

TIAGO TEODORO DE LIMA SOUZA

**Desreplicação do processo fermentativo espontâneo de cacau (*Theobroma cacao* L.) para
identificação de bioativos de interesse comercial**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara
2022

S729d

Souza, Tiago Teodoro de Lima

Desreplicação do processo fermentativo espontâneo de cacau (*Theobroma cacao* L.) para identificação de bioativos de interesse comercial / Tiago Teodoro de Lima Souza. --

Araraquara, 2022

89 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Cacau. 2. Fermentação. 3. Cafeína. 4. Espectrometria de massa. 5. *Theobroma*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

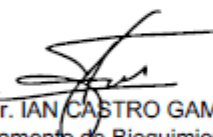
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desreplicação do processo fermentativo espontâneo de cacau (*Theobroma L.*) para identificação de bioativos de interesse comercial."

AUTOR: TIAGO TEODORO DE LIMA SOUZA

ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Ian Castro
Gamboa:213665
41871

Assinado de forma digital
por Ian Castro
Gamboa:21366541871
Dados: 2022.09.23 18:07:58
-03'00'

 Documento assinado digitalmente
ANA CAROLINE ZANATTA SILVA
Data: 23/09/2022 13:59:53-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dra. ANA CAROLINE ZANATTA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP- Ribeirão Preto

Me. RAFAEL VIEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia - INFRO - Ji-Paraná

 Documento assinado digitalmente
RAFAEL VIEIRA
Data: 23/09/2022 12:45:34-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Araraquara, 23 de setembro de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Tiago Teodoro de Lima Souza

Nome em citações bibliográficas: SOUZA, T. T. L.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química de Araraquara; Departamento de Química Orgânica – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – NuBBE. Rua Professor Francisco Degni, 55 – Quitandinha – Araraquara/SP – CEP: 14800-060, Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2023 – atual Graduação em Licenciatura em Matemática – 2ª Licenciatura – Universidade Estácio de Sá

Bacharelado em Estatística – Faculdades Metropolitanas Unidas

2019 – 2022 Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/Araraquara

Título: Desrepliação do processo fermentativo espontâneo de cacau (*Theobroma cacao* L.) para identificação de bioativos de interesse comercial.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2007 – 2013 Graduação em Licenciatura em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/Araraquara

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2020 – 2020 Espectrometria de massas: possibilidades experimentais no âmbito do parque instrumental do NuBBE (Duração: 2h)

Workshop – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

2020 – 2020 Introdução à rede de interações moleculares e a utilização da plataforma GNPS (Duração: 2h)

Workshop – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2014 – atual Governo do Estado de São Paulo

Professor da Educação Básica II

Dedico este trabalho a minha
família,

amigos (de laboratório e da
vida)

e ao professor Ian.

AGRADECIMENTOS

A minha família, por ter entendido minha ausência e mudança de cidade, mas sempre me apoiando.

Ao professor Ian, pela receptividade e por ter me acolhido de braços abertos, entendendo minha situação enquanto profissional da Educação. Obrigado pelo conhecimento, confiança e orientação.

Aos meus grandes amigos Rafael Vieira e Givaldo, não só pelo conhecimento trocado, mas também pelas risadas e momentos vividos fora do laboratório.

Às meninas de mentes brilhantes Natália (Barbie) e Ana (Aninha), que me ajudaram muito quando eu nada sabia e sempre estavam dispostas, tanto dentro do IQ quanto fora em reuniões fraternas.

Aos meus amigos de Araraquara pelos momentos de descontração e pelo acolhimento: Leonice, Lais e Gilmar.

Aos meus amigos de Hortolândia/Campinas: trigêmeas (Jac, Joci e Joyce, irmãs de longos 20 e poucos anos), Doug e Marcelo.

Às pessoas que não lembro, mas que de certa forma me ajudaram em algum momento.

Aos técnicos do Instituto de Química, especialmente Juliana e João.

Ao Nivaldo, pelo conhecimento transmitido e pela paciência.

Aos funcionários do Instituto de Química, que sanaram as dúvidas e auxiliaram em vários setores.

Aos alunos e professores do NuBBE.

Ao Instituto de Química e à UNESP, por ter possibilitado a realização do meu Mestrado na Instituição.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus alunos, que sempre me inspiravam a buscar mais conhecimento.

Aos meus amigos de profissão, especialmente Cintia e Fernanda, por serem grandes motivadoras e proporcionarem momentos agradáveis fora do ambiente escolar.

A Deus, por ter permitido vivenciar tudo isso e por ter protegido minha família e amigos dos maus acontidos por esse vírus e suas consequências.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Pertencente à família Malvaceae, o cacauéiro é o responsável por fornecer o fruto chamado cacau, principal componente do chocolate. Constituído por diferentes substâncias, principalmente polifenóis, o cacau é cultivado em diversos estados brasileiros, sendo Rondônia o 4º maior produtor interno do produto (de 2016 a 2019), enquanto o Brasil se destaca como o 6º maior produtor do mundo. O objetivo deste trabalho foi analisar amostras de sementes colhidas e fornecidas em parceria com o Instituto Federal de Rondônia (IFRO – Câmpus Ji-Paraná). Tais amostras foram submetidas ao processo fermentativo durante sete dias, sendo recolhidos 14 ensaios em cada fase do processo (início, meio e final), baseado em planejamento experimental. As 42 amostras resultantes foram analisadas através de técnicas de desreplicação e separação, tais como Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas e Cromatografia Líquida, objetivando verificar a variabilidade metabólica e os possíveis metabólitos com potencial interesse comercial. Inicialmente, com a utilização de softwares como MZmine, MSFinder e Data Analysis, e baseados na literatura e em banco de dados como o PubChem, pode-se confirmar a presença dos dois principais marcadores - teobromina e cafeína -, além de propostas para compostos não conhecidos. A discussão dos espectros de massas (MS^1 e MS^2) destas substâncias e de outra com m/z 276,216 encontra-se ao longo do trabalho. Através da rede de interações moleculares foi possível anotar dois compostos: (-)-epicatequina e procianidina B2. Por fim, as frações denominadas 3F, 9F, 13F e 14F, da última etapa da fermentação, podem ser utilizadas para atividades futuras, pois responderam positivamente ao planejamento de experimentos e tiveram um maior rendimento.

ABSTRACT

Belonging to the Malvaceae family, the cocoa tree is responsible for providing the fruit called cocoa, the main component of chocolate. Consisting of different substances, mainly polyphenols, cocoa is grown in several Brazilian states, with Rondônia being the 4th largest domestic producer of the product (from 2016 to 2019), while Brazil stands out as the 6th largest producer in the world. The objective of this work was to analyze seed samples collected and supplied in partnership with the Federal Institute of Rondônia (IFRO – Campus Ji-Paraná). Such samples were submitted to the fermentation process during seven days, being collected 14 assays in each phase of the process (beginning, middle and end), based on experimental planning. The 42 resulting samples were analyzed using dereplication and separation techniques, such as Mass Resonance and Liquid Chromatography, aiming to verify the metabolic variability and possible metabolites with potential commercial interest. Initially, with the use of MZmine, MSFinder and Data Analysis software, and based on the literature and a database such as PubChem, it was possible to confirm the presence of the two main markers – theobromine and caffeine -, in addition to proposals for unknown compounds. The discussion of the mass spectra (MS^1 and MS^2) of these substances and another with m/z 276,216 is found throughout the work. Through the molecular network interactions it was possible to annotate two compounds: (-)-epicatechin and procyanidin B2. Finally, the fractions called 3F, 9F, 13F and 14F, from the last stage of fermentation, can be used for future activities, as they responded positively to the planning of experiments and had a higher yield.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da Mesoamérica (área designada por traços) e da América Central com as principais zonas de cultivo do cacau.....	18
Figura 2 – Eventos importantes da história do cacau no Brasil.....	20
Figura 3 – Os 10 maiores produtores mundiais de cacau no ano de 2020.....	21
Figura 4 – Maiores produtores de cacau no Brasil (2020).....	23
Figura 5 - Maiores produtores nacionais de cacau nos anos de A) 2016, B) 2017, C) 2018 e D) 2019.....	24
Figura 6 - Variedades de cacau e suas sementes: A) <i>Criollo</i> e sua semente oval em (D); B) <i>Forastero</i> e semente achatada em (E); C) <i>Trinitario</i> e sua representação em (F).....	26
Figura 7 - Corte transversal do fruto de cacau da variedade <i>Forastero</i> (A) e corte longitudinal da semente de cacau (B).....	27
Figura 8 – Etapas envolvidas no pré-processamento e processamento do cacau.....	28
Figura 9 – Cocho de fermentação em (A), recoberto com folha de bananeira em (B), preenchido com massa de cacau em (C) e com controle da temperatura em (D).....	31
Figura 10 – A) Secagem por barcaças e B) secagem por estufas solares.....	33
Figura 11 – Estrutura de alguns polifenóis.....	36
Figura 12 – Principais polifenóis encontrados nas sementes de cacau.....	37
Figura 13 – Estruturas químicas das metilxantinas: A) cafeína, B) teobromina e c) teofilina.....	38
Figura 14 – Estruturas das primeiras moléculas isoladas por desreplicação.....	40
Figura 15 – Plataforma GNPS.....	41
Figura 16 – Sementes de cacau no início (A) e no final da fermentação (B).....	45
Figura 17 – Cromatograma de íons totais do branco (a) e da fração 3F (b), além da sobreposição dos dois (c), mostrando a similaridade dos picos intensos.....	54
Figura 18 – Identificação da teobromina e cafeína.....	55
Figura 19 – Espectros de MS ¹ (a) e MS ² (b) para a teobromina.....	57

Figura 20 – Valores apresentados pelo MSFinder para a molécula de teobromina.....	58
Figura 21 – Proposta de mecanismo de fragmentação para os principais sinais encontrados no espectro de massas da teobromina.....	59
Figura 22 – Espectros de MS ¹ (a) e MS ² (b) para a cafeína.....	60
Figura 23 – Valores apresentados pelo MSFinder para a molécula de cafeína.....	61
Figura 24 – Proposta de mecanismo de fragmentação para os principais sinais encontrados no espectro de massas da cafeína.....	62
Figura 25 – Rede de interações moleculares obtida pelo GNPS.....	64
Figura 26 – Agrupamento e respectivas estruturas da teobromina e cafeína pelo GNPS.....	65
Figura 27 – Nodos da teobromina e cafeína.....	65
Figura 28 – Cluster com íon precursor da (-)-epicatequina e sua respectiva estrutura.....	66
Figura 29 – Cluster e estrutura da procianidina B2.....	67
Figura 30 – Comparação dos cromatogramas de íons totais presentes no branco e nas frações 3F, 9F, 13F e 14F.....	69
Figura 31 – Quantitativo de teobromina (a) e cafeína (b) nas amostras consideradas.....	69
Figura 32 – Intensidade do íon 276,1426 nas frações e propostas P1 e P2 sugeridas pelo MSFinder.....	70
Figura 33 – Estrutura da morfolina.....	71
Figura 34 – A) Estrutura da carbodiimida e (B) dietilcarbodiimida.....	72
Figura 35 – (A) Estrutura e (B) espectro MS/MS da <i>N</i> -ciclohexil- <i>N'</i> -(2-(4-morfolinil)etil)carbodiimida, ambos sugeridos pelo MSFinder.....	72
Figura 36 – Espectros de MS ¹ (a) e MS ² (b) do sinal com <i>m/z</i> 276,1206 presente na fração 14F.....	73
Figura 37 - Espectro de MS ¹ e MS ² obtido pelo software Data Analysis.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção mundial de cacau (em mil toneladas) segundo a ICCO.....	22
Tabela 2 – Especificações dos cochos de fermentação.....	30
Tabela 3 – Planejamento de misturas e massas obtidas.....	47

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Homogeneização e obtenção das amostras.....	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD₃OD	Metanol Deuterado
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
FOASTAT	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFRO	Instituto Federal de Rondônia
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography coupled mass spectrometry</i>
LC-NMR	<i>Liquid chromatography nuclear magnetic resonance</i>
ICCO	<i>International Cocoa Organization</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RT	<i>Retention time</i>
TOF-MS	<i>Time-off-flight mass spectrometry</i>
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
V	Volt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 - ORIGEM DO CACAU E SUA PRESENÇA NO BRASIL	18
1.2 - PRODUÇÃO MUNDIAL E NACIONAL	20
1.3 - ASPECTOS GERAIS.....	24
1.4 - PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU	27
1.4.1 - Colheita e abertura dos frutos.....	29
1.4.2 - Fermentação	29
1.4.3 - Secagem	32
1.5 - BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO	34
1.6 - COMPOSTOS FENÓLICOS NO CACAU.....	35
1.7 - METILXANTINAS PRESENTES NO CACAU	38
1.8 – DESREPLICAÇÃO.....	39
1.9 - REDES MOLECULARES.....	40
2. OBJETIVOS	42
2.1 – Objetivos Gerais	43
2.2 – Objetivos Específicos	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 – Fermentação das amêndoas de cacau.....	45
3.2 – Planejamento Experimental.....	46
3.3 – Preparo das amostras para Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	48
3.4 – Elaboração da rede de interações moleculares	49
3.5 – Pré-processamento dos dados.....	49

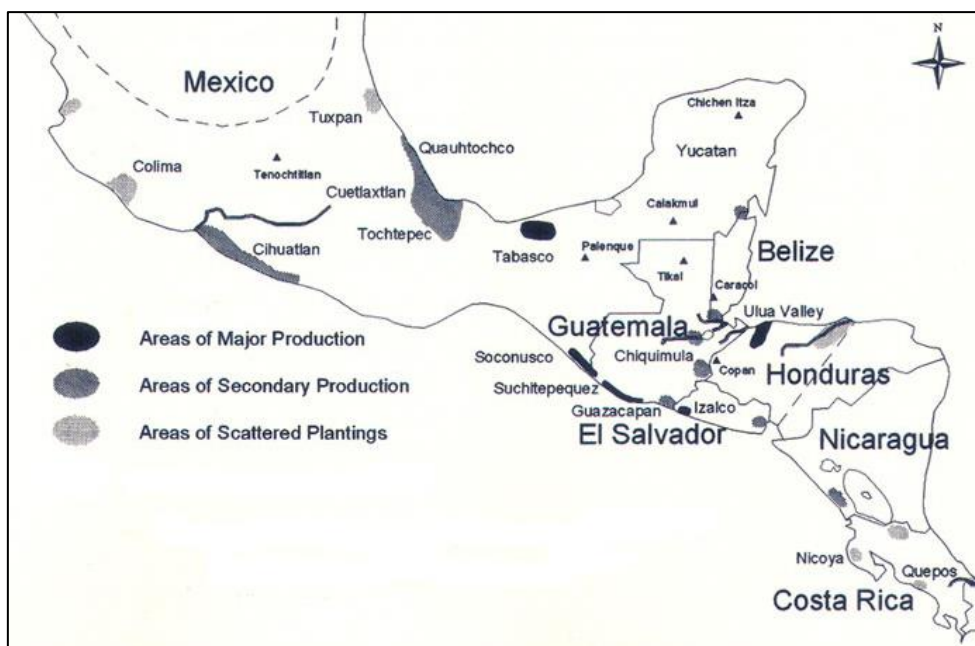
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
4.1 – Análise por espectrometria de massas	52
4.1.1 - A) Exploração dos compostos presentes na fração 3F.....	52
4.1.1 – A1) Teobromina	56
4.1.1 – A2) Cafeína	59
4.2 - Rede de interações moleculares	63
4.3 - Dados obtidos para substâncias não confirmadas	68
5. CONCLUSÃO.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 - ORIGEM DO CACAU E SUA PRESENÇA NO BRASIL

Desde antes da época de Cristo, os povos indígenas da Mesoamérica desfrutavam do cacau, utilizando-o como alimento, remédio e moeda de troca, tendo sido cultivado em todo o México, América Central e América do Sul desde o início do Período Formativo Inicial (1900 – 900 a. C.) (TOHI, 2013) (Figura 1). Através da história oral, cantaria, cerâmica e da narração do seu uso em rituais e na vida cotidiana, os povos antigos assim demonstravam o valor do cacau, imortalizando seu lugar na sociedade, tendo importância também ao longo da construção da história das Américas: as frutas desempenharam um papel na espiritualidade pré-colombiana; os feijões foram a primeira forma de moeda; os conquistadores espanhóis foram cativados pela utilização do cacau como bebida, o que acabou impulsionando e intensificando o cultivo; e a invenção do bombom de chocolate aumentou a demanda da Europa, que era atendida por um cultivo mais difundido na América Latina e, eventualmente, em outras áreas tropicais (DÍAS-VALDERRAMA *et al.*, 2020; TOHI, 2013).

Figura 1 –Mapa da Mesoamérica (área designada por traços) e da América Central com as principais zonas de cultivo do cacau.



Fonte: BERGMANN, 1969.

Os grãos eram valorizados tanto por seu uso como moeda quanto pela produção de uma bebida condimentada e com especiarias chamada de ‘*Chocolatl*’, considerada como tendo

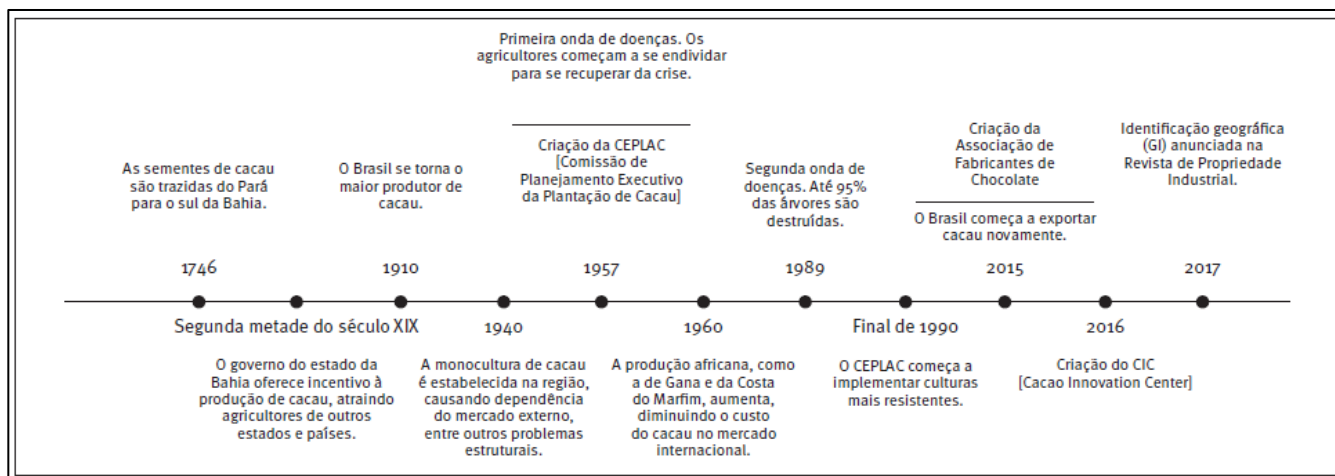
propriedades afrodisíacas (BECKETT, 2009) e que significava, literalmente, “água quente”. Juntamente com o termo náuatle (língua falada por muitos nativos) “*chocolatl*”, compõe o que conhecemos hoje como a palavra moderna “chocolate” (World Cocoa Foundation, 2018).

A chegada do cacau no Brasil ocorreu em 1746, no sul da Bahia, quando sementes da variedade Amelonado foram importadas da Amazônia pelo colonizador francês que vivia no Pará, Luiz Frederico Warneau, e plantadas pelo fazendeiro baiano Antônio Dias Ribeiro no município de Canavieiras, às margens do Rio Pardo. Essa introdução inicial deu origem à variedade “Comum” e, ao longo de dois séculos, os descendentes dessas plantas se espalharam e estabeleceram quase todas as plantações baianas, bem como plantações comerciais no Espírito Santo (SANTOS *et al.*, 2015).

A partir de 1822 o cacau baiano também foi usado para estabelecer plantações de cacau em países africanos, impulsionando alguns países da África Ocidental a se tornarem os principais produtores mundiais de cacau no início do século XX, enquanto no Brasil, nas primeiras décadas do mesmo século, o cacau era o produto mais importante de exportação da Bahia. Vários fazendeiros de origem humilde, proprietários de vastas plantações de cacau e de importantes casas comerciais, começaram a enriquecer e tornaram-se fundamentais para a economia cacaueira na sociedade baiana (CARRADORE, 2019; SANTOS *et al.*, 2015).

Em 1940 e 1950 instituições de pesquisa fizeram as primeiras seleções nos plantios derivados dessas introduções iniciais, como o ICB (Instituto do Cacau da Bahia), IAL (Instituto Agrônomo do Leste) e EEG (Estação Experimental de Goytacazes), sendo que as sementes polinizadas dessas seleções foram liberadas para os agricultores. Com a criação da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), o foco se voltou para os híbridos interclonais entre germoplasmas importados e locais. Com a introdução da doença de vassoura de bruxa na Bahia e Espírito Santo, programas de seleção recorrente foram implementados objetivando o apoio ao desenvolvimento de clones (LOPES *et al.*, 2011). Para Viotto (*et al.*, 2018), a história do cacau no Brasil pode ser apresentada em uma linha do tempo com os principais eventos ocorridos (Figura 2).

Figura 2 – Eventos importantes da história do cacau no Brasil.



Fonte: Viotto (*et al.*, 2018)

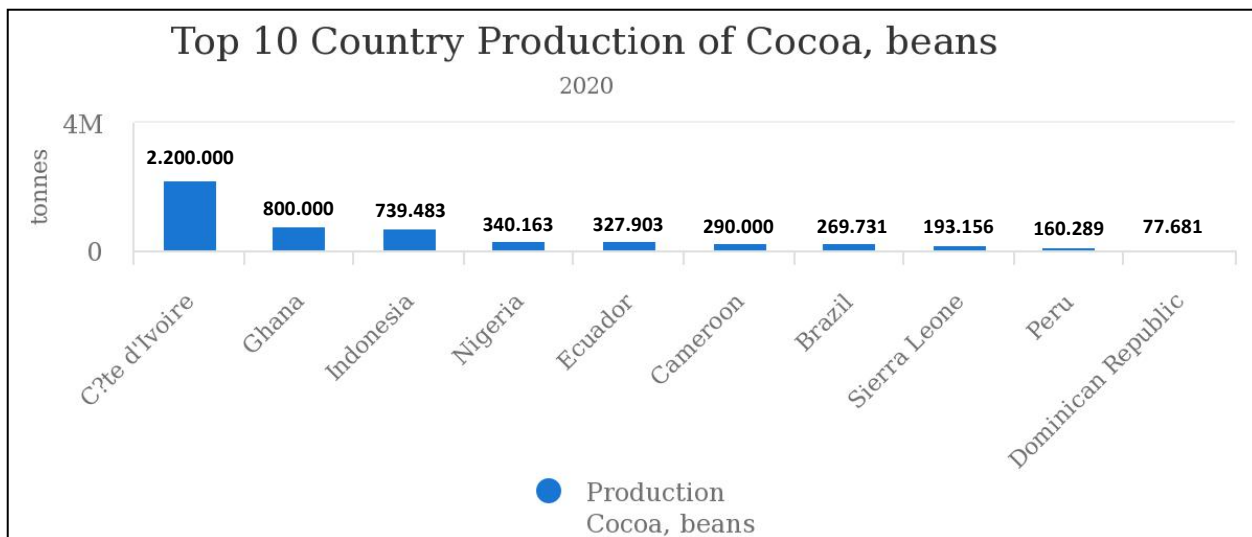
1.2 - PRODUÇÃO MUNDIAL E NACIONAL

A produção mundial de cacau, em 2021, ultrapassou a marca de 5,2 milhões de toneladas. Entre os 10 maiores produtores mundiais, a Costa do Marfim assume a liderança com uma produção de 2.034.000 toneladas, seguida de Gana (883.652 toneladas), Indonésia (659.776 toneladas), Nigéria (328.263 toneladas), Camarões (295.028 toneladas), Brasil (235.809 toneladas), Equador (205.955 toneladas), Peru (121.825 toneladas), República Dominicana (86.599 toneladas) e Colômbia (56.808 toneladas), de acordo com o site da WorldPopulationReview¹.

