



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**MADSON MOREIRA NASCIMENTO**

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METILXANTINAS E  
FLAVONOIDES EM AMOSTRAS DE CHOCOLATES ARTESANAIS COM  
DIFERENTES TEORES DE CACAU**

**ILHÉUS- BAHIA**

**2016**

**MADSON MOREIRA NASCIMENTO**

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METILXANTINAS E  
FLAVONOIDES EM AMOSTRAS DE CHOCOLATES ARTESANAIS COM  
DIFERENTES TEORES DE CACAU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica Aplicada. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de métodos analíticos.

Orientador: Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus

Co-orientador: Prof. Dr. Janclei Pereira Coutinho

**ILHÉUS-BAHIA**

**2016**

N244 Nascimento, Madson Moreira.

Estratégias analíticas para determinação de metilxantinas e flavonoídes em amostras de chocolates artesanais com diferentes teores de cacau / Madson Moreira Nascimento. – Ilhéus, BA: UESC, 2015.

102 f. : il.

Orientador: Raildo Mota de Jesus.

Co-orientador: Janclei Pereira Coutinho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências.

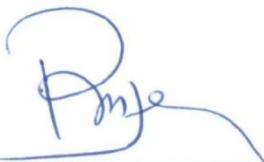
1. Química analítica. 2. Chocolate. 3. Flavonoídes. 4. Planejamento experimental. 5. Cacau – Processamento. I. Título.

CDD 543

**MADSON MOREIRA NASCIMENTO**

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METILXANTINAS  
E FLAVONOIDES EM AMOSTRAS DE CHOCOLATES ARTESANAIS COM  
DIFERENTES TEORES DE CACAU**

Ilhéus, 19/ 02/ 2016.



---

**Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus** – UESC (Orientador)  
Dr. em Química Analítica - UFBA



---

**Prof. Dr. Ivon Pinheiro Lôbo** – UESC  
Dr. em Química Analítica - UFBA



---

**Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy** – UNICAMP  
Dra. em Ciências de Alimentos - UNICAMP

Dedico este trabalho à minha mãe  
Marise Maria Moreira (*in memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de estudos concedida e às demais agências de fomento à pesquisa: CNPq, FAPESB e FINEP pelo apoio financeiro para realização do projeto.

À Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC e ao Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC/CEPLAC, pela infraestrutura disponibilizada.

Ao meu pai Wilson e minha mãe Marise (*in memoriam*) pelo apoio e amor incondicional.

Ao prof. Dr. Raildo Mota de Jesus pela valiosa orientação, amizade, boa vontade e apoio nos diversos momentos da minha vida acadêmica. Reconheço sua grande competência em conduzir os projetos e cumprir com os compromissos e levarei isso como um aprendizado para minha vida profissional e pessoal.

Aos professores Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva, Dr. Daniel de Castro Lima e Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim pela amizade, conhecimentos transmitidos e disponibilidade para discussão de problemas relacionados à Química Analítica, em especial ao prof. Dr. Ivon Pinheiro Lôbo pelos conhecimentos transmitidos na disciplina Química Analítica Avançada e ao prof. Dr. Marcelo Franco pelo empréstimo do rotavapor.

Ao Dr. Janclei Pereira Coutinho pela amizade e a valiosa co-orientação neste trabalho no qual desenvolvi muitas de suas ideias.

À minha noiva Melise pelo grande amor e compreensão e por estar sempre presente nos bons e maus momentos da minha vida.

Aos meus amigos e colegas do PPGQUIM da UESC: Luana, Lucas, Mayara, Pablo, Vinícius Câmara Costa, Thiago Damasceno, Tatiele, José Lucas e Lucas (alunos do Prof. Marcelo Franco) pelo apoio e descontração que sempre me fizeram bem.

À todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise de variância para avaliação de modelos matemáticos. ....	37
Tabela 2 - Relação das amostras de chocolates de diferentes marcas e tipos adquiridas para análise. ....	45
Tabela 3 - Planejamento composto central e as respectivas respostas expressas em resolução e tempo total de análise. ....	54
Tabela 4 - Resumo da análise de variância para as respostas avaliadas. ....	59
Tabela 5 - Coeficiente dos modelos matemáticos com seus respectivos erros-padrão. ....	59
Tabela 6 - Comparação entre os valores teóricos e os valores médios reais (experimentais) com intervalo de confiança ao nível de 95 %. ....	62
Tabela 7- Propriedades físico-químicas de alguns solventes utilizados na extração das metilxantinas. ....	65
Tabela 8 – Dados experimentais do planejamento de misturas centroide-simplex. ....	66
Tabela 9 - Resumo da ANOVA dos modelos avaliados para as respostas Teobromina e Cafeína. ....	68
Tabela 10 – Planejamento de misturas centroide simplex de três componentes para extração da catequina e epicatequina. ....	72
Tabela 11 – Resumo da ANOVA dos modelos avaliados para as respostas Catequina e Epicatequina. ....	73
Tabela 12 – Planejamento composto central para otimização da extração assistida por ultrassom. ....	77
Tabela 13- Parâmetros de validação para o procedimento proposto. ....	79
Tabela 14 - Comparação entre os valores encontrados empregando o procedimento otimizado e os valores certificados. ....	81
Tabela 15 – Valores médios de concentração em $\text{mg g}^{-1}$ para as metilxantinas e flavonoides determinados nas amostras de chocolate com diferentes teores de cacau. ....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular das metilxantinas. ....	26
Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides. ....	28
Figura 3. Estrutura química dos principais flavonoides encontrados no cacau e chocolate. ...	29
Figura 4. Desenho composto central. ....	36
Figura 5. Representações gráficas de um planejamento centroide-simplex para três componentes. ....	43

Figura 6. Gráficos de Pareto de efeitos padronizados das variáveis do planejamento composto central.....	56
Figura 7. Gráficos de valores observados versus preditos e valores preditos versus resíduos para cada uma das respostas avaliadas.....	58
Figura 8. Gráfico de valores de desejabilidade para as respostas analisadas.....	61
Figura 9. Cromatograma mostrando a separação das metilxantinas (cafeína e teobromina) e os polifenóis (catequina e epicatequina).....	62
Figura 10. Gráfico de barras mostrando a eficiência dos solventes na extração da teobromina e cafeína.....	64
Figura 11. A) Estrutura química da cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) e B) estrutura química da teobromina (3,7 – dimetilxantina).....	64
Figura 12. Gráficos de valores observados versus preditos e valores preditos versus resíduos para cada uma das respostas avaliadas.....	67
Figura 13. Curvas de nível referentes ao modelo cúbico especial ajustado para Teobromina e quadrático ajustado para cafeína.....	69
Figura 14. Avaliação da eficiência dos solventes acetato de etila e clorofórmio na extração exaustiva da teobromina e da cafeína.....	70
Figura 15. Gráficos de valores observados versus preditos e valores preditos versus resíduos para extração da catequina e epicatequina.....	74
Figura 16. Curvas de nível referentes ao modelo cúbico especial ajustado para as respostas Catequina e Epicatequina.....	75
Figura 17. Estrutura química da A) (+) - catequina e B) (-) – epicatequina.....	76
Figura 18. Avaliação do rendimento da extração assistida por ultrassom com a diminuição da massa da amostra.....	79
Figura 19. Cromatograma da análise do CRM de chocolate.....	82
Figura 20. Gráfico de pesos PC1 x PC2 com as variáveis teobromina (T), catequina (CT), epicatequina (E), cafeína (CF).....	84
Figura 21. Gráfico de escores PC1 x PC2 das amostras de chocolates artesanais.....	84
Figura 22. Dendograma obtido pelo agrupamento das amostras de chocolates artesanais... ..	86



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $\Delta_m$  – Valor absoluto da diferença entre o valor medido médio e o valor certificado
- AcEt** – Acetato de etila
- ANOVA** – Análise de Variância (do Inglês *Analysis of Variance*)
- C<sub>CRM</sub>** – Valor certificado
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLF** – Clorofórmio
- C<sub>m</sub>** – Valor medido experimentalmente
- DCM** – Diclorometano
- F** – Teste F
- gl** – Grau de liberdade
- ISO** – Organização Internacional para Padronização (do Inglês *International Organization for Standardization*)
- K** – Número de fatores
- Ke** – Fator de expansão
- LD** – Limite de detecção
- LQ** – Limite de quantificação
- MeOH (%)** – Porcentagem inicial de metanol
- MQ** – Média quadrática
- p** – Valor  $p < 0,05$
- p(Faj)** – Valor  $p < 0,05$  para falta de ajuste
- pH** – Potencial hidrogeniônico
- R<sup>2</sup>** - Coeficiente de determinação
- Rs CT-E** – Resolução entre os picos da catequina e epicatequina
- Rs E-CF** – Resolução entre os picos da epicatequina e a cafeína
- Rs T-CT** – Resolução entre os picos da teobromina e da catequina
- RSD** – Desvio padrão relativo (do Inglês *Relative Standard Deviation*)
- SQ** – Soma quadrática
- Ta** – Tempo total de análise
- TG** – Tempo de gradiente
- TR** – Tempo de retenção
- U<sub>A</sub>** – Incerteza expandida
- V** – Vazão da fase móvel
- $\alpha$**  – Parâmetro de rotabilidade

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Objetivo geral .....	18
1.1.2 Objetivos específicos .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 O chocolate .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Aspectos históricos.....	19
2.1.2 Aspectos econômicos do cacau e do chocolate .....	20
2.1.3 Processamento do chocolate .....	21
<b>2.2 Metilxantinas e flavonoides no cacau e chocolate: propriedades químicas e impactos na saúde.....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Metilxantinas.....	25
2.2.2 Flavonoides .....	28
2.2.3 Análise quantitativa de metilxantinas e polifenóis .....	31
<b>2.3 Planejamento de experimentos.....</b>	<b>33</b>
2.3.1 Fundamentação teórica .....	33
2.3.2 Planejamento Composto Central - <i>CCD</i> .....	35
2.3.3 Análise de Variância e otimização simultânea de múltiplas respostas.....	37
2.3.4 Principais técnicas de planejamento de experimentos aplicadas à otimização de separações analíticas.....	40
2.3.5 Desenho estatístico de misturas.....	41
<b>3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Amostragem .....</b>	<b>45</b>

