction yields of the hydroethanolic extracts were 14.17 % for the peel, 53.78 % for the pulp, and 18.50 % for the seeds. The concentrated extracts were defatted by liquid–liquid partitioning with hexane and subsequently subjected to solid-phase extraction (SPE) using Strata X cartridges (33 mm, Phenomenex, CA, USA). Cartridges were preconditioned with 1 mL of methanol followed by 1 mL of ultrapure water. Sequential elution was performed with water and then 100 % methanol. After solvent removal, three phenolic fractions were obtained: PFPe (phenolic fraction of the peel), PFPu (phenolic fraction of the pulp), and PFS (phenolic fraction of the seeds). These fractions were analyzed by UPLC-QTOF/MS and NMR to identify and elucidate the main phenolic compounds in each matrix.

2.3. Proximate composition

The proximate composition of the fruit components (peel, pulp, and seeds) was determined using the following standard methods: moisture content by oven drying at 105 °C; ash content by incineration at 550 °C; lipid content by Soxhlet extraction with hexane for 8 h; protein content by the classical Kjeldahl method (Lutz, 2008), and carbohydrate content as described by Ogunlaja et al. (2020). The total energy value was calculated using the equation proposed by (Palmeira et al., 2019):

$$\text{Energy (kcal)} = 4 \times (\text{g protein} + \text{g carbohydrates}) + 9 \times (\text{g lipids}).$$

2.4. UPLC-QToF/MS analysis

Metabolite profiling was performed using a Xevo® G2-XS QTof mass spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK) coupled to an Acquity H-Class UPLC system, operated with MassLynx® software (v4.1). Chromatographic separation was achieved on an Acquity UPLC BEH C18 reversed-phase column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size) maintained at 40 ± 2 °C. The mobile phase consisted of 0.1 % formic acid in water (solvent A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (solvent B), delivered at a flow rate of 0.3 mL/min. The gradient elution program was as follows (A:B, %): 0–15 min (98:2), 15–20 min (80:20), 20–25 min (60:40), 25–27 min (2:98), 27–27.1 min (98:2), and 27.1–30 min (98:2). The injection volume was 10 µL. Mass spectrometric detection was carried out in negative electrospray ionization (ESI^-) mode, with a mass scan range of *m/z* 100–1500 and a scan time of 0.2 s. ESI source parameters were set as follows: capillary voltage, 3.0 kV; source temperature, 100 °C; desolvation temperature, 250 °C; cone voltage, 30 V; cone gas flow, 50 L/h; and desolvation gas flow, 700 L/h. Data acquisition was conducted in MSE continuum mode, with low-energy scans at 6 eV and high-energy scans ramped from 20 to 35 eV over a 30-min run. Leucine enkephalin (*m/z* 554.2615 $[M-H]^-$ and *m/z* 556.2771 $[M+H]^+$) was used as the lock mass reference via the LockSpray™ system.

2.5. NMR analysis

^{1}H, ^{1}H–^{13}C HSQC, and ^{1}H–^{13}C HMBC NMR analyses of the phenolic fractions were performed using an 11.7 T spectrometer at 298.0 K (Bruker® Avance III, BBFO Plus SmartProbe™, New York, NY, USA). Samples from the peel, pulp, and seeds were dissolved in 550 μL of CD_3OD containing TMSP (purity ≥99.0 %) as an internal reference (0.0 ppm). Spectra were processed and analyzed using TopSpin™ software version 4.1.3 (Bruker®) (Silva et al., 2025).

2.6. Cytotoxicity assay

Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 Ham (DMEM-F12; Sigma, Germany), supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 1 % penicillin/streptomycin, at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO_2. To assess the cytotoxic effects of the phenolic fractions from blue cacao, A549 (human lung adenocarcinoma), HCT-8 (human colorectal adenocarcinoma), and HUVEC (human umbilical vein endothelial) cells were seeded in 96-well plates at densities of 5×10^3, 1×10^4, and 6×10^3 cells per well, respectively. After 24 h, cells were treated with these fractions at various concentrations (5, 10, 25, 50, and 100 μg/mL) for 48 h.

Following treatment, MTT solution (0.5 mg/mL) was added to each well and incubated for 4 h. The resulting formazan crystals were dissolved in DMSO, and absorbance was measured at 570 nm (Granato et al., 2022). Cytotoxicity parameters, including IC_{50}, GI_{50}, and LC_{50}, were calculated using established methods. IC_{50} is defined as the concentration at which cell growth is inhibited by 50 %, where $(T/C) \times 100 = 50$, with T and C representing the number of treated and control cells, respectively, at the end of the treatment period. GI_{50} represents the concentration required to inhibit net cell growth by 50 % relative to untreated cells and is calculated as $([T\text{-}T_0]/[C\text{-}T_0]) \times 100 = 50$, where $T > T_0$, and T_0 is the cell count at time zero. LC_{50} refers to the concentration at which there is a net 50 % loss in viable cells compared to the initial cell number and is defined as $([T\text{-}T_0]/T_0) \times 100 = -50$, where $T < T_0$. Moreover, the selectivity index (SI) was determined by the ratio between the IC_{50} value for HUVEC cells and the IC_{50} value for cancer cells.

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test, was used to assess multiple comparisons at a 95 % confidence level. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using Minitab® version 18.1 (State College, PA, USA).

Table 1
Physicochemical parameters, proximate composition (g/100 g of dry matter) and energy value (kcal/100 g of dry matter) of the peel, pulp and seed of *T. sylvestre*.

Parameters	Peel	Pulp	Seed
pH		4.36 ± 0.11	
Soluble solids in °Brix		11.03 ± 0.75	
Moisture	80.78 ± 0.73^{b}	90.91 ± 0.45^{a}	63.32 ± 0.82^{c}
Ash	1.19 ± 0.18^{a}	0.51 ± 0.01^{b}	1.30 ± 0.02^{a}
Lipids	0.12 ± 0.00^{b}	0.04 ± 0.00^{c}	0.52 ± 0.00^{a}
Protein	1.85 ± 0.03^{b}	1.54 ± 0.31^{b}	5.91 ± 0.00^{a}
Carbohydrates	16.04 ± 0.51^{b}	1.54 ± 0.14^{c}	28.94 ± 0.84^{a}
Energy	72.67 ± 2.18^{b}	34.48 ± 0.18^{c}	144.13 ± 3.38^{a}

Note: mean ± standard deviation. Values followed by different letters within the same rows are significantly different according to the T-test ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical parameters and proximate composition

Table 1 presents the physicochemical parameters, proximate composition (expressed in g/100 g of dry matter), and energy value (kcal/100 g of dry matter) of the different parts of *T. sylvestre* fruit (peel, pulp, and seeds). The pH and soluble solids content of the pulp are consistent with values reported for *T. cacao* pulp (Borges et al., 2021), suggesting similarities in acidity and sweetness profiles between the fruits. Moreover, the obtained physicochemical parameters fall within the limits established by current Brazilian legislation for cocoa juice (Ministério da Agricultura, 2018), which defines identity and quality standards for reinforcing the therapeutic potential of cocoa-derived products, including minimum soluble solids and pH requirements. This compliance reinforces the potential of *T. sylvestre* pulp for food applications. The pulp may be used in the preparation of jams, preserves, and juices, and also holds potential for the production of fermented beverages (Duarte et al., 2010; Puerari et al., 2012).

Regarding moisture content, the pulp exhibited the highest value (90.91 ± 0.45 %), followed by the peel (80.78 ± 0.73 %) and the seeds (63.32 ± 0.82 %), with statistically significant differences between them ($p < 0.05$). These results indicate the high-water content in the pulp, which contributes to the fruit's juicy texture. As for ash content, the peel and seeds showed the highest values, suggesting a greater concentration of inorganic minerals. Ash analysis is a key indicator of total mineral content, revealing the presence of essential elements such as calcium, phosphorus, iron, potassium, and magnesium – minerals that play fundamental physiological roles, including in bone health, muscle function, and oxygen transport (Alzahrani et al., 2017).

The seeds of blue cacao exhibited the highest protein (5.91 ± 0.00 g) and carbohydrate (28.94 ± 0.84 g) contents compared to the pulp and peel ($p < 0.05$). This nutritional profile is consistent with that observed in other *Theobroma* species, such as *T. cacao* (cacao), *T. bicolor* (macambo), and *T. grandiflorum* (cupuaçu), whose seeds are known to be rich in nutritional compounds – especially lipids and carbohydrates – whereas the pulp tends to contain higher levels of soluble sugars and dietary fiber (Benlloch-Tinoco et al., 2024). Previous studies have shown that seeds of *Theobroma* spp. are traditionally valued for their high energy and protein content, supporting the results of this study, in which blue cacao seeds exhibited the highest energy value (144.13 ± 3.38 kcal) (Araujo et al., 2021).

3.2. Qualitative chemical description

Fruits are recognized for containing various types of bioactive compounds, including phenolic compounds. These constituents have garnered increasing attention due to their health benefits, primarily related to their antioxidant (Oliveira et al., 2025) and antitumor properties (Saldarriaga et al., 2025). Given the relevance of these compounds, the phenolic fractions from the peel (PFPe), pulp (PFPu), and seeds (PFS) of *T. sylvestre* were separately analyzed by LC-HRMS and ^{1}H NMR, in combination with two-dimensional experiments (COSY, HSQC e HMBC).

LC-MS analyses were essential for the identification of nineteen compounds, confirmed by low mass errors and specific fragmentation patterns (Table 2). The combined use of both techniques enabled the identification of 23 metabolites, including organic acids, amino acids, methylxanthine alkaloids, free and glycosylated flavonoids, a lignan, a diterpene, a glycosylated alcohol, and a phenylpropanoid (Fig. 2). The presence of flavonoids and alkaloids across all three fractions is consistent with phytochemical profiles previously reported in species of the same genus (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; da Silva et al., 2024; Lo Coco et al., 2007; Silva et al., 2025).

In the aliphatic region of the ^{1}H NMR spectrum, succinic acid (**1**) was identified by a singlet at δ_H 2.55, showing direct correlation with a

Table 2
Metabolites identified in the phenolic fractions of *T. sylvestre* fruits by LC-HRMS and 1D/2D NMR spectroscopy. PFPe = phenolic fraction of the peel; PFPu = phenolic fraction of the pulp; PFS = phenolic fraction of the seeds.

No	RT (min)	Observed ions [M − H] − (*m*/*z*)/[M + H]$^+$ (*m*/*z*)	Calculated ions [M − H] − (*m*/*z*)/M + H]$^+$ (*m*/*z*)	Product ions [M − H] − (*m*/*z*)/[M + H]$^+$ (*m*/*z*)	Compound (Elemental composition, Mass error in ppm)	δ ^{1}H in ppm (*J*, Hz)	δ ^{13}C in ppm	Fractions	References
Organic acids/Sugar									
1	–	–	–	–	Succinic acid	2.55 (s)	30.1, 175.1	PFPe PFPu	Caligiani et al. (2010)
2	–	–	–	–	α-glucose	5.09 (d, *J* = 3.7 Hz)	93.1, 73.8	PFS	Silva et al. (2025)
3	6.3	329.0881	329.0873	167.0334 (50) 329.0881 (100) 108.0199 (10) 152.0107 (05)	Vanillic acid glycoside isomer 1 ($C_{14}H_{18}O_9$, 2.4)	7.60 (m), 3.73 (s)	56.5, 125.7		Ramos-escudero et al. (2024)
Amino acids									
4	–	–	–	–	γ-Aminobutyric acid	1.59 (m) 2.26 (t, *J* = 7.3 Hz)	24.8, 35.6, 182.7	PFPe PFPu PFS	Villalón-López et al. (2023)
5	–	–	–	–	Tyrosine	6.75 (d, *J* = 8.8 Hz) 7.09 (d, *J* = 8.8 Hz)	116.0, 129.7, 133.4, 158.6	PFPe PFS	(Caligiani et al., 2010; Campelo et al., 2024)
6	3.9	203.0826	203.0821	116.9285 (100) 142.0642 (10)	Tryptophan ($C_7H_8N_4O_2$, 2.5)	6.91 (d, *J* = 8.3 Hz), 7.32 (sl) 7.55 (m)	111.3, 118.6, 125.2		(Bertazzo et al., 2011; Kuhn et al., 2024)
Alkaloids									
7	2.9	181.0716 [M + H]$^+$	181.0726 [M + H]$^+$	124.0386 (100)	Theophylline ($C_7H_8N_4O_2$, -5.5)	3.53 (s), 3.73 (s), 8.08 (s)	29.6, 32.2, 100.3, 138,0, 152.3, 153.7	PFPe PFPu PFS	Villalón-López et al. (2023)
8	3.4	181.0727 [M + H]$^+$	181.0726 [M + H]$^+$	138.0672 (40) 110.0726 (20)	Theobromine ($C_7H_8N_4O_2$, 0.5)	7.89 (s)	–	PFPe PFPu PFS	Choi et al. (2005)
9	6.0	225.0969 [M + H]$^+$	225.0988 [M + H]$^+$	153.0513 (100) 210.0732 (70) 168.0766 (60)	Theacrine ($C_9H_{12}N_4O_3$, -8.4)	3.23 (s), 3.44 (s), 3.56 (s), 3.66 (s)	28.5, 29.5, 30.9, 32.2, 100.3, 138.0,152.3153.7	PFPu PFS	(Hammerstone JR et al., 1994; Wang et al., 2010)
10	6.5	195.0891 [M + H]$^+$	195.0882 [M + H]$^+$	138.0672 (100) 110.0726 (50)	Caffeine ($C_8H_{10}N_4O_2$, 4.6)	7.87 (s)	–		(Choi et al., 2005; Villalón-López et al., 2023)
Proanthocyanidin									
11	7.3	577.1342	577.1346	577.1342 (100) 289.0684 (50) 407.0764 (35) 425.0843 (20)	Procyanidin B1 ($C_{30}H_{26}O_{12}$, - 0.7)	–	–	PFPu PFS	Oliveira et al. (2022)
Aliphatic alcohol glycoside									
12	9.4	381.1771	381.1761	249.1345 (100) 381.1755 (70) 382.1785 (10) 161.0451 (20) 101.0242 (10) 113.0239 (12)	3-Methyl-1-butanol pentosyl-hexoside-1 ($C_{16}H_{30}O_{10}$, 2.7)	–	–	PFPe PFPu PFS	Wei et al. (2021)
Flavonoids									
13	8.0	289.0684	289.0712	289.0712 (100) 245.0808 (25)	Epicatechin ($C_{15}H_{14}O_6$, -9.7)	3.77 (m), 5.94 (m), 6.65 (d, *J* =	68.4, 96.9, 114.6, 119.4, 132.6, 147.5	PFPe PFPu PFS	Davis et al. (1996)

