

“

Perfil químico de amêndoas de cacau por espectrometria de massas com ionização por *paper spray*

| Afonso Henrique de **Oliveira Júnior**
UFSJ

| Ana Luiza Coeli Cruz **Ramos**
UFMG

| Mayara Neves Santos **Guedes**
UFPA

| Miriã Cristina Pereira **Fagundes**
UESC

| Rodinei **Augusti**
UFMG

| Júlio Onésio Ferreira **Melo**
UFSJ

| Henrique de Oliveira Prata **Mendonça**
UFSJ

| Raquel Linhares Bello de **Araújo**
UFMG

| Luisa Del Carmen Barrett **Reina**
UFMT

RESUMO

Objetivo: Este trabalho objetivou empregar a técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por Paper Spray (PS-MS) para a avaliação do perfil químico de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao*) da variedade forasteiro cultivados na região Transamazônica do Pará. **Métodos:** As amêndoas de cacau utilizadas nesse trabalho, foram oriundas da Cooperativa Central de Produção Orgânica da Transamazônica e Xingu. Foram fermentadas naturalmente durante seis dias e então preparados extratos metanólicos de amostras de amêndoas de cacau (1:2) L:L e em seguida avaliadas nos modos de ionização negativo e positivo. **Resultados:** Os resultados demonstram que no modo positivo foi possível identificar onze compostos, constituintes das classes das metilxantinas (18,2%), fenilpropanoides (9,1%), esteróides (27,3%) e flavonóides (45,5%), já no modo de ionização negativa foi possível identificar cinquenta e cinco compostos entre ácidos hidroxibenzóicos (16,4%), fenilpropanoides (20,0%), flavonoides (52,7%), açúcares e glicosídeos (10,9%). A metodologia empregada de PS-MS se demonstrou eficaz para a avaliação das amostras, possibilitando identificar no total sessenta e seis compostos. **Conclusão:** As propriedades bioativas atribuídas ao cacau foram confirmadas nas amostras analisadas pelos compostos identificados por PS-MS indicando a qualidade da matéria prima e descrevendo o seu perfil químico e contribuindo para o maior entendimento dos seus atributos.

Palavras-chave: PS-MS, *Theobroma Cacao*, Compostos Bioativos, 20-Hidroxiecdisona, Clovamida.

INTRODUCTION

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é um fruto nativo às regiões tropicais das Américas Central e do Sul, com distribuição natural da espécie se estendendo desde o sudeste do México à bacia Amazônica (WHITKUS et al., 1998).

É um fruto reconhecido devido à grande riqueza de compostos apresentados na sua constituição química, como polifenóis, metilxantinas e protoantocianidinas, cujas propriedades são associadas à benefícios à saúde, bem como potente atividade anti-inflamatória, bactericida e antioxidante (SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003; BARNABA et al., 2017; ORACZ et al., 2015; GALLEGO et al., 2019).

Para a obtenção das amêndoas, frutos de cacau são colhidos ainda em alto teor de umidade, a partir dos quais são separados a casca, a polpa e as sementes. As sementes são destinadas a fermentação para a eliminação da mucilagem que as recobrem. Após fermentadas, as sementes, denominadas amêndoas, passam por um processo de secagem que pode ocorrer artificialmente ou de maneira natural. Na secagem natural, o material é regularmente revolvido garantido a homogeneização do processo de secagem, além de evitar focos de umidade que podem propiciar o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (SILVA NETO, 2001; DE VUYST & WECKX, 2016; ROMANENS et al., 2019).

As amêndoas, portanto, são essenciais para a valorização e reconhecimento da qualidade dos produtos produzidos pelos cacauicultores (CHOI et al., 2016). Por serem a forma a partir da qual boa parte da cadeia agroindustrial do cacau se deriva, a avaliação da sua qualidade reflete no mercado, sendo capaz de estimular maior interesse por parte dos produtores de cacau, e por associação os consumidores, que serão ofertados produtos de maior qualidade (KONGOR et al., 2016; LOUREIRO et al., 2017; HASHIMOTO et al., 2018).

Parte dos trabalhos que buscam avaliar o perfil químico de amêndoas de cacau tem sido extensivamente realizados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography, HPLC*) sendo a metodologia mais comumente encontrada na literatura para a exploração de metabólitos secundários e caracterizar o perfil químico de diferentes cultivares da espécie (SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003; COUNET et al., 2004; PATRAS et al. 2014; D'SOUZA et al. 2017; GALLEGO et al. 2019).

Entre outras tecnologias utilizadas para análises de perfis químicos, a espectrometria de massas com ionização por paper spray (paper spray mass spectrometry, PS-MS), desenvolvida por Wang et al. (2010), é uma das técnicas de ionização ambiente que tem sido cada vez mais aplicada no estudo de substâncias complexas tais como fármacos, metabólitos e pesticidas devido à sua alta versatilidade, simplicidade e baixo custo, se destacando como uma ferramenta de alto potencial para o avanço de estudos nestas linhas de pesquisa, ganhando cada vez mais espaço em análises de qualidade de alimentos (Campelo et al.,