3.1.1 Pré-tratamento das amostras.....	46
<b>3.2 Equipamentos e materiais utilizados .....</b>	<b>46</b>
3.2.1 Reagentes e soluções .....	47
<b>3.3 Otimização da metodologia de separação da teobromina, catequina, epicatequina e cafeína.....</b>	<b>48</b>
3.3.1 Otimização multivariada da separação dos analitos .....	48
<b>3.4 Otimização da extração das metilxantinas .....</b>	<b>49</b>
3.4.1 Estudo da partição com diferentes solventes .....	49
3.4.2 Otimização empregando planejamento de misturas .....	49
3.4.3 Extração exaustiva empregando acetato de etila e clorofórmio.....	50
<b>3.5 Otimização da extração dos flavonoides .....</b>	<b>50</b>
3.5.1 Otimização multivariada da extração assistida por ultrassom .....	50
<b>3.6 Validação do procedimento analítico .....</b>	<b>51</b>
<b>3.7 Determinação das metilxantinas e flavonoides em amostras de chocolates em barra com diferentes teores de cacau .....</b>	<b>52</b>
3.7.1 Determinação da cafeína e da teobromina.....	52
3.7.2 Determinação da catequina e da epicatequina.....	53
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Otimização simultânea da separação da teobromina, catequina, epicatequina e cafeína .....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Determinação das condições desejáveis e obtenção do ponto ótimo .....	60
<b>4.2 Estudo e otimização multivariada da extração de metilxantinas por partição com solvente .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3 Estudo e otimização da extração dos flavonoides assistida por ultrassom.....</b>	<b>71</b>
<b>4.4 Validação do procedimento analítico.....</b>	<b>79</b>
<b>4.5 Aplicação do procedimento analítico em amostras de chocolates artesanais com diferentes teores de cacau .....</b>	<b>82</b>

4.5.1 Avaliação das concentrações de teobromina e cafeína .....	87
4.5.2 Avaliação das concentrações de catequina e epicatequina .....	90
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>94</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

## RESUMO

Os chocolates artesanais vêm atraindo a atenção do consumidor, principalmente devido ao elevado teor de cacau, que o torna uma excelente fonte metilxantinas e compostos antioxidantes, como catequina e epicatequina, contudo, ainda são escassas as pesquisas que busquem investigar as concentrações de metilxantinas e flavonoides em amostras de chocolates artesanais com diferentes teores de cacau. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as concentrações de teobromina, catequina, epicatequina e cafeína em amostras de chocolates artesanais com diferentes teores de cacau empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Visando otimizar o procedimento de separação dos analitos, foi aplicado um planejamento composto central com três variáveis: porcentagem inicial de metanol na fase móvel, tempo de gradiente e vazão da fase móvel. Os modelos gerados foram submetidos à análise de variância ANOVA ( $p < 0,05$ ) não apresentando evidência de significância de falta de ajuste. Para predição do ponto ótimo foi utilizada a metodologia de otimização de respostas múltiplas que emprega a função de desejabilidade. As melhores condições obtidas foram: porcentagem inicial de metanol em 0 % (iniciando com 100 % de solução de ácido acético 0,1 % v/v), mudando para 100 % de metanol no tempo de gradiente de 9,85 minutos, com vazão da fase móvel de  $0,74 \text{ mL min}^{-1}$ . Estas condições levaram a completa separação dos picos, com valores de resolução de 1,3 para os pares teobromina e catequina, 1,8 para catequina e epicatequina e 1,3 para epicatequina e cafeína. Para otimização do procedimento de extração das metilxantinas foi empregado o planejamento de misturas centroide-simplex com três solventes: acetato de etila, clorofórmio e diclorometano. Os resultados mostraram que os maiores percentuais de extração foram obtidos com os solventes puros. Uma extração exaustiva utilizando acetato de etila e clorofórmio foi realizada e os melhores rendimentos foram obtidos com o uso do acetato de etila. O planejamento de misturas em conjunto com o planejamento composto central também foi utilizado para otimização da extração dos flavonoides assistida por ultrassom. Como resultado, foi observado que a extração máxima da catequina e da epicatequina foi alcançada com uso de uma mistura de solventes na proporção de 1:1 (v/v) de água e acetona, com um tempo de extração no banho ultrassônico de 4 minutos e 54 segundos, temperatura de  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  e 50 % da potência máxima. O procedimento analítico foi validado considerando as seguintes figuras de mérito: linearidade das curvas analíticas, limites de detecção e de quantificação, repetibilidade e precisão intermediária. A exatidão do método foi avaliada através do Material de Referência Certificado de chocolate (Chocolate Banking NIST 2384), não sendo observadas diferenças significativas entre os valores medidos e os valores certificados. O procedimento otimizado foi empregado na determinação de teobromina, catequina, epicatequina e cafeína em 22 amostras de chocolates artesanais com teores variados de cacau, sendo obtidas as seguintes faixas de concentração ( $\text{mg g}^{-1}$ ) para os compostos: teobromina (1,56 - 13,9), catequina (0,018-0,607), epicatequina (0,048 - 1,67) e cafeína (0,235 - 1,51). A Análise de Componentes Principais (PCA) e de Agrupamento Hierárquico (HCA) permitiu a discriminação das amostras em função do teor de sólidos de cacau. As amostras de chocolates artesanais com elevado teor de sólidos de cacau NO85, AB70, AB80, AB100, CS85, DM67,5, MCF70, MCF80, CACB70 e ART70 apresentaram elevadas concentrações de teobromina, catequina, epicatequina e cafeína, enquanto que a amostra de chocolate ao leite CS28, apresentou os menores valores destes compostos orgânicos.

**Palavras-Chave:** Metilxantinas, Flavonoides, Chocolate, HPLC, Planejamento de Experimentos

## ABSTRACT

Nowadays, the handmade chocolates are attracting the attention of the costumers, mainly due to the high level of cocoa, which transforms them into an excellent source of methylxanthines and antioxidants compounds, as catechin and epicatechin. However, there is a short amount of researches to explore the concentration of methylxanthines and flavonoids in handmade chocolate's samples with different cocoa content. This work aims to test the concentrations of theobromine, catechin, epicatechin and caffeine in handmade chocolate samples with different cocoa content using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Aiming to optimize the analytes' separation procedure was applied a central composite design with three variables: initial percentage of methanol in mobile phase, gradient time and flow rate of mobile phase. The models created were submitted to analysis of variance ANOVA ( $p < 0,05$ ) and it did not show any lack of fit evidence. To predict the optimal conditions, optimization's methodology of multiple-response was used which one resorts the desirability function. The best conditions obtained were: the initial percentage of methanol in 0 % (starting with 100 % of acetic acid solution 0,1 % v/v), changing to 100 % of methanol in gradient time 9,85 minutes, with mobile phase flow rate equals  $0,74 \text{ mL min}^{-1}$ . These conditions brought the complete separation of peaks, with the resolution values equals to 1,3 for theobromine and catechin pairs, 1,8 for catechin and epicatechin, 1,3 for epicatechin and caffeine. To optimize the methylxanthine's extraction procedure were used the mixtures design simplex-centroid with three solvents: ethyl acetate, chloroform and dichloromethane. The results show that the biggest extraction percentage were obtained using pure solvents. One exhaustive extraction with ethyl acetate and chloroform had performed and the best results were obtained with ethyl acetate as a solvent. The mixtures design along to the central composite design also were used to optimize the ultrasound assisted extraction of flavonoids. As results, were observed that the catechin and epicatechin's maximum extraction were achieved using a mixture of solvents in the following conditions: proportion of water and acetone 1:1 (v/v), time of extraction in ultrasonic bath equals 4 minutes and 54 seconds, temperature  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  and maximum potency percentage equals 50 %. The analytic procedure were validated considering the following figures of merit: analytical curves linearity, detection limits and quantification, repeatability and intermediary precision. The method accuracy was evaluated through the Standard Reference Material of Chocolate (Chocolate Banking NIST 2384), which there are no significant differences between the values obtained and the certificated values. The procedure optimized was used to determine theobromine, catechin, epicatechin and caffeine into 22 samples of handmade chocolate with different cocoa contents, being obtained the range of concentration, in  $\text{mg g}^{-1}$ , for the compounds: theobromine (1,56-13,9), catechin (0,018-0,607), epicatechin (0,048 – 1,67) and caffeine (0,235 – 1,51). The Principal Component Analysis (PCA) and Hierarquical Cluster Analysis (HCA) allow the discrimination of samples as the function of the cocoa content. The samples of handmade chocolate with high content of cocoa solids NO85, AB70, AB80, AB100, CS85, DM67,5, MCF70, MCF80, CACB70 and ART70 were excellent sources of theobromine, caffeine, catechin and epicatechin, while the sample of milk chocolate CS28 had the lowest content these organic compounds.

**Key-words:** Methylxantines, Flavonoids, Chocolate, HPLC, Experimental Design.

## 1 INTRODUÇÃO

O chocolate é produto obtido através do processamento adequado das amêndoas do cacau (*Theobroma cacao* L.), fruto que é vastamente cultivado em países da África, Ásia e América Latina (RUSCONI; CONTI, 2010; WCF, 2014a). O chocolate pode ser definido como uma suspensão semissólida composta basicamente de sólidos de cacau, manteiga de cacau e açúcar, podendo-se acrescentar leite, frutas ou nozes para produzir variados tipos deste produto (AFOAKWA, 2010; RUSCONI; CONTI, 2010). O chocolate ao leite, chocolate amargo e o chocolate branco são os principais tipos de chocolate disponíveis no mercado e diferem entre si em função do teor de massa de cacau (líquor), manteiga de cacau e leite (AFOAKWA; PATERSON; FOWLER, 2007).

Os chocolates em barra ou “tablete” podem ser classificados em: chocolate branco, chocolate ao leite, chocolate meio amargo e chocolate amargo ou preto. Segundo a legislação brasileira, para ser definido como chocolate, o produto deve conter no mínimo 25 % de sólidos totais de cacau. No caso do chocolate branco, não são adicionados sólidos de cacau, entretanto, o produto deve conter no mínimo 20 % de sólidos totais de manteiga de cacau, podendo ser acrescentados outros ingredientes. O chocolate ao leite é o produto obtido a partir da mistura da massa de cacau (20 a 39 %), açúcar, leite e leite em pó. O chocolate meio amargo possui entre 40 a 55 % de massa de cacau e o chocolate amargo entre 60 a 85 %, sendo este preparado com pouco açúcar, podendo conter ou não leite em sua formulação (BRASIL, 2005a; FARAH, 2008).