(*continued on next page*)

Table 2 (*continued*)

No	RT (min)	Observed ions [M − H] − (*m*/*z*)/[M + H]$^+$ (*m*/*z*)	Calculated ions [M − H] − (*m*/*z*)/M + H]$^+$ (*m*/*z*)	Product ions [M − H] − (*m*/*z*)/[M + H]$^+$ (*m*/*z*)	Compound (Elemental composition, Mass error in ppm)	δ ^{1}H in ppm (*J*, Hz)	δ ^{13}C in ppm	Fractions	References
				203.0696 (40) 137.0240 (90) 125.0227 (80) 109.0293 (50)		8.0 Hz) 6.84 (m)			
14	10.4	449.0695	449.0720	316.0214 (100) 317.0290 (20)	Myricetin-3-*O*-arabinoside ($C_{20}H_{18}O_{12}$, - 5.5)	–	–	PFPe PFS	
15	12.9	433.0777	433.0771	300.0277 (100) 271.0245 (50) 433.0777 (30) 255.0270 (15)	Quercetin-3-arabinopyranoside (Guaijaverin) ($C_{20}H_{18}O_{11}$, 1.4)	7.63 (m)	103.2, 121.8	PFPe PFPu PFS	(Oliveira et al., 2022; Silva et al., 2025)
16	13.9	447.0907	447.0927	300.0277 (100) 301.0331 (90) 271.0245 (45) 255.0284 (20)	Quercetin-3-*O*-rhamnoside (quercitrin) ($C_{21}H_{20}O_{11}$, - 4.4)	0.91 (m), 5.34 (sl), 6.20 (d, *J* = 2.0 Hz), 6.38 (d, *J* = 2.0 Hz), 6.90 (d, *J* = 8.2 Hz), 7.30 (dd, *J* = 8.2; 2.0 Hz), 7.33 (d, *J* = 2.0 Hz)	16.2, 93.4, 98.6, 102.3, 116.5, 115.6, 121.6	PFPe PFPu PFS	Oliveira et al. (2021)
17	15.5	463.0872	463.0877	316.0214 (80) 271.0245 (12)	Myricetin-3-*O*-rhamnoside (Myricitrin) ($C_{21}H_{20}O_{12}$, - 1,1)	5.33 (sl), 6.94 (sl)	102.3, 109.5, 145.4	PFPe PFS	Oliveira et al. (2021)
18	15.8	431.0968	431.0978	284.0313 (100) 285.0403 (45) 255.0284 (25)	Kaempferol-3-*O*-rhamnoside ($C_{21}H_{20}O_{10}$, - 2.3)	0.90 (m), 5.37 (sl), 6.20 (d, *J* = 2.0 Hz), 6.39 (d, *J* = 2.0 Hz), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz)	16.3, 93.4, 98.6, 102.2, 115.2, 130.6	PFPe	Oliveira et al. (2021)
19	16.4	447.0907	447.0927	285.0365 (20)	Kaempferol-3-*O*-glucoside (Astragalin) ($C_{21}H_{20}O_{10}$, - 4.5)	6.83 (d, *J* = 8.8 Hz), 8.06 (d, *J* = 8.8 Hz), 6.36 (m)	115.4		(Ren et al., 2012; Silva et al., 2025)
20	19.1	285.0375	285.0399	133.0302 (100) 151.0047 (30) 217.0491 (20)	Kaempferol ($C_{15}H_{10}O_6$, - 8.4)	6.80 (d, *J* = 8.5 Hz), 8.00 (d, *J* = 8.5 Hz), 6.17 (d, *J* = 2.3 Hz), 6.33 (m)	115.4	PFPe PFPu PFS	Ren et al. (2012)
Lignan									
21	13.9	523.2147	523.2178	361.1668 (100)	(−)-Secoisolariciresinol-9′-*O*-β-D-glucopyranoside ($C_{26}H_{36}O_{11}$, -5.9)	3.84 (m), 4.26 (d, *J* = 8.0 Hz), 6.65 (d, *J* = 8.0 Hz), 6.58 (d, *J* = 1.8 Hz)	62.5, 104.6, 113.4, 122.4, 144.2	PFPe PFPu PFS	Crispim et al. (2025)
Diterpenoid glycoside									
22	12.3	521.2033	521.2017	521.2033 (100) 359.1468 (40) 344.1263 (10) 341.1371 (5)	Furanoid diterpene glycoside ($C_{26}H_{33}O_{11}$, 3.1)	–	–	PFPe	Xu et al. (2017)
Phenylpropanoid glycoside									
23	16.3	371.1330	371.1342	209.0804 (100) 371.1330 (50) 165.0902 (10)	Syringin ($C_{17}H_{24}O_9$, -3,23)	3.81 (m), 3.89 (s), 6.36 (d, *J* = 5.5 Hz)	56.7, 62.7, 130.8	PFPu PFS	Qian et al. (2024)

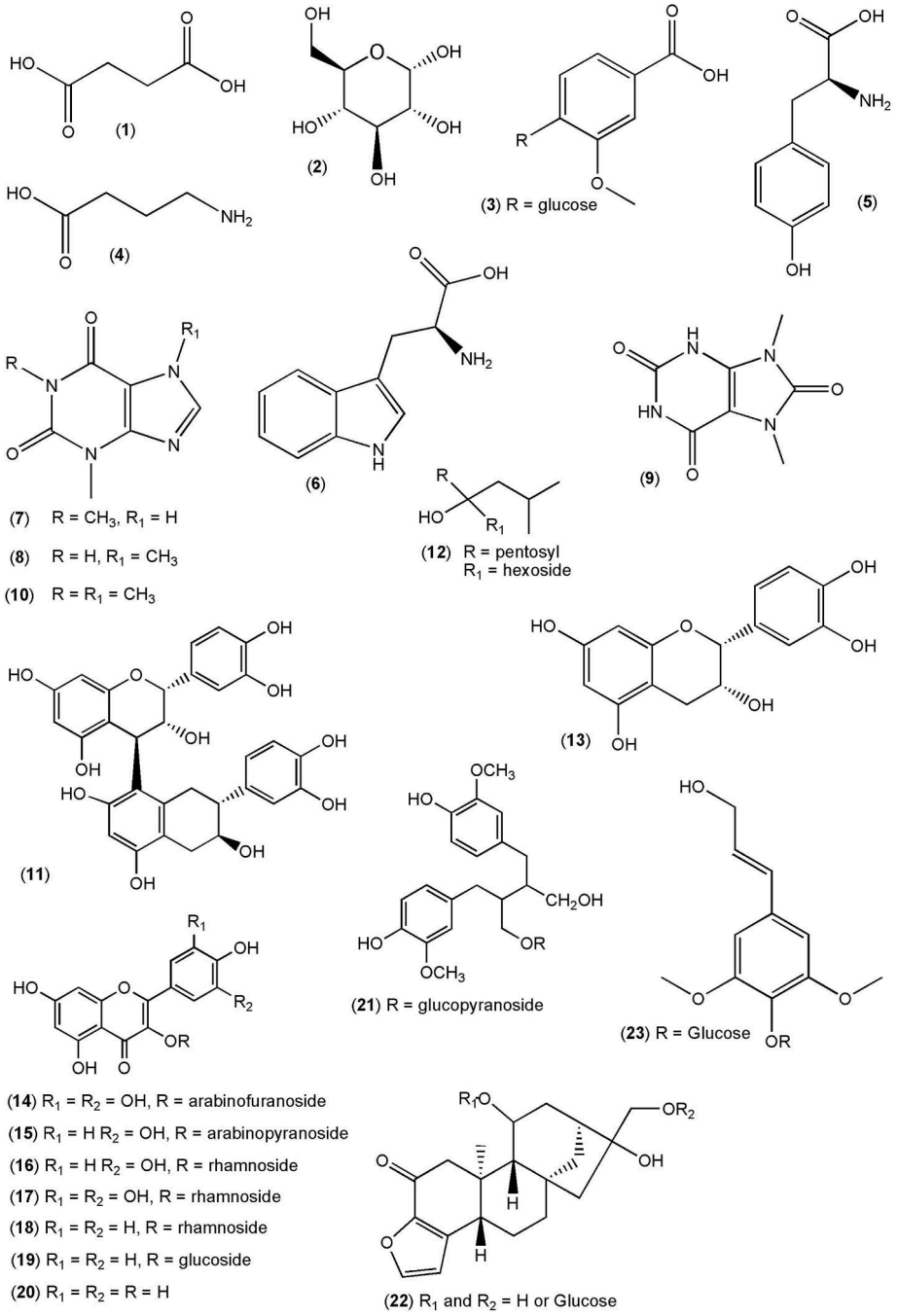


Fig. 2. Chemical structures of the constituents identified in *T. sylvestre* fruits by LC-HRMS and NMR analyses.

carbon at δ_C 30.1 and long-range correlation with a carbon at δ_C 175.1 (Caligiani et al., 2010). A carbinolic proton signal at δ_H 5.09 (d, J = 3.7 Hz), characteristic of α-glucose (**2**), was also observed in all fractions (Silva et al., 2025). In addition, vanillic acid glycoside isomer 1 (**3**) was identified by its molecular ion at *m/z* 329.0881 $[M-H]^-$ (RT 6.3 min), which produced a fragment at *m/z* 167.0334 $[M-H]^-$, consistent with vanillic acid after the loss of a hexose unit (162 Da) (Shang et al., 2022).

The amino acid γ-aminobutyric acid (GABA) (**4**) was identified by a triplet at δ_H 2.26 ($J = 7.3$ Hz), showing correlation with a multiplet at δ_H 1.59 (Villalón-López et al., 2023). Tyrosine (**5**) was detected in the pulp and seed fractions, with stronger ^{1}H NMR signals in the seed fraction. Two doublets at δ_H 6.75 ($J = 8.8$ Hz) and δ_H 7.09 ($J = 8.8$ Hz) were observed, typical of a *para*-substituted aromatic ring with ortho coupling (Caligiani et al., 2010). Additionally, tryptophan (**6**) was detected in the pulp fraction, evidenced by a singlet at δ_H 7.32, correlating with carbons at δ_C 108 and δ_C 27.8 (Kuhn et al., 2024). Tryptophan levels have been previously quantified in cacao beans from various origins (Bertazzo et al., 2011).

The methylxanthine alkaloids theophylline (**7**, RT 2.9 min) and theobromine (**8**, RT 3.4 min) are constitutional isomers with the same *m/z* value of 181.07 $[M+H]^+$, but they exhibit distinct fragmentation patterns. Theophylline yields a fragment at *m/z* 124.0386 due to imidazole ring cleavage (−57 Da), whereas theobromine produces a fragment at *m/z* 138.0672 from the combined loss of CO and CH_3 (−43 Da). Theacrine (**9**, RT 6.0 min) was identified by its molecular ion at *m/z* 225.0969 $[M+H]^+$, with characteristic fragment losses of a methyl group (−15 Da) and CO + CH_3 (−43 Da). A similar fragmentation pattern (−43 Da) was observed for caffeine (**10**, RT 6.5 min).

Characteristic ^{1}H NMR singlets at δ_H 7.89 (theobromine) and δ_H 7.87 (caffeine) confirmed their identities. Singlets for theophylline and theacrine were also observed; theacrine was found in the pulp and seed fractions, while theophylline appeared in all analyzed fractions. Compounds **7**, **8**, and **10** have been reported in cacao and cupuaçu seeds (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; Lo Coco et al., 2007), and are known for their pharmacological properties (Lo Coco et al., 2007).