De acordo com dados publicados pela Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAOSTAT (2021), o Brasil subiu uma posição em relação ao ano de 2020, em que ocupava a sétima posição, com uma produção anual de 269.731 toneladas. O primeiro lugar era da Costa do Marfim, seguida de Gana, Indonésia, Nigéria, Equador e Camarões. Completando o quadro com os 10 principais países produtores de cacau em 2020, ficaram Serra Leoa, Peru e República Dominicana (Figura 3).

¹Disponível em: <<https://worldpopulationreview.com/country-rankings/cocoa-producing-countries>>. Acesso em: 19 de jan. de 2022

Figura 3 – Os 10 maiores produtores mundiais de cacau no ano de 2020.



Fonte: FAOSTAT, 2021.

De acordo com o último documento da International Cocoa Organization (ICCO, 2022), datado de 31 de maio de 2022, a previsão de produção global de amêndoas de cacau para a safra 2021/2022 é de 4.923.000 toneladas, uma queda de aproximadamente 6,05% (ou 317.000 toneladas) em relação ao estimado para a safra 2020/2021, que foi de 5.240.000 toneladas (Tabela 1). Entretanto, em relação à 2019/2020, houve um aumento de 188.000 toneladas (ou seja, 3,97%).

Tabela 1 – Produção mundial de cacau (em mil toneladas) segundo a ICCO.

	2019/2020		2020/2021*		2021/2022**	
	Produção	Porcentagem	Produção	Porcentagem	Produção	Porcentagem
África	3549	74,90	4049	77,30	3720	75,60
Camarão	280		290		280	
Costa do Marfim	2105		2248		2200	
Gana	771		1047		800	
Nigéria	250		290		270	
Outros	143		174		170	
América	903	19,10	938	17,90	940	19,10
Brasil	201		200		210	
Equador	342		365		370	
Outros	360		372		360	
Ásia e Oceania	283	6,00	253	4,80	264	5,40
Indonésia	200		170		180	
Papua Nova Guiné	41		42		42	
Outros	42		41		42	
Total mundial	4735	100,0	5240	100,00	4923	100,00

*Estimado

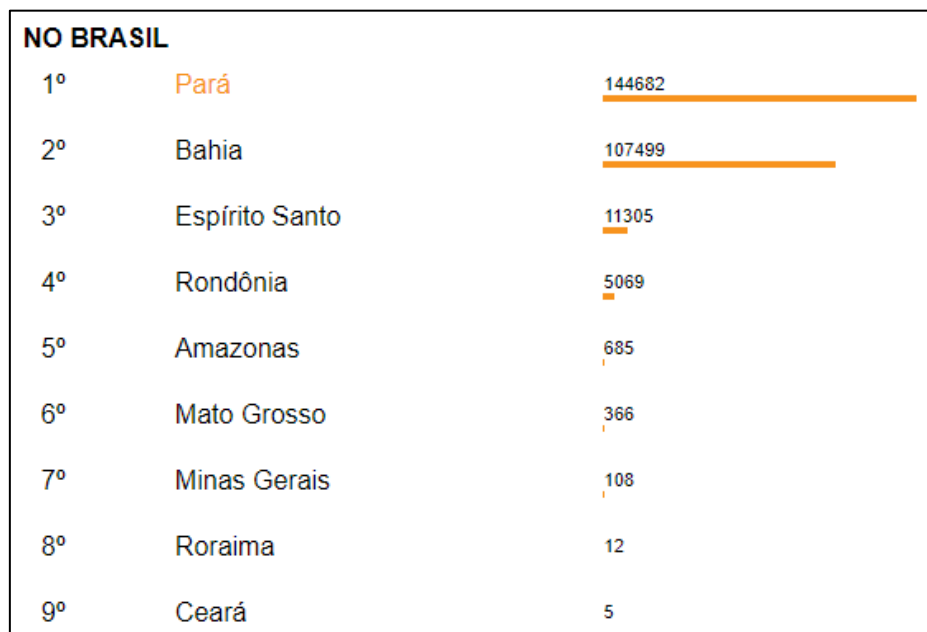
**Previsto

No Brasil, a produção do cacau em escala modesta tem uma longa história (LEITE e HARDING, 2004) ao longo dos séculos. No século XIX, na segunda metade, a produção de cacau atraiu famílias de outras áreas e países, fazendo com que a monocultura começasse a prosperar no sul da Bahia; enquanto no século XX a doença vassoura de bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, devastou a produção brasileira de cacau no final da década de 80, que era a segunda maior do mundo na época (VIOTTO *et al.*, 2018). Como consequência, a produção do país entrou em colapso, plantações foram dizimadas e a exportação teve queda acentuada em toneladas (MIRAGAIA, 2015). A produção cacauífera começou a ascender em 2004, após iniciativa da CEPLAC na criação de culturas mais resistentes (VIOTTO *et al.*, 2018).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021) mostram que, no ano de 2020, o valor da produção brasileira foi de 3.223.892 mil reais, com quantidade produzida de 269.731 toneladas, área destinada à colheita de 589.153 hectares, área colhida de 588.501 hectares e rendimento médio de 458 kg por hectare. O maior produtor foi o Pará, com uma produção de 144.682 toneladas e valor de produção de 1.726.027 mil reais, seguido da Bahia

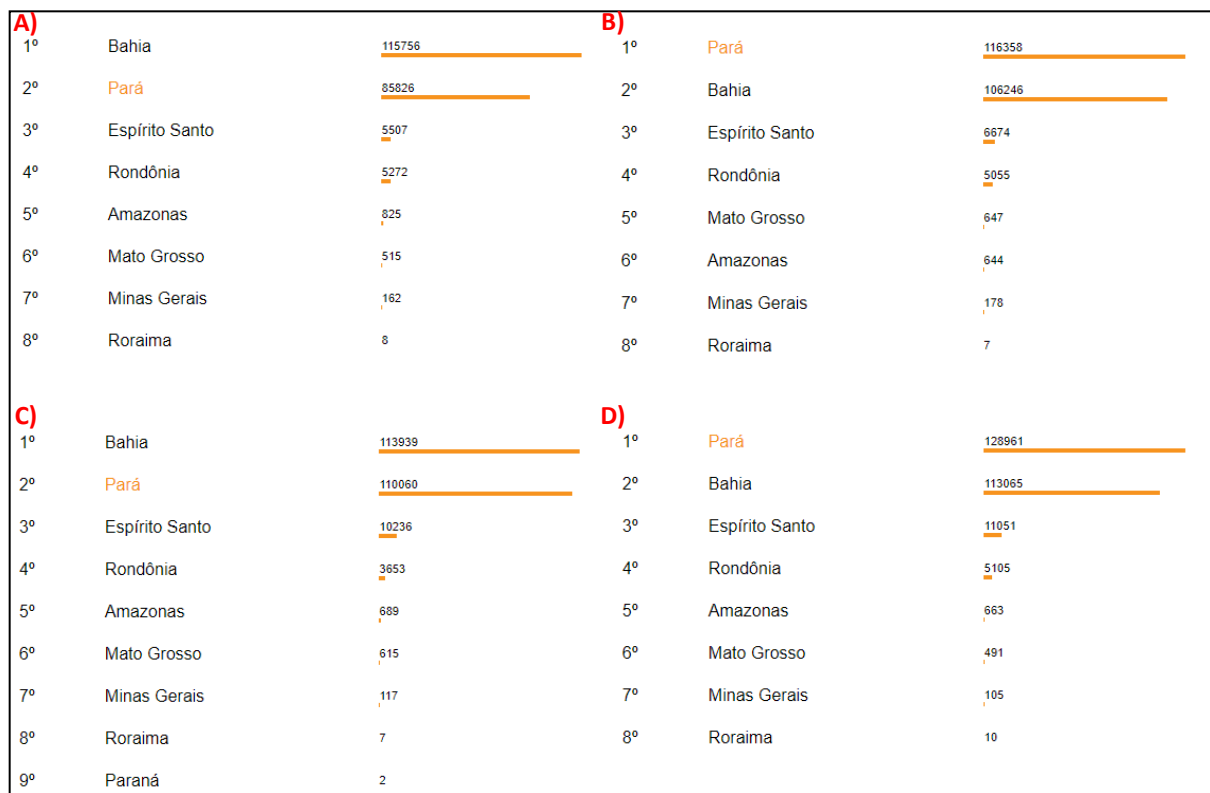
(107.499 toneladas e valor de produção de 1.314.334 mil reais), Espírito Santo (11.305 toneladas e valor de produção de 134.824 mil reais), Rondônia (5.069 toneladas e valor de produção de 41.406 mil reais) e Amazonas (685 toneladas e valor de produção de 3.294 mil reais). Na figura 4 temos o ranking dos 9 maiores produtores nacionais (em 2020).

Figura 4 – Maiores produtores de cacau no Brasil (2020).



Fonte: IBGE, 2021.

Nos últimos 5 anos (2016 a 2020) , de acordo com o IBGE, a liderança da produção nacional revezou entre os estados da Bahia e do Pará que, historicamente, começaram a cultivar as amêndoas de cacau, enquanto o estado de Rondônia encontra-se na quarta colocação (Figura 5).

Figura 5 – Maiores produtores nacionais de cacau nos anos de A) 2016, B) 2017, C) 2018 e D) 2019.

Fonte: IBGE, 2021.

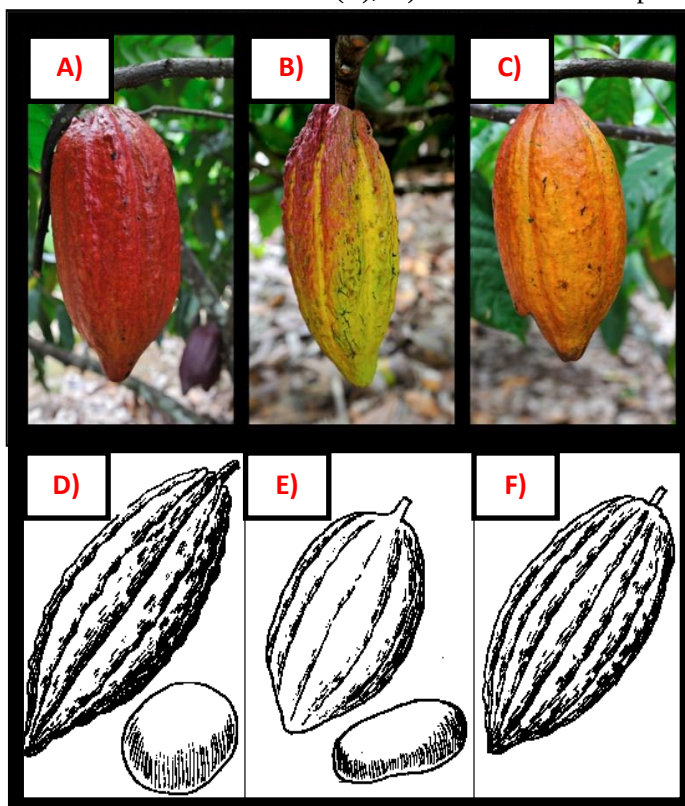
1.3 - ASPECTOS GERAIS

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma cultura tropical perene cuja produção das vagens ao longo do ano é capaz de atender a grande demanda do mercado por chocolate (TEE *et al.*, 2019). A ordem à qual pertence o cacaueiro é a Malvales, família Malvaceae, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L., sendo a única utilizada comercialmente para a produção de chocolate. Os astecas e outros grupos de língua *nahuatl* denominavam o cacaueiro de “cacaohoaquahuitl”, os frutos de “cachocentli” e suas sementes de “cacaoatl”, nome utilizado atualmente para a espécie. Lineu, em 1737, denomina o gênero *Theobroma*, que significa alimento dos deuses, em referência à origem divina atribuída ao cacaueiro pelos povos mesoamericanos e também à sua importância para os povos indígenas que habitavam a América tropical (CRUZ, 2012; SOUSA FILHO *et al.*, 2021).

O cacauero desenvolve-se nas florestas tropicais desde o sul do México até o extremo sul da Amazônia, sendo que sua expansão geográfica originou dois grupos importantes: *Criollo* e *Forastero*. Utilizados inicialmente na Venezuela, a intenção com estes termos era distinguir o material nativo da região (*Criollo*), do material introduzido (*Forastero*) (EFRAIM, 2009; PIRES, 2003). O *Trinitario*, cultivado na Malásia e na Indonésia, é híbrido das outras duas variedades, *Criollo* e *Forastero*, possuindo o sabor frutal e suave do primeiro e maior resistência a pragas do segundo (SOUZA, 2010). De acordo com o livro “*Cacau: produção, manejo e colheita*”, do Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (2018), as variedades do cacau (Figura 6) são assim caracterizadas:

- **Criollo:** apresenta frutos grandes e geralmente com casca fina e rugosa, com coloração verde-escura quando imaturos, passando para amarela ou alaranjada quando amadurecidos. As sementes são grandes, de cor branca a violeta-pálida, com muita polpa, o que resulta em um produto de qualidade superior, conhecido popularmente como “cacau-fino”.
- **Forasteiro:** apresenta frutos que variam de mais arredondados a mais alongados, possuindo sementes achatadas de cor violeta-intensa, o que produz um cacau conhecido como “tipo básico”. É a variedade mais difundida no mundo (80% da produção mundial), predominando nas plantações da Bahia, Amazônia e países produtores da África.
- **Trinitário:** obtida a partir do cruzamento entre o Criollo e o Forasteiro. Sua reprodução é por propagação vegetativa com enraizamento de estacas ou por enxertia, constituindo-se em clones. As sementes apresentam coloração que varia desde o amarelo-pálido até o roxo-escuro, resultando em um produto de qualidade intermediária.

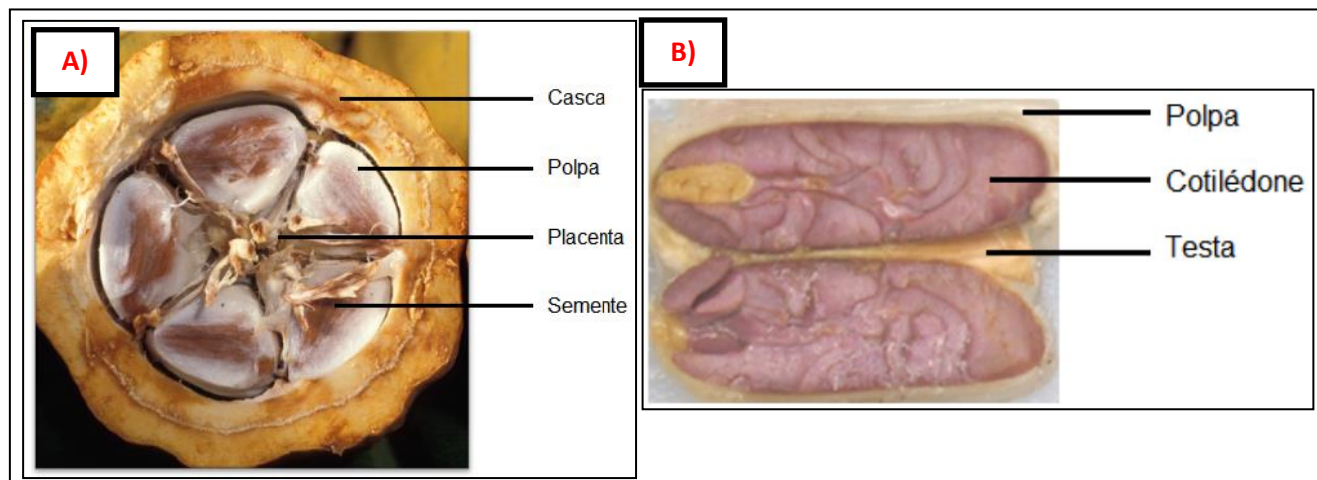
Figura 6 – Variedades de cacau e suas sementes: A) *Criollo* e sua semente oval em (D); B) *Forastero* e semente achatada em (E); C) *Trinitario* e sua representação em (F).



Fontes: <<https://terradochocolate.blogspot.com/2019/02/criollo-forasteiro-ou-trinitario-qual-o.html>> e <http://www.uq.edu.au/_School_Science_Lessons/55.12.GIF>

O fruto é composto por casca, polpa, placenta e sementes, sendo que cada fruto contém entre 30 e 40 sementes envolvidas numa polpa adocicada, mucilaginosa, acidulada, de sabor agradável e ficam levemente presas à placenta. Constituem cerca de 13,5% a 29% da massa total do fruto, com comprimento variando entre 21 e 29 mm, largura entre 10 a 17 mm, espessura entre 8 e 12 mm, formadas pelo mesocarpo, endocarpo, espermoderma, endosperma e cotilédones. As quatro primeiras camadas constituem a testa ou tegumento da semente, enquanto os cotilédones ficam envoltos na testa e representam a parte útil da semente na fabricação de chocolate e manteiga de cacau (JÚNIOR, 2011). A figura 7 apresenta o corte transversal do fruto de cacau (A) e corte longitudinal da semente (B).

Figura 7 – Corte transversal do fruto de cacau da variedade *Forastero* (A) e corte longitudinal da semente de cacau (B).

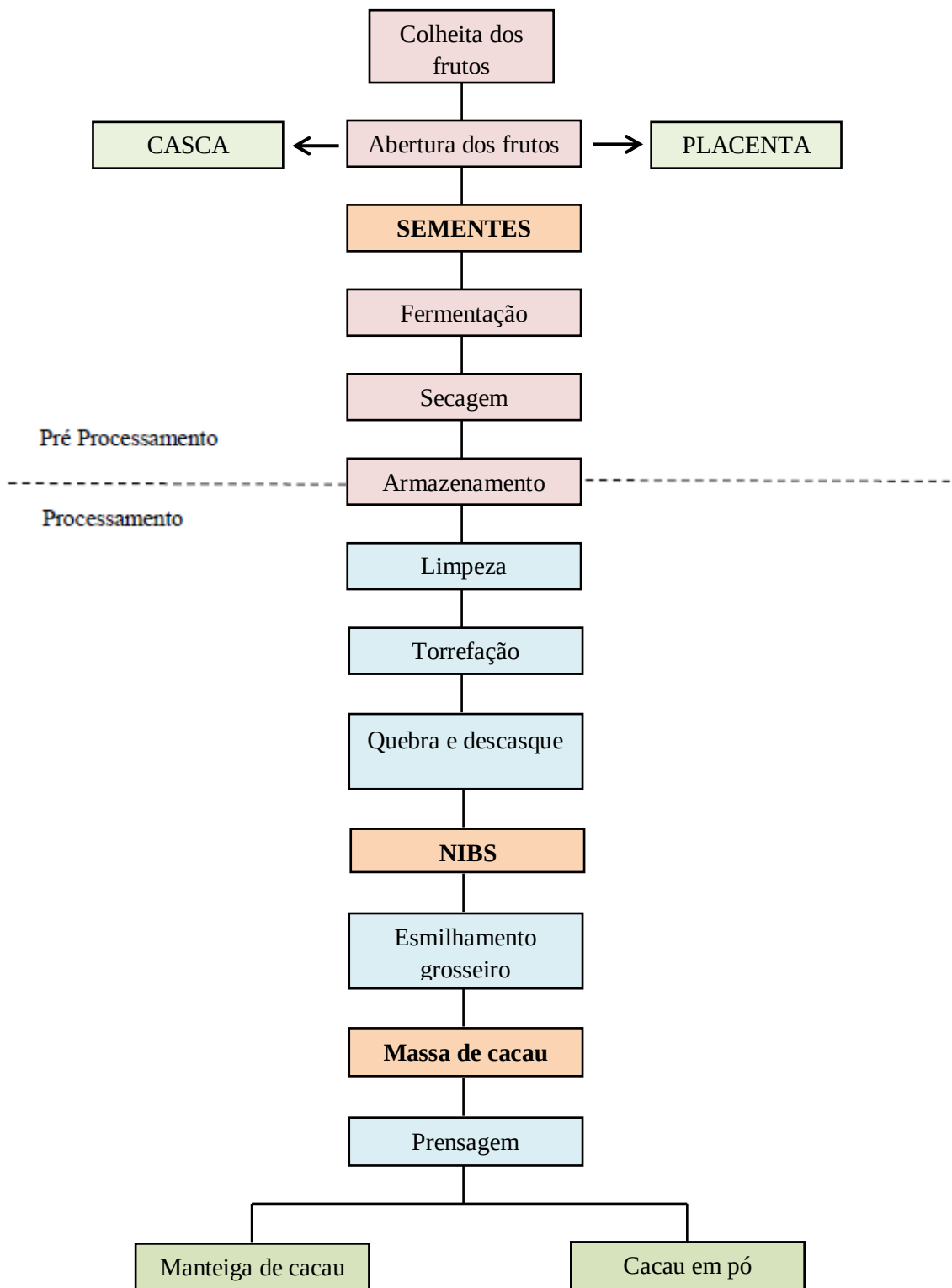


Fonte: JÚNIOR, 2011.

1.4 - PRÉ-PROCESSAMENTO DO CACAU

As sementes do cacau passam por duas etapas fundamentais: o pré-processamento e o processamento. A primeira compreende as etapas que são realizadas no campo pelo produtor de cacau, como a colheita, abertura dos frutos, retirada das sementes com a polpa, fermentação, secagem dos grãos e o armazenamento, enquanto a segunda etapa usualmente ocorre na indústria e envolve a obtenção dos ingredientes utilizados para a fabricação do chocolate e seus derivados (OKIYAMA *et al.*, 2017) (Figura 8).

Figura 8 – Etapas envolvidas no pré-processamento e processamento do cacau.