2020; Minighin et al., 2020, Oliveira et al., 2020; Ramos et al., 2020; Silva, E. B. M. et al., 2020;; Silva, M. R et al., 2020; Silva, V. D. M.; Arquelaua, P. B. F. et al., 2020; Silva, V. D. M., Macedo, M. C. C. et al., 2020; LI et al., 2013; EVARD et al., 2015; TAVERNA et al., 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o emprego de PS-MS na caracterização dos extratos derivados de amostras de amêndoas de cacau.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As amêndoas de cacau utilizadas nesse trabalho, foram oriundas da Cooperativa Central de Produção Orgânica da Transamazônica e Xingu, CEPOTX, da variedade forasteiro (tipo comum), com frutos colhidos sem perfurações de ponta de facão, maduros, com coloração amarelo ouro, durante a safra principal em julho de 2019. As sementes úmidas foram transportadas em sacos plásticos fechados e colocadas para fermentar em caixas de madeira quadradas (cochos de fermentação), com comprimentos de 1,40 x 0,70 x 0,70cm. A quantidade de massa de cacau utilizada, por lote, foi de aproximadamente 200 kg de cacau úmido.

A fermentação ocorreu naturalmente, durante seis dias, com revolvimentos controlados em função da temperatura (Bertorelli et al., 2009, Fernández et al., 2012). Ao final do processo fermentativo as amêndoas foram levadas para secagem em secadores tipo barcaça, onde as amêndoas de cacau foram dispostas em camadas com altura de 5cm, durante 144 horas, com revolvimentos a cada 2 horas até atingir a umidade de 6,2 % (Bertorelli et al., 2009).

Após a secagem ao sol, as amêndoas foram ensacadas em sacos de junta e uma amostra de 500g foi coletada aleatoriamente e encaminhada para o laboratório de Química da Universidade Federal de São João del-Rei, *campus* Sete Lagoas, MG.

Extrato metanoico

Para a obtenção dos extratos foi aplicada uma adaptação da metodologia descrita por Rufino et al. (2010).

As amostras foram homogeneizadas, e 0.5 g das amostras foram pesadas e em seguida acrescidas 1,0 mL de solução metanol/água (50:50, v/v). As amostras foram agitadas por 20 s em agitador tipo vórtex, e posteriormente mantidas em incubação por 1 h ao abrigo de luz e temperatura ambiente.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4 °C e rotação de 15000 x g. O sobrenadante foi em seguida transferido para um tubo Falcon de 15 mL, no

qual foi adicionado 1 mL de solução acetona/água (70:30, v/v), seguido por mais uma etapa de centrifugação.

O sobrenadante separado da segunda centrifugação foi transferido para um microtubo Eppendorf de 5 mL, completando-se o volume com água deionizada. Os extratos foram armazenados à temperatura de congelamento e permaneceram neste estado até a realização das análises.

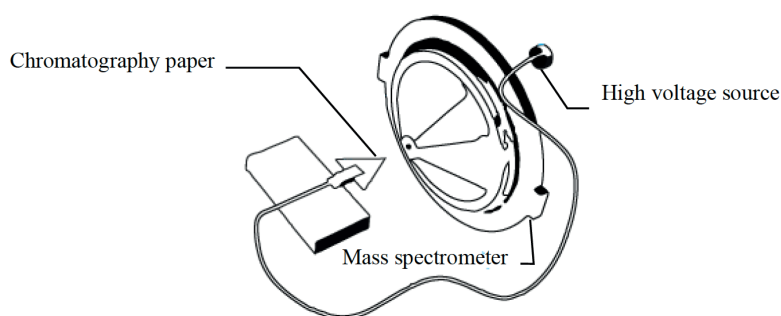
Espectrometria de massas com ionização por *paper spray*

O perfil químico das amostras foi analisado utilizando um espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) acoplado à uma fonte de ionização ambiente por *paper spray*. As análises foram realizadas em triplicata tanto para os modos negativo e positivo seguindo a metodologia descrita por Silva et al. (2019).

Alíquotas de 2 μL das amostras e de 40 μL de metanol foram aplicadas ao papel cromatográfico recortado em formato triangular acoplado ao equipamento. Para a aquisição dos dados, a fonte de voltagem foi ligada sob as condições instrumentais de voltagem de fonte PS-MS de +4 kV para o modo positivo e -3 kV para o modo negativo; voltagem do capilar de 40 V; temperatura do tubo de transferência de 275 °C; voltagem das lentes do tubo de 120 V; faixa de massas de 100 a 1000 m/z no modo de ionização negativo e de 100 a 2000 m/z no modo de ionização positivo.

A confirmação da identidade dos sinais se deu pela comparação de dados da literatura e fragmentação por espectrometria de massas sequencial. A fragmentação dos íons ocorreu utilizando energias de colisão de 15 e 45 eV.

Figura 1. Esquema adaptado de Silva et al 2019 da fonte de ionização por *paper spray*.



Source: Adapted from Teodoro et al. (2017).

Análise dos dados instrumentais

As tentativas de identificação dos compostos obtidos a partir dos sinais instrumentais foi feita baseando-se na importação dos dados a partir da aplicação Thermo Scientific™ FreeStyle™ 1.6. O arquivo importado contendo as razões massa carga (m/z), intensidade

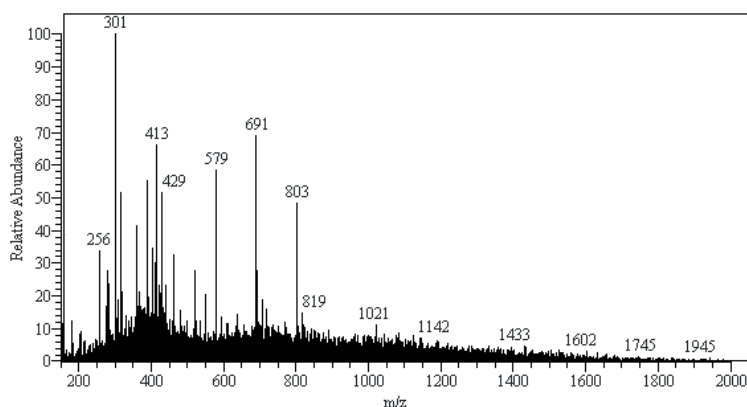
absoluta e relativa foram analisadas utilizando planilhas automatizadas desenvolvidas no Microsoft® Excel® 2016 MSO.