Os chocolates artesanais são produtos fabricados em escala reduzida, cuidadosamente manipulados e geralmente possuem um elevado teor de massa de cacau em sua formulação. São produzidos de acordo com as características culturais, regionais ou tradicionais, respeitando-se os padrões de identidade e qualidade estabelecidos para o chocolate (BRASIL, 2005b). O mercado dos chocolates artesanais tem crescido significativamente nos últimos anos, principalmente na região Sul da Bahia. Um dos fatores que favorecem esse crescimento é a discrepância entre o preço da amêndoa de cacau e do produto acabado (chocolate). Enquanto o quilo da amêndoa seca é comercializada por cerca de R\$ 10,00 atualmente, a mesma massa em chocolate pode chegar a R\$ 100,00. Desse modo, para o pequeno produtor de cacau é mais rentável a venda do chocolate processado em sua propriedade do que a própria venda da matéria-prima (JUSTE, 2005). Dentre os variados tipos de chocolates

artesanais, destacam-se os chocolates finos, que são chocolates de qualidade superior e de preço elevado, destinados principalmente à exportação (CAMARGO, 2005).

O chocolate tem sido considerado por muitos pesquisadores como um alimento funcional, ou seja, seu consumo pode trazer benefícios à saúde. Sabe-se que o chocolate amargo, com elevado teor de cacau, é rico em flavonoides, que são substâncias da classe dos polifenóis e que atuam como potentes antioxidantes, ajudando a prevenir doenças graves, como o câncer. As unidades monoméricas catequina e epicatequina ou mais comumente chamadas flavan-3-óis, juntamente com as proantocianidinas, são os grupos de polifenóis predominantes no cacau (RUSCONI; CONTI, 2010; STEINBERG; BEARDEN; KEEN, 2003).

O chocolate possui também elevadas concentrações de metilxantinas, principalmente teobromina e em menores concentrações, a cafeína e a teofilina, que além de possuir leve ação antioxidante, funcionam também como estimulante do sistema nervoso central e como relaxadores musculares, tendo ampla aplicação no tratamento de doenças do trato respiratório (MITCHELL *et al.*, 2011;FRANCO; OÑATIBIA-ASTIBIA; MARTÍNEZ-PINILLA, 2013)

Existe uma quantidade significativa de estudos voltados para a determinação de metilxantinas e flavonoides em amostras de cacau, produtos semiacabados e chocolate (BRUNETTO *et al.*, 2007; BELŠČAK *et al.*, 2009; CARRILLO; LONDOÑO-LONDOÑO; GIL, 2013;TODOROVIC *et al.*, 2015). De acordo com estas pesquisas, a concentração de metilxantinas e de flavonoides no chocolate geralmente cresce com o aumento do teor de sólidos de cacau, entretanto, ainda são escassas as informações acerca destes constituintes orgânicos em chocolates produzidos artesanalmente com diferentes teores de cacau em sua formulação, principalmente os chocolates finos e caseiros.

Levando-se em consideração o grande crescimento do mercado de chocolates artesanais e a associação direta dos flavonoides e das metilxantinas com os benefícios ligados à saúde e principalmente com a qualidade do chocolate, é de grande importância intensificar as pesquisas visando à determinação destes compostos.



## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a concentração de metilxantinas e flavonoides em amostras de chocolates artesanais com diferentes teores de cacau, produzidas ou comercializadas na região Sul da Bahia, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Otimizar a separação cromatográfica da teobromina, catequina, epicatequina e cafeína, utilizando técnicas de planejamento de experimentos.
- Investigar as melhores condições de extração da teobromina e da cafeína utilizando planejamento de misturas.
- Verificar quais as melhores condições de extração da catequina e epicatequina assistida por ultrassom, empregando técnicas de planejamento de experimentos.
- Avaliar as concentrações de cafeína, teobromina, catequina e epicatequina em amostras de chocolates artesanais com diferentes teores de cacau.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O chocolate

#### 2.1.1 Aspectos históricos

O cacau já era cultivado pelos Maias na América Central e pelos Astecas no México, sendo consumido na forma de bebida (CEPLAC, 2014; WCF, 2014c). A forma mais primitiva da bebida consistia na dissolução das amêndoas torradas e moídas em água, adicionando à mistura condimentos diversos. Devido a grande apreciação como bebida, seu consumo era restrito somente à elite daquela época, sendo as amêndoas utilizadas como moeda de troca em operações financeiras (LE COUTEUR; BURRESON, 2006).

Achados arqueológicos mostram que o cacau foi provavelmente uma das primeiras fontes de cafeína e teobromina da humanidade (LE COUTEUR; BURRESON, 2006). Um exemplo disso pode ser visto no trabalho realizado por Washburn, Washburn e Shipkova (2013), que mostrou que recipientes antigos da Mesoamérica, provavelmente utilizados para tomar a bebida à base de cacau, ainda continham traços de cafeína e teobromina, mesmo após vários séculos.

Um método prático para o consumo da bebida consistia em triturar as amêndoas de cacau e, em seguida, prensá-las em forma de tabletes para posterior dissolução em água (GRIVETTI; SHAPIRO, 2009). Isso permitiu o consumo da bebida de forma rápida e prática, principalmente durante viagens muito longas. A esse tablete foi dado o nome de chocolate.

O chocolate também era considerado sagrado pelas civilizações antigas (WCF, 2014c). Na América Central, o uso da bebida à base de cacau esteve relacionada a rituais de sacrifício, casamentos e presentes de cunho religioso. Acreditava-se que as sementes do fruto era um presente do deus Maia do cacau (GRIVETTI; SHAPIRO, 2009). Devido a estas características místicas, o cacau recebeu o nome de *Theobroma cacao*, que significa “manjar dos deuses” (CEPLAC, 2014).

## 2.1.2 Aspectos econômicos do cacau e do chocolate

O mercado multibilionário do chocolate estimula fortemente o cultivo do cacau em diversos países produtores. O continente africano é o maior produtor de cacau do mundo, contribuindo com aproximadamente 75 % da produção mundial (KUHNERT et al., 2014). Os países do continente africano que mais se destacam na produção de cacau são: Costa do Marfim, Camarões, Gana e Nigéria. Na Ásia/Oceania destacam-se: Indonésia, Malásia e Nova Guiné e na América do Sul: Brasil, Colômbia e Equador. O Brasil lidera a produção na América do Sul e atualmente situa-se entre os seis maiores produtores de cacau do mundo com produção de 210 mil toneladas anualmente (ICO, 2014; SCHWAN et al., 2013; WCF, 2014a; WCF, 2014b; TEYE et al., 2013).

O Brasil já ocupou a segunda posição na produção mundial de cacau antes da chegada da doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que dizimou grande parte da produção e fez o país despencar cinco posições no ranking mundial. O Estado da Bahia é o maior produtor de cacau do Brasil, fornecendo a maior parcela do cacau produzido no país (LOPES *et al.*, 2011). Municípios baianos como: Itabuna, Ilhéus, Uruçuca, Itajuípe e Una são destaques na produção de cacau, sendo que especificamente no eixo Itabuna e Ilhéus, se encontram várias indústrias de processamento de cacau instaladas, como Cargil, Joanes, Barry Callebaut e a antiga Delfi Cacau, que foi incorporada a Barry Callebaut. Essas indústrias produzem derivados intermediários das amêndoas de cacau: nibs, líquido, torta e pó de cacau, que posteriormente são comercializados como matéria-prima para indústrias chocolateiras.

Devido à forte queda na produtividade das lavouras cacaueiras baianas ocasionada pelo crescimento da vassoura-de-bruxa, foi necessária capacidade de inovação dos produtores para obter lucro. Deste modo, alguns produtores decidiram investir mais em qualidade do que em quantidade, selecionando variedades de frutos de melhor sabor e adotando rigorosos processos de controle de qualidade pós-colheita e fermentação. Assim nasceu o cacau fino ou amêndoa fina, que é utilizada na fabricação de chocolates de alta qualidade, o chamado chocolate fino ou *gourmet*. Este tipo de chocolate tem um preço elevado em relação aos chocolates convencionais e é destinado principalmente à exportação para países da Europa, como a França e Itália. As amêndoas finas também são exportadas para fabricação de chocolates de elevado padrão de qualidade. Este novo mercado de chocolates cresce em ritmo

acelerado e está ajudando a colocar a região Sul da Bahia na posição de destaque no mercado (CAMARGO, 2015).

O chocolate possui grande importância econômica para o mercado mundial, movimentando \$ 100 bilhões anualmente (WCF, 2014b). A Suíça lidera o *ranking* mundial de consumo do chocolate com 9,9 kg *per capita* anualmente (AFOAKWA, 2010). O Brasil ocupa a terceira posição no *ranking* mundial de produção e consumo de chocolate, com consumo *per capita* de 2,2 kg anualmente. No primeiro semestre de 2014, a produção de chocolate no Brasil alcançou 245,8 mil toneladas, tendo um aumento de 2 % em relação a 2013. No mesmo período de 2015, a produção foi de 231 mil toneladas, com uma queda significativa na produção devido à crise econômica (ABICAB, 2015a; ABICAB, 2015b).

### 2.1.3 Processamento do chocolate

Existem três principais variedades de cacau disponíveis para a produção do chocolate: “Criollo”, “Trinitário” e o “Forasteiro”. O fruto da variedade “Criollo” é considerado o mais nobre em termos de sabor e aroma, tendo sido utilizado pelos Maias na fabricação do chocolate. Possui menos amargor (devido a menor concentração de compostos fenólicos) apresentando sementes grandes e enrugadas. Por ter um maior teor de açúcar na polpa, sua fermentação é bem desenvolvida, entretanto, o cacau desta variedade é mais sensível à doenças e por isso, somente 5-10 % do cacau “Criollo” é utilizado para a produção de chocolate.

A variedade “Forasteiro” é considerada o verdadeiro cacau brasileiro. Possui um amargor mais intenso do que o “Criollo” devido a maior concentração de compostos fenólicos, contudo, é mais resistente à doenças. Essas características fazem do “Forasteiro” a variedade mais popular para o cultivo, com 80 % dos frutos sendo destinados a produção do chocolate. A variedade “Trinitário”, surgiu do cruzamento entre o “Criollo” e o “Forasteiro”, possuindo características intermediárias entre as duas (CEPLAC, 2014; RUSCONI; CONTI, 2010; BECKETT, 1994).

Para obtenção do chocolate, as amêndoas de cacau devem passar por várias etapas de processamento. O processo se inicia na colheita, onde se deve fazer somente a remoção dos frutos maduros do cacau. A poda deve ser bem executada, evitando-se o corte do fruto. A quebra do cacau para remoção das sementes é feita na própria fazenda e consiste na realização de um corte transversal na região central do fruto. As sementes são cuidadosamente

removidas e colocadas em um cesto de palha chamado “caçua”, sendo posteriormente conduzidas para as caixas ou “cochos” de fermentação (BECKETT, 1994; MARTINS et al, 2011).