Fonte: FERNANDES, 2019 (adaptado de OKIYAMA *et al.*, 2017).

1.4.1 - Colheita e abertura dos frutos

A colheita deve ser realizada quando os frutos estiverem no ponto ideal de maturação, apresentado uma coloração de casca de acordo com a variedade. A época de colheita depende das condições climáticas de cada região, ocorrendo o ano inteiro no Brasil, mas ocorrendo em dois períodos distintos de safra: a principal, de outubro a janeiro; e a secundária, conhecida como temporã, realizada de maio a agosto (CRUZ, 2012).

Para a colheita dos frutos das árvores, eles são retirados com uso de uma faca ou tesoura de poda. As frutas altas podem ser derrubadas utilizando-se uma faca curvada e de cabo longo. Após serem colhidos, os frutos são empilhados para posterior seleção e remoção da casca. Na fase de seleção, os frutos são examinados e todas as espécies magras ou verdes são descartadas, enquanto os selecionados são cortados e a têm a polpa removida. Essa remoção deve ser rápida, caso contrário, este processo levará à fermentação acelerada (FERNANDES, 2019).

Após a colheita dos frutos, o intervalo de tempo ideal para quebrá-los é de 2 a 3 dias, facilitando a separação das sementes da casca. Caso sejam quebrados com mais de 3 dias depois da colheita, pode haver início da germinação das sementes no interior do fruto, alterando o desenvolvimento do sabor e do aroma de chocolate. Dependendo do percentual de amêndoas germinadas, o lote pode ser classificado como refugo e ter o preço de compra reduzido (SERRA e SODRÉ, 2021).

1.4.2 - Fermentação

A fermentação é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas de boa qualidade, devido às reações bioquímicas que provocam a morte do embrião, hidrólise de açúcares e proteínas, liberação de enzimas e substratos, difusão de compostos fenólicos que entram em contato com as enzimas, entre outras (EFRAIM *et al.*, 2010). Tais reações também contribuem significativamente para a redução do amargor e da adstringência e também permitem o desenvolvimento dos precursores do sabor característico de produtos de cacau (EFRAIM, 2009).

No processo fermentativo, alguns fatores são importantes, tais como o sistema de fermentação (caixa, monte, cesto etc.); a temperatura do ambiente e da massa em fermentação; o pH e a acidez da polpa e do cotilédone; o tempo de fermentação; o revolvimento da massa; a

microflora presente; dentre outros (CRUZ, 2012; SANTOS, 2013). Essa fermentação das sementes é realizada em caixas de madeira, denominadas de cochos de fermentação (Figura 9), que possui algumas especificações em relação à altura, largura e comprimento, sendo que este último item é variável e depende do volume de produção (MAPA/CEPLAC, 2020) (Tabela 2).

Tabela 2 – Especificações dos cochos de fermentação.

Cochos	Áreas maiores que 10 hectares	Áreas com até 10 hectares
Largura (m)	1,20	0,60
Altura (m)	1,00	0,60
Comprimento (m)	Variável	Variável

Fonte: MAPA/CEPLAC, 2020.

A “*Cartilha de boas práticas da cultura do cacau no estado do Pará*”, elaborada em conjunto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação e pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (2020), as sementes colocadas nos cochos de fermentação devem ser cobertas com folhas de bananeira (Figura 9) ou sacos de aniagem, evitando-se a utilização de plástico. O intuito da cobertura da massa é evitar a perda de calor produzido pela fermentação e o ressecamento das amêndoas que ficam na superfície. Ao encher o cocho, devem-se deixar divisões vazias para que haja o revolvimento da massa de cacau, respeitando a seguinte orientação:

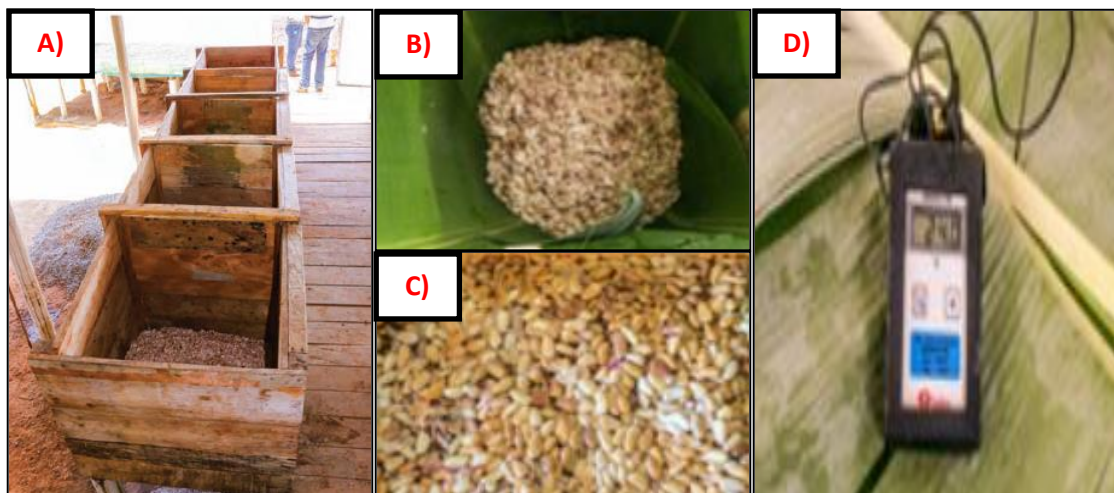
1º revolvimento: 24 horas após o enchimento do cocho.

2º revolvimento: 48 horas após o primeiro revolvimento.

3º revolvimento: 24 horas após o segundo revolvimento.

4º revolvimento: 24 horas após o terceiro revolvimento.

Figura 9 – Cocho de fermentação em (A), recoberto com folha de bananeira em (B), preenchido com massa de cacau em (C) e com controle da temperatura em (D).



Fonte: FERREIRA, 2017; SENAR, 2018.

O tempo requerido para a fermentação das sementes é variável, dependendo do tipo de cacau e da região de cultivo. Para que as principais reações que levam à formação dos precursores do sabor do chocolate ocorram, as sementes do cacaueiro do grupo *Forastero*, tipo predominante no mundo e no Brasil, devem ser, geralmente, fermentadas por períodos superiores a cinco dias (entre 5 e 8 dias), enquanto do *Trinitario* o período também é o mesmo (EFRAIM *et al.*, 2010; FERNANDES, 2019). Fermentação excessiva, superior ao tempo indicado, resulta em um cacau com coloração castanho escuro, com cheiro de amônia ou odor desagradável de matérias em putrefação, diferentemente do cacau bem fermentado, que apresenta perda da polpa mucilaginosa e mudança de coloração externa da semente, passando de rosada e branca para castanho avermelhada no final da fermentação (JÚNIOR, 2011; MAPA/CEPLAC, 2020).

O processo fermentativo inicia-se na polpa mucilaginosa, rica em açúcares e de baixo pH, propiciando o desenvolvimento de micro-organismos, que iniciam as reações bioquímicas no interior dos cotilédones, provocando, entre outros fenômenos, o desenvolvimento dos precursores do sabor de chocolate, principalmente aminoácidos e açúcares redutores (COHEN *et al.*, 2003). Segundo Quesnel e Lopez (1975), na fermentação do cacau há duas etapas principais: a etapa anaeróbica, na qual as leveduras convertem a etanol os açúcares presentes na casca da polpa que recobre as sementes, com liberação de gás carbônico; e a etapa aeróbica, realizada pelas acetobactérias, com posterior oxidação do etanol a ácido acético, gás carbônico e água. Entre

essas etapas há ainda uma fase láctica, conforme relatado por Beckett (2009) ao descrever os três estágios:

- **Estágio 1 - Leveduras anaeróbicas:** Nas primeiras 24-36 h, as leveduras convertem o açúcar em álcool sob condições de baixo oxigênio e pH abaixo de 4 (bastante ácido). A morte da semente ocorre no segundo dia e é causado por ácido acético e álcool.
- **Estágio 2 – Bactérias lácticas:** Estão presentes desde o início da fermentação, mas só se tornam dominantes entre 48 e 96 h. Convertem açúcares e alguns ácidos orgânicos em ácido láctico.
- **Estágio 3 – Bactérias acéticas:** Também estão presentes durante toda a fermentação, mas tornam-se mais significativas no final, quando há aumento da aeração. São responsáveis pela conversão do álcool em ácido acético, uma reação exotérmica que é a principal responsável pelo aumento da temperatura, podendo atingir 50° C ou mais em algumas fermentações.

Após a fermentação, é necessário que seja realizada a etapa da secagem no processamento das amêndoas para que diminua o teor de umidade a um ponto que iniba a atividade enzimática, garantindo a estabilidade microbiológica. Esta etapa também é precursora para a promoção do sabor e aroma da amêndoa (FERNANDES, 2019).

1.4.3 - Secagem

A escolha certa do tipo de secador de cacau também é um ponto importante para produzir qualidade. O indicado é o uso de secagem natural, ao sol, que pode ser realizada em barcaças ou em estufas próprias para cacau. A secagem realizada com o uso de lenha, além de contaminar os lotes com fumaça, tem custo de instalação e monitoramento elevado, não faz bem para o meio ambiente e nem para a saúde do trabalhador rural. O importante para a escolha do tipo de secagem é o local certo de instalação, que deve ser em áreas planas, abertas, que recebam o sol durante todo o dia e que fiquem longe de casas que utilizem fogão a lenha (FERREIRA, 2017).

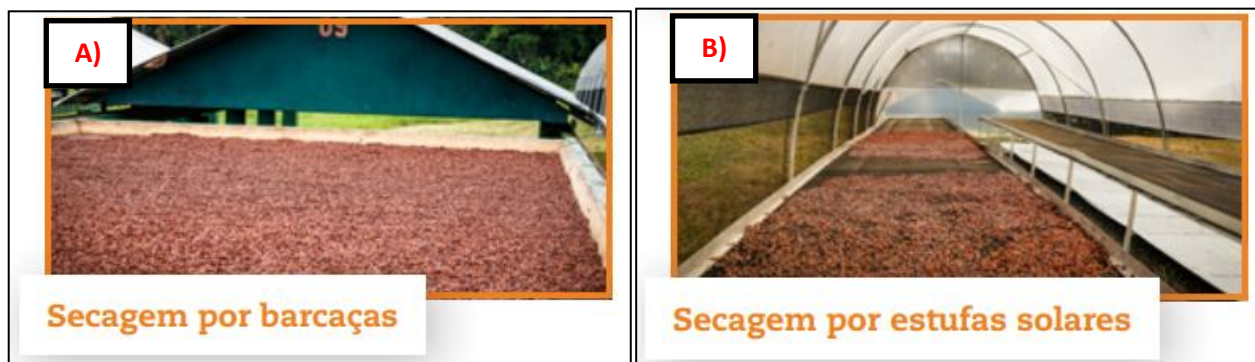
O processo de secagem deve ser iniciado logo após a fermentação, pois muitas das reações bioquímicas continuam durante a etapa da secagem, o que ocasiona a redução da

adstringência, amargor e acidez das amêndoas, assim como a alteração da cor dos cotilédones (IMBERTI, 2017; JESUS, 2015). A temperatura de secagem interfere na qualidade final das amêndoas, sendo que o ideal é entre 35° C e 40° C, pois esta é a faixa em que as enzimas responsáveis por catalisarem as reações químicas tem ação otimizada (JESUS, 2015).

A secagem não deve ser muito rápida, senão os grãos tendem a reter uma quantidade excessiva de ácido acético, o que é prejudicial ao sabor. Se for rápida resulta no endurecimento da casca, impedindo a migração para fora do ácido acético dos grãos, levando a um acúmulo de acidez nos grãos. Por outro lado, um tempo de secagem muito lento resulta em baixa acidez, cor mais pobre e alta presença de bolores. O tempo ótimo para ocorrer o processo de secagem é de 4 a 5 dias, encerrando-se quando 8% de umidade é atingida (JESUS, 2015; KONGOR *et al.*, 2016).

Na secagem natural, realizada em barcaças ou estufas (Figura 10), segundo Efraim *et al.* (2010), citada por Jesus (2015), há maior retenção de polifenóis em comparação com as secagens realizadas artificialmente com secadores existentes nas fazendas que os possuem, pelo fato das secagens artificiais ocorrerem em temperaturas mais elevadas.

Figura 10 – A) Secagem por barcaças e B) secagem por estufas solares.



Fonte: FERREIRA, 2017.

1.5 -BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO

No decorrer da fermentação, a proliferação de micro-organismos altera as características físico-químicas que ocasiona a seleção destes, prevalecendo aqueles que melhor se adaptem às condições físico-químicas oferecidas durante o processo. A presença dos micro-organismos na fermentação é acentuada, advindos do ar e do solo, das mãos dos trabalhadores que manipulam o cacau, da superfície dos recipientes usados no transporte das sementes para a fermentação e do chão das caixas de fermentação. Dessa forma, há uma variedade na microbiota ali presente (GARCIA, 2006), que também varia em relação à localidade, condições de fermentação e climáticas, método e tempo de fermentação (SERRA *et al.*, 2016).

As leveduras são os principais micro-organismos que atuam no processo fermentativo do cacau, convertendo os açúcares presentes na polpa do cacau em etanol e produzindo enzimas que degradam a pectina da polpa, favorecendo condições para crescimento de outros micro-organismos. Produzem também compostos voláteis que interferem significativamente no sabor e aroma do chocolate, como aldeídos, cetonas, álcoois, terpenos e ésteres (SERRA *et al.*, 2016). Segundo Bastos (2016), as leveduras são os principais agentes na fermentação das sementes de cacau, utilizando os carboidratos (pectina, sacarose, glicose e frutose) como fonte de carbono e desempenhando importantes funções para o sucesso do processo, através de suas atividades metabólicas.

Conforme mencionado no item 1.4.2, a fase inicial da fermentação é anaeróbica, realizada por leveduras, com produção de álcool etílico; enquanto a segunda é aeróbica, realizada por acetobactérias, com produção e oxidação do ácido acético. Na fase inicial, com a degradação da polpa pela atuação dos micro-organismos, há rompimento das células e liberação de um líquido denominado exsudato que escorre através dos orifícios presentes nos cochos de fermentação. Esta exsudação termina 24 a 36 horas a partir do início da fermentação, havendo elevação da temperatura entre 30° C e 35° C em torno de 48 h (REGES, 2019). Na segunda fase da fermentação, os ácidos formados no primeiro estágio vão permitir uma série de modificações bioquímicas necessárias para o desenvolvimento de precursores do sabor e aroma do chocolate, tais como:

- formação de aminoácidos livres e de peptídeos através da ação das proteases aspárticas e carboxipeptidases sob as proteínas (VOIGT *et al.*, 1993 apud JÚNIOR, 2011);
- formação de açúcares redutores, como a frutose e glicose, através da ação da enzima invertase sob a sacarose, que atingem suas atividades máximas no segundo e terceiro dia de fermentação, especialmente quando ocorre a morte da semente e que reduz com o progresso dessa etapa (BIEHL; VOIGT, 1996; BRITO *et al.*, 2001; HASHIM, 1998 apud JÚNIOR, 2011).

No processo fermentativo do cacau, há dois grupos importantes de bactérias: as do ácido láctico e bactérias do ácido acético. As bactérias lácticas também fermentam os açúcares e utilizam o ácido cítrico da polpa, tendo seu crescimento favorecido pela escassez de oxigênio e ligeiras elevações de pH e temperatura. Em geral, *Lactobacillus spp.* estão presentes no início da fermentação, enquanto *Lactococcus spp.* aparecem nos estágios finais da fermentação. A função principal das bactérias do ácido láctico para a fermentação do cacau é a produção de ácido láctico e ácido cítrico (REIS, 2014).

Entre as mudanças mais importantes que o cacau sofre durante sua fermentação, está a degradação de polifenóis (epicatequina, catequina, procianidina, cianidina e leucocianidina, entre outros), que desempenham um papel ativo na mudança de cor, sabor amargo e adstringente. A redução dos polifenóis ocorre quando encontram polifenoloxidasas e peroxidases (enzimas responsáveis por catalisar a oxidação dos polifenóis) e a formação dos taninos (compostos insolúveis de alto peso molecular, também associados aos sabores adstringentes do cacau). Todas as reações são favorecidas por altas temperaturas e longos tempos de exposição (CALVO, 2021).

1.6 - COMPOSTOS FENÓLICOS NO CACAU

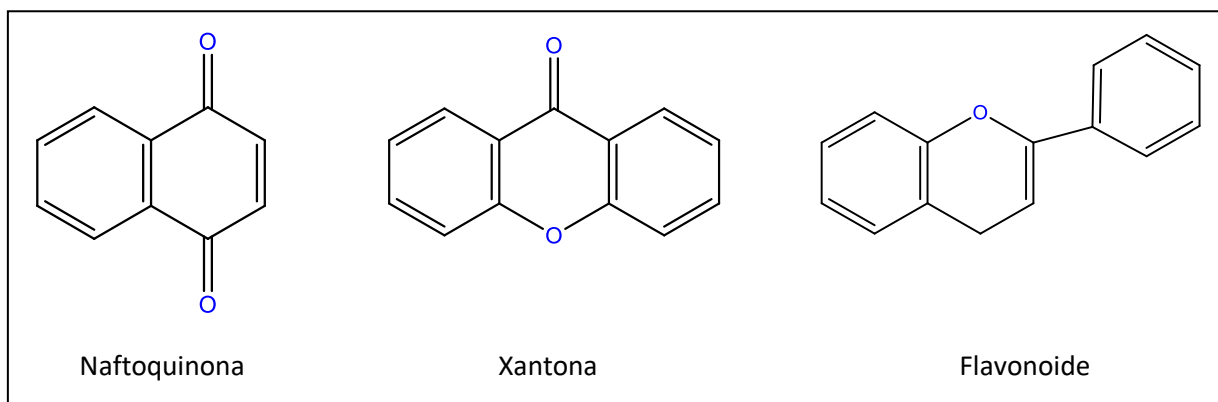
Os alimentos vegetais são fontes importantes de micronutrientes essenciais, como os compostos bioativos. Os compostos bioativos mais comuns em alimentos vegetais são os polifenóis e os carotenóides, que individualmente ou em combinação podem apresentar importantes atividades biológicas que promovem benefícios à saúde. A maioria dos polifenóis é compartimentada principalmente em vacúolos da célula vegetal, especificamente polifenóis como

as antocianinas e outros contidos no tonoplasto ou membranas lipídicas citoplasmáticas, que são encapsuladas pela parede celular vegetal (GONZÁLEZ-AGUILAR *et al.*, 2017).

Os polifenóis são considerados compostos bioativos devido aos seus potenciais benefícios na proteção da saúde humana contra o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. Estes efeitos, relacionados à saúde, têm sido atribuídos, principalmente, aos seus compostos fenólicos e metilxantilas. Espera-se que os polifenóis sejam bioacessíveis e biodisponíveis para absorção e metabolismo no corpo humano após serem liberados durante a ruptura celular (GONÇALVES, 2016; PHAN *et al.*, 2017). Estudos recentes mostram que os polifenóis dietéticos são antioxidantes eficazes e desempenham um papel significativo na prevenção das doenças degenerativas. Consequentemente, estes compostos podem ser considerados parte do futuro na prevenção e terapia na área da medicina (CALVO, 2021).

Em termos de estrutura química, os polifenóis contêm um anel benzênico com pelo menos um grupo hidroxila e podem ser divididos em não flavonóides e flavonóides (Figura 11).

Figura 11 – Estrutura de alguns polifenóis.

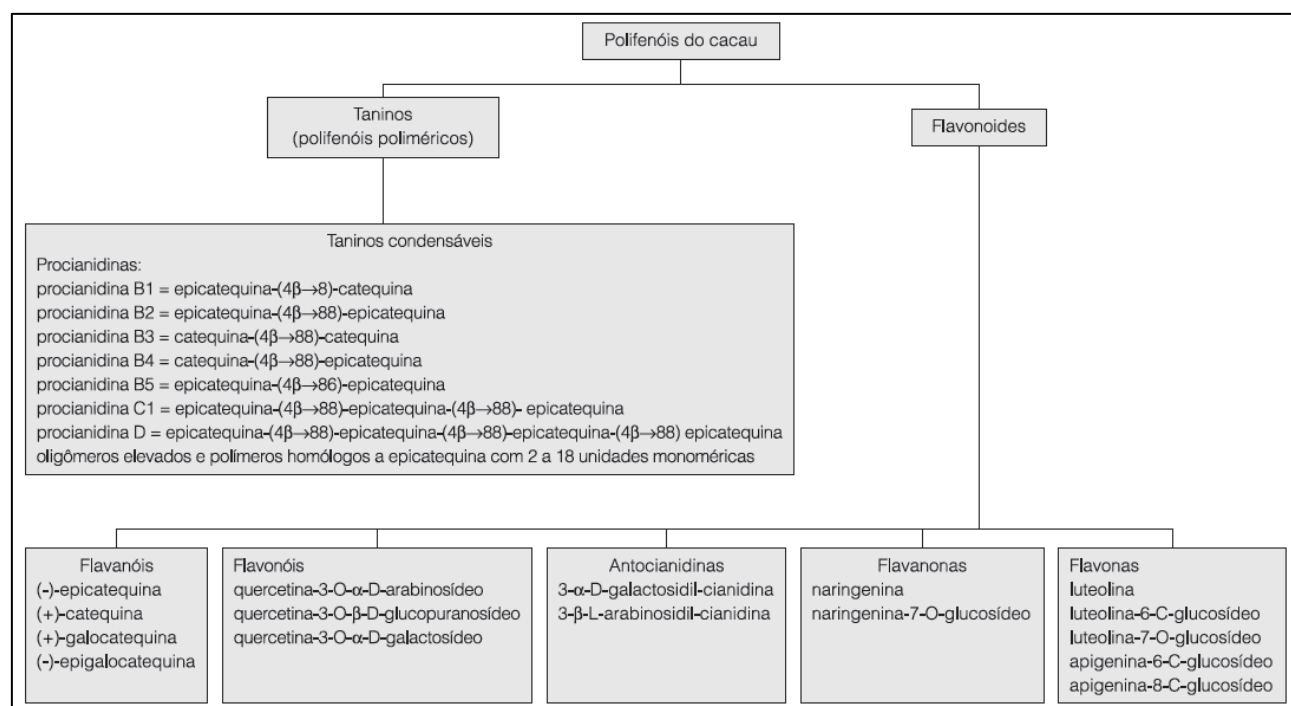


Fonte: adaptado de SARMENTO, 2007.