The ion detected at RT 7.3 min with *m/z* 577.1342 [M−H]$^-$ was attributed to procyanidin B1 (**11**), previously reported in *T. cacao* seeds (Caligiani et al., 2010; Jean-Marie et al., 2022). The MS^2 fragment at *m/z* 289.0684 results from cleavage of the lower interflavan bond, yielding the (epi)catechin monomer (Rush et al., 2018). Additional retro Diels–Alder (RDA) fragmentation generated the ion at *m/z* 425.08 (−152 Da), followed by water loss to yield a fragment at *m/z* 407.0764 (Oliveira et al., 2022).

The compound with *m/z* 381.1771 [M−H]$^-$ was assigned to 3-methyl-1-butanol pentosyl-hexoside-1 (**12**), with a dominant MS^2 fragment at *m/z* 249.1345 (100 %) resulting from pentose loss (−132 Da) (Wei et al., 2021). The compound at RT 8.0 min with *m/z* 289.0684 [M−H]$^-$ was identified as epicatechin (**13**), a widely distributed flavan-3-ol. NMR data supported this identification, with signals at δ_H 6.65 (d, J = 8.0 Hz) and δ_H 6.84 (m) indicating an ortho/meta substitution pattern in ring B, typical of a 3′,4′-dihydroxy configuration.

Additional glycosylated flavonoids included myricetin-3-*O*-arabinoside (**14**, *m/z* 449.0695), quercetin-3-arabinopyranoside (**15**, *m/z* 433.0777 [M−H]$^-$), quercetin-3-*O*-rhamnoside (**16**, *m/z* 447.0907 [M−H]$^-$), myricetin-3-*O*-rhamnoside (**17**, *m/z* 463.0872 [M−H]$^-$), kaempferol-3-*O*-rhamnoside (**18**, *m/z* 431.0968 [M−H]$^-$), and kaempferol-3-*O*-glucoside (**19**, *m/z* 447.0927 [M−H]$^-$), all showing sugar loss and generation of aglycone ions at *m/z* 316 (myricetin), *m/z* 300 (quercetin), and *m/z* 285 (kaempferol). In addition to glycosidic cleavage, RDA fragmentation of ring C was observed in compounds **15**, **16**, and **18**, generating fragments at *m/z* 255.0270 and *m/z* 255.0284. ^{1}H NMR assignments for flavonoids **15** to **19** are detailed in Table 2. Furthermore, the compound at RT 19.1 min with *m/z* 285.0399 [M−H]$^-$ was identified as kaempferol (**20**), confirmed by ^{1}H NMR signals: two doublets at δ_H 6.80 (J = 8.5 Hz) and δ_H 8.00 (J = 8.5 Hz), consistent with an AA'BB′ system in ring B (Ren et al., 2012).

Additionally, the lignan secoisolariciresinol-9′-*O*-β-D-glucopyranoside (**21**, *m/z* 523.2147 [M−H]$^-$) was detected in all three fractions, supported by ^{1}H NMR signals at δ_H 6.58 (d, J = 1.8 Hz) and δ_H 6.65 (d, J = 8.0 Hz), correlating with δ_C 113.4 and δ_C 122.4, respectively (Crispim et al., 2025). In PFPe, a furanoid diterpenoid glycoside (**22**, RT 12.3 min) was identified with a molecular ion at *m/z* 521.2033 [M−H]$^-$, and fragmentation at *m/z* 359.1468 due to hexose loss (−162 Da) (Xu et al., 2017). At RT 16.3 min, the ion at *m/z* 371.1330 [M−H]$^-$ was detected in the pulp and seed fractions. The ^{1}H NMR spectrum showed characteristic signals of syringin (**23**): δ_H 3.81 (m), δ_H 3.89 (s), and δ_H 6.36 (d, J = 5.5 Hz), correlating with δ_C 56.7, δ_C 62.7, and δ_C 130.8, respectively (Qian et al., 2024).

Overall, the combined LC-HRMS and 1D/2D NMR analyses were effective for the identification of metabolites in *T. sylvestre* fractions. Notably, compounds **12**, **21**, **22**, and **23** had not previously been reported in *Theobroma* species.

3.3. Cytotoxic and antiproliferative assay

The phenolic fractions from the peel, pulp, and seeds of *T. sylvestre* fruit were evaluated against human lung adenocarcinoma epithelial cells (A549), human colorectal carcinoma cells (HCT-8), and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). According to the cytotoxicity classification proposed by Anywar et al. (2022) and the National Cancer Institute (NCI), compounds with IC_{50} values ≤ 20 μg/mL are considered highly cytotoxic, those between 21 and 200 μg/mL moderately cytotoxic, and those between 201 and 500 μg/mL weakly cytotoxic. Evaluation according to these criteria revealed that the samples exhibited a predominantly moderate cytotoxic profile across all evaluated cell lines, both healthy and cancerous, with IC_{50} values ranging from 12.63 to 95.66 μg/mL (Fig. 3). Regarding the selectivity index (SI), *T. sylvestre* extracts exhibited low overall selectivity, as SI values above 3 are indicative of preferential cytotoxicity toward tumor cells. Notably, the seed fraction showed relatively higher selectivity toward normal cells (e.g., HUVEC), with SI values in the range of 0.5, suggesting increased cytotoxicity to non-tumor cells (Granato et al., 2022) (Table 3).

Additionally, the fractions demonstrated relevant antiproliferative activity, particularly the seed fraction, which showed the lowest GI_{50} value against HUVEC cells (7.55 μg/mL). In contrast, the peel (GI_{50} = 30.4 μg/mL) and pulp (GI_{50} = 26.7 μg/mL) fractions were more effective against HCT-8 cancer cells.

Within the Malvaceae family, the species *Sida santaremnensis* H. Monteiro also demonstrated significant antiproliferative activity, attributed to the presence of the flavonoid kaempferol (**20**) (Marques et al., 2021), a compound investigated as a therapeutic agent for hepatocellular carcinoma due to its well-documented antitumor effects (Guo et al., 2016; Huang et al., 2013). In the present study, kaempferol was identified in all three fractions of *T. sylvestre* fruit, supporting the cytotoxic effects observed in the tested cell lines. This same bioactive constituent was previously identified in the phenolic fraction of *T. mariae* flowers, which also exhibited antiproliferative activity against both normal (HUVEC) and tumor (HepG2) cell lines (Silva et al., 2025). Another relevant flavonoid, astragalin (**19**), a glycosylated derivative of kaempferol, has also been widely recognized for its anticancer properties. Studies have shown that astragalin significantly inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2, Huh-7, and H22) in *in vitro* assays (Li et al., 2017). The polyphenol procyanidin B1 (**11**), identified in the pulp and seed fractions of *T. sylvestre*, has been associated with notable antitumor activity. Recent studies demonstrated that oral administration of procyanidin B1 in murine models (15 mg/kg) significantly inhibited tumor growth in HepG2 cells, achieving a tumor inhibition rate of approximately 60 % without causing adverse metabolic effects (Na et al., 2020). Another flavonoid, myricitrin (**17**), detected in the peel and seed fractions of *T. sylvestre*, has demonstrated significant antiproliferative effects by inhibiting VEGF-induced angiogenesis in vascular endothelial cells and reducing tumor growth *in vivo* in U251 glioblastoma xenograft models (Hu et al., 2020). Therefore, the chemical profile of *T. sylvestre* fruit, particularly the presence of bioactive compounds such as kaempferol, astragalin, procyanidin B1, and myricitrin, may be directly associated with the observed cellular effects. These findings open new avenues for future investigations into the therapeutic potential of this Amazonian species.

4. Conclusion

A total of twenty-three compounds were identified in the phenolic fractions of *T. sylvestre*, including methylxanthine alkaloids and both free and glycosylated flavonoids, which have been previously reported in other *Theobroma* species. Notably, four additional metabolites are reported here for the first time in the genus: 3-methyl-1-butanol pentosyl-hexoside-1, secoisolariciresinol-9′-*O*-β-D-glucopyranoside, a furanoid diterpenoid glycoside, and syringin. This finding suggests unique chemical features of *T. sylvestre*. Furthermore, the samples exhibited moderate cytotoxicity and relevant antiproliferative effects against endothelial (HUVEC) and cancer cell lines (A549 and HCT-8). These effects that are attributed to the presence of bioactive compounds such as kaempferol, astragalin, procyanidin B1, and myricitrin, reinforcing the therapeutic potential of this Amazonian species. Collectively, these findings significantly advance the phytochemical knowledge of *T. sylvestre*. They also provide a solid basis for future studies focused on the quantification of bioactive compounds and the evaluation of functional properties, ultimately contributing to its potential pharmacological, nutraceutical, and biotechnological applications.

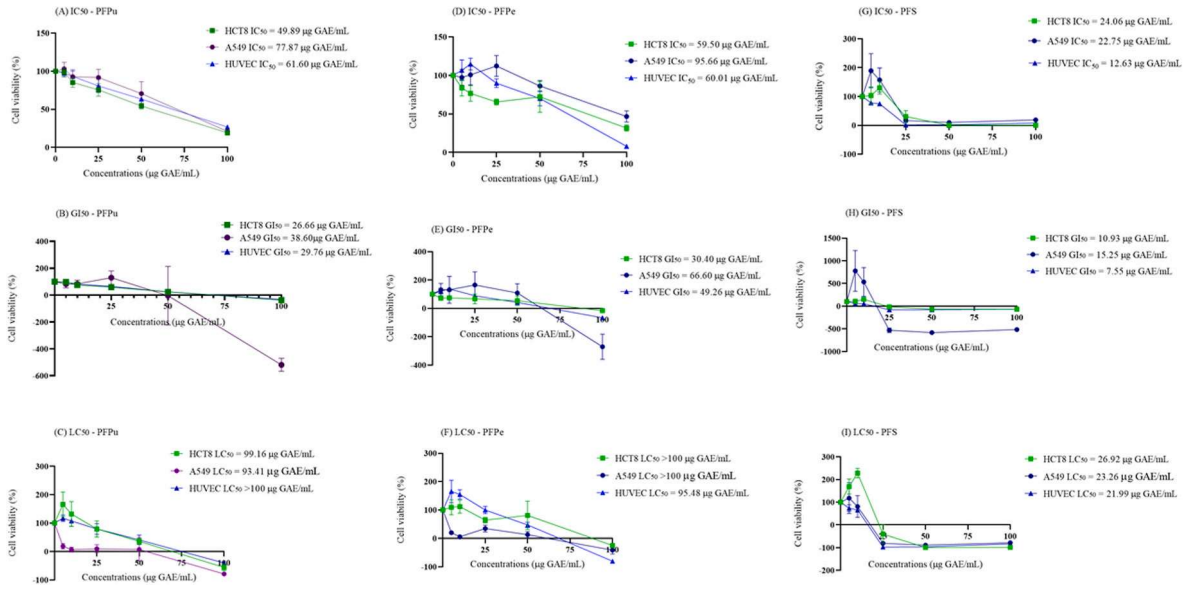


Fig. 3. Cytotoxicity assessment of PFPe (Phenolic Fraction of Peels); PFPu (Phenolic Fraction of Pulp) and PFS (Phenolic Fraction of Seeds) was performed on A549, HCT8, and HUVEC cell lines. (A, D and G) IC_{50}: the concentration of the agent that reduces cell growth by 50 %. (B, E and H) GI_{50}: the agent concentration that decreases growth by 50 % compared to untreated cells. (C, F and I) LC_{50}: the agent concentration that causes a net reduction of 50 % of the cells relative to the initial cell count at the beginning of treatment.

Table 3
IC_{50} and Selectivity Index (SI) of the extracts PFPe, PFPu and PFS.

Samples	IC_{50} (µg GAE/mL)			SI	
	HUVEC	A549	HCT-8	HUVEC/A549	HUVEC/HCT-8
PFPe	60.01	95.66	59.50	0.62	1.01
PFPu	61.60	77.87	49.89	0.79	1.23
PFS	12.63	22.75	24.06	0.55	0.52

Notes: IC_{50} is defined as the concentration of an agent that reduces cell growth by 50 %, calculated when (T/C) × 100 = 50, where T is the cell count at treatment time and C is the control cell count at the same time. The selectivity index (SI) is determined by dividing the IC_{50} value for HUVEC cells by the IC_{50} value for cancer cells. PFPe (Phenolic Fraction of Peels); PFPu (Phenolic Fraction of Pulp) and PFS (Phenolic Fraction of Seeds).