Destas etapas, a etapa de fermentação é considerada crítica, já que todos os processos bioquímicos responsáveis pelo desenvolvimento do aroma e sabor característicos do chocolate dependem de uma fermentação bem sucedida. Deste modo, algumas considerações devem ser feitas para garantir uma fermentação eficiente. Os frutos verdes, verdoengos ou em estado avançado de maturação devem ser fermentados separadamente visando garantir a homogeneidade da fermentação. O transporte até as caixas de fermentação devem ser realizadas no mesmo dia, evitando iniciar prematuramente o processo de fermentação (MARTINS et al., 2011).

A fermentação inicia-se logo na etapa de quebra dos frutos do cacau. Nesta etapa, os micro-organismos presentes no ambiente e nas mãos dos trabalhadores rurais entram em contato com a polpa das sementes. As sementes são transferidas para as caixas de fermentação, compactadas e cobertas com folhas de bananeira ou material similar. Durante as primeiras 24 horas ocorre a fermentação alcoólica com proliferação de leveduras (principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*), que se desenvolvem rapidamente em meio anaeróbico, rico em açúcar e água provenientes da polpa das sementes. As leveduras convertem o açúcar da polpa em etanol, produzindo também gás carbônico e calor, além de secretar enzimas pectinolíticas (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Com a degradação da pectina da polpa pela ação das enzimas pectinolíticas, a polpa se torna menos consistente e se liquefaz, escoando para o fundo da caixa de fermentação (BELITZ; GROSCH, 1997). Isso torna a polpa menos compactada e permite a entrada de oxigênio no sistema, facilitando o desenvolvimento de bactérias fermentadoras aeróbicas. Com a diminuição da quantidade de polpa e com aumento da concentração de etanol e oxigênio, o crescimento das leveduras é inibido e entra em declínio. Passadas as primeiras 24 horas, as bactérias lácticas e acéticas começam a se desenvolver rapidamente. A primeira produz ácido láctico em menor extensão e as bactérias acéticas provocam a oxidação do etanol, produzindo ácido acético e calor. Nesta etapa, chamada de fermentação acética, o revolvimento frequente da massa de cacau na caixa de fermentação é necessário, uma vez que a fermentação ocorre exclusivamente em meio aeróbico (BECKETT,1994; SCHWAN; WHEALS, 2004).

No pico de desenvolvimento das bactérias acéticas, a temperatura na massa de cacau pode chegar a 45-50 °C. Nessas condições, o tegumento (casca da amêndoa) se torna permeável e ocorre a penetração do ácido acético para o interior da semente, fazendo-a perder seu poder de germinação (SCHWAN; WHEALS, 2004). Nos últimos dias de fermentação, se processam reações de oxidação e condensação dos compostos fenólicos no interior da amêndoa, desenvolvendo a cor e o odor característico do cacau bem fermentado (BELITZ; GROSCH, 1997).

As amêndoas de cacau não fermentadas não desenvolvem o aroma e o sabor necessários para a produção do chocolate. Deste modo, os erros cometidos durante a fermentação não podem ser corrigidos nas etapas posteriores do processamento, levando a um produto final sem as características sensoriais do chocolate. Visando otimizar o processo de fermentação, muitas pesquisas científicas tem sido desenvolvidas. O trabalho realizado por De Melo Pereira et al. (2013) buscou verificar as diferenças entre a fermentação conduzida em tanques de aço e a fermentação realizada em caixas de madeira, concluindo que a fermentação em tanques de aço pode ser utilizada para se obter um maior controle sobre o processo e também para otimizações iniciais com culturas de microrganismos. Investigações a respeito dos microrganismos atuantes no processo fermentativo também tem sido amplamente realizadas (CRAFACK *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2013; HUE *et al.*, 2016; SANDHYA *et al.*, 2016).

Após a fermentação, as amêndoas devem ser adequadamente secas para reduzir o percentual de umidade. Geralmente a secagem ocorre à luz do sol, em barcaças na própria fazenda ou em secadores artificiais, quando se está em períodos chuvosos. Uma umidade de 6 a 7 % é considerada adequada para reduzir o desenvolvimento de fungos. A secagem também promove a remoção dos compostos voláteis produzidos durante a fermentação, além de reduzir a acidez excessiva oriunda da fermentação acética. O amargor característico das sementes do cacau também é reduzido com a oxidação dos polifenóis através da enzima polifenoloxidase (BECKETT, 1994; MARTINS *et al.*, 2011). Tais processos ocorridos durante a secagem são indispensáveis para produção do chocolate.

As amêndoas secas devem ser armazenadas em locais limpos, secos, protegidos contra luz e livre de produtos que possam contaminá-las com odores do ambiente. O período de estocagem não pode ser superior a 90 dias (MARTINS *et al.*, 2011). Após armazenagem, as amêndoas seguem para as etapas de processamento do chocolate, contudo, é necessário que

haja um controle de qualidade que decidirá se o lote será aceito para processamento ou se será rejeitado.

O procedimento inicial é uma inspeção visual das amêndoas, onde são observados os seguintes critérios: amêndoas achatadas ou “cochas”, as quais não podem ser cortadas; impurezas, oriundas de restos da polpa ou fruto; matérias estranhas, que não são advindas do cacau; amêndoas mofadas; amêndoas com suspeita de contaminação; amêndoas com umidade inadequada (BRASIL, 2008). Posteriormente é realizada a prova de corte, que é o método de classificação mais tradicional e aceito mundialmente, para avaliar a qualidade das amêndoas de cacau, e consiste em realizar um corte longitudinal dividindo-as em duas partes.

O interior das amêndoas cortadas é avaliado buscando-se identificar possíveis defeitos, tais como: amêndoas fermentadas, as quais apresentam coloração marrom e ranhuras internas decorrentes da passagem do ácido acético durante a fermentação; amêndoas ardósias, as quais não foram adequadamente fermentadas, apresentando coloração azul escuro e superfície interna compacta; amêndoas germinadas, que são outro tipo de amêndoa não fermentada e amêndoas sobre-fermentadas, as quais foram excessivamente fermentadas (BRASIL, 2008). Além disso, são avaliados também a presença de odores estranhos, como a presença de fumaça (MARTINS et al., 2011). Somente as sementes adequadamente fermentadas, livre de odores indesejáveis e impurezas são destinadas ao processamento. A legislação brasileira estabelece os limites aceitáveis (BRASIL, 2008) e as amêndoas que não se enquadram são descartadas.

As amêndoas selecionadas para a fabricação do chocolate passam inicialmente por um processo de torra, onde ocorre uma redução da umidade de 3 para 0,9 % e eliminação de alguns compostos voláteis indesejáveis (aldeídos, álcoois e excesso de ácido acético). As amêndoas torradas são posteriormente fragmentadas em um fragmentador ou descascador para serem divididas em partes menores, facilitando a remoção da casca sem perdas adicionais. Esses fragmentos são chamados de nibs de cacau (WCF, 2014a; MORORÓ, 2015; BECKETT, 1994).

O nibs é submetido à moagem, onde adquire consistência pastosa. Essa pasta ou massa de cacau é chamada liquor. O liquor de cacau é sólido em temperatura ambiente e é o componente base para a produção do chocolate. Ele pode passar por uma etapa de pré-tratamento (alcalinização), em que a pasta é misturada à uma solução alcalina, visando redução da acidez. A prensagem a quente do líquido gera dois subprodutos: a manteiga de cacau e a torta de cacau (AFOAKWA, 2010).

Para produção do chocolate, os ingredientes básicos líquido de cacau, açúcar, manteiga de cacau e leite em pó são misturados em um tacho encamisado sob aquecimento entre 40 a 50 °C por 12 a 15 minutos para formação de uma massa consistente. Posteriormente, a massa passa pelo processo de refinamento, para reduzir o tamanho das partículas, evitando que a mesma adquira consistência arenosa (AFOAKWA, 2010).

O processo final da produção do chocolate bruto é a etapa de conchagem. Nesta etapa, a massa é submetida à agitação constante com temperatura controlada, mantida entre 50 a 70 °C a depender do tipo de chocolate. Esse procedimento visa a homogeneização dos ingredientes e eliminação de compostos voláteis indesejáveis, como por exemplo, o ácido acético proveniente da etapa de fermentação. A massa é submetida a um processo de temperagem, onde são desenvolvidas as características físicas e sensoriais do chocolate. O chocolate é então envasado e adequadamente embalado, seguindo o para a comercialização (AFOAKWA, 2010; MORORÓ, 2015; WCF, 2014a).

## **2.2 Metilxantinas e flavonoides no cacau e chocolate: propriedades químicas e impactos na saúde**

O cacau é uma rica fonte de constituintes naturais bioativos, tais como metilxantinas e compostos fenólicos, o que faz com que seus produtos derivados, como o chocolate, tenham elevadas concentrações destes compostos (RUSCONI; CONTI, 2010; STEINBERG; BEARDEN; KEEN, 2003). A teobromina é a metilxantina predominante no chocolate, sendo que sua concentração chega a ser 10 vezes maior do que a concentração de cafeína. A teofilina normalmente se encontra a nível de traços (FRANCO; OÑATIBIA-ASTIBIA; MARTÍNEZ-PINILLA, 2013; MATISSEK, 1997). Dentre os compostos fenólicos, as unidades monoméricas catequina e epicatequina, em conjunto com as proantocianidinas são predominantes no cacau (COOPER et al., 2008; LANGER et al., 2011; RULL et al, 2015).

### **2.2.1 Metilxantinas**

As metilxantinas são alcaloides que pertencem ao grupo das purinas, sendo derivados metilados da forma lactama da 2,6-dioxipurina ou mais comumente chamada xantina. A teobromina (3,7-dimetilxantina), cafeína (1,3,7-trimetixantina) e a teofilina (1,3-



dimetilxantina) são os compostos naturais mais conhecidos (Figura 1) (EICHER; HAUPTMANN; SPEICHER, 2003).

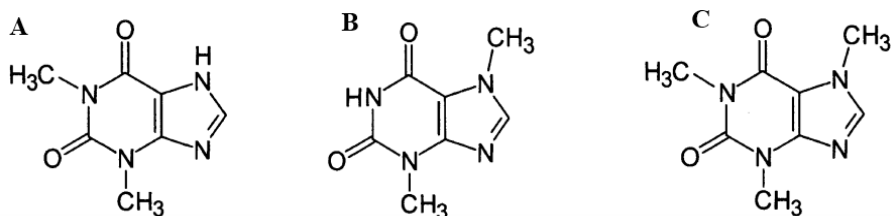


Figura 1. Estrutura molecular das metilxantinas. A (teofilina); B (teobromina); C (cafeína). Fonte: EICHER; HAUPTMANN; SPEICHER, 2003.