A abundância de polifenóis (mais de 8000 compostos identificados até o momento) e a diversidade de suas fontes naturais traduzem-se em alta variabilidade estrutural. Em particular, a massa destes compostos varia de menos de 100 Da a mais de 30.000 Da, dependendo do seu grau de polimerização. A semelhança estrutural e complexidade dos polifenóis, que podem ter diferentes polaridades e tamanhos, dificulta o estabelecimento de métodos confiáveis para a

separação efetiva em larga escala destes compostos (LI *et al.*, 2022). Os flavonóides, os ácidos fenólicos, as proantocianidinas e os tocoferóis se destacam como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural, encontrando-se disponíveis nos frutos, vegetais, sementes, flores e em suas cascas, sendo fundamentais para o crescimento das plantas (JÚNIOR, 2011). Nas sementes de cacau, os principais compostos fenólicos encontrados estão dentro da classe dos taninos e dos flavonóides, tais como flavanóis (mais abundante), flavonóis, antocianinas, flavonas e flavanonas (Figura 12). A (+)-catequina e a (-)-epicatequina são os principais representantes dos flavanóis, e esta corresponde a aproximadamente 35% do conteúdo total dos fenólicos. As sementes de cacau também contêm uma série complexa de procianidinas, formadas a partir da condensação de unidades individuais de catequinas ou epicatequinas – os monômeros; por isso são também conhecidas como taninos condensados (EFRAIM *et al.*, 2011).

Figura 12 – Principais polifenóis encontrados nas sementes de cacau.



Fonte: PORTER *et al.* (1991); SANBONGI *et al.* (1998); SANCHEZ-RABANEDA *et al.* (2003); COUNET *et al.* (2006) apud EFRAIM, 2011.

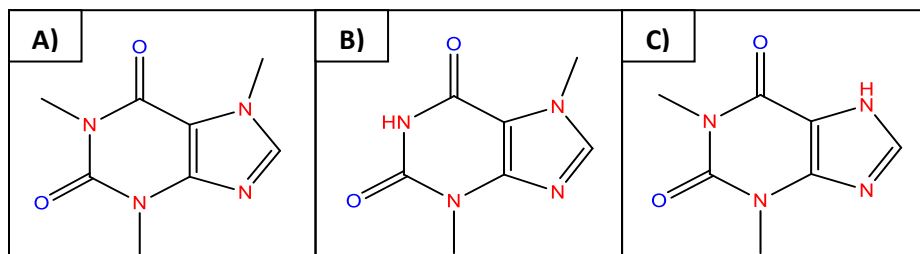
1.7 - METILXANTINAS PRESENTES NO CACAU

As metilxantinas são alcaloides farmacologicamente ativos responsáveis por um sabor amargo de cacau e efeitos fisiológicos desejáveis; por exemplo, estimulação do sistema nervoso central e da secreção gástrica, diurese, broncodilatação e estimulação da musculatura esquelética em altas doses. Também exibem benefícios para a saúde em doenças que envolvem a morte celular no sistema nervoso (QUELAL-VÁSCONEZ *et al.*, 2020). Ocorrem naturalmente em produtos comestíveis, como grãos de café, grãos de cacau ou folhas de chá e, portanto, são muito abundantes na dieta humana (LÖHER *et al.*, 2021).

São substâncias básicas, ou seja, possuem pK_a baixo (correspondente a 0,5), sendo altamente solúveis em lipídeos e, conseqüentemente, facilmente absorvidas pelo estômago e pelas paredes do intestino. No cérebro, competem com a adenosina (neuromodulador pré-sináptico), bloqueando esse receptor e eliminando sua ação inibitória, causando efeito estimulante. A cafeína catalisa o restante da epinefrina e de outras catecolaminas das glândulas adrenais, contribuindo para o efeito estimulante. A teobromina tem efeito estimulador menor em comparação com a cafeína (MCKIM, 1997; NEHLIG *et al.*, 1992 apud CRUZ, 2012).

Quimicamente, apresentam uma estrutura heterocíclica com presença de nitrogênio, sendo que a teofilina e teobromina são isômeros e seu grupo NH é substituído por um grupo N-CH₃ na cafeína (LI *et al.*, 2019). As metilxantinas mais abundantes são a cafeína, a teofilina e a teobromina (Figura 13). A cafeína e a teofilina têm grande aplicação farmacêutica, mas possuem diferentes origens: a cafeína é obtida das fontes vegetais, principalmente do café; a teofilina é encontrada em pequenas quantidades no reino vegetal, sendo obtida principalmente por síntese total (CASTRO, 2009).

Figura 13 – Estruturas químicas das metilxantinas: A) cafeína, B) teobromina e c) teofilina.



Fonte: O autor.

O gosto amargo do cacau é atribuído, em parte, à teobromina e cafeína, que se associam sinergicamente com as dicetopiperazinas, originando tal sabor. A teobromina está localizada nas células de estocagem dos polifenóis e, com a fermentação, os teores de teobromina e cafeína sofrem redução de cerca de 30%, devido principalmente à exsudação para a casca e para o meio externo (BRITO, 2000).

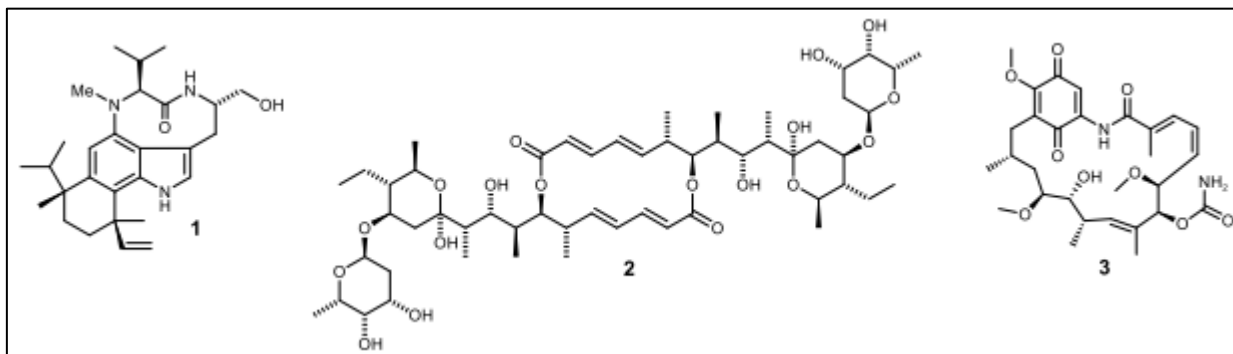
A amêndoa de cacau contém cerca de 2-3% de teobromina, 0,2% de cafeína e traços de teofilina, sem qualquer alteração quantitativa da concentração de ser relatado durante a fermentação e torração (CRUZ, 2012). Segundo Ferreira (2013), a teobromina é a metilxantina predominante no cacau, podendo ser encontrada em outros alimentos, mesmo que em pequenas quantidades, como no guaraná, noz de cola e o chá (*Camilla sinensis*); e a cafeína pode ser encontrada em vários produtos como café, chá e guaraná. As metilxantinas estão entre as substâncias psicoativas mais consumidas no mundo (FERREIRA, 2013).

1.8 – DESREPLICAÇÃO

A desreplicação é uma prática que utiliza instrumentação analítica acoplada, como LC-MS e LC-NMR, associada a bancos de dados não gratuitos, tais como a *Chapman & Hall's Dictionary of Natural Products* ou o *Chemical Abstracts Service's NAPRALERT*. Assim, devido a não gratuidade, muitas vezes o pesquisador é sujeito a criar banco de dados próprio, buscando maneiras alternativas para identificação em misturas complexas (CORRÊA, 2014; DA SILVA *et al.*, 2012).

O termo “desreplicação” (do inglês “dereplication”) foi introduzido inicialmente na literatura científico-acadêmica no início dos anos 90, sendo definido como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos brutos, com o objetivo de estabelecer o grau de ineditismo de substâncias presentes nesses extratos, de maneira a se evitar o re-isolamento e determinação estrutural de uma substância que não seja inédita. O processo foi inicialmente utilizado para a busca de substâncias específicas em meios de crescimento de diferentes linhagens de micro-organismos, tais como a teleocidina (**1**), a elaiofilina (**2**), e a geldanamicina (**3**) (Figura 14) (PARRA, 2016).

Figura 14 – Estruturas das primeiras moléculas isoladas por desreplicação.



Fonte: PARRA, 2016.

As análises de desreplicação estão atualmente bem estabelecidas e continuamente aprimoradas na pesquisa na área de Produtos Naturais devido à sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos brutos, a fim de promover a rápida priorização de extratos e compostos a serem isolados e vincular esses dados aos resultados de bioatividade adquiridos na triagem e/ou dados farmacológicos previamente reportados em banco de dados (LIMA *et al.*, 2022).

Uma análise exploratória pode ser realizada durante o processamento dos dados, através da varredura dos cromatogramas, visando a obtenção de sinais que evidenciem moléculas de alto potencial (VIEIRA, 2015).

1.9 – REDES MOLECULARES

As redes moleculares surgiram como uma ferramenta importante para estudos metabolômicos que permitem a organização e representação de dados de espectrometria de massas (MS/MS). Cada entidade molecular representa um íon e seu espectro de fragmentação associado, e as ligações entre os nós indicam semelhanças entre os espectros. Ao propagar as informações estruturais dentro da rede e facilitar a comparação amostra a amostra, a abordagem da rede molecular oferece informações valiosas sobre o metabolismo de drogas (DARÉ *et al.*, 2021).

Recentemente, surgiram plataformas globais, interativas e online de desreplicação para anotação rápida de metabólitos, bem como a criação de redes, como GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*). Tal rede conta com espectros de massa *tandem* (MS²)

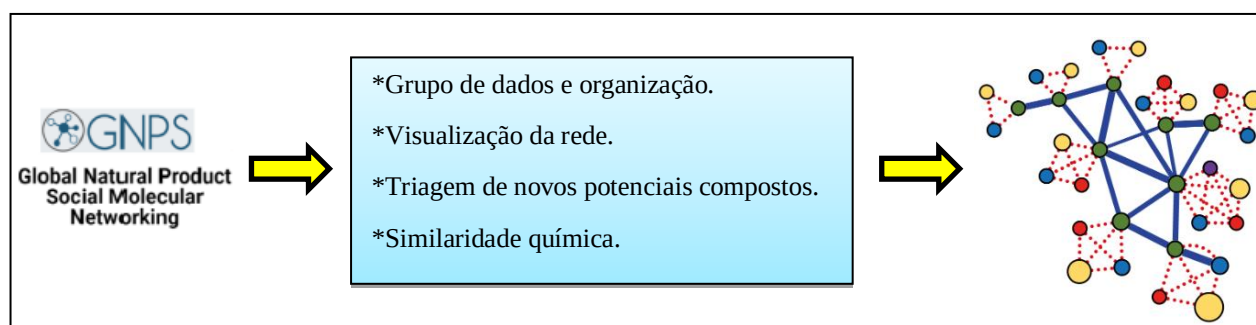
obtidos a partir de espectrômetros de massa de alta resolução que podem ser analisados e agrupados, resultando na criação de redes moleculares e na anotação de moléculas presentes no banco de dados (CALDAS *et al.*, 2022).

Esta plataforma GNPS foi construída na infraestrutura do Centro Computacional de Espectrometria de Massas (*Computational Center for Mass Spectrometry – CCMS*) da Universidade da Califórnia San Diego (UCSD), funcionando como um depósito público para dados de EM, bem como um sistema de reaquisição de dados através do repositório de dados “*Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment*” (massIVE). Dessa forma, a plataforma GNPS permite a desreplicação online, a análise automatizada de redes de interações moleculares e a preservação dos dados de EM/EM (MONTEIRO, 2018).

Para a inserção de dados na plataforma, é necessário converter os dados obtidos (.d) em uma extensão que seja compatível, como o formato .mzXML. Caso o conjunto de dados seja superior a 20 MB, devem ser compactados em softwares como *Filezilla* ou WinSCP, para posteriormente serem carregados na plataforma GNPS. Por fim, a rede molecular gerada pode ser visualizada utilizando o software Cytoscape (VIEIRA, 2020).

Na figura 15 temos um esquema resumido sobre a plataforma GNPS:

Figura 15 – Plataforma GNPS.



Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2022.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivos Gerais

Utilizar técnicas de desreplicação para identificação de bioativos de interesse comercial presentes na fermentação espontânea do cacau, como a cafeína e teobromina.

2.2 – Objetivos Específicos

- Desreplicar a variabilidade metabólica de exsudatos, de alta complexidade molecular e de grande interesse de exploração, provenientes da fermentação natural das sementes de cacau.
- Utilizar técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (MS) e Cromatografia Líquida (LC) para anotação dos compostos de interesse.
- Construir a rede molecular utilizando a plataforma GNPS e posterior exploração dos dados pelo programa Cytoscape.
- Contribuir, a partir dos resultados obtidos, para o melhoramento na produção do chocolate artesanal.

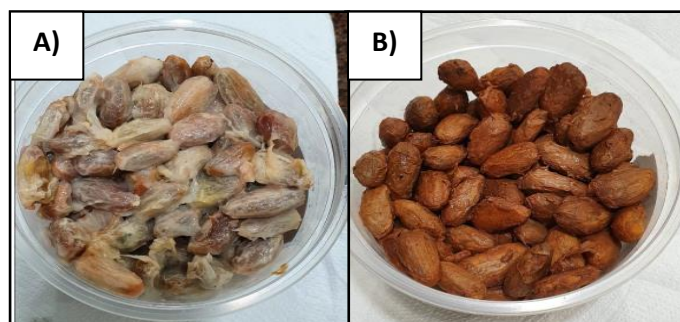
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Fermentação das sementes de cacau

As sementes de cacau, cedidas por uma cooperativa localizada no município de Ji-Paraná (RO), foram submetidas ao processo fermentativo espontâneo.

Provenientes da safra de 2019 (entre os meses de abril e maio), as sementes dos diferentes híbridos de *Theobroma cacao* L. foram mantidas em cochos de fermentação de madeira durante 7 dias (168 horas), onde ocorreu a fermentação espontânea. Para assegurar a representatividade das mudanças metabólicas das fases da fermentação, os pontos amostrais foram estabelecidos em início (0 hora), meio (84 horas) e final (168 horas) do processo (Figura 16).

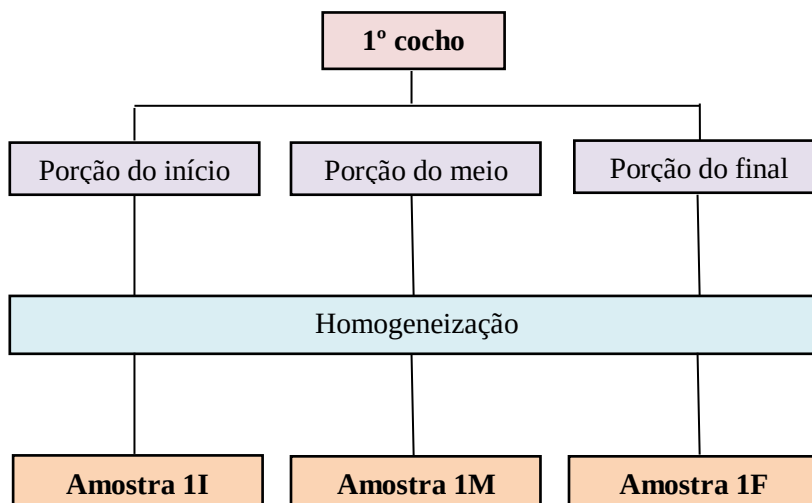
Figura 16 – Sementes de cacau no início (A) e no final da fermentação (B).



Fonte: Rafael Vieira.

Com o objetivo de chegar ao total de 42 ensaios provenientes do planejamento experimental (14 de cada ponto – início, meio e final da fermentação), foram homogeneizadas nos cochos 15 porções iguais de cada etapa do processo fermentativo, totalizando 20 gramas de cada etapa, sendo que cada cocho corresponde a uma amostra. Para uma melhor clareza, no Fluxograma 1 tem-se a descrição esquemática do processo realizado:

Fluxograma 1 – Homogeneização e obtenção das amostras.



Fonte: O autor.

O processo se repetiu sucessivamente até o 15º cocho, de tal forma que as amostras dos pontos iguais foram misturadas em três recipientes adequados (um recipiente para cada ponto). A partir daí, obtiveram-se os 42 ensaios. Posteriormente, mantidas em 4° C, foram encaminhadas aos Laboratórios de Química Orgânica do Instituto Federal de Rondônia (IFRO), câmpus Ji-Paraná, para a extração dos metabólitos sintetizados durante a fermentação das sementes.

3.2 – Planejamento Experimental

Em consonância com o trabalho de Doutorado realizado no grupo de pesquisa pelo aluno Rafael Vieira, foi estabelecido o Planejamento de Misturas *Simplex-Lattice* com 3 componentes: etanol, acetato de etila e hexano, realizado em duplicata. Na Tabela 3 há os dados das massas obtidas com as devidas proporções dos solventes utilizados, considerando que a massa de partida foi de 20 gramas:

Tabela 3 – Planejamento de misturas e massas obtidas.

Experimentos	Hexano	Acetato de etila	Etanol	Massa (mg) (0 hora)	Massa (mg) (84 horas)	Massa (mg) (168 horas)
1	1,00	0,00	0,00	17,50	98,55	197,45
2	0,00	1,00	0,00	56,85	152,70	182,71
3	0,00	0,00	1,00	1035,0	149,85	553,81
4	0,33	0,66	0,00	26,21	27,13	86,21
5	0,33	0,00	0,66	849,41	388,11	332,81
6	0,00	0,33	0,66	917,55	318,025	320,75
7	0,66	0,33	0,00	12,75	95,385	193,71
8	0,66	0,00	0,33	636,75	372,325	341,50
9	0,00	0,66	0,33	681,75	288,20	441,15
10	0,33	0,33	0,33	781,25	205,35	336,00
11	0,66	0,16	0,16	283,15	316,18	266,15
12	0,16	0,66	0,16	154,85	172,81	171,85
13	0,16	0,16	0,66	907,95	416,52	458,35
14	0,33	0,33	0,33	952,31	211,95	425,25

Os dados da tabela mostram que, quando temos hexano 100%, as massas obtidas são baixas. É um resultado esperado, pois os metabólitos presentes no cacau são mais polares. Essa é uma observação positiva, pois possibilita a substituição de tal solvente por outro menos poluente, como o heptano, respeitando os princípios da Química Verde: *“A Química Verde defende a ideia de que não devemos utilizar solventes tóxicos ou aqueles que promovem impactos negativos ao ambiente. As indústrias, se não houver alternativa, devem buscar a utilização de solventes de baixo impacto ambiental”* (DIAS, s.d.).

As maiores massas, tanto no ponto 0 hora (1035,0 mg) quanto de 168 horas (553,81 mg), são obtidas quando temos etanol 100%, enquanto no ponto de 84 horas a massa é de 416,52 mg com a proporção de etanol de 0,66. Isso é condizente com a função exercida por este solvente, juntamente com a ação do calor, que penetra na semente e quebra suas paredes celulares, o que provoca alterações bioquímicas dentro da amêndoa (LOPEZ, 1983).

3.3 – Preparo das amostras para Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Todas as amostras obtidas de cada etapa do processo fermentativo espontâneo foram submetidas ao mesmo procedimento de preparo para análises: 20 mg do extrato bruto foram solubilizados em 1,5 mL MeOH:H₂O (95:5, v/v) e levados ao ultrassom por cerca de 2 minutos. A ativação do cartucho C18 ocorreu inserindo-se 1,5 mL de metanol 100% por 3 vezes, seguido do condicionamento do cartucho com a mesma solução utilizada para solubilização do extrato (MeOH:H₂O, 95:5, v/v). Posteriormente, os 20 mg do extrato bruto foram inseridos no cartucho C18 e eluídos com 1,5 mL da solução MeOH:H₂O (95:5, v/v) por três vezes. A amostra recolhida foi acondicionada em concentrador de amostras sob fluxo constante de nitrogênio. Após a secagem, transferiu-se 4 mg do extrato para um microtubo do tipo Eppendorf de 2 mL, solubilizando-os em metanol grau HPLC. O microtubo foi centrifugado a 6000 rpm e filtrado em membrana de nylon 0,22 µm.

As análises de massas foram realizadas por espectrômetro de massas Agilent 6565 Q-TOF (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) equipado com fonte de ionização por electrospray. O software MassHunter® foi usado para aquisição de dados e trabalhos de processamento. A separação cromatográfica se deu pela coluna AgilentZorbax SB-C18 (3,0 × 50 mm) utilizando água, metanol e ácido fórmico (0,1%) como fase móvel, com fluxo de 0,3 mL.min⁻¹ e injeção de 5 µL da amostra. Os dados de massas foram adquiridos através o modo positivo de ionização [(M+H)⁺] sob fonte de eletrospray e analisador TOF-MS, aplicados no modo Auto-MS/MS para fragmentação.

Os parâmetros de operação do analisador TOF-MS foram estabelecidos utilizando os seguintes critérios: voltagem do capilar de 2400 V, voltagem do cone de 65 V, e voltagem do fragmentador de 110 V. A pressão do gás nebulizador utilizada foi de 28 psi, com fluxo de ar seco na taxa de 10 L.min⁻¹, temperatura do gás a 300°C, gás de bainha com fluxo de 10 L.min⁻¹ e temperatura de 350°C, com aquisição de 3 espectros por segundo e resolução de 32000. Os dados foram processados utilizando a base de dados MassHunter® levando em conta a ionização ([M + H]⁺) obtida do TOF-MS. Os espectros foram obtidos utilizando o modo de aquisição de dados independentes (DDA) e convertidos utilizando o software MSConvert (ProteoWizard).

3.4 – Elaboração da rede de interações moleculares

Os dados obtidos foram convertidos do formato *.d* para o formato *.mzXML* através do software ProteoWizard MSConvertGUI (64-bit – versão 3.0.20231) para posterior inserção na plataforma GNPS (gnps.ucsd.edu). Os seguintes parâmetros foram usados: os dados foram filtrados removendo todos os íons do fragmento MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor *m/z*; os espectros foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 principais íons de fragmento na janela de +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância da massa do íon precursor foi ajustada para 0.02 Da e a tolerância do íon fragmento foi de 0.06 Da. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0.7 e mais de 4 picos correspondentes. Além disso, as arestas entre dois nós foram mantidas na rede se e somente se cada um dos nós aparecesse nos 10 principais nós mais semelhantes de cada um. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados contra as bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre espectros de rede e espectros de biblioteca precisavam ter uma pontuação acima de 0.7 e pelo menos 4 picos correspondentes.

Foi gerada a rede molecular e os dados comparados com as bibliotecas disponíveis. O conjunto público do resultado da análise pode ser visualizado no link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=13792fec77d443f89cc6966d98c25a52>. Para a visualização da rede de interações foi utilizado o software Cytoscape 3.9.1.

3.5 – Pré-processamento dos dados

Os dados de espectrometria de massas foram convertidos no formato *.mzML* utilizando o software ProteoWizard MSConvertGUI (64-bit – versão 3.0.20231). Logo em seguida, foram processados pelo software MSIAL (versão 4.10).