CRediT authorship contribution statement

Edson Queiroz da Fonseca Júnior: Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Daniel de Queiroz Rocha:** Writing – original draft, Formal analysis, Data curation. **Edinilze Souza Coelho Oliveira:** Writing – original draft, Formal analysis. **Samuel Oliveira da Silva:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Francisca das Chagas do Amaral Souza:** Methodology, Data curation. **Gabriela Furlaneto:** Methodology, Data curation. **Laura da Silva Cruz:** Methodology, Data curation. **Luciana Azevedo:** Methodology, Data curation. **Renilto Frota Correa:** Writing – review & editing, Resources. **Edgar Aparecido Sanches:** Writing – review & editing, Writing – original draft. **Pedro Henrique Campelo:** Writing – review & editing, Writing – original draft. **Jaqueline de Araújo Bezerra:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Project administration, Methodology, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank to FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, grant number 01.02.016301.01140/2023–33 CHAMADA PÚBLICA N. 003/2022 - JOVENS DOUTORES, Edital n. 013/2022 - Produtividade em CT&I, Analytical Center IFAM-CMC, Post-graduate Program in Chemistry at the Federal University of Amazonas (PPGQ-UFAM) and Nuclear Magnetic Resonance Laboratory (NMRLab) of the Analytical Center of UFAM for the financial support, fellowships, and infrastructure. The authors also acknowledge the support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107673.

Data availability

Data will be made available on request.

References

Alzahrani, H. R., Kumakli, H., Ampiah, E., Mehari, T., Thornton, A. J., Babyak, C. M., & Fakayode, S. O. (2017). Determination of macro, essential trace elements, toxic heavy metal concentrations, crude oil extracts and ash composition from Saudi Arabian fruits and vegetables having medicinal values. *Arabian Journal of Chemistry, 10*, 906–913. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.012

Anywar, G. U., Kakudidi, E., Oryem-Origa, H., Schubert, A., & Jassoy, C. (2022). Cytotoxicity of medicinal plant species used by traditional healers in treating people suffering from HIV/AIDS in Uganda. *Front. Toxicol., 4*. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.832780

Araujo, N. M. P., Arruda, H. S., Marques, D. R. P., de Oliveira, W. Q., Pereira, G. A., & Pastore, G. M. (2021). Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: A review. *Food Research International, 147*, Article 110520. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110520

Balcázar-Zumaeta, C. R., Castro-Alayo, E. M., Cayo-Colca, I. S., Idrogo-Vásquez, G., & Muñoz-Astecker, L. D. (2023). Metabolomics during the spontaneous fermentation in cocoa (*Theobroma cacao* L.): An exploratory review. *Food Research International, 163*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112190

Benlloch-Tinoco, M., Nuñez Ramírez, J. M., García, P., Gentile, P., & Girón-Hernández, J. (2024). Theobroma genus: Exploring the therapeutic potential of *T. grandiflorum* and

T. bicolor in biomedicine. *Food Bioscience, 61*, Article 104755. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104755

Bertazzo, A., Comai, S., Brunato, I., Zancato, M., & Costa, C. V. L. (2011). The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in Theobroma cacao beans. *Food Chemistry, 124*, 93–96. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.110

Bezerra, J. de A., Corrêa, R. F., Sanches, E. A., Lamarão, C. V., Stringheta, P. C., Martins, E., & Campelo, P. H. (2024). "Cupuaçu" (*Theobroma grandiflorum*): a brief review on chemical and technological potential of this Amazonian fruit. *Food Chem. Adv, 5*, Article 100747. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100747

Borges, E. M. E. S., Silva, F. L. H. da, Ferreira, A. L. de O., & Medeiros, L. L. de (2021). Cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) as a substrate in the preparation of potentially probiotic Pulpa. *Res. Soc. Dev., 10*, Article e01101119002. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19002

Caligiani, A., Acquotti, D., Cirlini, M., & Palla, G. (2010). 1H NMR study of fermented cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*, Article 12105c12111. https://doi.org/10.1021/jf102985w

Campelo, M. da S., Câmara Neto, J. F., Magalhães, H. C. R., Alves Filho, E. G., Zocolo, G. J., Leal, L. K. A. M., & Ribeiro, M. E. N. P. (2024). GC/MS and 2D NMR-based approach to evaluate the chemical profile of hydroalcoholic extract from *Agaricus blazei* Murill and its anti-inflammatory effect on human neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology, 322*, Article 117676. https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117676

Carrion, L. L., Ramos, D. F., Martins, D., Osório, M. I. C., & Cursino, L. D. (2013). Antimycobacterial activity of Brazilian Amazon plants extracts. *Int. J. Phytomedicine, 5*, 479–485.

Choi, Y. H., Sertic, S., Kim, H. K., Wilson, E. G., Michopoulos, F., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Kricun, S. D. P., & Verpoorte, R. (2005). Classification of Ilex species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*, 1237–1245. https://doi.org/10.1021/jf0486141

Crispim, M., Silva, T. C., Lima, A., dos, S., Cruz, L. da S., Bento, N. A., Cruz, T. M., Stelle, Y., Mar, J. M., Rocha, D. de Q., Bezerra, J. de A., & Azevedo, L. (2025). From traditional amazon use to food applications: *Tapirira guianensis* seed extracts as a triad of antiproliferative effect, oxidative defense, and antimalarial activity. *Foods, 14*, 467. https://doi.org/10.3390/foods14030467

da Silva, C. V. A., Salimo, Z. M., de Souza, T. A., Reyes, D. E., Bassicheto, M. C., de Medeiros, L. S., Sartim, M. A., de Carvalho, J. C., Gonçalves, J. F. C., Monteiro, W. M., Tavares, J. F., de Melo, G. C., da Silva, F. M. A., Bataglion, G. A., & Koolen, H. H. F. (2024). Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): A multifunctional Amazonian fruit with extensive benefits. *Food Research International, 192*, Article 114729. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114729

Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P., & Lewis, J. R. (1996). 1H and 13C NMR assignments of some green tea polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry, 34*, 887–890. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199611)34:11<887::AID-OMR995>3.0.CO;2-U

Duarte, W. F., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., Almeida e Silva, J. B., & Schwan, R. F. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiroba, jaboticaba and umbu. *Lwt, 43*, 1564–1572. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.010

Febrianto, N. A., & Zhu, F. (2022). Comparison of bioactive components and flavor volatiles of diverse cocoa genotypes of *Theobroma grandiflorum, Theobroma bicolor, Theobroma subincanum* and *Theobroma cacao*. *Food Research International, 161*, Article 111764. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111764

Gilabert-Escrivá, M. V., Gonçalves, L. A. G., Silva, C. R. S., & Figueira, A. (2002). Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 82*, 1425–1431. https://doi.org/10.1002/jsfa.1107

Giorgetti, M., Negri, G., & Rodrigues, E. (2007). Brazilian plants with possible action on the central nervous system - A study of historical sources from the 16th to 19th century. *Journal of Ethnopharmacology, 109*, 338–347. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.003

Granato, D., Reshamwala, D., Korpinen, R., Azevedo, L., do Carmo, M. A. V., Cruz, T. M., Marques, M. B., Wen, M., Zhang, L., Marjomäki, V., & Kilpeläinen, P. (2022). From the forest to the plate – Hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. *Food Chemistry, 381*, Article 132284. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132284

Guo, H., Ren, F., Zhang, L., Zhang, X., Yang, R., Xie, B., Li, Z., Hu, Z., Duan, Z., & Zhang, J. (2016). Kaempferol induces apoptosis in HepG2 cells via activation of the endoplasmic reticulum stress pathway. *Molecular Medicine Reports, 13*, 2791–2800. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4845

Hammerstone, J. R., Romanczyk, L. J., & Aitken, W. M. (1994). Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. *Phytochemistry, 35*, 1237–1240. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94827-1

Hu, Z., Zhao, G., Gou, W., & Cheng, H. (2020). Myricitrin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells and mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 130*, Article 110726. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110726

Huang, W.-W., Tsai, S.-C., Peng, S.-F., Lin, M.-W., Chiang, J.-H., Chiu, Y.-J., Fushiya, S., Tseng, M. T., & Yang, J. S. (2013). Kaempferol induces autophagy through AMPK and AKT signaling molecules and causes G2/M arrest via downregulation of CDK1/cyclin B in SK-HEP-1 human hepatic cancer cells. *International Journal of Oncology, 42*, 2069–2077. https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1909

Jardim Botânico do Rio de Janeiro (n.d.). Malvaceae in Flora e Funga do Brasil. https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB156 (accessed May 1, 2025).

Jean-Marie, E., Jiang, W., Bereau, D., & Robinson, J. C. (2022). Theobroma cacao and Theobroma grandiflorum: Botany, composition and pharmacological activities of pods and seeds. *Foods, 11*, 3966. https://doi.org/10.3390/foods11243966

Kuhn, L. T., Weber, S., Bargon, J., Parella, T., & Pérez-Trujillo, M. (2024). Hyperpolarization-Enhanced NMR spectroscopy of unaltered biofluids using Photo-CIDNP. *Analytical Chemistry, 96*, 102–109. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03215

Li, W., Hao, J., Zhang, L., Cheng, Z., Deng, X., & Shu, G. (2017). Astragalin reduces hexokinase 2 through increasing miR-125b to inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65*, 5961–5972. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02120

Lim, T. K. (2014). Malvaviscus arboreus. In *Edible medicinal and non medicinal plants* (pp. 405–408). Netherlands, Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8748-2_29.

Lo Coco, F., Lanuzza, F., Micali, G., & Cappellano, G. (2007). Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in by-products of cupuacu and cacao seeds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science, 45*, 273–275. https://doi.org/10.1093/chromsci/45.5.273

Lutz, I. A. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 1ª edição. Instituto Adolfo Lutz, Brasil, São Paulo*.

Marques, A. E. F., Monteiro, T. M., Dos Santos, C. R. B., Piuzevan, M. R., De Souza, M. D. F. V., Mororó, G. T., Alves, M. M. de M., Carvalho, F. A. de A., Arcanjo, D. D. R., Gonçalves, J. C. R., & Costa, D. A. da (2021). Flavonoides isolados de *Sida santaremnensis* H. Monteiro ("Guanxuma") e avaliação das atividades biológicas. *Ciencia e Natura, 43*, e58. https://doi.org/10.5902/2179460X64361

Ministério da Agricultura, P. e A. (2018). Instrução Normativa nº 37 de 1º de outubro de 2018. https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/44304943/do1-2018-10-08-instrucao-normativa-n-37-de-1-de-outubro-de-2018-44304612. (Accessed 1 May 2025).

Na, W., Ma, B., Shi, S., Chen, Y., Zhang, H., Zhan, Y., & An, H. (2020). Procyanidin B1, a novel and specific inhibitor of Kv10.1 channel, suppresses the evolution of hepatoma. *Biochemical Pharmacology*. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114089. Elsevier Inc.

Nwonuma, C. O., Abdurrahman, J. E., Rotimi, D. E., Evbuomwan, I. O., Lele, K. C., Alejolowo, O. O., Ezea, S. C., Asogwa, N. T., & Oludipe, E. O. (2023). *Theobroma cacao* fortified-feed ameliorates potassium bromate-induced oxidative damage in male Wistar rat. *Toxicology Reports, 10*, 269–280. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.02.007

Ogunlaja, O. O., Moodley, R., Baijnath, H., & Jonnalagadda, S. B. (2020). Elemental distribution and health risk assessment of the edible fruits of two *Ficus* species, *Ficus sycomorus* L. and *Ficus burtt-davyi* Hutch. *Biological Trace Element Research, 198*, 303–314. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02048-4

Oliveira, E. S. C., Acho, L. D. R., da Silva, B. J. P., Morales-Gamba, R. D., Pontes, F. L. D., do Rosário, A. S., de, A., Bezerra, J., Campos, F. R., Barcellos, J. F. M., Lima, E. S., & Machado, M. B. (2022). Hypoglycemic effect and toxicity of the dry extract of *Eugenia biflora* (L.) DC. leaves. *Journal of Ethnopharmacology, 293*, Article 115276. https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115276

Oliveira, A. C. de, Cruz, J. M., dos, A., Mar, J. M., Corrêa, R. F., Rodrigues, J. V. da S., Mendes, T. A. de O., Aguiar, J. P. L., Souza, F., das, C. do A., Neves, K. de O. G., Santos, A. D. C., Sanches, E. A., Campelo, P. H., Oliveira, L. M., & Bezerra, J. de A. (2025). Abiu-do-Mato (*Pouteria caimito*, Sapotaceae): A promising Amazonian fruit with rich chemical composition, antioxidant potential, and cytotoxic safety. *Food Research International, 205*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115984

Oliveira, E. S. C., Pontes, F. L. D., Acho, L. D. R., do Rosário, A. S., da Silva, B. J. P., de, A., Bezerra, J., Campos, F. R., Lima, E. S., & Machado, M. B. (2021). qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. *Journal of Pharmacy Biomedicine Analytical, 201*. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114109

Palmeira, L., Pereira, C., Dias, M. I., Abreu, R. M. V., Corrêa, R. C. G., Pires, T. C. S. P., Alves, M. J., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Nutritional, chemical and bioactive profiles of different parts of a Portuguese common fig (*Ficus carica* L.) variety. *Food Research International, 126*, Article 108572. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108572