As metilxantinas são compostos incolores, inodoros e que conferem um sabor levemente amargo a alguns alimentos, como por exemplo, cacau e café. Possuem pontos de fusão relativamente elevados (a cafeína funde a 263 °C), o que permite submeter certos tipos de alimentos ao processo de torra sem que haja diminuição significativa na concentração destas substâncias. São altamente solúveis em água quente, entretanto, a cafeína é mais solúvel em água à temperatura ambiente do que a teobromina e a teofilina (EICHER; HAUPTMANN; SPEICHER, 2003; MATISSEK, 1997).

As sementes de cacau possuem cerca de 1 a 4 % de teobromina e 0,2 a 0,5 % de cafeína, sendo que a teofilina é encontrada a nível de traços (DEWICK, 2002). Durante a etapa de amadurecimento do fruto, a concentração de teobromina e cafeína é maior nos cotilédones e permanece elevada nos primeiros dias de fermentação (BRUNETTO et al., 2007), contudo, a concentração cai significativamente nos últimos dias deste processo, devido a migração destas metilxantinas da amêndoa para a casca (SCHWAN; WHEALS, 2004; CALIGIANI, et al., 2014). Devido a considerável estabilidade térmica das metilxantinas, sua concentração não é significativamente reduzida nas etapas posteriores de processamento do cacau para produção do chocolate, como secagem, torra, conchagem, etc., nas quais se eleva consideravelmente a temperatura (MATISSEK, 1997).

Os fatores genéticos e geográficos influenciam fortemente os níveis de metilxantinas no cacau. Apesar de haver exceções, a variedade “Forasteiro” geralmente apresenta a maior relação teobromina/cafeína, enquanto que a variedade “Criollo” possui menores teores de teobromina e uma maior concentração de cafeína em relação à variedade “Forasteiro” (BRUNETTO et al., 2007; CARRILLO; LONDOÑO-LONDOÑO; GIL, 2013).

As elevadas concentrações de teobromina e também de cafeína no cacau e produtos derivados, como o chocolate, tem despertado o interesse das pesquisas científicas,

principalmente devido ao efeito destas substâncias no organismo humano. As metilxantinas agem no sistema nervoso bloqueando receptores da adenosina, a qual é responsável por controlar múltiplas funções no organismo, como a frequência cardíaca e pressão arterial (BEAUDOIN; GRAHAN, 2011; FRANCO; OÑATIBIA-ASTIBIA; MARTÍNEZ-PINILLA, 2013). A cafeína é um bloqueador mais potente que a teobromina e age promovendo um aumento no estado de alerta, diminuição do cansaço e uma considerável melhoria na concentração, o que permite realizar tarefas de modo mais eficiente (GUERRA, BERNARDO, GUTIÉRREZ, 2000; MITCHELL et al., 2011). A teobromina, por sua vez, tem efeito menos estimulante do que a cafeína, contudo, possui efeitos benéficos, atuando como redutor da pressão sanguínea e relaxador muscular, além de aliviar sintomas de doenças do trato respiratório, como a tosse e a asma (HALFDANARSON; JATOI, 2007; MITCHELL, 2011; SMIT; GAFFAN; ROGERS, 2004).

Um estudo pioneiro revelou que a velocidade de liberação de cafeína no plasma sanguíneo de seis voluntários do sexo masculino (com idades entre 19 e 21 anos) foi de  $2,1 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ , quase duas vezes superior ao encontrado para teobromina ( $1,2 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ). Em função disto, o tempo de meia vida da teobromina no plasma foi de 7 horas e 12 minutos, superior ao da cafeína, cuja concentração inicial leva 4 horas e 6 minutos para ser reduzida à metade (LELO et al., 1986). Recentemente, um estudo realizado por Martínez-López et al. (2014), os quais submeteram voluntários homens ao consumo de cacau em pó natural e cacau em pó enriquecido com metilxantinas, mostrou que após 30 minutos da ingestão das amostras foi observado um aumento na concentração das metilxantinas no plasma sanguíneo, mantendo-se em níveis similares durante um período de 8 horas.

A rápida metabolização das metilxantinas presentes no chocolate leva os consumidores a sentirem rapidamente seus efeitos psicoativos. A melhora do humor e a sensação de prazer e relaxamento, são um dos motivos que podem justificar o elevado consumo deste produto. Um estudo realizado por Mitchel et al. (2011) em 24 pacientes do sexo feminino, avaliou os efeitos da ingestão de 700 mg de teobromina e 120 mg de cafeína. O principal efeito da teobromina foi uma diminuição significativa da pressão sanguínea após 1 hora da ingestão. Isso foi atribuído às propriedades vasodilatadoras da teobromina. A cafeína promoveu um aumento significativo na percepção, além de contribuir para a melhora do humor das pacientes após 1 hora da ingestão.

## 2.2.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos pertencentes a classe dos polifenóis e estão presentes em elevadas concentrações em uma variedade de plantas, frutas e nas sementes do cacau (GADKARI; BALARAMAN, 2015). Sua estrutura básica é de um difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ), que consiste em dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que formam um oxigenado heterocíclico, conforme mostrado na Figura 2. São biossintetizados através da condensação do ácido cinâmico com grupos malonil-CoA e são classificados de acordo com o grau de oxidação de suas estruturas químicas (BLOOR, 2001; EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; WOLLGAST; ANKLAM, 2000a).

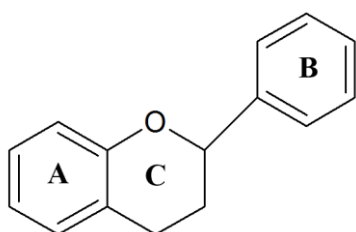


Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides. Fonte: Adaptado de Wollgast e Anklam, 2000a.

Os principais compostos da classe dos flavonoides são: as antocianinas, flavonóis, flavanóis, flavonas e flavanonas (STEINBERG; BEARDEN; KEEN, 2003). Os flavonoides majoritários no cacau e no chocolate são: os flavan-3-óis ou catequinas (que são constituídos pelas unidades monoméricas catequina e epicatequina) representando 37 % da concentração total de polifenóis e as procianidinas, que são as unidades poliméricas formadas por subunidades de catequina e epicatequina com 58 % da concentração total (RUSCONI; CONTI, 2010; WOLLGAST; ANKLAM, 2000a). A (-)-epicatequina é o principal flavan-3-ol encontrado no cacau e no chocolate, correspondendo a 35 % do total de polifenóis (RUSCONI; CONTI, 2010; WOLLGAST; ANKLAM, 2000a; WOLLGAST; ANKLAM, 2000b).

As procianidinas contendo de duas a cinco unidades dos monômeros (catequina ou epicatequina) são chamadas de oligoméricas e as que são formadas por mais de cinco unidades monoméricas são chamadas de procianidinas poliméricas (ROBBINS et al., 2013). Alguns exemplos de estruturas das unidades monoméricas e de um dímero da procianidina são mostrados na Figura 3.

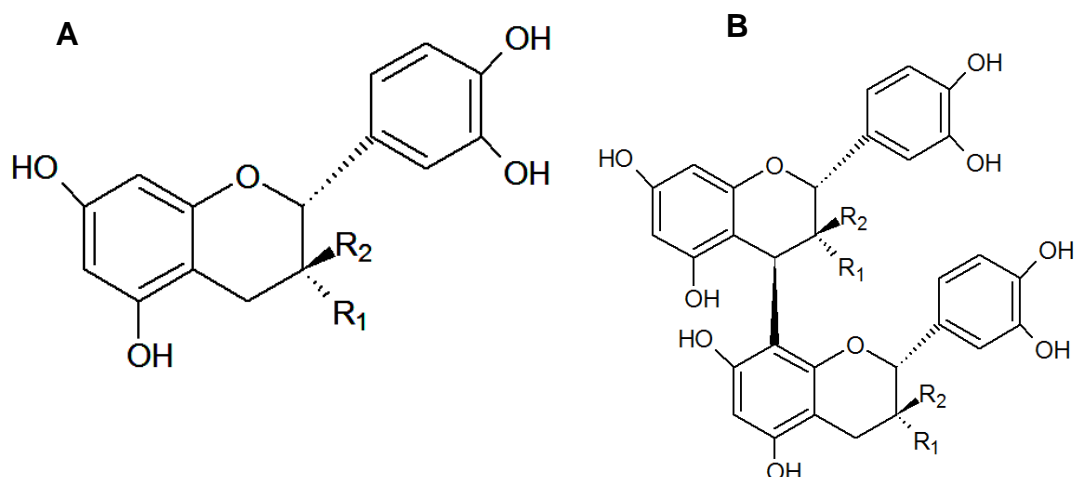


Figura 3. Estrutura química dos principais flavonoides encontrados no cacau e chocolate. A Figura 3A se refere a (+)-catequina, quando R1 = H e R2 = OH e (-)-epicatequina quando R1 = OH e R2 = H. Figura 3B se refere ao dímero procianidina (4 $\beta$ >8). Fonte: Adaptado de Wollgast e Anklam, 2000b.

O chocolate amargo é formulado com elevado percentual de sólidos de cacau, e devido a isso, geralmente apresenta concentrações de catequinas maiores do que o chocolate ao leite. Deve-se levar em consideração, porém, que a concentração destes constituintes no chocolate são dependentes de diversos fatores, como: variedade genética dos frutos, procedimentos pós-colheita e as etapas de processamento do chocolate (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; RAMIREZ-SANCHEZ et al., 2010; STEINBERG; BEARDEN; KEEN, 2003).

Durante a fase aeróbica da fermentação, a catequina e a epicatequina são oxidadas à quinonas pela ação da enzima polifenoloxidase, sendo que ocorre também reações de condensação e complexação destes compostos com proteínas, que leva ao desenvolvimento das características desejáveis do chocolate, como redução da adstringência e do amargor (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998). Apesar de contribuir para o desenvolvimento do sabor e aroma do chocolate, estas reações diminuem drasticamente o teor de compostos fenólicos neste produto. A (-)-epicatequina é o principal substrato da enzima polifenoloxidase e, devido a isso, tem sua concentração inicial reduzida a 90 % (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011).