RESULTADOS

Modo positivo de ionização

Na figura 2 é apresentado o espectro gerado a partir de amostras de amêndoas de cacau no modo positivo.

Figura 2. Espectrograma de PS-MS no modo positivo de uma amostra de cacau.



Source: Authors (2020).

A totalidade dos íons identificados é apresentada na Tabela 1.

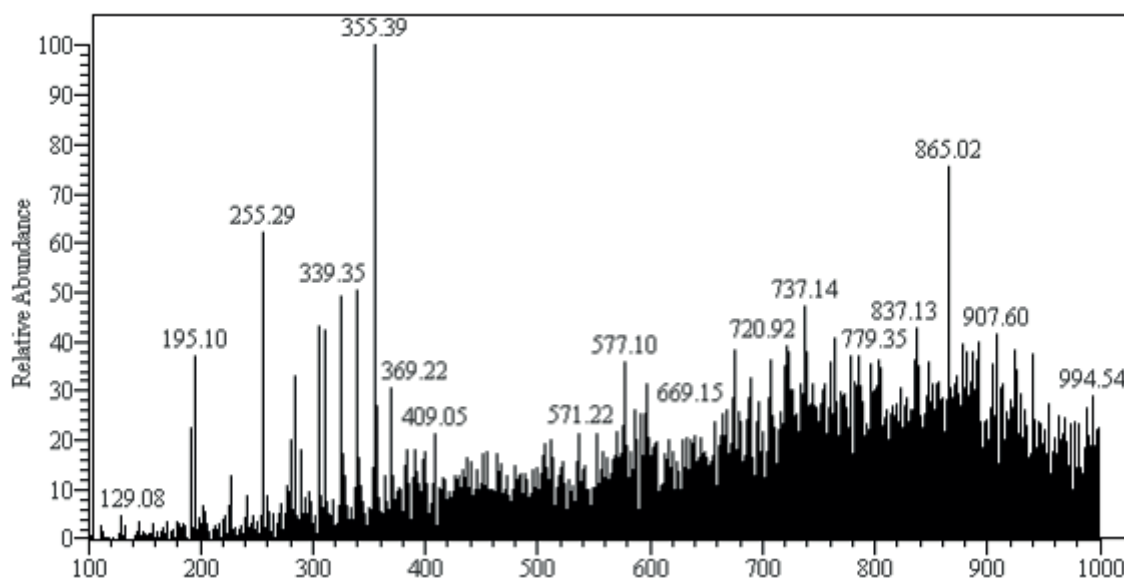
Tabela 1. Identificação de íons por PS(+)-MS.

Nº	Tentativa de Identificação	m/z	CAS	MS/MS	Referência
Metilxantinas					
1	Teobromina	181	83-67-2	163, 140	Ortega, 2008
2	Cafeína	195	58-08-2	138, 110	Ortega, 2008
Fenilpropanoides					
3	N-Feruloiltiramina	314	66648-43-9	177	Da Rosa, 2015
Flavonoides					
4	Cianidina 3-O-arabinosídeo	419	111613-04-8	287	Pereira-Caro, 2013
5	Cianidina 3-O-galactosídeo	449	27214-71-7	287	Oracz, 2015
6	Quercetina	465	117-39-5	303	Türker, 2013
7	Kaempferol-3-O-β-D-(600-E-p-cumaroil)-glucopiranosídeo	595	480-10-4	449, 287	Da Rosa, 2015
Esteróides					
9	20-Hidroxicdisona	481	5289-74-7	463, 445, 427	Da Rosa, 2015
10	20-Hidroxicdisona-3-O-β-D-xilose	613	–	481, 463, 445, 427	Da Rosa, 2015
11	20-Hidroxicdisona-3-O-β-D-glicopiranosídeo	643	–	625, 607, 481, 463, 445, 427	Da Rosa, 2015

Modo negativo de ionização

Um exemplo de espectro PS(-)-MS de amostras de cacau analisadas é apresentado na Figura 3.

Figura 3. Espectrograma de PS-MS no modo negativo de uma amostra de cacau.



A Tabela 2 apresenta a tentativa de identificação dos íons com base nos sinais m/z obtidos pelos instrumentos e comparação com a literatura.

Tabela 2. Identificação de íons por PS(-)-MS.