Patil, P. P., Patil, V. S., Khanal, P., Darasaguppe, H. R., Charla, R., Bhatkande, A., Patil, B. M., & Roy, S. (2022). Network pharmacology and *in vitro* testing of *Theobroma cacao* extract's antioxidative activity and its effects on cancer cell survival. *PLoS One, 17*, 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259757

Pereira, A. L. F., Abreu, V. K. G., & Rodrigues, S. (2018). Cupuassu— *Theobroma grandiflorum*. *Exot. Fruits*, 159–162. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00021-6

Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International, 48*, 634–640. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005

Qian, Q., Pan, J., Yang, J., Wang, R., Luo, K., Wu, Z., Ma, S., Wang, Y., Li, M., & Gao, Y. (2024). Syringin: A naturally occurring compound with medicinal properties. *Frontiers in Pharmacology, 15*, 1–18. https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1435524

Ramos-Escudero, F., Rojas-García, A., Cádiz-Gurrea, M. de la L., & Segura-Carretero, A. (2024). High potential extracts from cocoa byproducts through sonotrode optimal extraction and a comprehensive characterization. *Ultrasonics Sonochemistry, 106*, Article 106887. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106887

Ren, G., Hou, J., Fang, Q., Sun, H., Liu, X., Zhang, L., & Wang, P. G. (2012). Synthesis of flavonol 3-*O*-glycoside by UGT78D1. *Glycoconjugate Journal, 29*, 425–432. https://doi.org/10.1007/s10719-012-9410-5

Rush, M. D., Rue, E. A., Wong, A., Kowalski, P., Glinski, J. A., & Van Breemen, R. B. (2018). Rapid determination of procyanidins using MALDI-ToF/ToF mass

spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66*, 11355–11361. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04258

Saldarriaga, S., Rodríguez-Salazar, C. A., Recalde-Reyes, D. P., Beltrán, G. M. P., Álvarez, L. N. C., & Ortíz, Y. L. S. (2025). Phenolic composition, antioxidant, and anti-proliferative activities against human colorectal cancer cells of Amazonian fruits copoazú (*Theobroma grandiflorum*) and Buriti (*Mauritia flexuosa*). *Molecules, 30*, 1–17. https://doi.org/10.3390/molecules30061250

Shang, Y.-F., Zhang, T.-H., Thakur, K., Zhang, J.-G., Cespedes-Acuña, C. L. A., & Wei, Z.-J. (2022). HPLC-MS/MS targeting analysis of phenolics metabolism and antioxidant activity of extractions from *Lycium barbarum* and its meal using different methods. *Food Science and Technology, 42*, Article e71022. https://doi.org/10.1590/fst.71022

Silva, L. Y. S., Cavalcante, D. N., Oliveira, E. S. C., Salvador, A. M., Pereira, Z. C., Consentini, J. C. C., Furlaneto, G., Campelo, P. H., Sanches, E. A., Azevedo, L., & Bezerra, J. de A. (2025). *Theobroma mariae*: Bioactive compound-rich flowers. *Plants, 14*, 377. https://doi.org/10.3390/plants14030377

Velasquez-Vasconez, P. A., Castro-Zambrano, M. I., Rodríguez-Cabal, H. A., Castro, D., Arbelaez, L., & Zambrano, J. C. (2025). Exploring *Theobroma grandiflorum* diversity to improve sustainability in smallholdings across Caquetá, Colombia. *Italian Journal of Agronomy, 20*, Article 100034. https://doi.org/10.1016/j.ijagro.2025.100034

Villalón-López, D. N., Hernández-Ortega, M., Ortiz-Moreno, A., Ceballos, G., Zepeda-Vallejo, G., & Valadez-Carmona, L. (2023). ^{1}H NMR-based metabolomics of cacao pod husk: Profile comparison of three drying treatments. *Explor. Foods Foodomics, 1*, 101–104. https://doi.org/10.37349/eff.2023.00009

Vriesmann, L. C., Silveira, J. L. M., & Petkowicz, C. L. O. (2010). Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Carbohydrate Polymers, 79*, 312–317. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.013

Wang, Y., Yang, X., Zheng, X., Li, J., Ye, C., & Song, X. (2010). Theacrine, a purine alkaloid with anti-inflammatory and analgesic activities. *Fitoterapia, 81*, 627–631. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.03.008

Wei, Y., Chen, Z., Zhang, X. K., Duan, C. Q., & Pan, Q. H. (2021). Comparative analysis of glycosidic aroma compound profiling in three Vitis vinifera varieties by using ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Frontiers of Plant Science, 12*, Article 694979. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.694979

Xu, L.-L., Guo, F.-X., Chi, S.-S., Wang, Z.-J., Jiang, Y.-Y., Liu, B., & Zhang, J.-Y. (2017). Rapid screening and identification of diterpenoids in Tinospora sinensis based on high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *Molecules, 22*, 912. https://doi.org/10.3390/molecules22060912

Zapata-Alvarez, A., Bedoya-Vergara, C., Porras-Barrientos, L. D., Rojas-Mora, J. M., Rodríguez-Cabal, H. A., Gil-Garzon, M. A., Martinez-Alvarez, O. L., Ocampo-Arango, C. M., Ardila-Castañeda, M. P., & Monsalve-F, Z. I. (2024). Molecular, biochemical, and sensorial characterization of cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans: A methodological pathway for the identification of new regional materials with outstanding profiles. *Heliyon, 10*, Article e24544. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24544

Original Article
Food Science and Technology
ISSN 0101-2061 (Print)
ISSN 1678-457X (Online)
DOI: https://doi.org/10.5327/fst.585
CC BY

Nutritional and bioactive potential of *Theobroma subincanum* Mart.: a promising Amazonian fruit for the food industry

Edson Queiroz da FONSECA JUNIOR[1,2], Edinilze Souza Coelho OLIVEIRA[2], Daniel de Queiroz ROCHA[2], Samuel Oliveira da SILVA[1,2], Andreza Cavalcante de OLIVEIRA[1,2], Francisca das Chagas do Amaral SOUZA[3], Gabriela FURLANETO[4], Julia Carvalho Cardoso CONSENTINI[4], Luciana AZEVEDO[4], Pedro Henrique CAMPELO[5], Edgar Aparecido SANCHES[6], Railma Pereira MORAES[7], Jaqueline de Araújo BEZERRA[1,8*]

Abstract

Theobroma subincanum (cupuí) is an Amazonian species with recognized nutritional and bioactive potential, although its chemical composition and biological properties remain scarcely explored. This study characterized the chemical constituents and evaluated the cytotoxic effects of hydroalcoholic extracts obtained from the peel, pulp, and seeds of T. subincanum fruits. The extracts were analyzed by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and nuclear magnetic resonance, and their cytotoxic and antiproliferative activities were assessed against cancer (A549 and HCT8) and normal (human umbilical vein endothelial cells) cell lines. The seeds exhibited the highest levels of proteins, carbohydrates, and energy content, while the pulp and peel were rich in fatty acids such as palmitic and oleic acids. The compounds theacrine, epicatechin, clovamide, and luteolin were identified in the extracts. Cytotoxicity assays indicated moderate activity of the pulp extract against all tested cell lines (IC_{50} [inhibitory concentration that reduces cell viability by 50%]: 12.29–22.80 μg/mL), with higher selectivity toward cancer cells (selectivity index > 1). Overall, the findings highlight the nutritional relevance of the seeds and the bioactive potential of the pulp, suggesting promising applications in the food industry.

Keywords: Malvaceae; cytotoxicity; phenolic fractions; NMR; nutritional analysis.

Practical Application: The cupuí fruit shows potential for use in the food industry due to its nutritional and bioactive properties.

1 INTRODUCTION

The Amazon rainforest represents an invaluable reservoir of biological diversity, remarkable for its wide variety of edible fruits with distinctive flavors, as well as numerous unconventional food and medicinal plants. Although traditionally consumed by riverine and local populations, many of these species remain underexplored by both science and industry (Cruz et al., 2025). Within this rich biodiversity, species of the *Theobroma* genus (Malvaceae), such as cacao (*Theobroma cacao* L.) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.), stand out for their recognized applications in the food, cosmetic, and pharmaceutical sectors. In cacao processing, for instance, the beans produce a honey-like byproduct rich in reducing sugars, organic acids, and phenolic compounds, which contribute to its antioxidant potential and distinctive nutritional and physicochemical profile, highlighting its applicability in the food industry (Rocha et al., 2025; Silva et al., 2014). Conversely, cupuaçu seeds, owing to their high lipid content, are commercially exploited for butter and liqueur production, reinforcing their potential as a substitute for cacao derivatives in confectionery and chocolate industries (Benlloch-Tinoco et al., 2024; Bezerra et al., 2024).

Unconventional food plants (UFPs) have emerged as promising resources for the 21st-century food industry, offering alternative sources of nutrients, bioactive compounds, and natural

Received: Oct. 17, 2025.
Accepted: Nov. 9, 2025.
[1]*Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Química, Manaus, Amazonas, Brazil.*
[2]*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Núcleo de Estudos em Ciência e Tecnologia da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil.*
[3]*Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Laboratório de Análises Funcionais e Química dos Alimentos, Manaus, Amazonas, Brazil.*
[4]*Universidade Federal de Alfenas, Laboratory of Nutritional and Toxicological Analyses In Vitro and In Vivo, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.*
[5]*Universidade Federal de Viçosa, Department of Food Technology, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.*
[6]*Universidade Federal do Amazonas, Laboratory of Nanostructured Polymers, Manaus, Amazonas, Brazil.*
[7]*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil.*
[8]*Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Coordenação de Tecnologia e Inovação, Manaus, Amazonas, Brazil.*
*Corresponding author: jaqueline.bezerra@inpa.gov.br
Conflict of interest: nothing to declare.
Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (grant number 01.02.016301.01140/2023–33 Chamada Pública n. 003/2022—Jovens Doutores, Edital N. 006/2022—Painter), Analytical Center of the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Postgraduate Program in Chemistry of the Universidade Federal de Amazonas (UFAM), Nuclear Magnetic Resonance Laboratory of the Analytical Center of UFAM, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

ingredients with potential applications in food, pharmaceutical, and cosmetic formulations (Ferreira et al., 2024). These plants possess one or more edible parts, such as leaves, roots, fruits, or flowers, and may be wild or cultivated, native or exotic. They are typically absent from conventional diets, often due to limited consumer awareness or cultural habits (Milião et al., 2022). Among the lesser-known *Theobroma* species, *Theobroma sylvestre* has recently gained attention for its nutritional and pharmacological potential and is currently classified as a UFP (Kinupp & Lorenzi, 2014; Mar et al., 2024). Studies have revealed the presence of organic acids, amino acids, purine alkaloids, proanthocyanidins, flavonoids, and glycosylated terpenoids in this species, as well as antiproliferative activity associated with these metabolites (Fonseca Júnior et al., 2025).

Similarly, another underexplored Amazonian species is *Theobroma subincanum* Mart., commonly known as "cupuí" or "macambillo." This species is native to South America and is distributed in countries such as Peru, Colombia, Venezuela, and the northern regions of Brazil (Amazonas, Acre, and Rondônia). The fruits (Figure 1) are ellipsoid in shape, measuring approximately 7–11 cm in length and 5–6 cm in diameter. They have a thick and resistant pericarp covered with an indumentum similar to that of true cupuaçu. The numerous seeds are oblong, about 2–2.5 cm long, and are surrounded by a whitish-yellow pulp that is sweet and odorless (Lira et al., 2020). Although less commercially exploited than cacao and cupuaçu, this fruit is highly appreciated by local communities and consumed fresh or used in juices, refreshments, ice creams, liqueurs, and wines, owing to its edible yellowish pulp (Figure 1A) with a distinctive flavor and pronounced acidity (Lim, 2014; Lira et al., 2020; Martini et al., 2008). The seeds of *T. subincanum* contain tocopherols, fatty acids, and sterols distributed in their parts (embryo, tegument, and endosperm), highlighting their potential as an alternative to *T. cacao* in the production of chocolates and confectionery products (Bruni et al., 2002). Beyond its nutritional value, the species has attracted scientific attention due to its potential as a source of bioactive compounds (Febrianto & Zhu, 2022). However, its physicochemical characteristics, proximate composition, chemical profile, and biological activities remain poorly characterized.

Therefore, this study aimed to investigate the chemical composition and cytotoxic effects of extracts obtained from the peel, pulp, and seeds of *T. subincanum* fruits. The extracts were analyzed by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QToF/MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The cytotoxic and antiproliferative effects of the extracts were assessed in cancer cell lines as well as in healthy cells to evaluate selectivity.