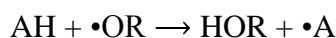
Nas etapas de secagem das amêndoas e nas etapas de processamento do chocolate, como, por exemplo, a torra e a conchagem, pode ocorrer decréscimo da concentração de flavonoides devido a ação de reações de oxidação, como também de complexação dos flavonoides com proteínas do leite (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; ZHOU et al., 2015). Em função da pouca estabilidade das catequinas, reações de epimerização também podem ocorrer quando se tem elevação de temperatura e pH. Nestas reações, a (-)-epicatequina pode

ser convertida no epímero (-)-catequina, que não é encontrado naturalmente nas sementes de cacau (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; GADKARI; BALARAMAN, 2015).

O consumo moderado de chocolates ricos em compostos fenólicos, como a catequina e epicatequina, é capaz de trazer benefícios à saúde. Apesar das catequinas não serem consideradas compostos essenciais à nutrição humana, elas contribuem para o melhoramento da saúde, ajudando prevenir diversas doenças, principalmente porque são consideradas potentes antioxidantes (GADKARI; BALARAMAN, 2015).

O principal mecanismo antioxidante das catequinas é através do combate às espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são formadas nas reações de transporte de elétrons na membrana mitocondrial e as principais espécies geradas incluem: o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), que devido a sua elevada reatividade e curto tempo de meia vida, causa danos nas intermediações onde é produzido (ANDRADE JUNIOR et al., 2005; SILVA; GOLÇALVES, 2010). Sabe-se que as membranas celulares e intracelulares possuem elevadas quantidades de ácidos graxos polinsaturados e devido a isso são atacadas facilmente por radicais livres (OBERLEY, 1998). Deste modo, o aumento das ERO acima dos níveis críticos pode causar danos na estrutura de moléculas como o DNA e RNA, resultando no desenvolvimento de células mutantes e conseqüentemente, dando origem aos tumores malignos (BAKALOVA et al., 2013).

As catequinas agem como antioxidantes, sequestrando radicais livres formados na etapa de iniciação ou propagação. Estes radicais abstraem um hidrogênio das hidroxilas pertencentes ao grupo o-difenólico no anel B (Figura 3A), conforme ilustra a reação simplificada:



Onde AH, corresponde ao antioxidante;  $\bullet OR$  é o radical livre; HOR, corresponde ao radical estabilizado;  $\bullet A$  é o radical inerte.

Os radicais livres são estabilizados pela ligação com o hidrogênio e o radical procedente do antioxidante (catequinas) é estabilizado devido a ressonância do anel aromático deste composto. Os intermediários formados são relativamente estáveis e não são capazes de iniciar uma nova reação em cadeia (RAMALHO; JORGE, 2006).

Devido a esse mecanismo de ação antioxidante, o consumo de alimentos ricos em catequinas, como o chocolate amargo, tem contribuído para reduzir a concentração de radicais

livres no organismo e, conseqüentemente, prevenir as doenças ocasionadas por essas espécies reativas. Além disso, são associados ao consumo de chocolate amargo alguns dos seguintes benefícios: redução do risco de desenvolvimento de diabetes (CORDERO-HERRERA, et al., 2015; GREEBERG, 2015), diminuição da tendência de agregação das plaquetas (RULL et al., 2015) e atividade antiviral (SONG; LEE; SEONG, 2005).

Estudos de biodisponibilidade mostram que a epicatequina é mais rapidamente absorvida do que a catequina. A rápida absorção da epicatequina foi demonstrada em um trabalho recente desenvolvido por Barnett et al. (2015). Após a ingestão de 200 mg de (-)-epicatequina por voluntários saudáveis, verificou-se que a máxima concentração deste composto no plasma sanguíneo foi alcançada após o intervalo de 1 a 2 horas, sendo que o tempo de meia vida deste composto foi de 2 horas e 30 minutos. Neste estudo, um aumento nos níveis de óxido nítrico (NO) foi observado após a ingestão da epicatequina, o que indica um potencial efeito benéfico, uma vez que o aumento da concentração deste composto está associado à melhoria da saúde cardiovascular por meio do relaxamento dos vasos endoteliais (SCHNORR et al., 2008).

### 2.2.3 Análise quantitativa de metilxantinas e polifenóis

As metilxantinas e os flavonoides são compostos que possuem grupos cromóforos, e portanto, são capazes de absorver a radiação UV, o que permite o uso de técnicas analíticas baseadas nesse princípio. Para os compostos fenólicos, técnicas colorimétricas tem sido bastante empregadas (MATISSEK, 1997; SARKER; LATIF; GRAY, 2006). Para determinação de polifenóis totais, tem-se utilizado o método de Folin-Cicalteu e Azul da Prússia e para catequinas e procianidinas, os ensaios de Vaillin-HCl e Butanol-HCl são os mais recomendados (CARRILLO; LONDOÑO-LONDOÑO; GIL, 2013; TODOROVIC et al., 2015; WOLLGAST; ANKLAM, 2000a).

As técnicas colorimétricas se baseiam no comportamento químico destas substâncias e são incapazes de discriminar diferentes classes de polifenóis, sendo portanto, não específicas (ROBBINS et al., 2013). Deste modo, as técnicas cromatográficas, como a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e mais recentemente a técnica de eletroforese capilar (EC) tem sido preferencialmente utilizadas para a obtenção de resultados mais específicos (WOLLGAST; ANKLAM, 2000a).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica analítica mais amplamente empregada tanto para determinação de metilxantinas quanto para determinação de flavonoides, uma vez que permite a separação e quantificação simultânea, com elevada precisão e sensibilidade.

As metilxantinas e os flavonoides, como a teobromina, cafeína, catequina e epicatequina, podem ser simultaneamente separadas utilizando a cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC), com colunas com fase estacionária de sílica quimicamente ligada à C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> ou com grupos fenil. A eluição por gradiente utilizando fase móvel composta por água/ácido acético ou água/ácido fórmico 0,1 % (v/v), com utilização de metanol e acetonitrila como modificador orgânico, é geralmente preferida para obtenção de uma separação em um tempo curto com resolução satisfatória (ARAGÃO et al., 2009; PTOLEMY et al., 2010; TZANAVARAS; ZACHARIS; THEMELIS, 2010; VEPOORTE, 2000; ZACHARIS et al., 2013; WOLLGAST; ANKLAM, 2000a).

A análise de metilxantinas e flavonoides por RP-LC requer um cuidadoso controle do pH da fase móvel. A cafeína (pka = 14), teobromina (pka = 10,5) e teofilina (pka 8,6) são bases fracas e, normalmente, consegue-se obter uma separação satisfatória da cafeína das demais metilxantinas em um pH próximo ao neutro, entretanto, a coeluição entre as metilxantinas isoméricas teobromina e teofilina geralmente ocorre nestas condições. A redução do pH para um valor entre 2 e 4 (respeitando-se o limite mínimo tolerado pela fase estacionária da coluna) faz com que as metilxantinas estejam em sua forma ionizada, e deste modo, a interação com estas moléculas com a fase móvel é aumentada, modificando os fatores de seletividade de acordo com o pka de cada composto. Em relação a análises dos flavonoides, a redução do pH da fase móvel contribui para suprimir a ionização dos grupos fenólicos. Deste modo, as moléculas se mantêm em sua forma neutra e um aumento no fator de retenção ocorre devido a maior interação com a fase estacionária (ARAGÃO et al., 2009; BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012; VEPOORTE, 2000; WOLLGAST; ANKLAM, 2000a).

Para identificação destes compostos, um sistema HPLC com detector UV-vis de comprimento de onda fixo pode ser empregado, monitorando o comprimento de onda próximo ao de máxima absorvância ( $\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$ ), contudo, estes detectores apresentam limitações quando comparados aos detectores espectrofotométricos por arranjo de diodos (DAD). Estes detectores são os mais amplamente empregados, uma vez que permitem monitorar uma ampla faixa do espectro. Deste modo, algumas vantagens são obtidas

utilizando o DAD, tais como: determinação da pureza do pico (com algumas limitações) e a obtenção do espectro de absorvância de cada composto durante a corrida cromatográfica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2014; WOLLGAST; ANKLAM, 2000a).

Para alcançar uma separação satisfatória destes compostos, muitas vezes é necessária uma etapa de otimização. Deste modo, parâmetros como composição da fase móvel, tempo do gradiente utilizado, temperatura da coluna e controle de pH são manipulados visando obter as melhores condições de análise. Tais parâmetros são muitas vezes otimizados de maneira univariada, o que leva a um grande consumo de tempo e de reagentes.

Visando contornar este problema, técnicas de planejamento de experimentos tem sido cada vez mais empregadas nas separações cromatográficas, permitindo a otimização simultânea de vários parâmetros, e com isso, uma maior economia de tempo e de reagentes.

## **2.3 Planejamento de experimentos**

Nesta seção serão descritas de forma simplificada as principais técnicas de planejamento de experimentos e sua utilização em procedimentos de otimização cromatográfica e de extração. Para uma abordagem mais aprofundada, recomenda-se ao leitor a consulta dos materiais citados nas referências.

### **2.3.1 Fundamentação teórica**

Por um longo período de tempo, as variáveis de um processo ou experimento foram estudadas de maneira univariada, ou seja, enquanto um fator (variável independente) é mudado de nível, os demais fatores se mantêm constantes. Devido a isso, muitas desvantagens eram observadas, dentre elas: o elevado número de experimentos necessários, gasto excessivo de tempo, além de não ser possível observar os efeitos de interação entre as variáveis (BEZERRA *et al.*, 2008). Em função destas limitações, a utilização da otimização univariada de experimentos se tornou cada vez menos frequente, perdendo espaço para as técnicas de planejamento de experimentos realizadas de maneira multivariada, onde as variáveis são mudadas de nível simultaneamente (BEZERRA *et al.*, 2008; SENA *et al.*, 2000).

As técnicas de planejamento de experimentos são ferramentas estatísticas utilizadas para planejar e otimizar experimentos, possuindo algumas vantagens, tais como: redução do



número de experimentos, economia de tempo e de recursos, e a possibilidade de avaliar as interações entre os fatores (FERREIRA, 2015; CALADO; MONTGOMERY, 2003; FERREIRA, 2004). Através destas técnicas, são geradas funções matemáticas que regem o sistema estudado (domínio experimental) e podem ser aproximadas à polinômios (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Estas funções são chamadas de modelos matemáticos e, se bem ajustados e validados, são capazes de prever novos valores da variável resposta em qualquer região dentro do domínio experimental (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

As principais ferramentas estatísticas de otimização multivariada empregando planejamento de experimentos são: as baseadas em estudos de triagem de fatores, que consiste no planejamento fatorial completo e fracionário, e a otimização por metodologia de superfície de resposta (MSR), onde as mais empregadas são: planejamento fatorial de três níveis, planejamento Box Behnken, matriz de Doehlert, planejamento composto central e o planejamento de misturas (FERREIRA, 2015).