Os seguintes parâmetros foram usados: tipos de dados para MS¹ e MS² foram centróide e ionização no modo positivo. A tolerância para acurácia foi de 0.02 Da para MS¹ e 0.06 Da para MS². O tempo de retenção foi de 0 a 15 minutos, com faixa de massa entre 100 e 1000 Da. O número máximo de carga foi 1. A intensidade mínima para detecção foi de 10000 Da. Os

parâmetros de deconvolução para MS^2 foram 0.5 de valor para Sigma e 0 para amplitude da abundância do cut off do MS/MS. O tempo de retenção para identificação foi de 100 minutos, com tolerância de massa para MS^1 de 0.01 Da e 0.05 Da para MS^2 , sendo o *score* de identificação do cut off de 80%. Os adutos selecionados foram $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$. A tolerância do tempo de retenção foi de 0.5 minutos; desvio de massa para o MS^1 de 0.02 Da e seleção da opção de remoção das entradas baseada nas informações do branco.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análise por espectrometria de massas

As análises de massas foram realizadas no Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em equipamento Agilent, através de ionização por electrospray. Para a visualização dos espectros, utilizou-se o software MZmine (versão 2.53).

O MZmine é uma caixa de ferramentas de código aberta para o processamento e visualização de espectrometria de massa com base em dados de perfil molecular, que pode processar, automaticamente, um grande número de espectros de massa de várias maneiras, incluindo detecção de massa, construção de cromatograma, deconvolução, alinhamento e identificação de compostos (ZHOU *et al.*, 2021). É um software utilizado para detecção dos dados espectrais de massas, tendo sua função de detecção de picos dividida basicamente em:

- a) construção do cromatograma, a partir do qual cria-se uma listagem de massas em cada tempo de retenção;
- b) deconvolução dos picos por quatro algoritmos distintos.

O módulo de visualização fica disponível em ambos os casos para posterior otimização dos parâmetros manualmente, caso necessário (PILON *et al.*, 2020).

4.1.1 - A) Exploração dos compostos presentes na fração 3F

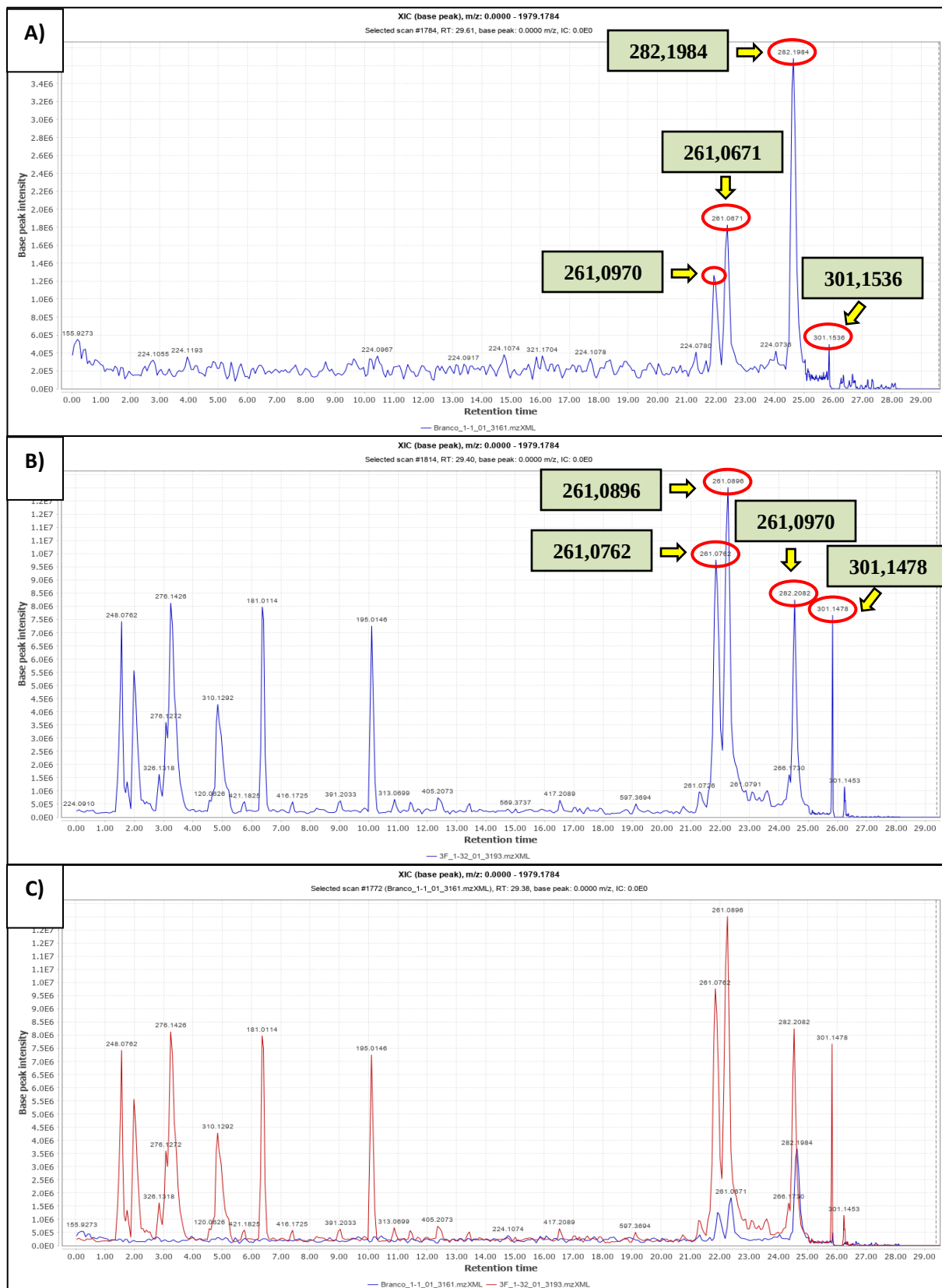
Inicialmente, comparou-se o cromatograma de íons totais do branco com o da fração 3F, observando alguns sinais em comum. Assim, sinais que estivessem presentes no branco não seriam alvos de estudo.

Na Figura 17 temos o cromatograma citado, considerando o tempo de retenção (RT) de 0 a 30 minutos, do branco (a), da fração 3F (b) e a sobreposição dos dois (c):

- Em (a) há presença de quatro principais picos, correspondentes a m/z 261,0970 (RT: 21,93 min), m/z 261,0671 (RT: 22,39 min), m/z 282,1984 (RT: 24,64 min) e m/z 301,1536 (RT: 25,86), respectivamente.

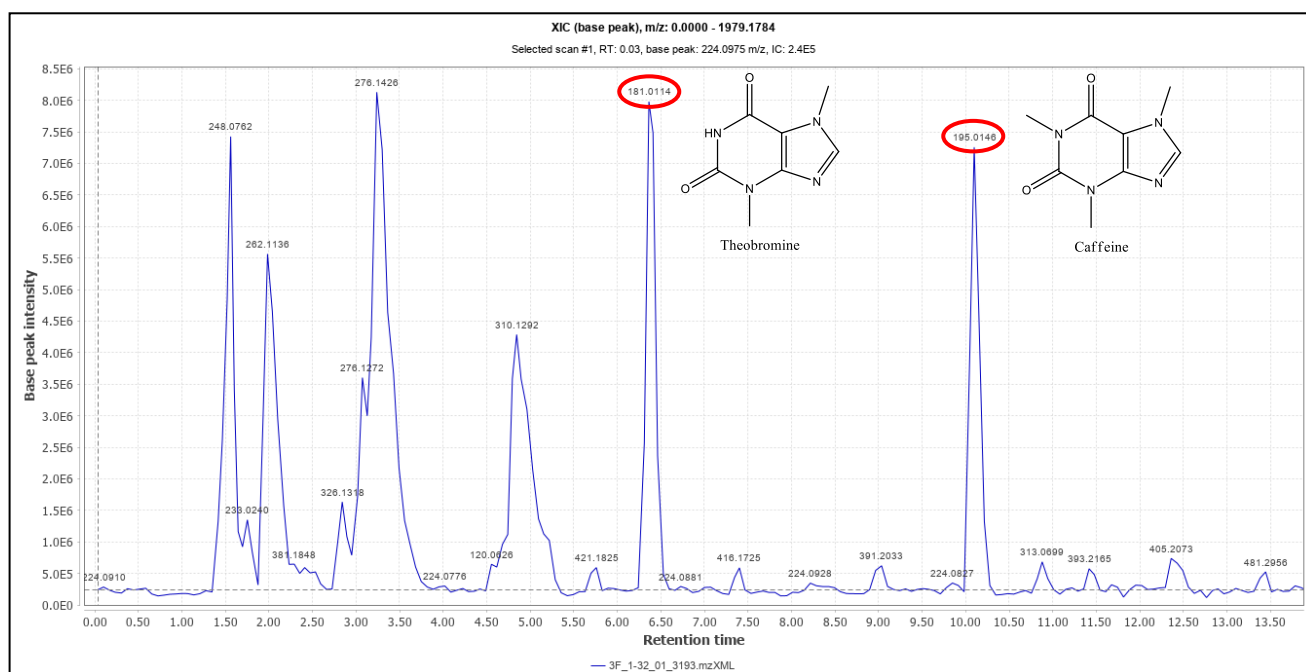
- Em (b) aparecem os picos com valores próximos, que são m/z 261,0762 (RT: 21,85), m/z 261,0896 (RT: 22,26), m/z 282,2082 (RT: 24.54) e m/z 301,1478 (RT: 25,84), respectivamente.
- Em (c) é perceptível a similaridade destes picos (em azul o perfil do branco e, em vermelho, da fração 3F) mais intensos, justificando, a princípio, a decisão em não utilizá-los como foco do trabalho realizado até o momento.

Figura 17 – Cromatograma de íons totais do branco (a) e da fração 3F (b), além da sobreposição dos dois (c), mostrando a similaridade dos picos intensos.



Dessa forma, optou-se por explorar a busca pelos dois principais marcadores do gênero *Theobroma*: cafeína e teobromina. Essas duas substâncias foram identificadas na fração, correspondendo aos valores de m/z igual a 181,0114 para teobromina e m/z igual a 195,0146 para a cafeína, com seus respectivos tempos de retenção: 6,36 e 10,10 minutos. Abaixo (Figura 18) estão destacados os picos correspondentes às duas substâncias, além de suas estruturas.

Figura 18 – Identificação da teobromina e cafeína.



A comprovação da presença dos dois compostos pode ser obtida através das propostas de mecanismos para ambas, com base nos espectros de massas (MS^2). A cafeína e a teobromina, além da teofilina, são os principais alcalóides pertencentes à classe das xantinas (uma base purínica), substâncias que apresentam, em sua constituição, dois anéis aromáticos: um semelhante ao anel benzênico, mas que contém dois átomos de carbono substituídos por dois nitrogênios na posição 1 e 3, denominado anel pirimidínico; e um anel de cinco membros heterocíclico aromático, também com dois átomos de carbono substituídos por dois nitrogênios, denominado anel imidazólico. A diferença estrutural entre a teobromina e a cafeína é que esta apresenta um grupo metil ligado a um nitrogênio do anel pirimidínico.

Tanto a cafeína quanto a teobromina apresentam o mesmo padrão de fragmentação: primeiramente são protonadas (as análises foram feitas em modo positivo) na região básica, estando apenas o par de elétrons do imizadol disponível para reagir (os outros pares estavam sendo utilizados na conjugação da aromaticidade dos anéis) e, depois, por rearranjo de retro-Diels Alder, há formação do íon com relação m/z de 138.

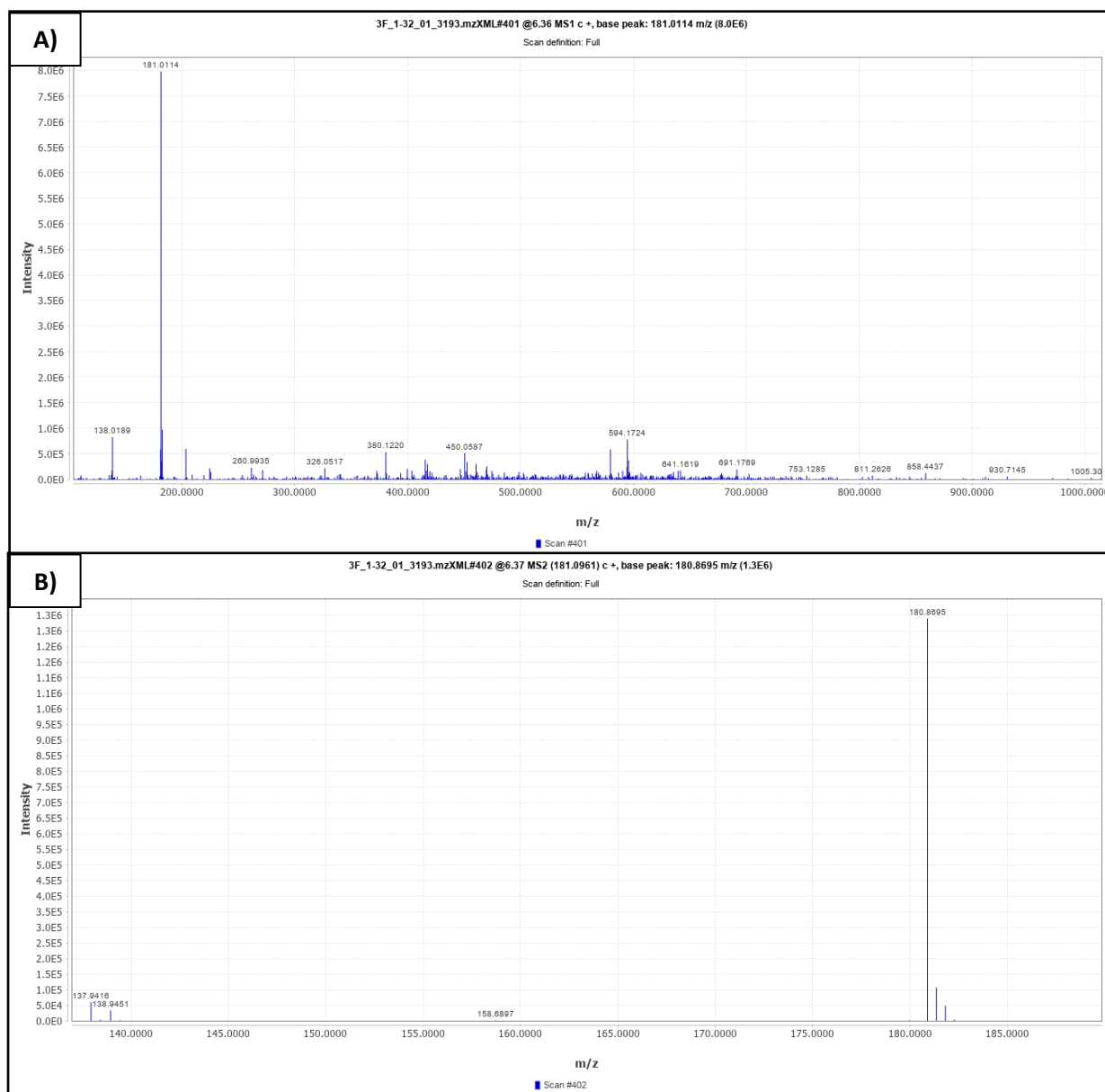
4.1.1 – A1) Teobromina

A teobromina (3,7-dimetilxantina), uma metilxantina natural, pode ser obtida no corpo pelo metabolismo da cafeína ou pela ingestão e absorção de alguns alimentos, como produtos de cacau, apresentando efeitos antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladores e anticancerígenos em cânceres de glioblastoma, melanoma, sarcoma, rim, urotelial, ovário e pulmão (SHOJAEI-ZARGHANI *et al.*, 2020).

Fisicamente é um pó branco cristalino e é produzido principalmente através das cascas das sementes de cacau, tendo baixa solubilidade em água à temperatura ambiente e álcool, sendo mais solúvel em água quente (FERREIRA, 2013).

A Figura 19 apresenta o espectro de MS^1 (a) do pico base 181,0114 da teobromina com a predominância deste e do íon com m/z 138,0189, além do espectro de MS^2 (b) com os picos intensos de m/z 180,8695 e m/z 137,9416.

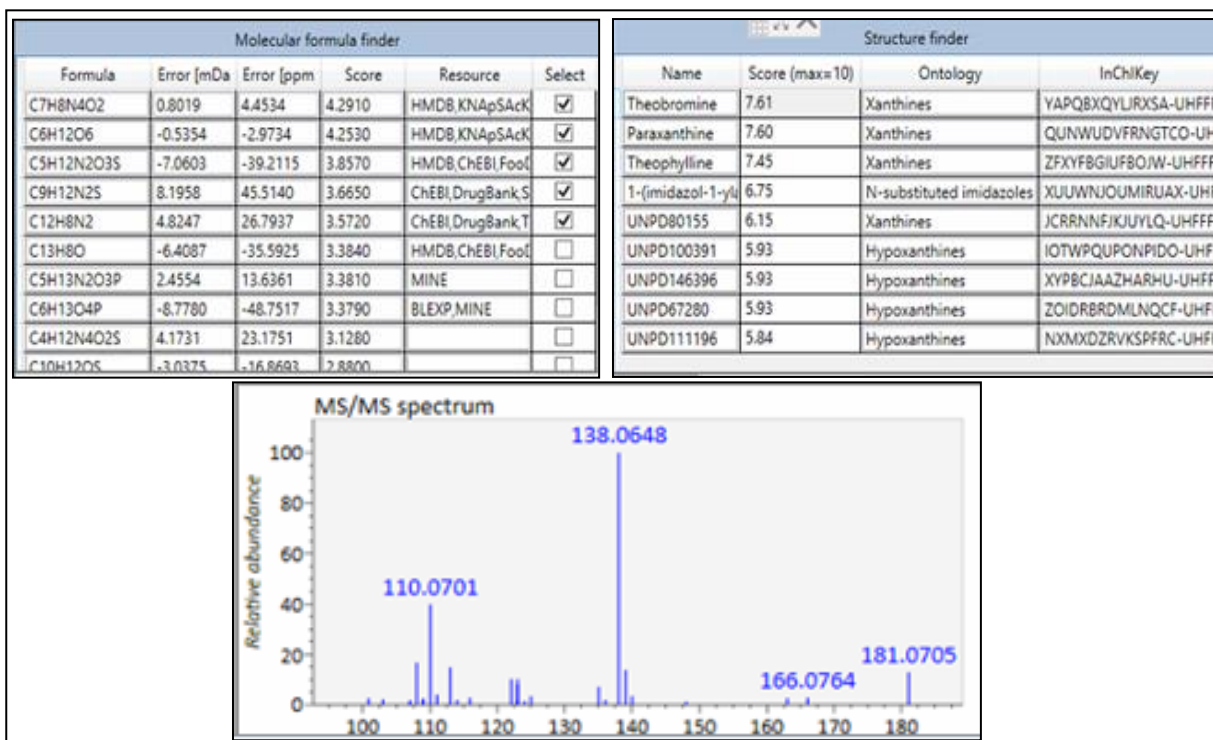
Figura 19 – Espectros de MS¹ (a) e MS² (b) para a teobromina.



A fim de confirmar as informações acima, utilizamos o MSFinder (versão 3.42) para verificar qual a possibilidade do sinal indicado corresponder à teobromina. O pré-processamento dos dados se deu através do software MSDIAL (versão 4.10). O MSFinder é um software para obtenção de espectros MS e MS/MS de compostos desconhecidos, integrando estruturas e fórmulas para esses compostos hipotéticos (VANIYA *et al.*, 2016; LAI *et al.*, 2018).

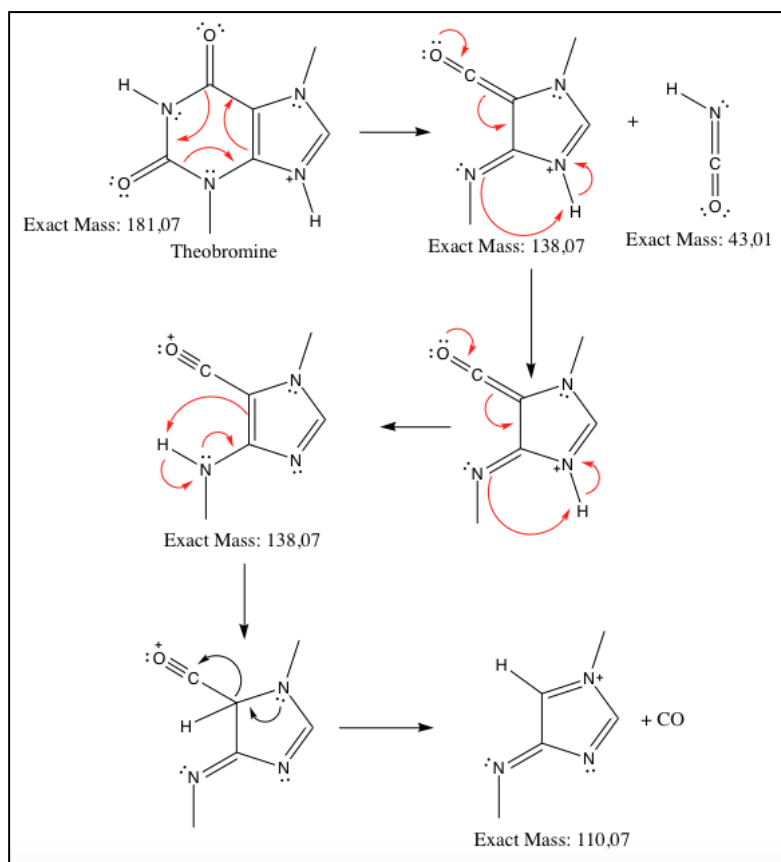
Conforme consta na Figura 20, em um *score* de 0 até 10, o valor obtido foi de 7,61, que é bem significativo para ser o composto analisado, dentre todas as substâncias elencadas pelo programa. Além disso, também obteve-se o espectro de MS/MS da teobromina.

Figura 20 – Valores apresentados pelo MSFinder para a molécula de teobromina.



Abaixo é apresentada uma proposta de mecanismo de fragmentação para os principais sinais presentes no espectro de massas da teobromina.

Figura 21 – Proposta de mecanismo de fragmentação para os principais sinais encontrados no espectro de massas da teobromina.