Nº	Tentativa de Identificação	m/z	CAS	MS/MS	Referência
Ácidos hidroxibenzoicos					
1	Ácido hidroxibenzoico	137	99-96-7	93	Ortega, 2008
2	Vanilina	151	121-33-5	103	Ortega, 2008
3	Ácido protocatecuico	153	99-50-3	109	Sánchez-Rabaneda, 2003
4	Ácido vanílico	167	121-34-6	123	Ortega, 2008
5	Ácido gálico	169	149-91-7	125	Sánchez-Rabaneda, 2003
6	Ácido siríngico	197	530-57-4	153	Ortega, 2008
Fenilpropanoides					
7	Ácido cinâmico	147	140-10-3	103	Ortega, 2008
8	Ácido cumárico	163	501-98-4	119	Sánchez-Rabaneda, 2003
9	Ácido cafeico	179	331-39-5	135	Sánchez-Rabaneda, 2003
10	Ácido ferúlico	193	1135-24-6	149, 178, 134	Sánchez-Rabaneda, 2003
11	N-cumaroil-L-aspartato	278	–	163, 132, 119	Pereira-Caro, 2013
12	p-cumaroil glutamina	291	–	–	D'Souza, 2017
13	N-cafeoil-L-aspartato	294	–	276, 179, 131	Pereira-Caro, 2013
14	Ácido hidroxibenzóico-O-hexosídeo	299	–	137	Türker, 2013
15	Ácido clorogênico	353	327-97-9	191	Türker, 2013

Nº	Tentativa de Identificação	m/z	CAS	MS/MS	Referência
16	Cafeoil-tirosina	342	124027-56-1	–	D'Souza, 2017
17	Clovamida	358	53755-03-6	222, 178, 161	Barros, 2016
Flavonoides					
18	Apigenina	269	520-36-5	151	Sánchez-Rabaneda, 2003
19	Naringenina	271	67604-48-2	177, 151, 119, 107, 93, 83	Sánchez-Rabaneda, 2003
20	Luteolina	285	491-70-3	217, 199, 175, 151, 133, 107	Sánchez-Rabaneda, 2003
21	Di-hidroxikaempferol	287	–	259	Ortega, 2008
22	Catequina	289	154-23-4	245	Sánchez-Rabaneda, 2003
23	Quercetina	301	117-39-5	151	Ortega, 2008
24	Taxifolina	303	480-18-2	285	Ortega, 2008
25	Epigallocatequina	305	970-74-1	125	Ortega, 2008
26	Isoramnetina	315	480-19-3	300, 151	Sánchez-Rabaneda, 2003
27	Deoxyclovamida	326	–	–	Cádiz-Guerrea, 2014
28	Vitexina	431	3681-93-4	341, 311, 269	Sánchez-Rabaneda, 2003
29	Prunina	433	529-55-5	271	Sánchez-Rabaneda, 2003
30	Orientina	447	28608-75-5	357, 327, 285	Sánchez-Rabaneda, 2003
31	Kaempferol-3-O-hexosídeo	447	–	271	Sánchez-Rabaneda, 2003
32	Catequina-3-O-glicosídeo	451	–	331, 289, 245	Patras, 2014
33	Isoscutelareina 8-O-β-D- glicuronida	461	–	285	Barros, 2016
34	Hiperosida	463	482-36-0	301	Sánchez-Rabaneda, 2003
35	Hipolaetina 8-O-β-D- glicuronida	477	–	301	Barros, 2016
36	Miricetina-glicosídeo	479	–	316	Ortega, 2008
37	Amentoflavona	537	1617-53-4	375	Sánchez-Rabaneda, 2003
38	Isoroifolina	577	552-57-8	269	Sánchez-Rabaneda, 2003
39	Naringina	579	10236-47-2	459, 271	Sánchez-Rabaneda, 2003
40	Proantocianidina	591	18206-61-6	–	Cádiz-Guerrea, 2014
41	Nicotilflorina	593	17650-84-9	285	Sánchez-Rabaneda, 2003
42	Rutina	609	153-18-4	301	Sánchez-Rabaneda, 2003
Outros					
43	Ácido cítrico	191	77-92-9	–	D'Souza, 2017
44	Prolidroxprolina	227	–	–	D'Souza, 2017
45	Citrato de isopropila	233	39413-05-3	–	D'Souza, 2017
46	Leucina hexósido	292	–	–	D'Souza, 2017
47	Ácido L-aspártico	308	56-84-8	–	Cádiz-Guerrea, 2014
48	Sacarose	341	57-50-1	–	Cádiz-Guerrea, 2014
49	Swerosida	357	14215-86-2	–	Cádiz-Guerrea, 2014
50	Cis-3-hexenil β-primeverosida	393	132278-37-6	–	Cádiz-Guerrea, 2014
51	Octen-3-il primaverosida	421	209863-01-4	359, 319, 277	Patras, 2014

DISCUSSÃO

Modo positivo de ionização

As tentativas de identificação de compostos em PS-MS no modo de ionização positivo distinguiram quatro classes químicas, dentre essas são classificados os flavonoides representando a maioria dos compostos identificados, seguidos por esteroides, metilxantinas e fenilpropanoides.

A teobromina, identificada pelo sinal m/z 181, é um metabólito da cafeína que segundo Duke (1992) é comumente encontrado nas sementes e casca do cacau, mocambo (*Theobroma bicolor*), e nas folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e chá-da-índia (*Camellia sinensis*).

A cafeína (íon com m/z 195) é outro composto observado em análises anteriores utilizando UPLC-MS/MS, uma das principais metilxantinas que encontradas nas sementes de cacau (ORTEGA et al., 2008; OGAH et al., 2012).