Quando se deseja fazer um estudo exploratório, para identificar quais fatores influenciam significativamente na resposta experimental de um processo ou experimento, geralmente se emprega o planejamento fatorial completo, ou o planejamento fatorial fracionário, caso o número de fatores seja muito elevado. Quando os fatores estatisticamente significativos são identificados, estes são otimizados em uma das metodologias de superfície de resposta (BEZERRA *et al.*, 2008; FERREIRA, *et al.*, 2004; TEÓFILO; FERREIRA, 2006; FERREIRA, 2015).

Nos planejamentos de triagem, os fatores são geralmente estudados em dois níveis dentro do domínio experimental estabelecido, um nível superior (+) e um inferior (-). Além disso, podem ser realizadas repetições dos experimentos no ponto central (0) do planejamento para obter uma estimativa do erro experimental (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; VERA CANDIOTI *et al.*, 2014). Estes planejamentos geram modelos matemáticos de primeira ordem, também chamados de modelo linear. A Equação 1 mostra um exemplo de modelo linear com dois fatores  $x_1$  e  $x_2$ .

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + \mathcal{E} \quad (1)$$

Onde  $\hat{y}$  é o valor previsto pelo modelo,  $b_0$  é a média global de todas as respostas do experimento;  $b_1x_1$  e  $b_2x_2$  são os coeficientes dos termos lineares do modelo;  $b_{12}x_1x_2$  é o coeficiente do termo de interação entre os dois fatores e  $\mathcal{E}$  é o erro aleatório associado ao

modelo. Todos os efeitos e os coeficientes do modelo podem ser obtidos pelo método dos mínimos quadrados (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; TARLEY *et al.*, 2009; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). A dificuldade dos cálculos varia com a complexidade dos modelos, e para estes casos, softwares estatísticos como Statistica, MatLab, Origin, etc., são utilizados com frequência para a realização destes cálculos automaticamente.

Devido a simplicidade do modelo linear, ele só é capaz prever efeitos principais e interações, portanto, espera-se uma linearidade nos efeitos dos fatores, que pode ser representado geometricamente em um plano. Quando os termos de interação são adicionados, é possível que haja uma torção no plano. Se houver uma curvatura significativa nesse plano, ou seja, uma região de máxima resposta no ponto central do planejamento, então termos quadráticos devem ser adicionados ao modelo para explicar essa variabilidade (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Quando o modelo linear não é adequado para explicar a variabilidade nos dados experimentais, um modelo quadrático é proposto. Um exemplo de modelo quadrático para duas variáveis é mostrado na Equação 2.

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + \epsilon \quad (2)$$

Onde  $b_1x_1^2$  e  $b_2x_2^2$  são os termos quadráticos adicionados ao modelo.

O modelo de segunda ordem ou quadrático é empregado nas etapas de modelagem da metodologia de superfície de resposta quando o objetivo é determinar as condições ótimas de um procedimento experimental (CALADO; MONTGOMERY, 2003; TARLEY *et al.*, 2009). O planejamento composto central é uma das metodologias de superfície de resposta amplamente utilizada nestas circunstâncias.

### 2.3.2 Planejamento Composto Central - CCD

O planejamento composto central (*Central Composite Design*) é uma técnica de metodologia de superfície de resposta e foi inicialmente apresentado por Box e Wilson em 1951 como alternativa para os planejamentos fatoriais de três níveis, os quais necessitavam de muitos experimentos e portanto, se mostravam pouco eficientes (HIBBERT, 2012; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Este planejamento é formado por uma parte referente ao planejamento fatorial completo de dois níveis ou fracionário de resolução V, uma parte contendo pontos axiais ou em estrela com  $2k$  ( $k$  = número de fatores) corridas axiais, onde os pontos estão situados a uma distância  $\alpha$  do centro do planejamento, e uma parte com parte contendo  $n$  corridas no ponto central do planejamento (CALADO; MONTGOMERY, 2003). A Figura 4 mostra um exemplo de desenho geométrico para um planejamento composto central de dois e três fatores.

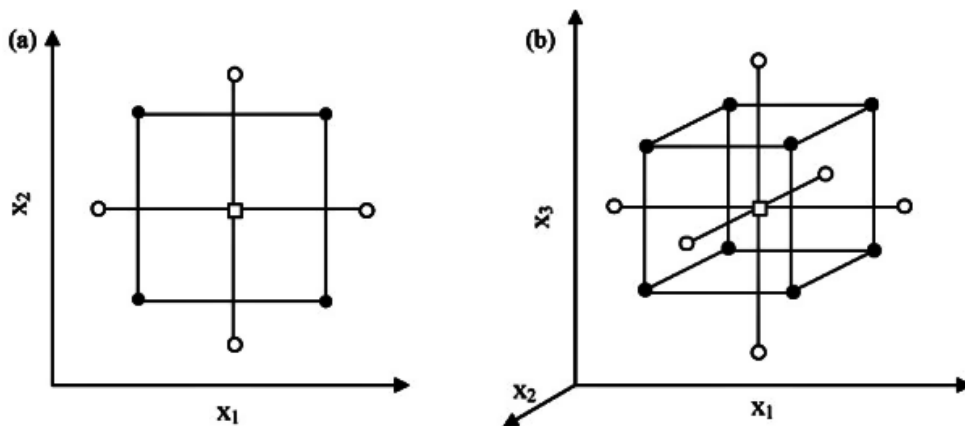


Figura 4. Desenho composto central. (a) com dois fatores e (b) três fatores. (○) são os pontos axiais, (●) são os pontos da porção fatorial e (□) o ponto central. Fonte: Bezerra et al. (2008).

Em função destas características, quatro diferentes modelos podem ser testados sequencialmente: *i*) somente termos lineares dos efeitos principais; *ii*) termos lineares e quadráticos dos efeitos principais; *iii*) termos lineares dos efeitos e interações de segunda ordem e *iv*) termos lineares e quadráticos dos efeitos principais e interações de segunda ordem (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Para realização do planejamento composto central, é necessário estabelecer dois importantes parâmetros: a distância  $\alpha$  partindo do centro do planejamento até os pontos axiais e o número de experimentos no ponto central. O  $\alpha$  é chamado de parâmetro de rotabilidade e dependendo do seu valor, pode fazer com que o planejamento se torne rodável, ou seja, a variância do valor previsto pelo modelo é constante em todos os pontos dos fatores que estejam à mesma distância do centro do planejamento (CALADO; MONTGOMERY, 2003; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Deste modo, para que o planejamento seja rodável são necessários alguns procedimentos: a) um número de experimentos calculados de acordo com a expressão  $N = k^2 + 2k + C_p$ , onde  $k$  é igual ao número de fatores e  $C_p$  é o número de experimentos no ponto central do planejamento; b) o valor de  $\alpha$  é obtido pela

expressão  $\alpha = 2^{(k-p)/4}$ , onde p é o número de redução do planejamento completo. Para dois, três e quatro fatores, o valor de alfa é 1,41, 1,68 e 2,00 respectivamente; c) todos os fatores estudados em cinco níveis distintos:  $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$  (BEZERRA *et al.*, 2008; FERREIRA, 2015).

### 2.3.3 Análise de Variância e otimização simultânea de múltiplas respostas

De modo a assegurar a confiabilidade na previsão do modelo matemático gerado pela metodologia de superfície de resposta é necessário que o modelo seja submetido a um procedimento de validação. O método mais empregado é a Análise de Variância (ANOVA), embora o método de avaliação do coeficiente de determinação  $R^2$  também seja utilizado (FERREIRA, 2015).

A ANOVA pressupõe que a variação total da resposta é composta pela soma quadrática da regressão (modelo) e a soma quadrática residual (resíduos) (Tabela 1). Tanto a soma quadrática da regressão quanto a soma quadrática residual são obtidas de todos os níveis ( $m$ ) do planejamento e de todas as replicatas realizadas em cada nível (FERREIRA *et al.*, 2007).

Tabela 1. Análise de variância para avaliação de modelos matemáticos. Fonte: Soares, 2010.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Modelo	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p-1$	$MQ_R = SQ_R / p - 1$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n-p$	$MQ_r = SQ_r / n - p$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m-p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / m - p$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n-m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / n - m$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n-1$	

$SQ_R$  = soma quadrática da regressão (modelo);  $SQ_r$  = soma quadrática dos resíduos;  $SQ_{faj}$  = soma quadrática da falta de ajuste;  $SQ_{ep}$  = soma quadrática do erro puro;  $SQ_T$  = soma quadrática total;  $\hat{y}$  = valor previsto pelo modelo;  $y_{ij}$  = i-ésima resposta obtida para o i-ésimo ensaio;  $\bar{y}$  = média global das respostas;  $\bar{y}_i$  = média das respostas no nível i; p = número de parâmetros do modelo ajustado; m = número de níveis distintos dos fatores; n = número total de observações.