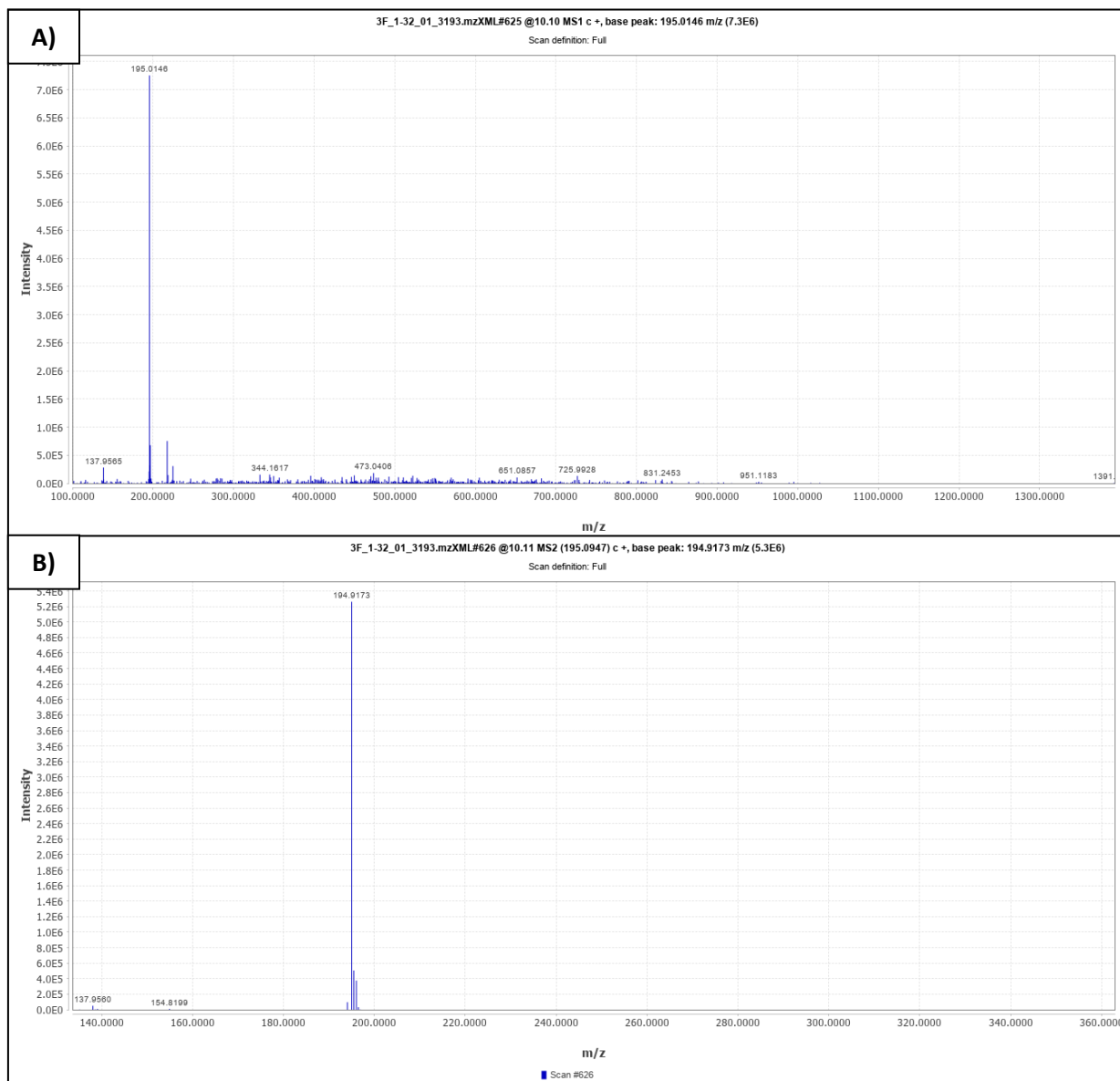
Fonte: adaptado de CHOI *et al.*, 2013; PERIN, 2021.

4.1.1 – A2) Cafeína

A cafeína é um alcaloide de sabor amargo encontrado nas folhas, sementes ou frutos de mais de 63 espécies de plantas no mundo todo e pode ser um estimulante leve do Sistema Nervoso Central (depende da dose consumida), tendo ação vasodilatadora e diurética (BAEK *et al.*, 2022; NUNES, 2010). É metabolizada no fígado em paraxantina (80%), teobromina (11%) e teofilina (4%), podendo melhorar o desempenho de pessoas com privação de sono, reduzir os erros de fadiga para trabalhadores em turno e, no caso dos atletas, melhorar a saúde mental, a resistência e o desempenho da equipe, desde que a dose seja moderada (BAEK *et al.*, 2022). Além disso, é uma substância amplamente utilizada como estimulante na indústria farmacêutica (TEOH *et al.*, 2022).

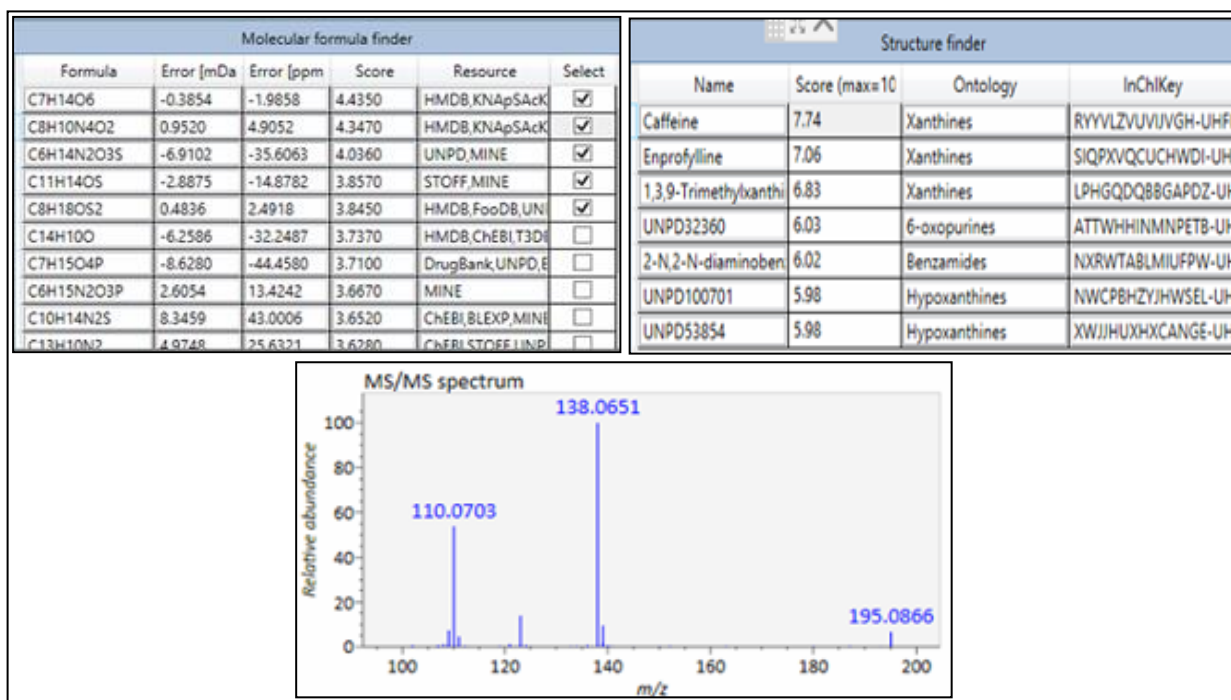
Seguindo o mesmo raciocínio exposto anteriormente para a teobromina, para a cafeína as mesmas análises foram realizadas. Na Figura 22 temos os espectros de MS¹ (a), com picos intensos de m/z 195,0146 e m/z 137,9565, e MS² (b), com sinais mais intensos de m/z 194,9173 e m/z 137,9560.

Figura 22 – Espectros de MS¹ (a) e MS² (b) para a cafeína.



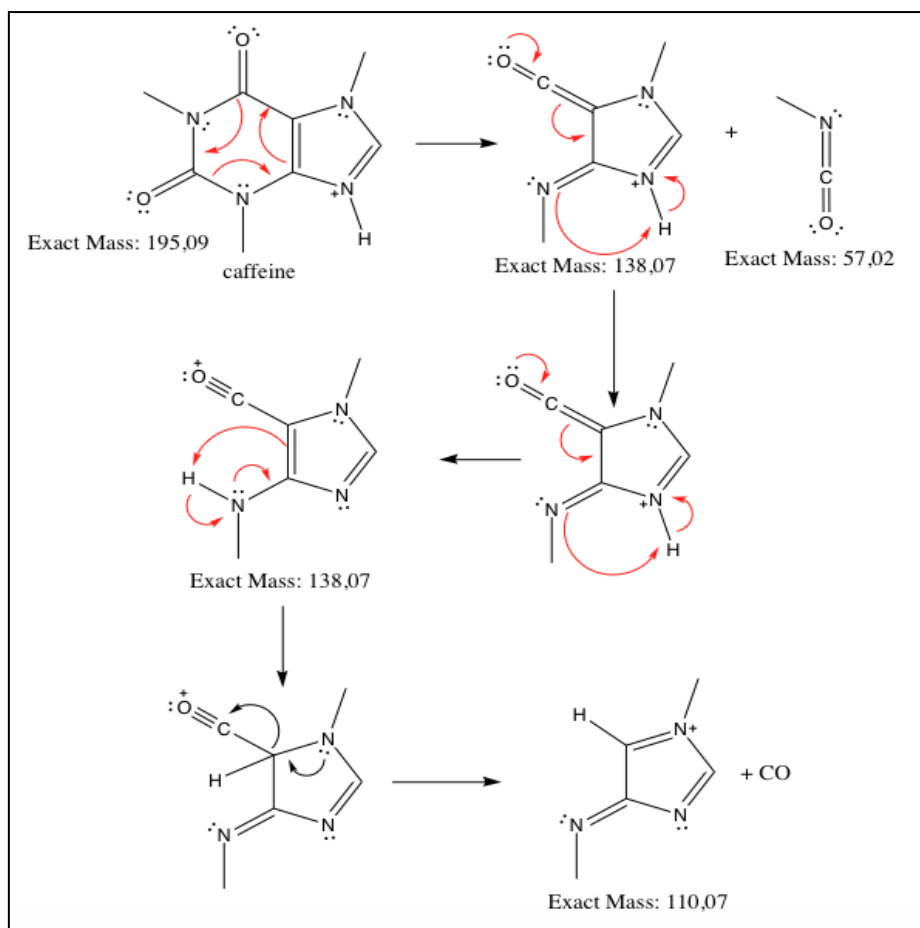
Pelo MSFinder, o *score* para a molécula de cafeína foi de 7,74, que também é bem elevado. Esse valor e outros mais baixos, assim como o espectro de MS/MS, estão contidos na Figura 23.

Figura 23 – Valores apresentados pelo MSFinder para a molécula de cafeína.



A proposta de mecanismo de fragmentação da cafeína é apresentada na Figura 24.

Figura 24 – Proposta de mecanismo de fragmentação para os principais sinais encontrados no espectro de massas da cafeína.



Fonte: adaptado de CHOI *et al.*, 2013; PERIN, 2021.

Descreveu-se até então as moléculas identificadas com base nas informações colhidas a respeito destes dois importantes e essenciais compostos. Na próxima parte, há discussões acerca da rede de interações moleculares e também projeções/apontamentos sobre alguns outros sinais intensos não só na fração 3F, mas também em outras frações do final da fermentação.

4.2 – Rede de interações moleculares

A rede de interações moleculares foi construída considerando os dados de MS/MS das 42 frações, obtendo um total de 2178 nodos e 16 substâncias anotadas com a base de dados do GNPS.

Na figura 25 é possível notar rede molecular considerando apenas as frações 3F, 9F, 13F e 14F, por apresentarem maior quantidade de massa, de acordo com o planejamento experimental, além de outros fatores explicitados no item 4.3. Nota-se pela rede a identificação da classe das metilxantinas, assim como das substâncias procianidina B2 e (epi)catequina, presentes no cacau e relatadas na literatura. A legenda para as respectivas cores dos nodos encontra-se abaixo:

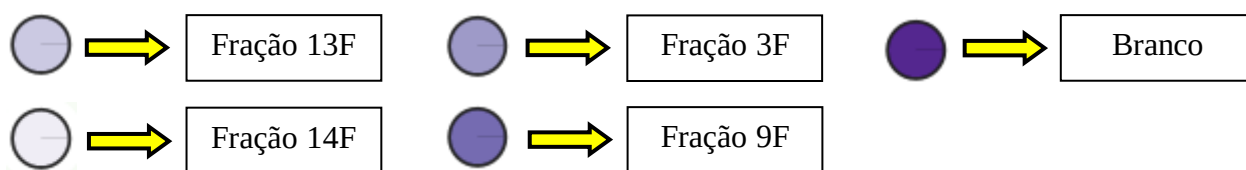
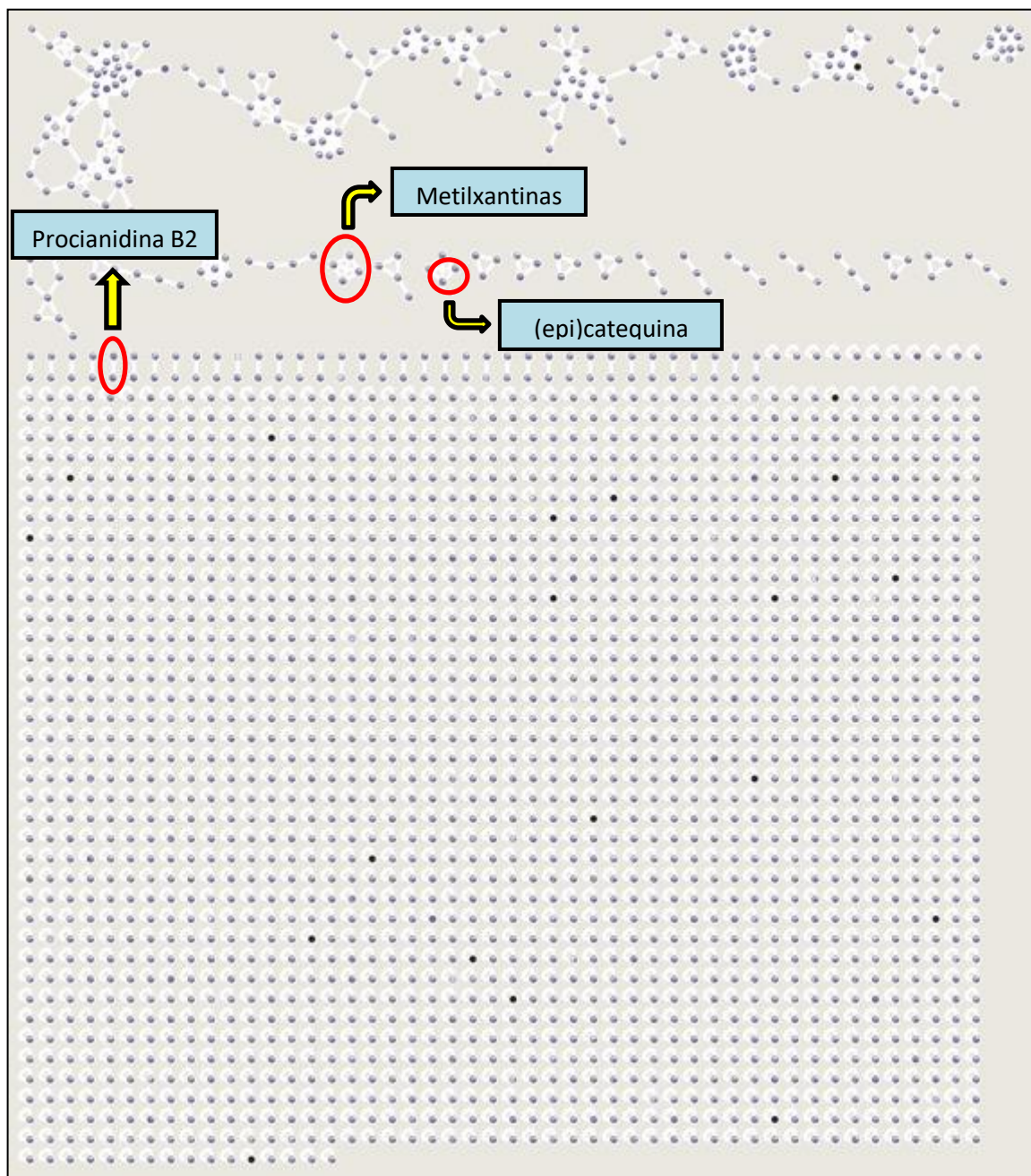


Figura 25 – Rede de interações moleculares obtida pelo GNPS.

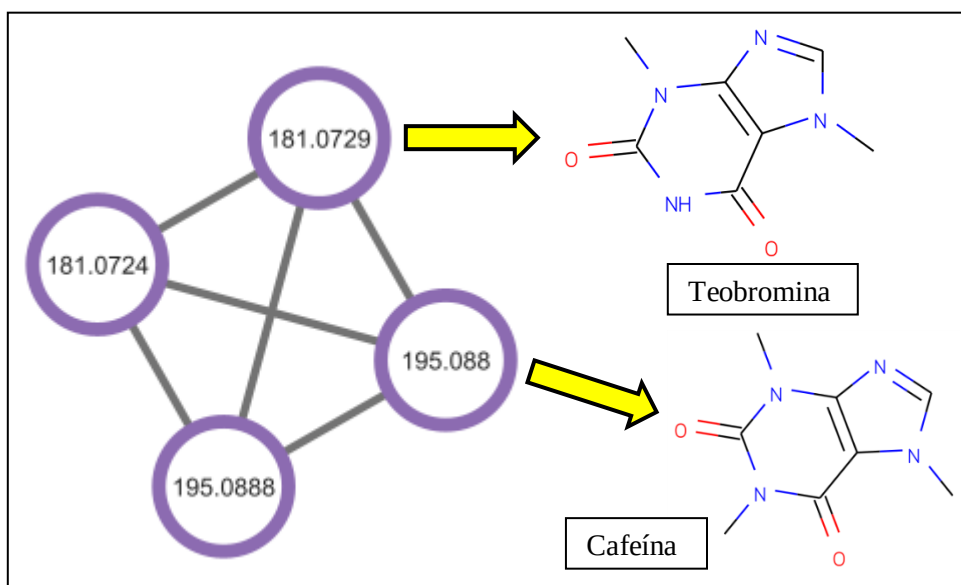


Na imagem da rede de interações acima é possível notar a presença de nodos de cor escura. Isto indica que as substâncias não foram produzidas na etapa final para estes nodos.

➤ Cafeína e teobromina

Para a cafeína e a teobromina o agrupamento foi facilmente identificado, com seus respectivos valores de m/z apontados pelo software. O agrupamento, as massas e as estruturas fornecidas pelo GNPS estão na figura 26.

Figura 26 – Agrupamento e respectivas estruturas da teobromina e cafeína pelo GNPS.



Ambas as substâncias apareceram em todas as amostras (3F, 9F, 13F e 14F). Entretanto, a teobromina é mais presente, sequencialmente, na fração 14F, 9F, 13F e 3F. A cafeína, segundo a rede de interações, aparece com maior presença, em ordem decrescente, na fração 9F, 14F, 13F e 3F. Na figura 27 tem-se os nodos de teobromina e cafeína com os respectivos quantitativos de acordo com as cores das frações:

Figura 27 – Nodos da teobromina e cafeína.



O mecanismo de fragmentação de ambas foi discutido e mostrado anteriormente.

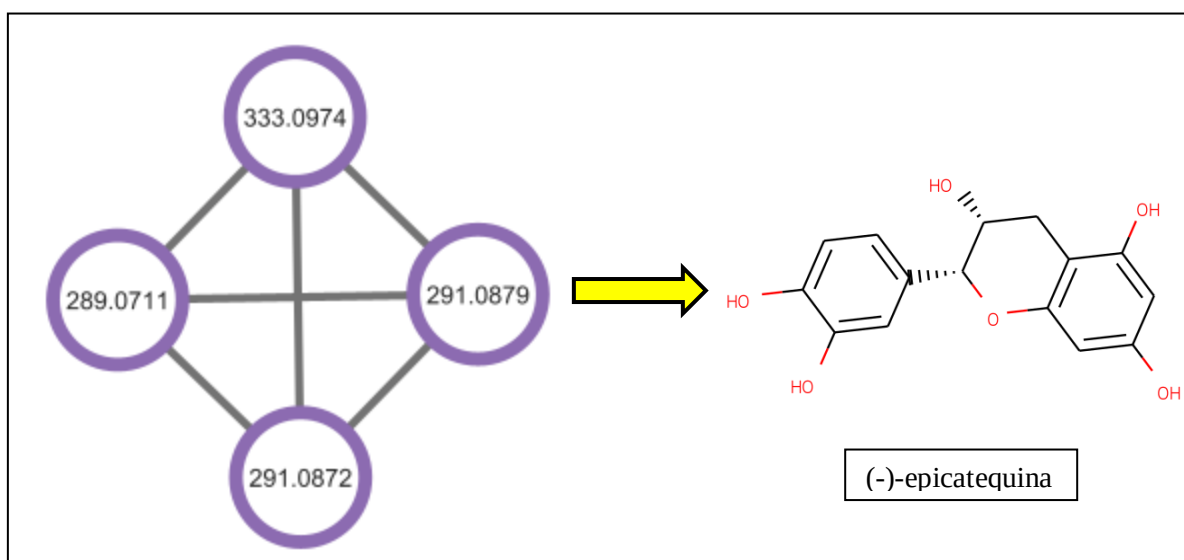
➤ (-)-epicatequina

A epicatequina é um composto fenólico da classe dos flavonóis, atuando com antioxidante e presente em sementes de frutas, como o cacau e a maçã, nas folhas de chás e em certas castanhas e leguminosas (DIAS, 2016). É o principal componente dos flavonóis em extratos de cacau e tem demonstrado bioatividade em seres humanos (HECK, 2014).

As sementes de cacau são uma das principais fontes de polifenóis, especialmente a (-)-epicatequina, um composto que apresenta melhores resultados sobre a saúde vascular, por apresentar maior capacidade de dilatação arterial (OTHMAN *et al.*, 2010; SOTELO C. *et al.*, 2015).

O nodo da (-)-epicatequina apresentou íon precursor de relação m/z de 291.0879. Seu valor de coseno foi de 0,93. Na figura 28 temos sua estrutura, fornecida pelo GNPS:

Figura 28 – Cluster com íon precursor da (-)-epicatequina e sua respectiva estrutura.