1.1 Relevance of the work

This study performed the chemical characterization of phenolic fractions from different parts of *Theobroma subincanum* (cupuí) fruit, together with the cytotoxicity assessment against tumor and normal cells. The analysis of proximate composition, fatty acid profile, and phenolic compounds identified potential sources of nutrients and bioactive compounds for the food industry. These findings contribute to understanding the health potential and safety of this unconventional food plant, promoting the valorization of Brazilian biodiversity and encouraging the development of new applications for native fruits.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Standards, reagents, and solvents

Methanol, acetonitrile, and formic acid of HPLC grade were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled water was purified using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The leucine enkephalin reference solution was acquired from Waters Co. (Manchester, UK). Analytical grade reference standards were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used to prepare the

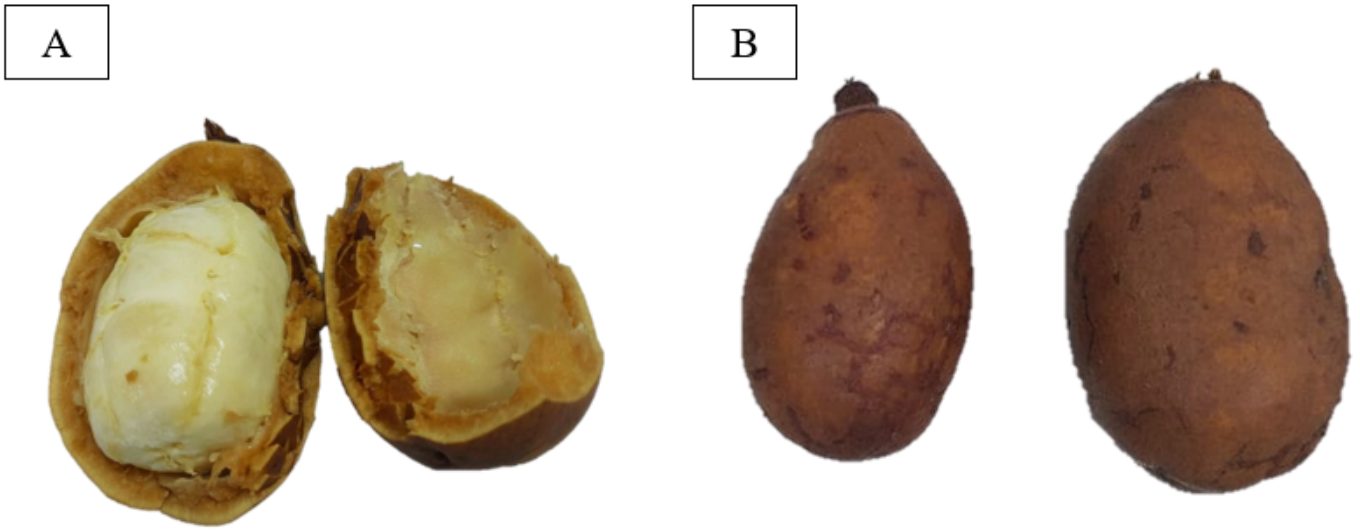


Figure 1. *Theobroma subincanum* Mart.: (A) Fruit pericarp; (B) Ripe cupuí fruits, highlighting their morphological and phenotypic characteristics. Images taken in Manaus, Amazonas, Brazil.

external calibration curves. All other reagents and solvents were of analytical grade and commercially available.

2.2 Collection and preparation of fruit samples

Fruits of *T. subincanum* Mart. were collected in February 2023 near Manaus, Amazonas, Brazil (Ramal da Boa Esperança, BR-174; 2°45′14.93″S, 60°2′22.47″W). Peel, pulp, and seeds were freeze-dried and extracted with ethanol/water (8:2, v/v) using an ultrasonic bath at room temperature for 30 min, repeated three times. Extracts were concentrated under ambient conditions, yielding 14.14, 46.34, and 8.72% for peel, pulp, and seed, respectively. Samples were defatted with hexane and further fractionated on Strata X SPE cartridges (Phenomenex, CA, USA), eluting sequentially with water and 100% methanol, resulting in phenolic compound-enriched extracts from peel (ECC), pulp (EPC), and seed (ESC). These extracts were used for UPLC-QToF/MS and NMR analyses.

2.3 Proximate composition

The proximate composition of *T. subincanum* fruit parts (peel, pulp, and seeds) was assessed using standard analytical methods. Moisture content was determined by oven drying at 105 °C, ash by incineration at 550 °C, lipids by Soxhlet extraction with hexane for 8 h, and proteins by the classical Kjeldahl method (Lutz, 2008). Carbohydrate content was estimated following the procedure of Ogunlaja et al. (2020). The total energy value was calculated using the Equation 1 (Palmeira et al., 2019):

$$\text{Energy (kcal)} = 4 \times (\text{g of proteins} + \text{g of carbohydrates}) + 9 \times (\text{g of lipids}) \quad (1)$$

2.4 Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis

Approximately 10 mg of lipid fractions (hexane extracts) were dissolved in 0.25 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v) and mixed with 500 μL of 0.1 M NaOH in methanol. The mixture was heated at 60 °C for 30 min to form fatty acid methyl esters (FAMEs), and the reaction was stopped with 0.2 mL of distilled water. FAMEs were extracted three times with 1 mL of GC-grade hexane, and the pooled hexane layer was allowed to stand for 30 min. An aliquot of 1 mL was analyzed by GC-MS (Shimadzu Nexis GC2030—GCMS-QP2020 NX) with a split–splitless injector. Separation was achieved on an SH-RTx-5Sil-MS column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) using helium as a carrier gas (initial pressure 51.2 kPa). The temperature program started at 40 °C, increased at 3 °C/min to 210 °C, and was held for 5 min, for a total run time of 60:09 min. Fatty acids were identified using the WILEY 275 and NIST 3.0 libraries. Analyses were performed in triplicate, and results are reported as mean relative peak area ± standard deviation (Oliveira et al., 2025).

2.5 UPLC-QToF/MS analysis

Metabolite profiling of the extracts was conducted using a Xevo® G2-XS QTof mass spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK) coupled to an Acquity H-Class UPLC system, operated with MassLynx® software (v4.1). Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC BEH C18 reversed-phase column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 *m*m particle size) maintained at 40 ± 2 °C. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B), delivered at a flow rate of 0.3 mL/min. The gradient elution program was as follows (A:B, %): 0–15 min (98:2), 15–20 min (80:20), 20–25 min (60:40), 25–27 min (2:98), 27–27.1 min (98:2), and 27.1–30 min (98:2). The injection volume was 10 *m*L. Mass spectrometric detection was performed in both negative and positive electrospray ionization (ESI^- and ESI^+) modes, using a mass scan range of *m/z* 100–1500 and a scan time of 0.2 s. The ESI source parameters were set as follows: capillary voltage, 3.0 kV; source temperature, 100 °C; desolvation temperature, 250 °C; cone voltage, 30 V; cone gas flow, 50 L/h; and desolvation gas flow, 700 L/h. Data were acquired in continuous Mass Spectrometry at Elevated Energy continuum mode, with low-energy scans at 6 eV and high-energy scans ramped from 20 to 35 eV over the 30-min run. Leucine enkephalin (*m/z* 554.2615 $[M-H]^-$ and *m/z* 556.2771 $[M+H]^+$) was used as a lock mass reference through the LockSpray™ system.

2.6 NMR analysis

Extracts of *T. subincanum* (peel, pulp, and seeds) were analyzed by NMR (^1H, $^1H-^{13}C$ HSQC, and $^1H-^{13}C$ HMBC) on an 11.7 T spectrometer (Bruker® Avance III HD 500, 13 MHz for 1H and 125.8 MHz for 13C, BBFO Plus SmartProbe™, New York, NY, USA) at 298.0 K. Samples were dissolved in 550 mL of CD_3OD containing trimethylsilylpropanoic acid (purity ≥ 99.0%) as an internal reference (0 ppm). Spectra were processed and analyzed using TopSpin™ software version 4.1.3 (Bruker®).

2.7 Cytotoxicity assay

The cytotoxic potential of the different fruit parts of *T. subincanum* was assessed using the colorimetric MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, following the experimental conditions and methodological procedures described by de Lima et al. (2024). Human cell lines A549 (lung adenocarcinoma), HCT-8 (colorectal adenocarcinoma), and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (umbilical vein endothelial) were obtained from the Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brazil) and used in the *in vitro* assays. The MTT reagent (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]--2,5-diphenyltetrazolium bromide) is a yellow compound that is enzymatically reduced by mitochondrial dehydrogenases to form insoluble blue formazan crystals in metabolically active cells (Geirnaert et al., 2017). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium Ham-F12 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 100 mg/mL penicillin, and seeded into 96-well plates (100 *m*L per well) at densities of 1×10^4 cells/well for HCT-8 and 6×10^3 cells/well for HUVEC and A549. After cell attachment, cultures were exposed for 48 h to serial concentrations (5, 10, 25, 50, and 100 *m*g/mL) of *T. subincanum* fruit extracts. Subsequently, MTT solution (0.5 mg/mL) was added to each well, followed by incubation for an additional 4 h at 37 °C. The resulting formazan crystals were solubilized in 100 *m*L of dimethyl sulfoxide, and absorbance was measured at 570 nm. The IC_{50} (inhibitory concentration

that reduces cell viability by 50%), GI_{50} (growth inhibition concentration that suppresses proliferation by 50%), and LC_{50} (lethal concentration resulting in 50% cell death) values were determined according to the procedures of Carmo et al. (2018; 2019). The selectivity index (SI) was calculated as the ratio between the IC_{50} value for the non-tumor HUVEC line and the IC_{50} for each cancer cell line. According to Carmo et al. (2019), SI values greater than three are indicative of a high degree of selectivity toward tumor cells.

2.8 Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation. Statistical differences were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Analyses were performed using Minitab® version 18.1 (State College, PA, USA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Physicochemical parameters and proximate composition

Table 1 presents the physicochemical parameters of the freeze-dried pulp, peel, and seeds of *T. subincanum*, highlighting their nutritional potential. The high moisture content of the pulp (83.61 g/100 g) contributes to the fruit's succulent texture, similar to that observed in mango, cacao, and blue cacao fruits (Fonseca Júnior et al., 2025; Nguyen et al., 2025). The peel and seeds exhibited the highest ash levels, suggesting a greater concentration of inorganic minerals. In food matrices, ash primarily represents the inorganic residue remaining after complete combustion, consisting mainly of elements such as calcium, phosphorus, potassium, and trace minerals. These elements play essential physiological roles, including bone formation, muscle contraction, and oxygen transport (Alzahrani et al., 2017). These findings indicate that the peel and seeds could serve as potential sources of dietary minerals, contributing to nutritional value and functional food applications (Edo et al., 2023).

Cupuí seeds showed the highest protein (10.88 ± 0.59 g) and carbohydrate (75.01 ± 0.68 g) contents compared with the pulp and peel ($p < 0.05$). This nutritional pattern aligns with that of other *Theobroma* species, including *T. cacao* (cocoa), *T. bicolor* (macambo), *T. grandiflorum* (cupuaçu), and *T. sylvestre* (blue cacao), whose seeds are typically rich in lipids and carbohydrates, whereas the pulp contains higher levels of soluble sugars and fibers (Benlloch-Tinoco et al., 2024; Fonseca Júnior et al., 2025).

The high energy content of the seeds (360.69 ± 0.36 kcal) reinforces their potential as ingredients in energy-dense foods or functional formulations. Previous studies have shown that *Theobroma* seeds are traditionally recognized for their high energy and protein content, supporting the present findings (Araujo et al., 2021). It is important to note that fruit composition can vary depending on seasonality, region of collection, and processing methods, suggesting that further studies on vitamins, fiber fractions, and detailed lipid profiles are warranted to fully characterize the nutritional and functional potential of *T. subincanum*.

3.2 Fatty acid profile of lipid fractions

Esterified fatty acid profiles of the pulp, seed, and peel of *T. subincanum* were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), allowing the identification of five major compounds. Results are expressed as relative peak areas (%).

The pulp showed the highest proportion of total FAMEs (91.68%), followed by the peel (71.23%) and the seeds (47.58%). In all parts of the fruit, palmitic, linoleic, and stearic acids were detected, with a predominance of palmitic acid in the peel (24.43%) and pulp (15.34%). This finding suggests that these tissues may serve as potential sources of saturated fatty acids. Similar profiles have been reported for *T. subincanum* from Ecuador (Bruni et al., 2000).

Linoleic acid, an essential polyunsaturated fatty acid known for its anti-inflammatory and cardioprotective effects, was also identified in the peel, further supporting its nutritional and medicinal relevance. Elaidic acid (a trans fatty acid) was detected in the pulp (46.75%) and peel (12.44%) but was absent in the seeds, indicating that the latter may be more suitable for direct consumption. Comparable results were reported by Bruni et al. (2002). Given that high intake of trans fatty acids is associated with cardiovascular risk (Mozaffarian et al., 2006), their presence in the pulp should be carefully considered when developing food products. In contrast, the seeds, free of elaidic

Table 1. Physicochemical parameters, proximate composition (g/100 g of dry matter) and energy (kcal/100 g of dry matter) of pulp, seed, and peel of *T. subincanum* (cupuí)*.