Os compostos esteroides como 20-hidroxiecdisona, identificada pelo íon com m/z 481 e seus metabólitos de sinal com m/z 613, 20-hidroxiecdisona-3-O- β -D-xilose, e sinal com m/z 643, 20-hidroxiecdisona-3-O- β -D-glicopiranosídeo, foram constatados previamente na literatura por Da Rosa et al. (2015) em amostras de guanxuma (*Sida tuberculata* L., Malvaceae), a descrição desses compostos na composição do cacau é inédita.

As antocianidinas são representadas nas amostras de cacau pelos íons de m/z 419 e 449, cianidina 3-O-arabnosídeo e cianidina 3-O-galactosídeo, também observados por Pereira-Caro et al. (2013) e Oracz et al. (2015) no fruto utilizando as metodologias de HPLC-MS/MS e RP-UHPLC-DAD/ESI-MS/MS respectivamente.

Os sinais com m/z 465 e 611 podem ser atribuídos ao flavonol quercetina, e o glicosídeo rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), respectivamente. Türker & Dalar (2013) identificaram estes compostos em *Malva neglecta* Wallr., outra espécie da família Malvaceae, utilizando HPLC-DAD, observando a atividade antioxidante e inibitória de enzimas *in vitro* dos compostos fenólicos desta espécie.

Modo negativo de ionização

A análise PS-MS no modo de ionização negativo possibilitou a identificação de cinquenta e um compostos distintos, pertencentes às classes dos ácidos hidroxibenzoicos, fenilpropanoides, flavonoides, e outros compostos como açúcares, ácidos orgânicos e glicosídeos.

O ácido hidroxibenzóico, identificado pelo íon com m/z 137, é um composto associado ao ácido salicílico e salicina, os primeiros compostos isolados com atividade farmacológica (NORN et al., 2009).

O sinal com m/z 153 é atribuído ao ácido protocatecuico, cuja presença foi registrada no cacau por Sánchez-Rabaneda et al. (2003) por LC-MS/MS, foi observado por Winters et al. (2017) apresentando efeitos neuroprotetores e antioxidantes em culturas celulares, são também observadas propriedades anti-inflamatórias e atenuação de depósitos amiloides associados à melhora de déficits cognitivos (TSAI et al., 2012; SONG et al., 2014).

À clovamida pode ser atribuída a m/z 358, previamente identificada no cupuaçu por Barros et al. (2016) aplicando UPLC-ESI-QTOF. O composto geralmente é encontrado no cacau em pequenas quantidades, sendo mais comumente encontrado em espécies do gênero *Trifolium*, mais especificamente o trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) (CABALLERO et al., 2015; TEBAYASHI et al., 2000).

O sinal com m/z 353 é identificado como ácido clorogênico, o composto mais abundante entre os isômeros de ácido cafeoilquínico. É um dos ácidos de maior disponibilidade entre os compostos fenólicos encontrado naturalmente em extratos de café e chá (MENG et al., 2013; VENDITTI et al., 2015).

Os sinais com m/z 179 e m/z 193 identificam os ácidos cafeico e ferúlico, foram registrados em extratos de sementes de cacau por Sánchez-Rabaneda et al. (2003) utilizando LC/MS/MS. O efeito terapêutico do ácido ferúlico se deve principalmente às propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, exibindo atividades biológicas como anticarcinogenicidade, anti-apoptose e anti-diabético. e cardioprotetor e neuroprotetor (GHOSH et al., 2017).

A proantocianidina pode ser identificada pelo íon com m/z 591, descrito também por Cádiz-Guerrea et al. (2014) em extratos de cacau utilizando HPLC-MSESI-QTOF, o composto apresenta características promotoras de benefícios à saúde, principalmente devido à sua capacidade antioxidante (ODAI et al., 2019).

Assim como a proantocianidina, o sinal com m/z 591 identificado como naringina, possui potencial antioxidante, com estudos apontando sua eficácia na redução de danos ao DNA induzidos por H_2O_2 , esta característica é também associada a redução de risco de desenvolvimento de câncer devido ao seu efeito genoprotetor (BACANLI et al., 2015; SZCZEPANIAK et al., 2020).

Nicotilflorina, atribuída ao sinal com m/z 593, é um glicosídeo comumente associado a benefícios neurológicos. O composto possui potencial protetivo ao sistema nervoso, apresentando melhora significativa em casos de disfunção de memória, falha metabólica e estresse oxidativo associados à demência causada por acidentes vasculares cerebrais (HUANG et al., 2007). A orientina, identificada pelo íon com m/z 447, é outro glicosídeo

associado à benefícios neurológicos, com efeitos de atenuação de danos causados por isquemia e reperfusão ao atuar em vias metabólicas sinalizadoras, possuindo também mecanismos neuroprotetores contra dano oxidativo causado por peróxido de hidrogênio em células nervosas (WANG et al., 2017; LIM et al., 2018)

O íon com m/z 303 é identificado como taxifolina, um flavonol comumente utilizado em produtos comerciais devido às suas atividades biológicas e mecanismos moleculares relacionados. A taxifolina possui efeitos antitumorais, antioxidantes e protetores cardiovasculares, destacando-se entre esses efeitos a atividade anticancerígena (SUNIL & XU, 2019).