➤ Procianidina B2

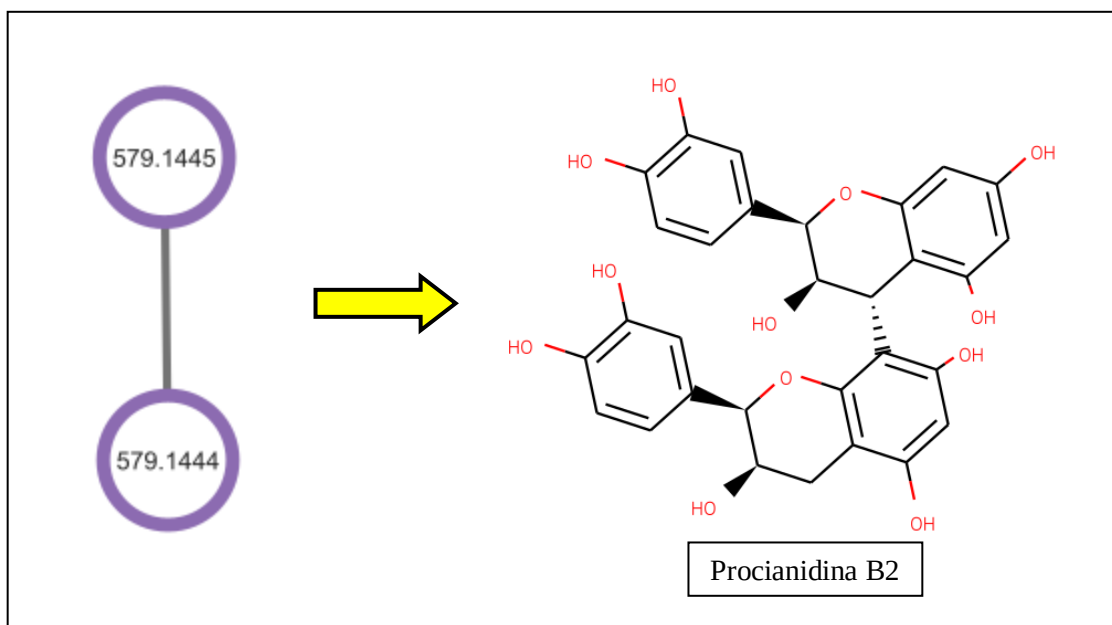
As procianidinas são flavonóides abundantes em uvas, chás, morangos, vinho tinto e produto de cacau, como o chocolate (TIAN *et al.*, 2018). São potentes antioxidantes que possuem outros efeitos benéficos, tais como atividade antibacteriana, antivirais, anticancerígenas, anti-inflamatórias e antialérgica (TREMOCOLDI, 2015). Pertencem à classe das proantocianidinas

e são polímeros constituídos por subunidades de (+)-catequina e (-)-epicatequina (PORTO, 2002).

A procianidina B2, juntamente com a (-)-epicatequina, são os principais compostos biologicamente ativos presentes em produtos de cacau, incluindo chocolate (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2015). É um dímero derivado de duas moléculas de flavan-3-ol(-)-epicatequina e serve como componente bioativo alimentar em razão da sua função e efeito de promoção da saúde, bem como na restauração e manutenção da homeostase (TIAN *et al.*, 2018).

Pelo GNPS foi possível visualizar o cluster da procianidina B2, substância apresentou valor de coseno de 0,89, sendo seu íon precursor o de razão m/z 579.15. Sua estrutura, determinada no banco de dados da plataforma, assim como o cluster da substância, são apresentados na figura 29.

Figura 29 – Cluster e estrutura da procianidina B2.



4.3 - Dados obtidos para substâncias não confirmadas

Nesta seção encontramos perspectivas futuras em relação às informações obtidas para compostos não identificados, a partir das análises das técnicas utilizadas até agora e também da resposta inicial do planejamento de experimentos.

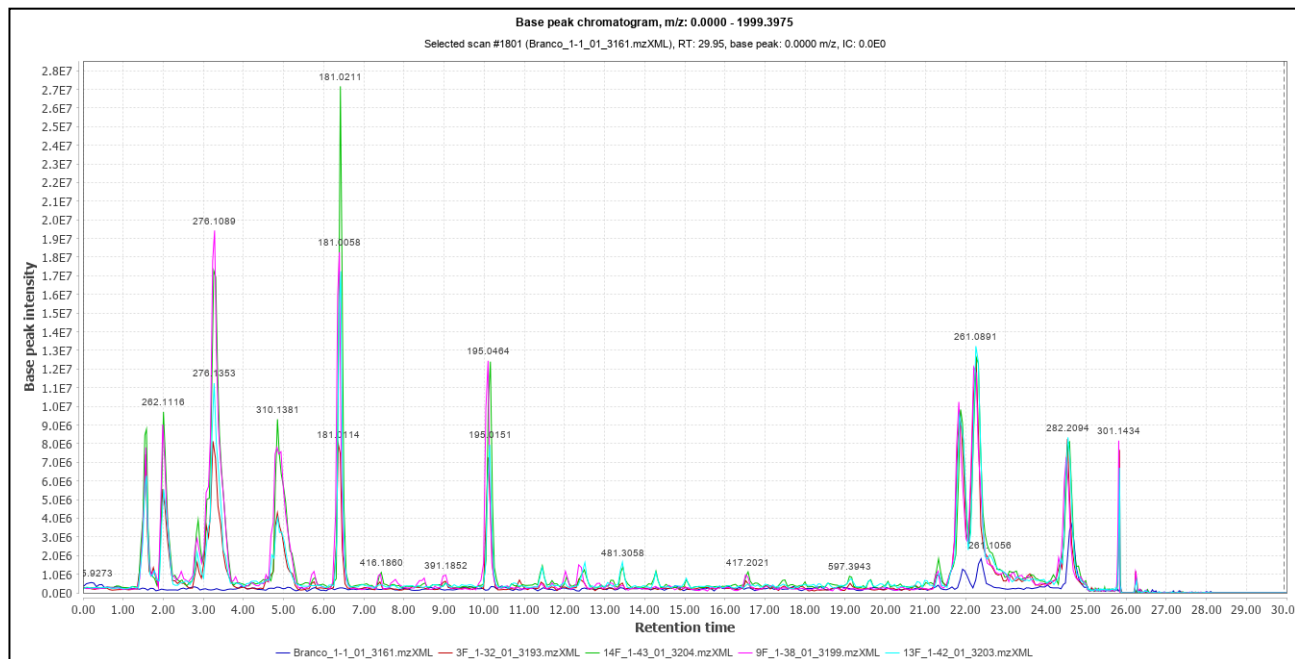
Entretanto, é de extrema importância salientar que o isolamento social causado pela pandemia da COVID-19, assim como comprometimentos na performance instrumental, impactaram a evolução e análise desses dados experimentais.

Com o objetivo de direcionar o estudo para a exploração de sinais intensos na fração 3F que não estejam presentes no branco, alguns deles foram anotados e constam na figura 17 apresentada anteriormente, tais como: m/z 248,0762 (RT: 1.56), m/z 262,1136 (RT: 1.98), m/z 326,1318 (RT: 2.84), m/z 276,1272 (RT: 3.07), m/z 276,1426 (RT: 3.24) e m/z 310,1292 (RT: 4.84). Entretanto, para a obtenção de um trabalho mais robusto e informativo, novas frações do final da fermentação foram consideradas para verificar se há presença destes sinais em seus cromatogramas: 9F, 13F e 14F. A escolha destas três novas amostras, assim como por pertencerem ao final do processo fermentativo, se deu por dois motivos principais:

- a) de acordo com a resposta inicial (massa das frações) do planejamento de experimentos, estas apresentaram valores consideráveis que propicie a realização de futuros ensaios;
- b) no final do processo fermentativo já ocorreram as transformações biológicas e químicas nas amêndoas do cacau.

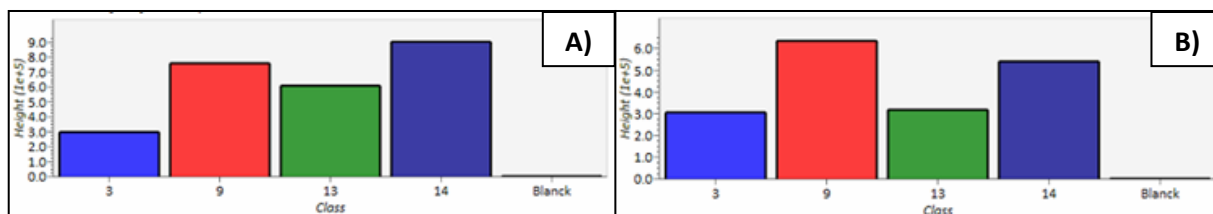
A primeira análise realizada foi a comparação do cromatograma de íons totais considerando o branco e as frações citadas. A sobreposição dos 5 cromatogramas está na Figura 30, no tempo de retenção de 0 a 30 minutos. As cores representam as seguintes frações: azul escuro → branco; vermelho escuro → 3F; rosa → 9F; azul bem claro → 13F; verde claro → 14F.

Figura 30 – Comparação dos cromatogramas de íons totais presentes no branco e nas frações 3F, 9F, 13F e 14F.



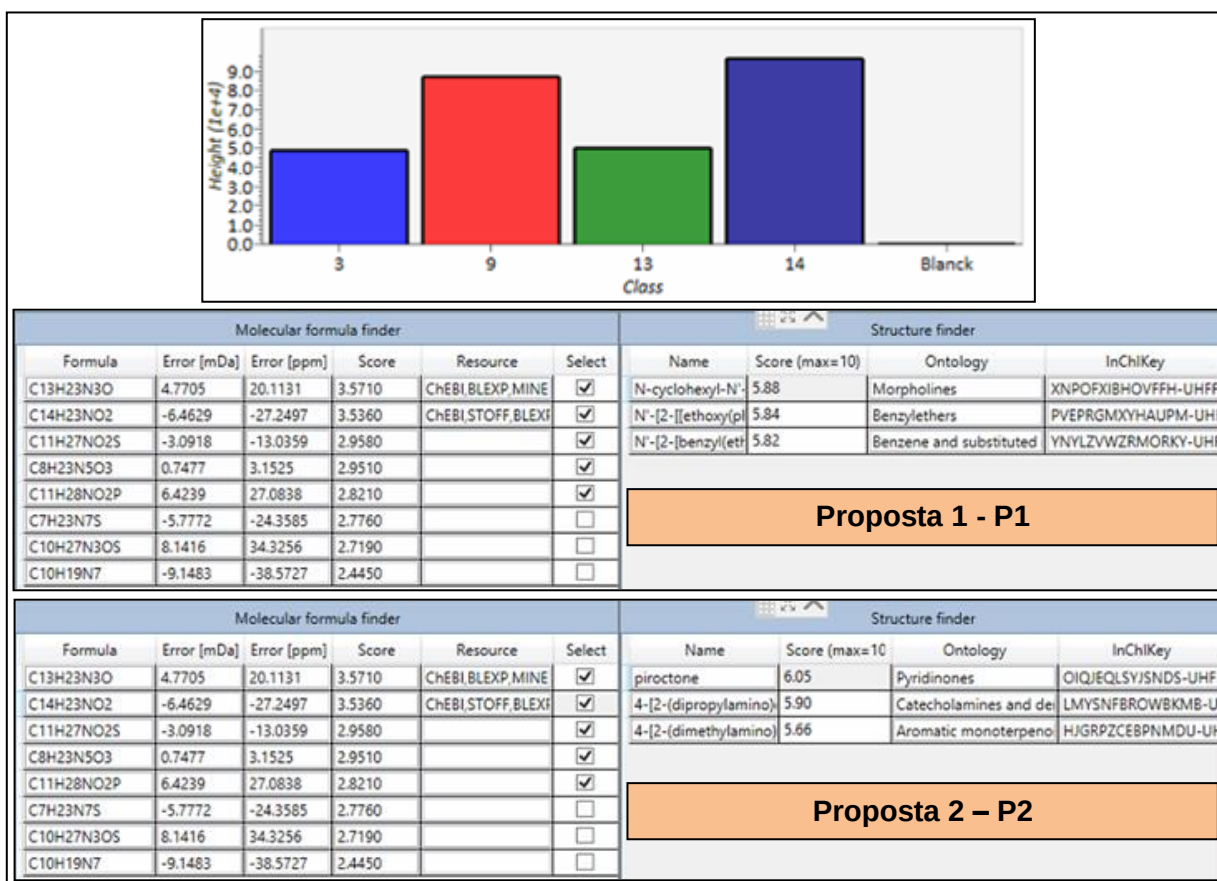
A partir desta figura podemos notar, por exemplo, que a teobromina (m/z 181,0211) aparece com maior intensidade na fração 14F, enquanto a cafeína (m/z 195,0464) está com um valor intenso quase igualitário nas frações 9F e 14F. Porém, ao ampliarmos a figura, vemos que sua presença é um pouco mais acentuada na fração 9F. Essas conclusões podem ser confirmadas ao olharmos os gráficos da Figura 31, que apresentam o resultado dos dados obtidos pelo MSFinder para essas 5 amostras. Em (a) temos o quantitativo de teobromina e em (b) o da cafeína. As cores das barras não se relacionam com as cores dos cromatogramas.

Figura 31 – Quantitativo de teobromina (a) e cafeína (b) nas amostras consideradas.



A segunda parte consistiu no estudo do íon com relação m/z em torno de 276 (276,1089 na 9F, 276,1206 na 14F, 276,1353 na 13F e 276,1426 na 3F), pois estava bastante acentuado. Ao analisar os dados no MSFinder, o íon 276,1426 aparece como um aduto de potássio na molécula, na forma $[M+K]$. Sua intensidade é maior na fração 14F, seguida da 9F, 13F e 3F, conforme a Figura 32, que também contém as tabelas (fornecidas pelo programa) com as respectivas propostas de substâncias, denominadas de **P1** (proposta 1) e **P2** (proposta 2).

Figura 32 – Intensidade do íon 276,1426 nas frações e propostas P1 e P2 sugeridas pelo MSFinder.

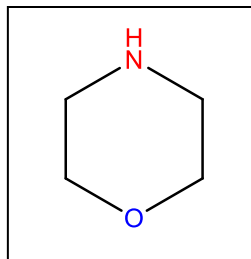


A proposta 2 – P2, por fornecer como possibilidade o composto sintético denominado piroctona olamina, não foi considerada para análise, sendo rejeitada.

✓ PROPOSTA 1

Considerando a proposta número 1, a fórmula molecular do composto seria $C_{13}H_{23}N_3O$, seu nome *N*-ciclohexil-*N'*-(2-(4-morfolinil)etil)carbodiimida e o *score* de possibilidades de 5,88. Tal composto pertenceria à classe das morfolinas, importantes compostos heterocíclicos que possuem propriedades biológicas notáveis, tais como antitumorais, antidepressivas e anti-inflamatórias (ANGAMUTHU; TAI, 2019). São frequentemente exploradas na química medicinal devido às suas propriedades físico-químicas, biológicas e metabólicas vantajosas, bem como às suas rotas sintéticas na maioria das vezes fáceis. As morfolinas apropriadamente substituídas são conhecidas há muito tempo por possuírem vasta aplicação biológica, sendo que a primeira droga comercializada contendo morfolina foi apreludina, introduzida na terapia da obesidade em 1955. Dois anos depois, uma série de análogos da morfolina foi desenvolvida como potentes agentes analgésicos, criando, desde então, um número significativo de medicamentos no mercado contendo tal composto (KOUROUNAKIS *et al.*, 2020). As morfolinas possuem, em seu anel hexagonal, um átomo de oxigênio e um de nitrogênio no lugar do átomo de carbono, sendo que estes heteroátomos ocupam posições opostas (Figura 33).

Figura 33 – Estrutura da morfolina.

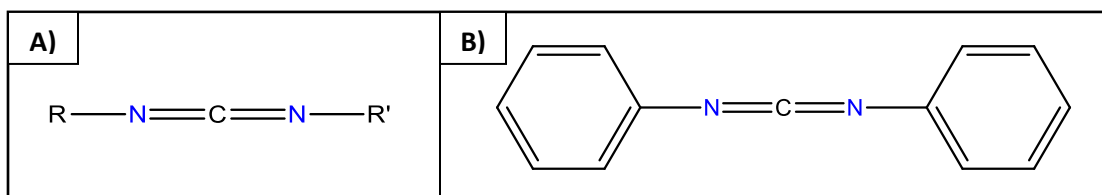


Fonte: o autor.

Em química orgânica, a carbodiimida (nome IUPAC: metanodiimida) é um grupo funcional com a fórmula $R-N=C=N-R'$ (Figura 34-A), com R e R' alifáticos ou aromáticos, comodietilcarbodiimida (Figura 34-B). São importantes compostos e intermediários importantes na síntese orgânica. Geralmente, de acordo com as principais estruturas de ressonância de carbodiimidas, o início da reação das carbodiimidas está intimamente relacionado com três sítios reativos clássicos: átomo de nitrogênio, centro de carbono eletrofílico e ligações duplas $C=N$ insaturadas. Nos últimos tempos, os químicos sintéticos têm focado na utilização de derivados de

carbodiimida para a síntese de compostos heterocíclicos (BAUMINGER e WILCHEK, 1980; LIN *et al.*, 2021).

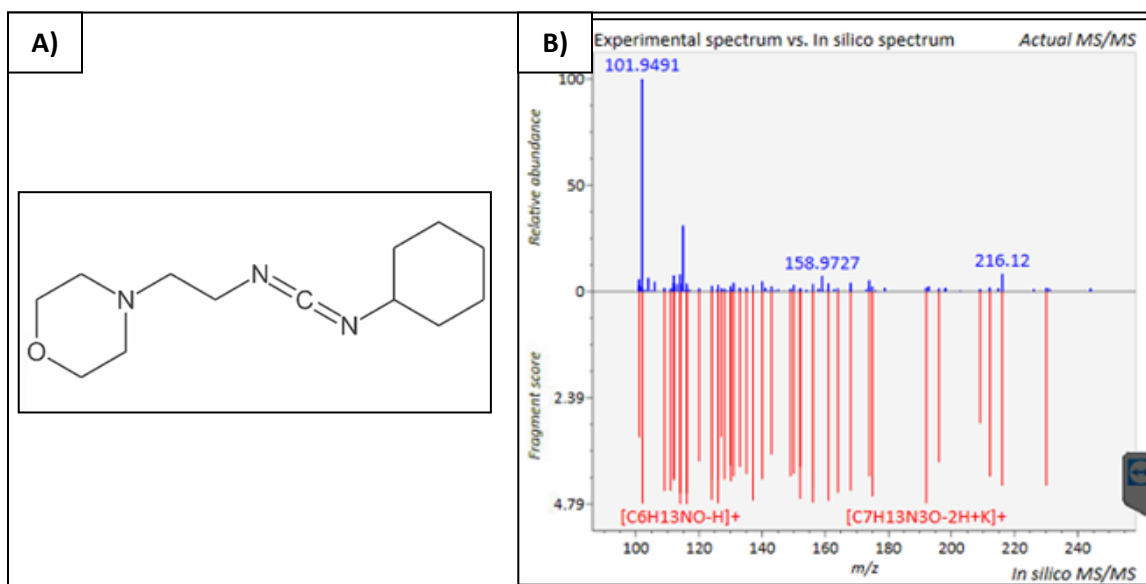
Figura 34–A) Estrutura da carbodiimida e (B) dietilcarbodiimida.



Fonte: O autor.

A estrutura indicada e o espectro MS/MS atual e *in silico* da substância com sua fragmentação são mostrados na Figura 35.

Figura 35 – (A) Estrutura e (B) espectroMS/MS da *N*-ciclohexil-*N'*-(2-(4-morfolinil)etil)carbodiimida, ambos sugeridos pelo MSFinder.

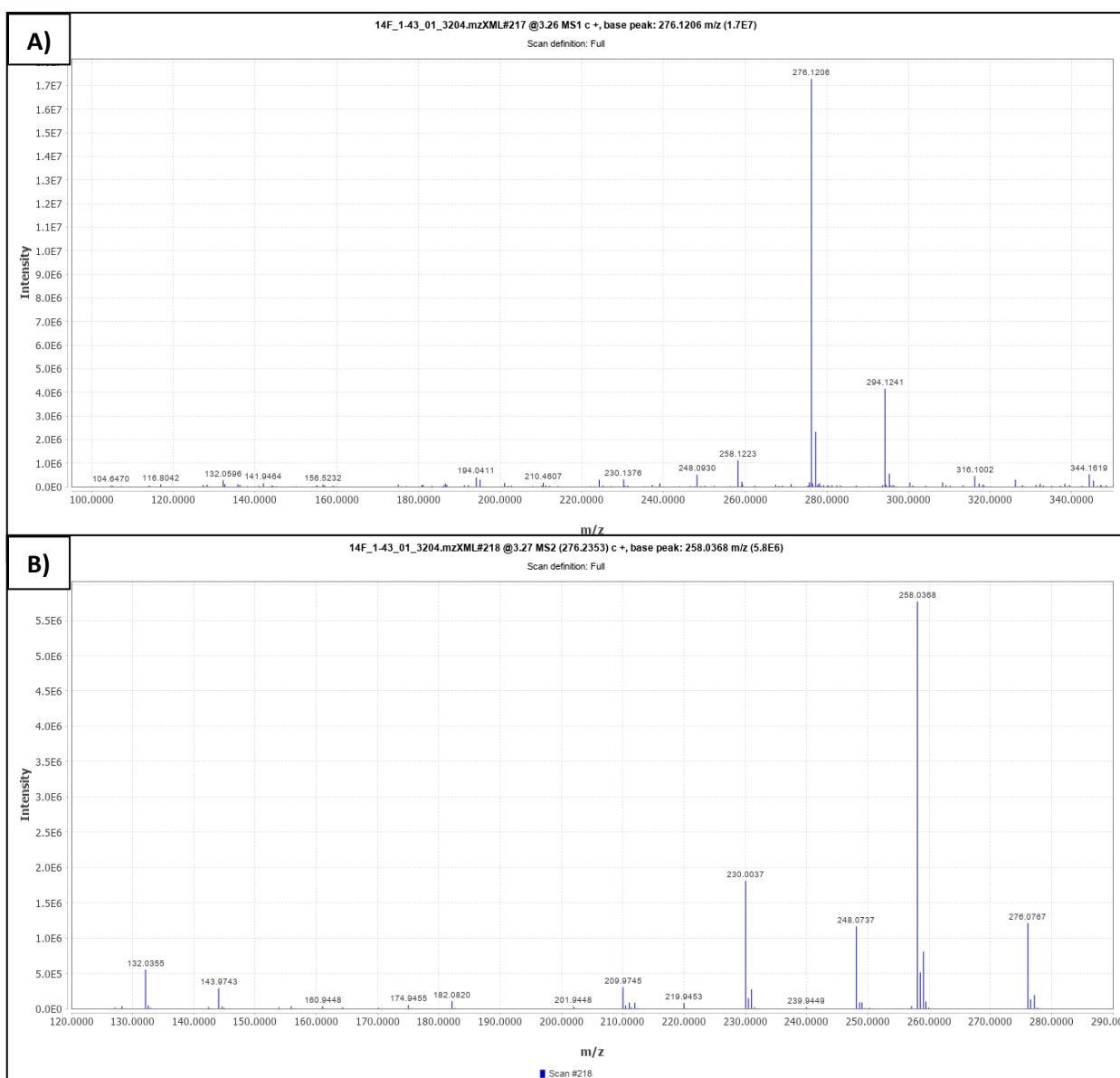


De acordo com o PubChem, que é uma plataforma de banco de dados de moléculas operado e mantido pelo National Center of Biotechnology Information, que faz parte da National

Libray of Medicine, a substância acima citada possui alguns sinônimos em relação ao nome, sendo encontrada principalmente como 1-ciclohexil-3-(2-(4-morfolinil)etil)carbodiimida.