Parameters	Pulp	Seed	Peel
pH	3.47 ± 0.06	—	—
°Brix	14.43 ± 0.40	—	—
Moisture	83.61 ± 0.20^{a}	8.76 ± 0.13^{c}	76.37 ± 0.52^{b}
Ash	0.55 ± 0.01^{c}	3.45 ± 0.04^{a}	1.16 ± 0.04^{b}
Lipids	0.05 ± 0.00^{b}	1.90 ± 0.00^{a}	0.04 ± 0.00^{c}
Proteins	1.20 ± 0.31^{c}	10.88 ± 0.59^{a}	4.47 ± 0.22^{b}
Carbohydrates	14.58 ± 0.20^{c}	75.01 ± 0.68^{a}	17.96 ± 0.69^{b}
Energy	63.59 ± 0.79^{c}	360.69 ± 0.36^{a}	90.06 ± 1.92^{b}

*Mean ± standard deviation. Identical letters indicate that there is no statistically significant difference, according to the Tukey test.

acid, appear more suitable for direct consumption or use in food formulations. These results emphasize the importance of a detailed lipid profile analysis for *T. subincanum* fruit extracts, both to highlight their nutritional and bioactive potential and to ensure safety in food and nutraceutical applications.

3.3 Chemical description

The chemical profile of *T. subincanum* fruit extracts was characterized by LC-HRMS and one- and two-dimensional NMR spectroscopy (^{1}H, HSQC, and HMBC), allowing the identification of six constituents (Table 2) supported by comparison with literature data.

Tryptophan (1) was detected exclusively in the pulp extract (EPC), with characteristic signals at d_H 7.18 (s, H-8) and d_H 7.35 (sl, H-6). In the HSQC spectrum, these protons correlated with carbons at d_C 108.3 (C-7) and d_C 111.2 (C-6), respectively. The occurrence of this amino acid, both in free form and protein-bound, has previously been reported in cocoa beans from different origins (Bertazzo et al., 2011) and in the fruits of *T. sylvestre* (Fonseca Júnior et al., 2025). In addition, Theacrine (2), a purine alkaloid reported in *Theobroma* and *Herrania* species (Fonseca Júnior et al., 2025; Hammerstone Jr. et al., 1994), was identified in both peel (ECC) and pulp (EPC) extracts. The molecular ion at *m/z* 225.0980 $[M+H]^+$ and fragments at *m/z* 210.0756 and 168.0771 are typical of methylated xanthines. Methyl hydrogen signals at d_H 3.23–d_H 3.66, correlating with carbons at d_C 28.2–d_C 31.7 ppm, together with HMBC correlations to C-2 (d_C 152.2) and C-4 (d_C 136.5), confirmed the structure.

Table 2. Compounds in *T. subincanum* extracts identified by UPLC-QToF/MS and NMR. ECC: peel, EPC: pulp, ESC: seed.

No	TR (min)	Compounds (Chemical formula)	Precursor ion (m/z) $[M-H]^-$ /$[M+H]^+$	Fragmentations *(m/z)*	d ^{1}H in ppm (*J*, Hz)	d ^{13}C in ppm	Samples	References
1	4.48	Tryptophan ($C_{11}H_{12}N_2O_2$)	205.0961 $[M+H]^+$	146.0588, 188.0700, 118.0628	7.18 (s, H-8), 7.35 (sl, H-6)	108.3 (C-7), 111.2 (C-6), 127.8 (C-2).	EPC	(Fonseca Júnior et al., 2025)
2	5.93	Theacrine ($C_9H_{12}N_4O_3$)	225.0980 $[M+H]^+$	210.0756, 168.0771, 153.0536	3.44 (s, 3H), 3.56 (s, 3H,), 3.23 (s, 3H), 3.66 (s, 3H).	152.2 (C-2), 136.5 (C-4), 99.0 (C-5), 153.5 (C-6), 150.5 (C-8), 29.2 (CH_3-1), 30.6 (CH_3-3), 28.2 (CH_3-7), 31.7 (CH_3-9).	ECC EPC	(Hammerstone Jr. et al., 1994; Wang et al., 2010)
3	7.84	Epicatechin ($C_{15}H_{14}O_6$)	289.0731 $[M-H]^-$	245.0157	5.92 (d, *J* = 2.3 Hz, H-6), 5.89 (d, *J* = 2.3 Hz, H-8), 6.80 (d, *J* = 8.0 Hz, H-5′).	95.2 (C-6), 94.7 (C-8), 115.5 (C-5′),	ESC	(Febrianto & Zhu, 2022; Huang et al., 2021)
4	9.57	Clovamide ($C_{18}H_{17}NO_7$)	358.0969 $[M-H]^-$	254.9837, 222.0416, 178.0534, 135.0459	—	—	ESC EPC	(Barros et al., 2016; Febrianto & Zhu, 2022)
5	11.51	Hypolaetin-8-*O*-b-D-glucoronide 3″-*O*-sulfate ($C_{21}H_{18}O_{16}S$)	557.0275 $[M-H]^-$	301.0389, 254.9837, 175.0255	—	—	ESC EPC	(Febrianto & Zhu, 2022; Moita, 2019)
6	17.36	Luteolin ($C_{15}H_{10}O_6$)	285.0462 $[M-H]^-$	254.9837, 175.0285, 133.0315	—	—	ESC EPC	(Sánchez-Rabaneda et al., 2003)

The MS spectrum of epicatechin (*m/z* 289.0731 [M–H]$^-$) exhibited typical fragment ions at *m/z* 245.0157, confirming retro-Diels–Alder cleavage of the flavan-3-ol skeleton. In the ^{1}H NMR spectrum, doublets at d_H 5.92 (J = 2.3 Hz) and d_H 5.84 (J = 2.3 Hz) of ring A and at d_H 6.80 (J = 8.0 Hz) of ring B supported its identification (Huang et al., 2021). Epicatechin (3) was previously reported in the beans of *T. grandiflorum*, *T. bicolor,* and *T. subincanum* (Febrianto & Zhu, 2022). Similarly, clovamide (4) and hypolaetin-8-*O*-β-D-glucuronide 3″-*O*-sulfate (5) were detected in the seed and pulp extracts of *T. subincanum* and have also been reported in the beans of *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, and *T. subincanum* (Febrianto & Zhu, 2022), reinforcing the chemical similarity among members of this genus. The flavone luteolin (6) was identified by its molecular ion at *m/z* 285.0462 [M–H]$^-$ (Sánchez-Rabaneda et al., 2003). *T. cacao* is also characterized by the presence of luteolin (Benlloch-Tinoco et al., 2024), which has been associated with antioxidant and anti-inflammatory activities (Tian et al., 2021). Taken together, these findings highlight that *T. subincanum* is a promising source of antioxidant phenolic compounds, supporting its potential use in the development of functional foods and nutraceutical formulations.

3.4 Cytotoxic and antiproliferative effects

The extracts obtained from the pulp, seeds, and peel of *T. subincanum* fruits were evaluated for cytotoxicity against lung adenocarcinoma epithelial cells (A549), human colon carcinoma cells (HCT8), and HUVEC. According to the cytotoxicity classification proposed by Anywar et al. (2022) and the National Cancer Institute (NCI), the seed and peel extracts showed no cytotoxic activity toward any of the tested cell lines, including both healthy and cancerous cells, with IC_{50} values above 100 *m*g/mL (Figure 2). This absence of cytotoxicity indicates that these fractions are safe and suitable for potential food or nutraceutical applications. In contrast, the pulp extract exhibited moderate cytotoxicity toward both cancerous (A549 and HCT8) and healthy (HUVEC) cells, with IC_{50} values ranging from 12.29 to 22.80 *m*g/mL. Although the SI values were below the threshold of three, indicating low selectivity for tumor cells, the pulp extract showed slightly higher activity against cancer cell lines compared to normal endothelial cells (SI > 1) (Granato et al., 2022) (Table 3). These findings suggest that, while the pulp exhibits moderate bioactivity, the seed and peel extracts demonstrate promising profiles of biocompatibility and safety, reinforcing their potential as functional ingredients or sources of bioactive compounds in food formulations.

Compared to the peel and seeds, the cupuí pulp exhibited the highest capacity to inhibit cell growth, with GI_{50} values ranging from 10.32 to 11.66 *m*g/mL, an effect also reported for another species of the genus, *T. sylvestre* (Fonseca Júnior et al., 2025). Notably, it was the only fruit fraction to exert a lethal effect at a concentration of 23.46 mg/mL in both healthy and cancerous cell lines. In the present study, clovamide was identified in the pulp extract of *T. subincanum*, a compound widely associated with antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, antiplatelet, and anticancer activities (Kolodziejczyk-Czepas, 2024). Luteolin, also detected, has been shown to inhibit the

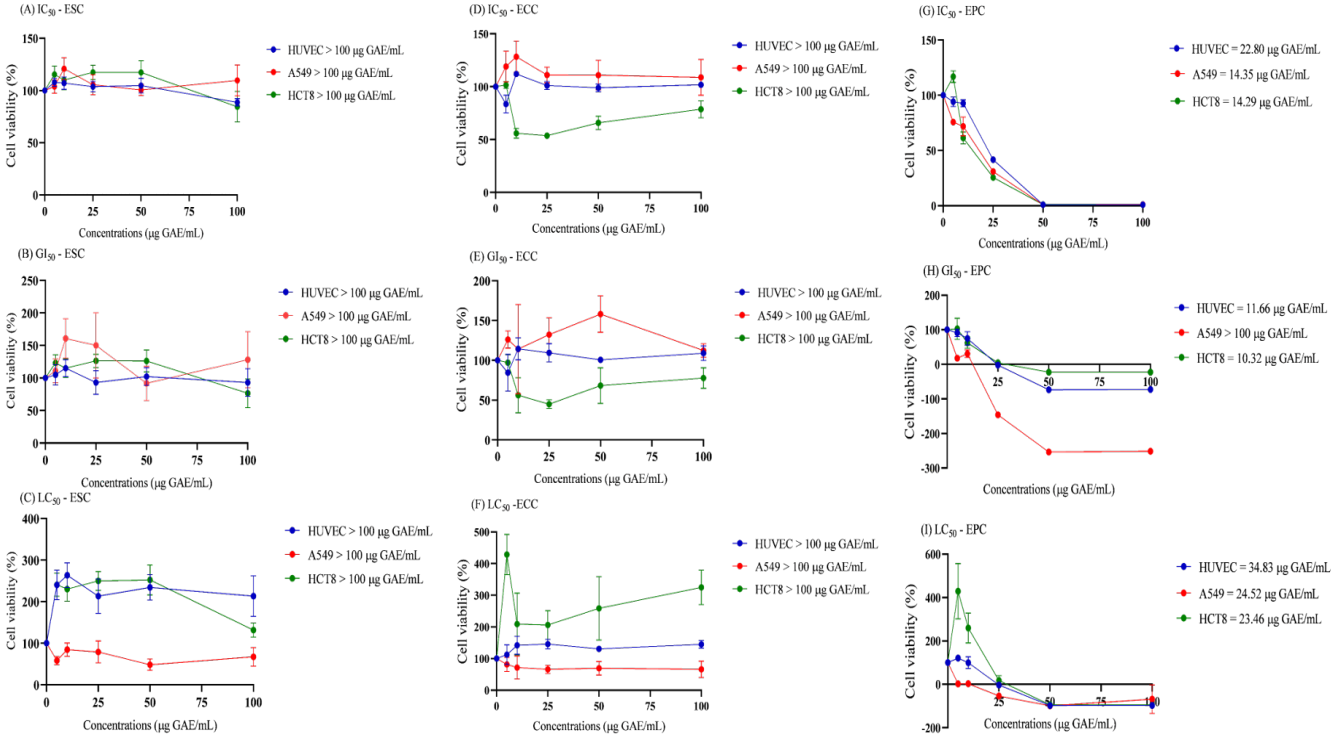


Figure 2. Cytotoxicity assessment of ESC (seed extract of Cupuí), ECC (peel extract of Cupuí), and EPC (pulp extract of Cupuí) was performed on A549, HCT8, and HUVEC cell lines. (A, D, and G) IC_{50}: the concentration of the agent that reduces cell growth by 50%. (B, E, and H) GI_{50}: the agent concentration that decreases growth by 50% compared to untreated cells. (C, F, and I) LC_{50}: the agent concentration that causes a net reduction of 50% of the cells relative to the initial cell count at the beginning of treatment.

Table 3. IC_{50} and selectivity index (SI) of the extracts ESC (seed extract of Cupuí), ECC (peel extract of Cupuí), and EPC (pulp extract of Cupuí)*.

Samples	IC_{50} (mg GAE/mL)			SI	
	HUVEC	A549	HCT-8	HUVEC/A549	HUVEC/HCT-8
ESC	> 100	> 100	>1 00	1	1
ECC	> 100	> 100	> 100	1	1
EPC	22.80	14.35	14.29	1.59	1.60

*IC_{50} represents the concentration of an agent needed to decrease cell growth by 50%, determined when (T/C) × 100 = 50. Here, T is the cell count at the time of treatment, and C is the cell count in the control group at the same moment. The selectivity index (SI) is calculated by comparing the IC_{50} in healthy HUVEC cells to the IC_{50} in cancer cells, offering insight into the agent's potential to selectively target cancer cells over healthy ones.

growth of human prostate tumors (Pratheeshkumar et al., 2012). These findings indicate the potential of *T. subincanum* pulp as a source of bioactive compounds for food applications.