CONCLUSÃO

As amêndoas de cacau apresentaram em sua composição flavonoides, fenilpropanoides, ácidos hidroxibenzóicos, esteróides, metilxantinas, açúcares, ácidos orgânicos e glicosídeos. As propriedades bioativas atribuídas ao consumo do cacau são condizentes com o encontrado no trabalho, demonstrando a importância da exploração da composição química de produtos do cacau associados a benefícios popularmente atribuídos a eles. Além disso, foi possível identificar dentro da classe dos esteróides e fenilpropanóides, compostos como a 20-hidroxiecdisterona e clovamida, respectivamente, compostos pouco descritos no gênero *Theobroma* e inéditos em análises de amostras de cacau por PS-MS.

■ REFERÊNCIAS

1. BACANLI, M.; BASARAN, A. A.; BASARAN, N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. **Food and chemical Toxicology**, v. 81, p. 160-170, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.015>
2. BARISIC, V.; KOPJAR, M.; JOZINOVIC, A.; FLANJAK, I.; ACKAR, Đ.; MILICEVIC, B.; SUBARIC, D.; JOKIC, S.; BABIC, J. The chemistry behind chocolate production. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3163, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24173163>
3. BARNABA, C.; NARDIN, T.; PIEROTTI, A.; MALACARNE, M.; LARCHER, R. Targeted and untargeted characterisation of free and glycosylated simple phenols in cocoa beans using high resolution-tandem mass spectrometry (Q-Orbitrap). **Journal of Chromatography A**, v. 1480, p. 41-49, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.022>
4. BARROS, H. R. de M.; GARCÍA-VILLALBA, R.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GENOVERSE, M. I.. Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 477–489, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.009>
5. BERTORELLI, L. O.; FARIÑA, L. G.; ROVEDAS, G. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. **Agronomía Tropical**, v. 59, n. 2, p. 119-127, 2009. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000200001

6. CABALLERO, B.; FINGLAS, P.; TOLDRÁ, F. Encyclopedia of food and health. Academic Press, 2015.
7. CÁDIZ-GURREA, M. L.; LOZANO-SANCHEZ, J.; CONTRERAS-GÁMEZ, M.; LEGEAI-MALLET, L.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; SEGURA-CARRETERO, A. Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of Theobroma cacao extract. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 485–498, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.016>
8. CAMPELO, F. A.; HENRIQUES, G. S.; SIMEONE, M. L. F.; QUEIROZ, V. A. V.; SILVA, M. R.; AUGUSTI, R.; MELO, J. O. F.; LACERDA, I. C. A.; ARAÚJO, R. L. B. Study of Thermoplastic Extrusion and Its Impact on the Chemical and Nutritional Characteristics and Two Sorghum Genotypes SC 319 and BRS 332. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 788-802, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190243>
9. CHOI, S. Y.; SON, Y. J.; YOO, K. M.; LEE, K. W.; HWANG, I. K. Functional activities of cacao nibs and couvertures according to process conditions. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 68-75, 2016. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.1.068>
10. COUNET, C.; OUWERX, C.; ROSOUX, D.; COLLIN, S. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6243-6249, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf040105b>
11. DA ROSA, H. S.; DE CAMARGO, V. B.; CAMARGO, G.; GARCIA, C. V.; FUENTEFRIA, A. M.; MENDEZ, A. S. L. Ecdysteroids in *Sida tuberculata* R.E. Fries (Malvaceae): Chemical composition by LC-ESI-MS and selective anti-*Candida krusei* activity. **Food Chemistry**, v. 182, p. 193–199, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.144>
12. DE VUYST, L.; WECKX, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 5-17, 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
13. D'SOUZA, R. N.; GRIMBS, S.; BEHRENDTS, B.; BERNAERT, H.; ULLRICH, M. S.; KUHNERT, N. Origin-based polyphenolic fingerprinting of *Theobroma cacao* in unfermented and fermented beans. **Food Research International**, v. 99, p. 550-559, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.007>
14. Duke, J. A. Handbook of phytochemical constituent grass, herbs and other economic plants. 1st Ed. CRC press, 1992.
15. EVARD, H.; KRUBE, A.; LÖHMUS, R.; LEITO, I. Paper spray ionization mass spectrometry: study of a method for fast-screening analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 221-225, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.010>
16. FERNÁNDEZ, R. D. R.; GALLO, F. W. M.; CEDEÑO, A. M. G.; GALEAS, M. M. P.; QUITEROS, H. N. M.; FERRÍN, L. M. C.; ALVAREZ, A. E. B.; MORANTE, P. E. N. Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo nacional. **Ciencia y Tecnología**, v. 5, n. 1, p. 7-12. <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.18779%2Fcyt.v5i1.165>