Os espectros de MS¹ e MS² do íon com razão m/z 276,1206 para a fração 14F, onde este se apresentou com maior intensidade, estão na Figura 36. Para o MS¹ (a) foi considerado o intervalo entre m/z 95,0000 e m/z 350,0000, enquanto que para o MS² (b) o intervalo foi de m/z 120,0000 a m/z 290,0000.

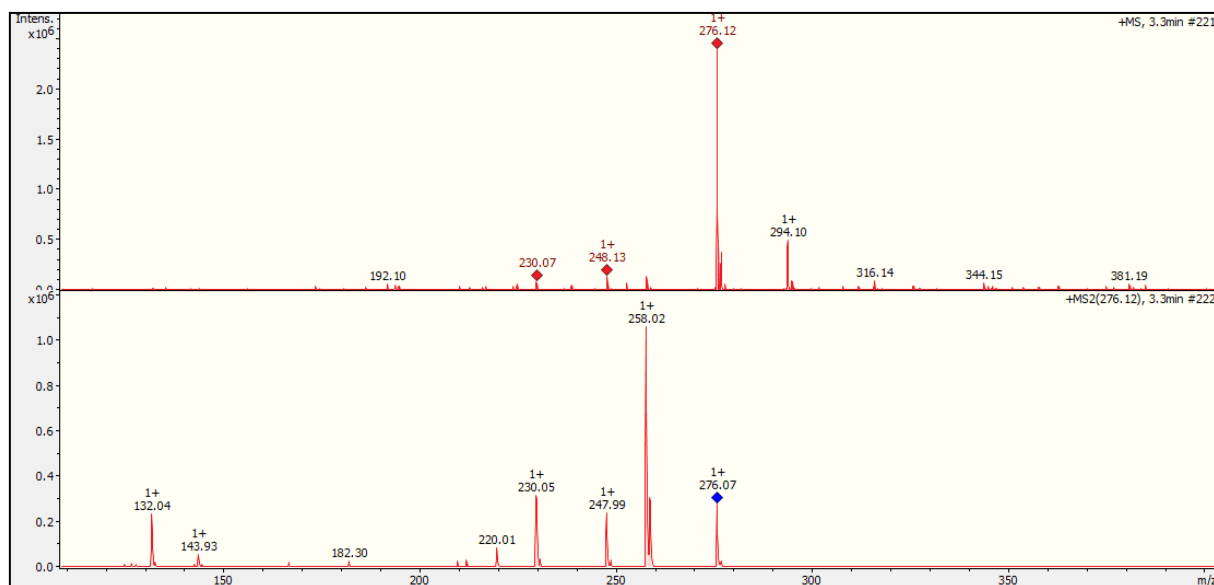
Figura 36 – Espectros de MS¹ (a) e MS² (b) do sinal com m/z 276,1206 presente na fração 14F.



Pelos espectros acima podemos visualizar sinais bem nítidos e que, com um pouco mais de conhecimento e discussão, podem fornecer respostas que confirmem as estruturas estabelecidas pelo MSFinder ou que refutem completamente as propostas. Entretanto, novos experimentos são necessários para que tenhamos dados mais concretos.

Para efeito de informação que possa contribuir para análise futura e justifique sua utilização, a fragmentação do pico também foi obtida pelo software Data Analysis (versão 4.3), mostrando que as fragmentações mantiveram praticamente o mesmo perfil (Figura 37).

Figura 37 – Espectro de MS¹ e MS² obtido pelo software Data Analysis.



Além do pico citado, existem outros que parecem interessantes e promissores. Pelo MSFinder, foram obtidos um total de 44 possíveis moléculas, protonadas [M+H], com sódio [M+Na] ou com potássio [M+K]. Algumas delas possuem cromatogramas semelhantes ao de outras, sendo tal informação fornecida pelo próprio software. Porém, conforme já relatado, para aprofundar os estudos e decidir qual selecionar, é necessário ter resultados de outras análises.

5. CONCLUSÃO

- ✓ O exsudato oriundo da fermentação das sementes de cacau mostrou variedade metabólica, sendo que as diferentes etapas do processo fermentativo interferem diretamente nessa variedade.
- ✓ O planejamento experimental é uma importante etapa do processo e auxilia diretamente no aprimoramento e desenvolvimento da pesquisa.
- ✓ Através das técnicas analíticas utilizadas e da análise dos resultados obtidos foi possível confirmar a presença das duas principais metilxantinas presentes nas sementes de cacau: teobromina e cafeína.
- ✓ A análise da rede de interação molecular possibilitou a identificação de compostos presentes nas amostras e que já foram relatados na literatura.
- ✓ Há presença de outros compostos não identificados neste trabalho, mas que se mostraram promissores. Duas propostas foram estabelecidas, com base em programas usados atualmente e na pesquisa na literatura. Entretanto, outros experimentos são necessários para que se possa aprofundar e ter uma resposta concreta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGAMUTHU, V.; TAI, D.-F. New chiral morpholine-pyrrolidine ligands affecting asymmetric selectivity in copper catalyzed Henry reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 9, p. 653-659, Feb. 2019.

BAEK, G.-H.; YANG, S. W.; YUN, C.-I.; LEE, J.-G.; KIM, Y.-J. Determination of methylxanthine contents and risk characterization for various types of tea in Korea. **Food Control**, v. 132, Feb. 2022.

BASTOS, V. S. **Sucessão microbiana e dinâmica de substratos e metabólitos durante a fermentação espontânea de grãos de cacau (*Theobroma cacao* L.), variedade clonal TSH 565, cultivado no Sul da Bahia**. 132 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

BAUMINGER, S.; WILCHEK, M. The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. **Methods in Enzymology**, v. 70, p. 151-159, 1980.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. UK: Blackwell Publishing Ltd, 2009.

BERGMANN, J. F. The Distribution of Cacao Cultivation in Pre-Columbian America. **Annals of the Association of American Geographers**, v. 59, n. 1, Mar., 1969.

BIEHL, B.; VOIGT, J. Biochemistry of chocolate flavour precursors. In **International cocoa conference**. Salvador, Bahia, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cartilha de boas práticas na lavoura cacaueira no estado do Pará**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. – Belém: Mapa/CEPLAC, 2020. 64 p.

BRASÍLIA. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. **Cacau: produção, manejo e colheita**. Coleção Senar, 215. Brasília: Senar, 2018. 145 p.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobroma cacao* L.); e propostas de**

tratamentos para o melhoramento do sabor. 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2000.

BRITO, E. S.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; GALLÃO, M.; CORTELAZZO, A. L.; FEVEREIRO, P. S.; BRAGA, M. R. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 2, p. 281-288, Jan. 2001.

CALDAS, L. A.; SOARES, D. M. M.; JR, N. M.; STEVANI, C. V.; SARTORELLI, P. Metabolomics of the wild mushroom *Gymnopilus imperialis* (Agaricomycetes, Basidiomycota) by UHPLC-HRMS/MS analysis and molecular network. **Fungal Biology**, v. 126, n. 2, p. 132-138, Feb. 2022.

CALVO, A. M.; BOTINA, B. L.; GARCÍA, M. C.; CARDONA, W. A.; MONTENEGRO, A. C.; CRIOLLO, J. Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. **Nature**, Aug. 2021.

CARRADORE, C. A história do cacau. **Fórum do cacau**, mar. 2019. Disponível em: <<https://forumdocacau.com.br/a-historia-do-cacau/>>. Acesso em: 06 de jan. 2022.

CASTRO, L. S. **Estudo teórico da relação estrutura-atividade de derivados análogos da cafeína contra o câncer epitelial.** Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) – Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2009.

CHOI, E. J.; BAE, S. H.; PARK, J. B.; KWON, M. J.; JANG, S. M.; ZHENG, Y. F.; LEE, Y. S.; LEE, S. J.; BAE, S. H. Simultaneous quantification of caffeine and its three primary metabolites in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2735-2742, Dec. 2013.

COHEN, K. O.; LUCCAS, V.; SOUZA, M. V.; JACKIX, M. N. H. **Processamento tecnológico das amêndoas de cacau e de cupuaçu.** Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará: 2003, 34 p.

CORREIA, W. R. **Prospecção de substâncias bioativas em *Pfaffia townsendii* e *Pfaffia tuberosa* (Gomphreneae, Amaranthaceae).** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2014.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 649-657, 2006.

CRUZ, J. F. M. **Caracterização das sementes de variedade de cacao *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

DARÉ, B. L.; FERRON, P.-J.; COUETTE, A.; RIBAUT, C.; MOREL, I.; GICQUEL, T. *In vivo* and *in vitro* α -amanitin metabolism studies using molecular networking. **Toxicology Letters**, v. 346, p. 1-6, Aug. 2021.

DA SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; DE ALMEIDA, R. A.; DE SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 944-947, 2012.

DIAS, D. L. Química Verde. **Manual da Química**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.manualdaquimica.com/quimica-ambiental/quimica-verde.htm#:~:text=A%20Qu%C3%ADmica%20Verde%20defende%20a,solventes%20de%20baixo%20impacto%20ambiental.>>. Acesso em: 12 de jan. 2022.

DIAS, T. **Desenvolvimento de metodologia enzimático-espectrofotométrica baseada em tirosinase para quantificação de catequina e epicatequina em alimentos**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

DÍAS-VALDERRAMA, J. R.; LEIVA-ESPINOZA, S. T.; AIME, M. C. The history of cacao and its diseases in the Americas. **Phytopathology**, v. 110, n. 10, p. 1604-1619, Oct. 2020.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio de caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 208 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 181-201, jul./set. 2011.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 142-150, maio 2010. Suplemento 1.

FERNANDES, P. S. **NIBS de cacau: características nutricionais e sensoriais, compostos bioativos e desenvolvimento do produto**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

FERREIRA, A. C. R. **Beneficiamento de cacau de qualidade superior**. Editora: PTCSB, Ilhéus, Bahia: 2017, 76p.

FERREIRA, A. S. **Validação da determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, c2022. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity>. Acesso em: 06 de jan. de 2022.

GARCIA, I. P. **Enzimas produzidas durante os diferentes estágios de fermentação das sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann)**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

GONÇALVES, C. G. **Avaliação do impacto da fermentação, secagem e torração sobre o perfil dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de sementes de cacau (*Theobroma cacao* var. Forasteiro) produzidos no Estado do Pará**. 61 f. Dissertação

(Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; BLANCAS-BENÍTEZ, F. J.; SÁYAGO-AYERDI, S. G. Polyphenols associated with dietary fibers in plant food: molecular interactions and biaccessibility. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 84-88, Feb. 2017.

HASHIM, P.; SELAMAT, J.; MUHAMMAD, S. K. S.; ALI, A. Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 78, n. 4, p. 535-542, Dec. 1998.

HECK, M. C. **Efeitos do cacau, flavonóide epicatequina e chocolate, na citotoxicidade, genotoxicidade e radioproteção, sobre o radiofármaco Iodo-131, em células de hepatoma humano HepG2/C3A**. 124 f. Tese (Doutorado em Biologia das Interações Orgânicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, 2014.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola – Lavoura Permanente**, 2021. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ba/pesquisa/15/11863?tipo=ranking&indicador=11897>>. Acesso em: 7 de jan. de 2022.

IMBERTI, R. M. **Estudo da secagem artificial de amêndoas de cacau visando ao aproveitamento na indústria de chocolate: otimização estrutural do processo e eficiência energética**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Energia) – Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2017.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, v. XLVIII, n. 2, May 2022.

JESUS, P. A. **Síntese e análise do processo de secagem artificial de amêndoas de cacau**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Energia) – Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2015.

- JÚNIOR, A. G. A. R. **Comportamento cinético de compostos polifenólicos e enzimas oxidativas na fermentação de cacau da Amazônia**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.
- KONGOR, J. E.; HINNEH, M.; 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.
- KOPUSTINSKIENE, D. M.; SAVICKAS, A.; VETCHÝ, D.; MASTEIKOVA, R.; KASAUSKAS, A.; BERNATONIENE, J. Direct effects of (-)-epicatechin and procyanidin B2 on the respiration of rat heart mitochondria. **BioMed Research International**. Article ID 232836, 7 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/232836>.
- KOUROUNAKIS, A. P.; XANTHOPOULOS, D.; TZARA, A. Morpholine as a privileged structure: A review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, p. 709-752, Mar. 2020.
- LAI, Z.; TSUGAWA, H.; WOHLGEMUTH, G.; MEHTA, S.; MUELLER, M.; ZHENG, Y.; OGIWARA, A.; MEISSEN, J.; SHOWALTER, M.; TAKEUCHI, K.; KIND, T.; BEAL, P.; ARITA, M.; FIEHN, O. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. **Nature Methods**, v. 15, n. 01, p. 53-56, Jan. 2018.
- LEITE, J.; HARDING, S. Trinidad, Brazil, and Ghana: three melting moments in the history of cocoa. **Journal of Rural Studies**, v. 20, n. 1, p. 113-130, Jan. 2004.
- LI, C.; SUN, C.; YANG, Y.; MA, N.; WANG, Y.; ZHANG, F.; PEI, Y. A novel strategy by integrating chemical profiling, molecular networking, chemical isolation, and activity evaluation to target isolation of potential anti-ACE2 candidates in *Forsythiae Fructus*. **Phytomedicine**, v. 96, Feb. 2022.
- LI, H.; ROXO, M.; CHENG, X.; ZHANG, S.; CHENG, H.; WINK, M. Pro-oxidant and lifespan extension effects of caffeine and related methylxanthines in *Caenorhabditis elegans*. **Food Chemistry: X**, v. 1, Mar. 2019.

LI, L.; ZHAO, J.; YANG, T.; SUN, B. High-speed countercurrent chromatography as an efficient technique for large separation of plant polyphenols: A review. **Food Research Internacional**, v. 153, Jan. 2022.

LIMA, N. M.; ANDRADE, T. J. A. S.; SILVA, D. H. S. Dereplication of terpenes and phenolic compounds from *Inga edulis* extracts using HPLC-SPE-TT, RP-HPLC-PDA and NMR spectroscopy. **Natural Product Research**, v. 36, n. 1, p. 488-492, 2022.

LIN, Y. H.; LI, J.C.; QIN, Y.X.; WANG, H.K.; GUPTA, S. Carbodiimide scaffolds: Efficient and versatile reagents in synthesis of heterocycles. **Synthetic Communications**, v. 51, n. 18, p. 2713-2731, 2021.

LÖHER, F.; PALM, W-U.; SCHAFFER, M.; OLSSON, O. Concentrations and sources of methylxanthines in a Northern German river system. **Science of the Total Environment**, v. 775, June 2021.

LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil – strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, p. 73-81, June 2011.

LOPEZ, A.S.F. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. **Revista Theobroma**, v. 13, n. 3, p. 233-248, 1983.

MCKIM, W. A. **Drugs and Behavior**: an introduction to behavioral pharmacology. New York: Prentice Hall, 1997.

MIRAGAIA, 2015. Lojas usam cacau nacional em cenário dominado por chocolate importado. **Folha de São Paulo**, out., 2015. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/saopaulo/2015/10/1697437-lojas-usam-cacau-nacional-em-cenario-dominado-por-chocolate-importado.shtml>>. Acesso em: out, 2022.

MONTEIRO, A. F. **Perfil metabólico das raízes de *Senna spectabilis* e a exploração de fungos associados à sua microbiota para produção e biotransformação de metabólitos secundários**. 191 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

NEHLIG, A.; DAVAL, J. L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Research Review**, v. 17, n. 2, p. 139-170, May-Aug. 1992.

NUNES, L. M. **Café: consumo regular, dependência e consequências para a saúde**. Cadernos Mediáticos. Hábitos alimentares, saúde e bem-estar: abordagens comunicacionais 7, p. 123-134, 2010.

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

OTHMAN, A.; JALIL, A. M. M.; WENG, K. K.; ISMAIL, A.; ABD.GHANI, N.; ADENAN, I. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 7, p. 1052-1059, Feb. 2010.

PARRA, L. L. L. **Uso de desreplicação por HPCL-UV-MS para a descoberta de metabólitos bioativos de invertebrados marinhos**. 107 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

PERIN, M. **Avaliação quantitativa de fármacos, agrotóxicos e metais/metaloídeos, e análise qualitativa de compostos suspeitos no lago Guaíba: uma abordagem especial e temporal**. 292 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

PHAN, A. D. T.; FLANAGAN, B. M.; D'ARCY, B. R.; GIDLEY, M. J. Binding selectivity of dietary polyphenols to different plant cell wall components: Quantification and mechanism. **Food Chemistry**, v. 233, p. 216-227, Oct. 2017.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M. C.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; NETO, F. C.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329-354, 2020.

PIRES, J. L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças**. 342 f.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Departamento de Biologia Geral e Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

PORTER, L. J., MA, Z.; CHANG, G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1657-1663, 1991.

PORTO, P. A. L. S. **Estudo da actividade antioxidante de catequinas e procianidinas oligoméricas**. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal, 2002.

QUELAL-VÁSCONEZ, M. A.; LERMA-GARCÍA, M. J.; PÉREZ-ESTEVE, É.; ARNAU-BONACHERA, A.; BARAT, J. M.; TALENS, P. Changes in methylxanthines and flavanols during cocoa powder processing and their qualification by near-infrared spectroscopy. **LWT – Food Science and Technology**, v. 117, Jan. 2020.

REGES, B. M. **Cacau do semiárido: caracterização, fermentação e produção de chocolate trufado com recheio de frutos regionais**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Ceará, Limoeiro do Norte, 2019.

REIS, L. V. C. **Efeitos da inoculação nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais da fermentação de cacau**. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.

SANCHEZ-RABANEDA, O.; JAUREGUI, I.; CASALS, C. ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobromacacao* L.). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003.

SANTOS, C. C. **Influência dos processos de fermentação e secagem no teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de amêndoas de cacau amazônico (*Theobroma cacao***

var. Forasteiro). 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

SANTOS, E. S. L.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; MORI, G. M.; AHNERT, D.; MELLO, D. L. N.; PIRES, J. L.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Genetic structure and molecular diversity of cacao plants established as local varieties for more than two centuries: the genetic history of cacao plantations in Bahia, Brazil. **PLoS ONE** **10(12): e0145276**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145276>. Dez. 2015.

SARMENTO, L. A. V. **Obtenção e separação de polifenóis de sementes de cacau por extração supercrítica associada a membranas**. 102 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SERRA, J. L.; MOUCHRECK, A. N.; ROGEZ, H.; DARNET, S. Quantificação de leveduras associadas a fermentações de cacau no estado do Pará. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016, Gramado.

SERRA, W. S.; SODRÉ, G. A. Manual do cacaucultor: perguntas e respostas. **Boletim Técnico CEPLAC/CEPEC**, Ilhéus, n. 221, 190 p., 2021.

SHOJAEI-ZARGHANI, S.; RAFRAF, M.; KHOSROUSHAHI, A. Y.; SHEIKH-NAJAFI, S. Effectiveness of theobromine on inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer by suppression of the Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 75, nov. 2020.

SOTELO C., L.; ALVIS B., A.; ARRÁZOLA P., G. Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cascaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 9, n. 1, p. 124-134, jan.-jul. 2015.

SOUSA FILHO, H. R.; de JESUS, R. M.; BEZERRA, M. A.; SANTANA, G. M. & de SANTANA, R. O. (2021) History, dissemination, and field control strategies of cocoa witches' broom. **Plant Pathology**, 70, 1971-1978. <https://doi.org/10.1111/ppa.13457>.

SOUZA, A. S. L. **Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de chocolates amargos**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

TEE, Y. K.; BALASUNDRAM, S. K.; DING, P.; HANIF, A. H. M.; BARIAH, K. Determination of optimum harvest maturity and non-destructive evaluation of pod development and maturity in cacao (*Theobroma cacao* L.) using a multiparametric fluorescence sensor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1700-1708, Mar. 2019.

TEOH, T.-P.; ONG, S.-A.; HO, L.-N.; WONG, Y.-S.; LUTPI, N. A.; OON, Y.-L.; TAN, S.-M.; ONG, Y.-P.; YAP, K.-L. Caffeine-containing wastewater treatment and bioelectricity generation in up-flow constructed wetland-microbial fuel cell: Influence of caffeine concentration, operating conditions, toxicity assessment, and degradation pathway. **Journal of Water Process Engineering**, v. 46, Apr. 2022.

TIAN, H.; SUN, W.; ZHANG, Q.; LI, X.; SANG, Y.; LI, J.; NIU, Y.; DING, H. Procyanidin B2 mitigates behavioral impairment and protects myelin integrity in cuprizone-induced schizophrenia in mice. **The Royal Society of Chemistry Advances**, n. 8, p. 23835-23846, 2018.

TOHI, W. History of cacao. **Natural News**, jul. 2013. Disponível em: <https://www.naturalnews.com/041178_cacao_history_chocolate.html#>. Acesso em: jan. 2022.

TREMOCOLDI, M. A. **Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuerte**. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

VANIYA, A.; SAMRA, S. N.; PALAZOGLU, M.; TSUGAWA, H. Using MS-FINDER for identifying 19 natural products in the CASMI 2016 contest. **Phytochemistry Letters**. 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.008>

VIEIRA, N. C. **Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos**. 196 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2020.

VIEIRA, R. **Exploração racional da rede metabólica de *Xylaria sp.* visando à produção de metabólitos de interesse farmacológico através de ferramentas quimiométricas e técnicas de desreplicação.** Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2015.

VIOTTO, M. H.; SUTIL, B.; ZANETTE, M. C. Legitimidade como uma barreira: análise do processo de legitimação do cacau e chocolate *premium* brasileiros. **Revista de Administração de Empresas – FGV – EAESP**. v. 58, n. 3, p. 267-278, maio-jun. 2018.

VOIGT, J.; BIEHL, B.; HEINRICHS, H. Proteolytic formation of cocoa Ñavour precursors. In: **Progress in Flavour Precursors Studies**, ed. Schreier P. Allured Publ Corp, Wheaton, USA, p. 213-216, 1993.

WORLD COCOA FOUNDATION. **History of cocoa**, ago. 2018. Disponível em: <<https://www.worldcocoafoundation.org/blog/history-of-cocoa/>>. Acesso em: jan. 2022.

ZHOU, J.; LIU, F.-J.; LI, X.-X.; LI, P.; YANG, H.; LIU, Y.-C.; CHEN, Y.-H.; WEI, C.-D.; LI, H.-J. A strategy for rapid discovery of traceable chemical markers in herbal products using MZmine 2 data processing toolbox: A case of Jing Liqueur. **Chinese Herbal Medicines**, v. 13, p. 430-438, July 2021.