4 CONCLUSION

The study concludes that the different parts of the *T. subincanum* fruit present distinct chemical and biological profiles. The seeds stand out for their high nutritional value, being rich in proteins and carbohydrates, which makes them a promising ingredient for the food industry. The peel and pulp are sources of fatty acids and phenolic compounds, such as theacrine and epicatechin. From a biological perspective, the pulp was the only part that showed significant cytotoxic activity, albeit with low selectivity between cancerous and normal cells, indicating the need for further studies to ensure its safe application. The presence of elaidic acid in the pulp also warrants attention in future research. Overall, the results highlight the potential of *T. subincanum* as a source of nutrients and bioactive compounds, reinforcing the importance of exploring Amazonian biodiversity for food and technological applications.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Ramos, A. S., for providing the fruits used in this study. We also thank the Postgraduate Program in Chemistry at the Federal University of Amazonas (PPGQ-UFAM) and the Nuclear Magnetic Resonance Laboratory (NMRLab) of the Analytical Center of UFAM for their support in terms of infrastructure.

The authors thank to FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, grant number 01.02.016301.01140/2023–33 CHAMADA PÚBLICA N. 003/2022— - JOVENS DOUTORES, Edital N. 006/2022— - PAINTER), Analytical Center IFAM-CMC, Postgraduate Program in Chemistry at the Universidade Federal do Amazonas (PPGQ-UFAM), and Nuclear Magnetic Resonance Laboratory (NMRLab) of the Analytical Center of UFAM for the financial support, fellowships, and infrastructure. The authors also acknowledge the support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

REFERENCES

Alzahrani, H. R., Kumakli, H., Ampiah, E., Mehari, T., Thornton, A. J., Babyak, C. M., & Fakayode, S. O. (2017). Determination of macro, essential trace elements, toxic heavy metal concentrations, crude oil extracts and ash composition from Saudi Arabian fruits and vegetables having medicinal values. *Arabian Journal of Chemistry, 10(7)*, 906–913. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.012

Anywar, G. U., Kakudidi, E., Oryem-Origa, H., Schubert, A., & Jassoy, C. (2022). Cytotoxicity of medicinal plant species used by traditional healers in treating people suffering from HIV/AIDS in Uganda. *Frontiers in Toxicology, 4*. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.832780

Araujo, N. M. P., Arruda, H. S., Marques, D. R. P., Oliveira, W. Q., Pereira, G. A., & Pastore, G. M. (2021). Functional and nutritional properties of selected Amazon fruits: A review. *Food Research International, 147*, 110520. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110520

Barros, H. R. M., García-Villalba, R., Tomás-Barberán, F. A., & Genovese, M. I. (2016). Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract. *Journal of Functional Foods, 22*, 477–489. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.009

Benlloch-Tinoco, M., Nuñez Ramírez, J. M., García, P., Gentile, P., & Girón-Hernández, J. (2024). *Theobroma* genus: Exploring the therapeutic potential of *T. grandiflorum* and *T. bicolor* in biomedicine. *Food Bioscience, 61*, 104755. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104755

Bertazzo, A., Comai, S., Brunato, I., Zancato, M., & Costa, C. V. L. (2011). The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. *Food Chemistry, 124(1)*, 93–96. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.110

Bezerra, J. A., Corrêa, R. F., Sanches, E. A., Lamarão, C. V., Stringheta, P. C., Martins, E., & Campelo, P. H. (2024). "Cupuaçu" (*Theobroma grandiflorum*): A brief review on chemical and technological potential of this Amazonian fruit. *Food Chemistry Advances, 5*, 100747. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100747

Bruni, R., Bianchini, E., Bettarello, L., & Sacchetti, G. (2000). Lipid composition of wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* Mart. seeds and comparison with two varieties of *Theobroma cacao* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(3)*, 691–694. https://doi.org/10.1021/jf991015n

Bruni, R., Medici, A., Guerrini, A., Scalia, S., Poli, F., Romagnoli, C., Muzzoli, M., & Sacchetti, G. (2002). Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. *Food Chemistry, 77(3)*, 337–341. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00357-0

Carmo, M. A. V., Fidelis, M., Pressete, C. G., Marques, M. J., Castro-Gamero, A. M., Myoda, T., Granato, D., & Azevedo, L. (2019). Hydroalcoholic *Myrciaria dubia* (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. *Food Research International, 125*, 108551. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108551

Carmo, M. A. V., Pressete, C. G., Marques, M. J., Granato, D., & Azevedo, L. (2018). Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. *Current Opinion in Food Science, 24*, 26–35. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.10.013

Cruz, J. M. A., Corrêa, R. F., Kinupp, V. F., Pereira, M. F., Neves, K. O. G., Rodrigues, J., Ventura, B. M. L., Mendes, T. A. O., Sanches, E. A., Campelo, P. H., & Bezerra, J. de A. (2025). Amazon fig (*Ficus subapiculata*): A unconventional food plant with technological potential for the food industry. *Food Chemistry X, 29*, 102699. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102699

Edo, G. I., Samuel, P. O., Oloni, G. O., Ezekiel, G. O., Onoharigho, F. O., Oghenegueke, O., Nwachukwu, S. C., Rapheal, O. A., Ajokpaoghene, M. O., Okolie, M. C., Ajakaye, R. S., Ndudi, W., & Igbodo, P. C. (2023). Review on the biological and bioactive components of nutrition. *Natural Resources for Human Health, 3(4)*, 426–448. https://doi.org/10.53365/nrfhh/174302

Febrianto, N. A., & Zhu, F. (2022). Comparison of bioactive components and flavor volatiles of diverse cocoa genotypes of *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma bicolor*, *Theobroma subincanum* and *Theobroma cacao*. *Food Research International, 161*, 111764. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111764

Ferreira, C. P., Lima, M. C., Silva, J. G., & Peixoto Araujo, N. M. (2024). Nutritional composition, phenolic compounds and biological activities of selected unconventional food plants. *Food Research International, 191*, 114643. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114643

Fonseca Júnior, E. Q., Rocha, D. Q., Oliveira, E. S. C., Silva, O. S., Souza, F. C. A., Furlaneto, G., Cruz, L. C., Azevedo, L., Corrêa, R. F., Sanches, E. A., Campelo, P. H. & Bezerra, J. A. (2025). Chemical characterization, nutritional profile, and cytotoxicity potential of Amazonian *Theobroma sylvestre* Mart. fruits. *Food Bioscience, 73*, 107673. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107673

Geirnaert, A., Calatayud, M., Grootaert, C., Laukens, D., Devriese, S., Smagghe, G., De Vos, M., Boon, N., & Van de Wiele, T. (2017). Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity. *Scientific Reports, 7*, 11450. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11734-8

Granato, D., Reshamwala, D., Korpinen, R., Azevedo, L., Carmo, M. A. V., Cruz, T. M., Marques, M. B., Wen, M., Zhang, L., Marjomäki, V., & Kilpeläinen, P. (2022). From the forest to the plate – Hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. *Food Chemistry, 381*, 132284. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132284

Hammerstone Jr., J. R., Romanczyk, L. J., & Aitkent, W. M. (1994). Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. *Phytochemistry, 35(5)*, 1237–1240. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94827-1

Huang, H., Ho, C., Chang, G., Shia, W., & Lai, C. (2021). HPLC/ESI-MS and NMR analysis of chemical constitutes in bioactive extract from the root nodule of *Vaccinium emarginatum*. *Pharmaceuticals, 14(11)*, 1098. https://doi.org/10.3390/ph14111098

Kinupp, V. F., & Lorenzi, H. (2014). *Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas*. Instituto Plantarum da Flora.

Kolodziejczyk-Czepas, J. (2024). Clovamide and its derivatives—Bioactive components of *Theobroma cacao* and other plants in the context of human health. *Foods, 13(7)*, 1118. https://doi.org/10.3390/foods13071118

Lim, T. K. (2014). *Malvaviscus arboreus*. In *Edible medicinal and non-medicinal plants* (pp. 405–408). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8748-2_29

Lima, A. S., Maltarollo, V. G., Carmo, M. A. V., Pinheiro, L. C., Cruz, T. M., Barros, F. A. R., Pap, N., Granato, D., & Azevedo, L. (2024). Blackcurrant press cake by-product: Increased chemical bioaccessibility and reduced antioxidant protection after in vitro simulation of gastrointestinal digestion. *Food Research International, 182, 114099*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114099

Lira, N. R., Santos, E. F., Santos, D. N., Bezerra, P. G. F., & Lima, D. E. S. (2020). Physical-chemical and centesimal characterization of cupuí (*Theobroma subincanum* Mart.). *Brazilian Journal of Development, 6*(3), 15798–15813. https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-451

Lutz, I. A. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Instituto Adolfo Lutz.

Mar, J. M., Fonseca Júnior, E. Q., Corrêa, R. F., Campelo, P. H., Sanches, E. A., & Bezerra, J. A. (2024). *Theobroma spp.: a review of its chemical and innovation potential for the food industry. Food Chemistry Advances, 4*, 100683. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100683

Martini, M. H., Lenci, C. G., Figueira, A., & Tavares, D. Q. (2008). Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. *Revista Brasileira de Botânica, 31(1), 147-154*. https://doi.org/10.1590/S0100-84042008000100013

Milião, G. L., Oliveira, A. P. H., Soares, L. S., Arruda, T. R., Vieira, É. N. R., & Leite Junior, B. R. C. (2022). Unconventional food plants: nutritional aspects and perspectives for industrial applications. *Future Foods, 5*, 100124. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100124

Moita, I. S. (2019). *Caracterização química das cascas das sementes de espécies do gênero Theobroma* (Master's Dissertation). Universidade Federal do Amazonas.

Mozaffarian, D., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., & Willett, in mango jam formulations: effects on jam qualities during storage and sensory discrimination. *Sustainable Food Technology, 3(1)*, 333–342. https://doi.org/10.1039/D4FB00331D

Nguyen, V.-L., Tran, M.-T., Nguyen-Thi, T.-D., Nguyen, M.-A., Le, M.-T., Nguyen, T.-M., & Nguyen, Q.-D. (2025). Valorization of cocoa (Theobroma cacao L.) pod husks as a fruit pulp substitute in mango jam formulations: effects on jam qualities during storage and sensory discrimination. Sustainable Food Technology, 3(1), 333–342. https://doi.org/10.1039/D4FB00331D

Ogunlaja, O. O., Moodley, R., Baijnath, H., & Jonnalagadda, S. B. (2020). Elemental distribution and health risk assessment of the edible fruits of two *Ficus* species, *Ficus sycomorus* L. and *Ficus burtt-davyi* Hutch. *Biological Trace Element Research, 198*, 303–314. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02048-4

Oliveira, A. C., Cruz, J. M. A., Mar, J. M., Corrêa, R. F., Rodrigues, J. V. S., Mendes, T. A. O., Aguiar, J. P. L., Souza, F. C. A., Neves, K. O. G., Santos, A. D. C., Sanches, E. A., Campelo, P. H., & Bezerra, J. A. (2025). Abiu-do-Mato (*Pouteria caimito*, Sapotaceae): A promising Amazonian fruit with rich chemical composition, antioxidant potential, and cytotoxic safety. *Food Research International, 205, 115984*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115984

Palmeira, L., Pereira, C., Dias, M. I., Abreu, R. M. V., Corrêa, R. C. G., Pires, T. C. S. P., Alves, M. J., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Nutritional, chemical and bioactive profiles of different parts of a Portuguese common fig (*Ficus carica* L.) variety. *Food Research International, 126*, 108572. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108572

Pratheeshkumar, P., Son, Y. O., Budhraja, A., Wang, X., Ding, S., Wang, L., Hitron, A., Lee, J. C., Kim, D., Divya, S. P., Chen, G., Zhang, Z., Luo, J., & Shi, X. (2012). Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. *PLoS One, 7*(12), e52279. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052279

Rocha, G. H. A. M., Almeida, M. C., Silva, L. L. P., Flores, I. S., Castiglioni, G. L., Oliveira, T. F., & Pereira, J. (2025). Food-related properties and composition of cocoa honey (*Theobroma cacao* L.): An integrated investigation. *Food Research International, 202*, 115694. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115694

Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry, 38(1)*, 35–42. https://doi.org/10.1002/jms.395

Silva, E. N., Ramos, D. C., Menezes, L. M., Souza, A. O., Lannes, S. C. S., & Silva, M. V. (2014). Nutritional value and antioxidant capacity of "cocoa honey" (*Theobroma cacao* L.). *Food Science and Technology, 34(4)*, 755–759. https://doi.org/10.1590/1678-457X.6447

Tian, C., Liu, X., Chang, Y., Wang, R., Lv, T., Cui, C., & Liu, M. (2021). Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *South African Journal of Botany, 137*, 257–264. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.022

Wang, Y., Yang, X., Zheng, X., Li, J., & Ye, C. (2010). Theacrine, a purine alkaloid with anti-inflammatory and analgesic activities. *Fitoterapia, 81(6)*, 627–631. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.03.008