17. GALLEGO, A. M.; ROJAS, L. F.; RODRIGUEZ, H. A.; MORA, C.; ATEHORTÚA, L.; URREA, A. I.; GUILTINAN, M. J.; MAXIMOVA, S. N.; GAQUEREL, E.; ZULUAGA, M.; PABÓN-MORA, N. Metabolomic profile of cacao cell suspensions growing in blue light/dark conditions with potential in food biotechnology. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 139, n. 2, p. 275-294, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01679-3>
18. GHOSH, S.; BASAK, P.; DUTTA, S.; CHOWDHURY, S.; SIL, P. C. New insights into the ameliorative effects of ferulic acid in pathophysiological conditions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 103, p. 41-55, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.028>
19. GUO, T.; ZHANG, Z.; YANNELL, K. E.; DONG, Y.; COOKS, R. G. Paper spray ionization mass spectrometry for rapid quantification of illegal beverage dyes. **Analytical Methods**, v. 9, n. 44, p. 6273-6279, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7AY02241G>
20. HASHIMOTO, J. C.; LIMA, J. C.; CELEGHINI, R. M.; NOGUEIRA, A. B.; EFRAIM, P.; POPPI, R. J.; PALLONE, J. A. Quality control of commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) by near-infrared spectroscopy. **Food analytical methods**, v. 11, n. 5, p. 1510-1517, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1137-2>
21. HUANG, J. L.; FU, S. T.; JIANG, Y. Y.; CAO, Y. B.; GUO, M. L.; WANG, Y.; XU, Z. Protective effects of Nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 4, p. 741-748, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.03.003>
22. ICCO, International Cocoa Organization. Cocoa and chocolate in Brazil: A study of recent developments and analysis of the prospects for production and consumption. In: ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics XLVI. p. 13–14, 2020.
23. KONGOR, J. E.; HINNEH, M.; VAN DE WALLE, D.; AFOAKWA, E. O.; BOECKX, P.; DEWET-TINK, 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>
24. LI, A.; WEI, P.; HSU, H. C.; COOKS, R. G. Direct analysis of 4-methylimidazole in foods using paper spray mass spectrometry. **Analyst**, v. 138, n. 16, p. 4624-4630, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3AN00888F>
25. LIM, K. Y.; SASMITA, A. O.; LING, A. P. K.; KOH, R. Y.; VOON, K. G. L.; SAY, Y. H.; WONG, Y. P. (2018). Neuroprotective Mechanisms of Orientin against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage in SH-SY5Y Cells. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 10-18 2018. <https://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/JOBIMB/article/view/384>
26. LOUREIRO, G. A.; ARAUJO, Q. R.; SODRÉ, G. A.; VALLE, R. R.; SOUZA Jr, J. O.; RAMOS, E. M.; COMERFORD, N. B.; Grierson, P. F. Cacao quality: Highlighting selected attributes. **Food Reviews International**, v. 33, n. 4, p. 382-405, 2017. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175011>
27. MENG, S.; CAO, J.; FENG, Q.; PENG, J.; HU, Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/801457>

28. MINIGHIN, E. C.; ANASTÁCIO, L. R.; MELO, J. O. F.; LABANCA, R. A. Açai (*Euterpe oleracea*) and its contributions to achieve acceptable daily intake of essential fatty acids. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, e760986116, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.6116>
29. NORN, S.; PERMIN, H.; KRUSE, P. R.; KRUSE, E. From willow bark to acetylsalicylic acid. **Dansk medicinhistorisk arbog**, v. 37, n. 79, 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20509453/>
30. ODAI, T.; TERAUCHI, M.; KATO, K.; HIROSE, A.; MIYASAKA, N. Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Vascular Endothelial Function in Participants with Prehypertension: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2844, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11122844>
31. OGAH, C. O.; OBEBE, O. T. Caffeine content of cocoa and coffee beverages in Lagos, Nigeria. **Journal of innovative research in engineering and sciences**, v. 3, n. 1, 2012. <https://www.semanticscholar.org/paper/Caffeine-Content-of-Cocoa-and-Coffee-Beverages-in-Ogah-Obebe/f932de1c1ceb2dcad86290e28ca81436d5245bfb>
32. OLIVEIRA, C. T.; RAMOS, A. L. C. C.; MENDONÇA, H. O. P.; CONSENZA, G. P.; SILVA, M. R.; FERNANDES, C.; AUGUSTI, R.; MELO, J. O. F.; FERREIRA, A. V. M.; ARAÚJO, R. L. B. Quantification of 6-gingerol, metabolomic analysis by paper spray mass spectrometry and determination of antioxidant activity of ginger rhizomes (*Zingiber officinale*). **Research, Society and Development**, v. 9, p. e366984822, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.4822>
33. ORACZ, J.; NEBESNY, E.; ŻYZELEWICZ, D. Changes in the flavan-3-ols, anthocyanins, and flavanols composition of cocoa beans of different Theobroma cacao L. groups affected by roasting conditions. *European Food Research and Technology*, v. 241, n. 5, p. 663–681, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2494-y>
34. ORTEGA, N.; ROMERO, M. P.; MACLÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J. R.; MOTILVA, M. J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9621–9627, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf8014415>
35. PATRAS, M. A.; MILEV, B. P.; VRANCKEN, G.; KUHNERT, N. Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC-MSn. **Food Research International**, v. 63, p. 353–359, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.031>
36. PEREIRA-CARO, G.; BORGES, G.; NAGAI, C.; JACKSON, M. C.; YOKOTA, T.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Profiles of phenolic compounds and purine alkaloids during the development of seeds of Theobroma cacao cv. Trinitario. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 427–434, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf304397m>
37. RAMOS, A. L. C. C.; MENDES, D. D.; SILVA, M. R.; AUGUSTI, R.; MELO, J. O. F.; ARAÚJO, R. L. B.; LACERDA, I. C. A. Chemical profile of *Eugenia brasiliensis* (Grumixama) pulp by PS/MS paper spray and SPME-GC / MS solid-phase microextraction. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e318974008, 2020. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4008>
38. ROMANENS, E.; LEISCHTFELD, S. F.; VOLLAND, A.; STEVENS, M. J.; KRÄHENMANN, U.; ISELE, D.; FISCHER, B.; MEILE, L.; SCHWENNINGER, S. M. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 290, p. 262-272, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.001>

39. RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>
40. SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; JÁUREGUI, O.; CASALS, I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of mass spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003. <https://doi.org/10.1002/jms.395>
41. SANTOS, C. O. D.; BISPO, E. D. S.; SANTANA, L. R. R. D.; CARVALHO, R. D. S. D. Use of "cocoa honey" (*Theobroma cacao* L) for diet jelly preparation: an alternative technology. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 3, p. 640-648, 2014. <https://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-042/13>
42. SILVA NETO, P. J. D.; MATOS, P. G. G.; MARTINS, A. C.; SILVA, A P. Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Belém: PA, Brasil, 2001.
43. SILVA, E. B. M.; AUGUSTI, R; MELO, J. O. F.; TAKAHASHI, J. A.; ARAÚJO, R. L. B. de. Physicochemical characterization, antioxidant activity and fingerprints of industrialized "detox" mixed beverages by paper spray mass spectrometry. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p.319-324, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170490>
44. SILVA, M. R.; FREITAS, L. G.; SOUZA, A. G.; ARAÚJO, R. L.; LACERDA, I. C.; PEREIRA, H. V.; AUGUSTI, R.; MELO, J. O. F. Antioxidant Activity and Metabolomic Analysis of Cagaitas (*Eugenia dysenterica*) using Paper Spray Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1034-1044, 2019. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190002>
45. SILVA, V. D. M.; ARQUELAUA, P. B. F.; SILVA; M. R.; AUGUSTI, R.; MELO, J. O. F.; FANTE, C. A. Use of paper spray-mass spectrometry to determine the chemical profile of ripe banana peel flour and evaluation of its physicochemical and antioxidant properties. **Química Nova**, v. 43, n. 5, p. 579-585, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170521>
46. SILVA, V. D. M.; MACEDO, M. C. C.; SANTOS, A. N.; SILVA, M. R.; AUGUSTI, R.; LACERDA, I. C. A.; MELO, J. O. F.; FANTE, C. A. Bioactive activities and chemical profile characterization using paper spray mass spectrometry of extracts of Lindl. leaves. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 34, p. 1, 2020. <https://doi.org/10.1002/rcm.8883>.
47. SONG, Y.; CUI, T.; XIE, N.; ZHANG, X.; QIAN, Z.; LIU, J. Protocatechuic acid improves cognitive deficits and attenuates amyloid deposits, inflammatory response in aged A β PP/PS1 double transgenic mice. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 276-281, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.03.006>
48. STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. **Journal of the American dietetic association**, v. 103, n. 2, p. 215-223, 2003. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50028>
49. SUNIL, C.; XU, B. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). **Phytochemistry**, v. 166, p. 112066, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112066>
50. SZCZEPANIAK, O.; LIGAI, M.; KOBUS-CISOWSKA, J.; TICHONIUK, M.; DZIEDZINSKI, M.; PRZEOR, M.; SZULC, P. The Genoprotective Role of Naringin. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 700, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10050700>

51. TAVERNA, D.; DI DONNA, L.; BARTELLA, L.; NAPOLI, A.; SINDONA, G.; MAZZOTTI, F. Fast analysis of caffeine in beverages and drugs by paper spray tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 14, p. 3783-3787, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9468-1>
52. TEBAYASHI, S. I.; ISHIHARA, A.; TSUDA, M.; IWAMURA, H. Induction of clovamide by jasmonic acid in red clover. **Phytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 387-392, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00098-4)
53. TSAI, S. J.; YIN, M. C. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of protocatechuic acid in brain of mice treated by D-galactose. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3198-3205, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.056>
54. TÜRKER, M.; DALAR, A. In vitro antioxidant and enzyme inhibitory properties and phenolic composition of *M. neglecta* Wallr. (Malvaceae) fruit: A traditional medicinal fruit from Eastern Anatolia. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 376–380, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.015>
55. VENDITTI, A.; BIANCO, A.; FREZZA, C.; CONTI, F.; BINI, L. M.; GIULIANI, C.; BRAMUCCI, M.; QUASSINTI, L.; DAMIANO, S.; LUPIDI, G.; BEGHELLI, D.; CATERBI, S.; PETRELLI, D.; VITALI, L. A.; PAPA, F.; CAPRIOLI, G.; MAGGI, F. Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. **Industrial crops and products**, v. 77, p. 353-363, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.002>
56. WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. **Angewandte Chemie**, v. 122, n. 5, p. 889-892, 2010. <https://doi.org/10.1002/ange.200906314>
57. WANG, X.; AN, F.; WANG, S.; AN, Z.; WANG, S. Orientin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rat model through the AQP-4 and TLR4/NF-κB/TNF-α signaling pathway. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 26, n. 10, p. 2199-2214, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.05.002>
58. WHITKUS, R.; DE LA CRUZ, M.; MOTA-BRAVO, L.; GÓMEZ-POMPA, A. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, n. 5, p. 621-627, 1998. <https://doi.org/10.1007/s001220050780>
59. WINTER, A. N.; BRENNER, M. C.; PUNESSEN, N.; SNODGRASS, M.; BYARS, C.; ARORA, Y.; LINSEMAN, D. A. Comparison of the neuroprotective and anti-inflammatory effects of the anthocyanin metabolites, protocatechuic acid and 4-hydroxybenzoic acid. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6297080>
60. YAZAKI, K.; SASAKI, K.; TSURUMARU, Y. Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1739-1745, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.023>