Conforme mostrado na tabela da ANOVA, a soma quadrática da regressão  $SQ_R$  é a soma dos quadrados da diferença entre os valores preditos pelo modelo matemático  $\hat{y}$  em determinado nível  $i$  e a média de todas as respostas  $\bar{y}$ , com  $p-1$  graus de liberdade. A soma quadrática residual  $SQ_r$  é a soma quadrática da diferença entre os valores da resposta experimental  $y_{ij}$  e os valores da resposta previstos pela equação do modelo matemático  $\hat{y}_i$ , com  $n-p$  graus de liberdade (FERREIRA, *et al.*, 2007). Provavelmente haverá resíduos nas observações, entretanto, em um modelo bem ajustado, a contribuição da soma quadrática residual deve ser mínima (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A soma quadrática residual pode ser decomposta na soma quadrática da falta de ajuste e na soma quadrática do erro puro, com  $m-p$  e  $n-m$  graus de liberdade respectivamente, conforme mostrado na Tabela 1. A soma quadrática da falta de ajuste está diretamente associada a qualidade do modelo e ela será maior quanto mais as estimativas do modelo para um dado nível  $\hat{y}_i$ , se distanciarem do valor médio da resposta naquele nível  $\bar{y}_i$ . Ela pode ser reduzida testando diferentes ajustes no modelo matemático. A soma quadrática do erro puro está relacionada com os erros aleatórios das replicatas e não tem relação com o modelo matemático (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Assumindo-se que não há anormalidade na distribuição dos resíduos, um teste F para variâncias pode ser realizado para avaliar a significância da regressão. Neste caso, divide-se as somas quadráticas pelos seus respectivos graus de liberdade para obter as média quadráticas de cada fonte de variação, que podem ser consideradas como uma estimativa da variância. Para avaliar a significância da regressão em relação aos resíduos, compara-se a razão  $MQ_R/MQ_r$  com o valor da distribuição F (normalmente ao nível de 95 % de confiança). Se o valor  $MQ_R/MQ_r > F_{crítico}$ , então a hipótese nula é rejeitada e assume-se que há diferença significativa entre a equação de regressão e os resíduos, ou seja, a maior parte da variação experimental é explicada pelo modelo matemático e não pelos resíduos. O mesmo teste pode ser aplicado para avaliar a significância da falta de ajuste, neste caso, para um modelo bem ajustado, espera-se que o valor da razão  $MQ_{faj}/MQ_{ep} < F_{crítico}$ , mostrando que a falta de ajuste não é significativa no nível e confiança estabelecido (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Quando se deseja otimizar somente uma resposta experimental, pode-se encontrar o ponto ótimo empregando-se o Critério de Lagrange (FERREIRA *et al.*, 2004), contudo, quando se quer otimizar várias respostas simultaneamente isso não é possível. Uma

alternativa para otimização de respostas múltiplas foi desenvolvida por Derringer e Suich em 1980. Trata-se da função desejabilidade (*desirability*), que consiste em converter inicialmente cada resposta em uma função individual  $d_i$  que esteja dentro da faixa  $0 \leq d_i \leq 1$ . Quando  $d_i = 1$  a resposta é aquela que se quer, quando  $d_i = 0$ , a resposta está fora da região aceitável e, portanto, não é desejável (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

As desejabilidades individuais são determinadas de acordo com as Equações 3 e 4.

$$d_i = \begin{cases} 0 & y < Li \\ \left(\frac{y-Li}{A-Li}\right)^s & Li \leq y \leq A \\ 1 & y > A \end{cases} \quad \text{Li} \geq y \leq A, \text{ para maximizar uma resposta} \quad (3)$$

$$d_i = \begin{cases} 0 & y > Ls \\ \left(\frac{y-Ls}{A-Ls}\right)^t & A \geq y \geq Ls \\ 1 & y < Ls \end{cases} \quad \text{A} \geq y \geq Ls, \text{ para minimizar uma resposta} \quad (4)$$

Onde,  $y$  é a resposta que se deseja;  $A$  é o valor alvo;  $Li$  (limite inferior) é o menor valor aceitável para a resposta e  $Ls$  (limite superior) é o maior valor aceitável; os expoentes  $s$  e  $t$  são pesos, que quando igual a 1, a função é linear. Quando maior que 1, maior importância será dada aos valores próximos ao valor alvo e quando menor que 1, isso será pouco importante (CALADO; MONTGOMERY, 2003; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

As equações 3 e 4 mostram que quando a resposta  $y$  se iguala ao valor alvo  $A$ , a desejabilidade individual é 1. Quando a resposta se afasta do valor alvo, a desejabilidade cai, tornando-se zero quando os valores limites são alcançados (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

As desejabilidades individuais são combinadas de modo a fornecer a desejabilidade global de acordo com a expressão  $D = (d_1 d_2 \dots d_m)^{1/m}$ . Deve-se observar que as desejabilidades individuais devem ser obtidas de modo a maximizar o valor de  $D$ , já que quando algum valor de  $d_i$  é zero, a desejabilidade global se anula (BEZERRA *et al.*, 2008; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

### 2.3.4 Principais técnicas de planejamento de experimentos aplicadas à otimização de separações analíticas

As técnicas de planejamento de experimentos tem sido cada vez mais empregadas para otimização das separações cromatográficas e eletroforéticas. Em um estudo visando otimizar a separação cromatográfica de três metilxantinas, Aragão et al. (2005) aplicaram um planejamento fatorial de três níveis visando a separação da teobromina e teofilina empregando a cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa. Os picos foram completamente separados com resolução de 1,28 utilizando-se as seguintes condições otimizadas: vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e fase móvel composta por etanol/água/ácido acético (24:75:1%, v/v/v), em um tempo de análise inferior a 6 minutos.

Em trabalhos onde o número de compostos a serem separados é elevado, o planejamento composto central em conjunto com a otimização de respostas múltiplas de Derringer e Suich tem sido utilizados com frequência devido a sua maior eficiência comparado ao planejamento fatorial de três níveis.

Para otimizar a separação de 13 compostos fenólicos de óleo de oliva empregando eletroforese capilar, Ballus *et al.* (2011) utilizou um planejamento composto central onde foram otimizados três fatores: a concentração de ácido bórico, o pH e a voltagem aplicada. A resolução de cinco pares de picos mais difíceis de separar e o tempo de análise foram selecionados como resposta experimental. Como resultado, os autores conseguiram separar todos os picos com resoluções adequadas no tempo de 12 minutos. Vale ressaltar que um dos modelos apresentou falta de ajuste significativa para a separação dos pares de picos ácido gálico-ácido p-hidroxibenzoico, entretanto, a resolução obtida (9,16) foi suficiente para separação dos picos. Em 2014, utilizando a mesma técnica, estes autores relataram a separação de 17 compostos fenólicos em óleo de oliva empregando a matriz de Doehlert na otimização de dois fatores: pH e a concentração do ácido bórico. Os resultados mostraram que a completa separação de todos os picos foi alcançada em 19 minutos, utilizando como condição experimental ótima o pH de 9,15 e a concentração de ácido bórico de  $101,3 \text{ mmol L}^{-1}$ . Comparando-se estes dois trabalhos, observa-se que com o aumento da quantidade de compostos a serem separados, optou-se por um planejamento mais eficiente, uma vez que a matriz de Doehlert requer uma quantidade de experimentos inferior ao composto central para a mesma quantidade de fatores.

O planejamento composto central foi utilizado por Dias et al. (2015) para separação de cinco diferentes tipos de edulcorantes por cromatografia líquida de ultra performance com detector de arranjo de diodos (UPLC-DAD). Os fatores otimizados foram pH do tampão da fase móvel e a temperatura da coluna. A resposta avaliada foi a resolução entre 13 pares de picos, onde os pares sacarina-ciclamato foram analisados em dois diferentes comprimentos de onda (192 e 201 nm) e os demais compostos foram analisados na presença de interferentes. Devido à dificuldade imposta à separação cromatográfica, a maioria dos modelos testados apresentaram falta de ajuste significativa, entretanto, foram utilizados os modelos com menor valor  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$ . Através da otimização simultânea de todas as respostas, foi observado que o pH igual a 3,0 e uma temperatura de coluna de 56 °C, permitiu a separação de todos os compostos com resoluções adequadas.

Nos sistemas de cromatografia de ultra alta performance permite-se o uso de colunas de dimensões reduzidas. Colunas de 100 e até 50 mm são comuns. Neste contexto, Coutinho et al. (2015) realizaram uma otimização de separação de 17 capsinoides por UHPLC-DAD em duas colunas com comprimentos diferentes (100 e 50 mm). Para isso, os autores empregaram um planejamento composto central para cada coluna, onde três fatores foram otimizados: a porcentagem inicial de acetonitrila na fase móvel, o tempo de gradiente e a vazão. A resolução entre os três pares de picos mais difíceis de separar e o tempo de análise foram utilizados como resposta experimental. Com base na otimização de múltiplas respostas, foi verificado que a separação de todos os picos foi alcançada utilizando ambas as colunas, entretanto, a coluna de 100 mm apresentou melhores resoluções, com todos os picos obtidos em menos de 5 minutos.

Em procedimentos de separação cromatográfica ou extração com solventes, muitas vezes é necessária a utilização de uma mistura de dois ou mais solventes para obtenção de uma boa performance. Nestes casos, otimizações multivariadas visando estabelecer as melhores proporções dos componentes são empregadas. O planejamento de misturas ou desenho estatístico de misturas é a técnica de otimização mais utilizada nestas circunstâncias.

### 2.3.5 Desenho estatístico de misturas

No desenho estatístico de mistura ou mais comumente chamado planejamento de misturas, as variáveis não são mudadas de nível independentemente como mostrado nas seções anteriores. Isto porque, as misturas são sistemas em que as propriedades dependem



unicamente das proporções relativas dos seus componentes, ou seja, para qualquer variação que ocorra nos componentes da mistura, é esperada uma variação proporcional na resposta (CALADO; MONTGOMERY, 2003; VERA CANDIOTE et al. 2014).

A soma das proporções de  $q$  componentes de uma mistura deve ser sempre 100 %, devido à restrição imposta pela Equação 5 (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad (5)$$

Onde  $x_i$  é a proporção do  $i$ -ésimo componente.

Os modelos matemáticos mais utilizados em misturas são: o linear, quadrático e o cúbico especial, os quais são mostrados nas Equações 6, 7 e 8, respectivamente (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i \quad (6)$$

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i<j}^q \beta_{ij} x_i x_j \quad (7)$$

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i<j}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum \sum_{i<j<k}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad (8)$$

Onde,  $\beta_i$  se refere ao coeficiente linear e  $\beta_{ij}$  e  $\beta_{ijk}$  os coeficientes de interações da mistura binária e da mistura ternária, respectivamente.

Pode-se observar que estes modelos diferem dos modelos utilizados nos demais planejamentos com variáveis independentes, principalmente devido à ausência do termo  $\beta_0$ . Isto se deve a restrição imposta pela Equação 5, que pode ser demonstrada matematicamente (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Os planejamentos de misturas com três componentes são os mais utilizados, não sendo incomum planejamentos com quatro ou mais componentes. Para estes sistemas, podem ser construídos dois tipos de planejamento: o planejamento em rede simplex (*simplex-lattice*) ou o planejamento centróide-simplex.

Para uma mistura ternária, o planejamento centróide-simplex é o mais amplamente empregado e sua representação gráfica consiste em um triângulo equilátero (Figura 5), onde devem ser feitos três experimentos com os componentes puros, três com uma mistura binária 1:1 dos componentes puros e um experimento no ponto central com uma mistura ternária 1:1:1. Pontos axiais podem ser adicionados no centro do planejamento, neste caso realiza-se

três experimentos com a proporção de 2/3 de um dos ingredientes e 1/6 dos outros dois. Para obter uma estimativa do erro experimental e portanto, avaliar a qualidade do ajuste dos modelos matemáticos através da ANOVA, é necessário realizar no mínimo três ensaios no ponto central do planejamento (VERA CANDIOTI *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2007).

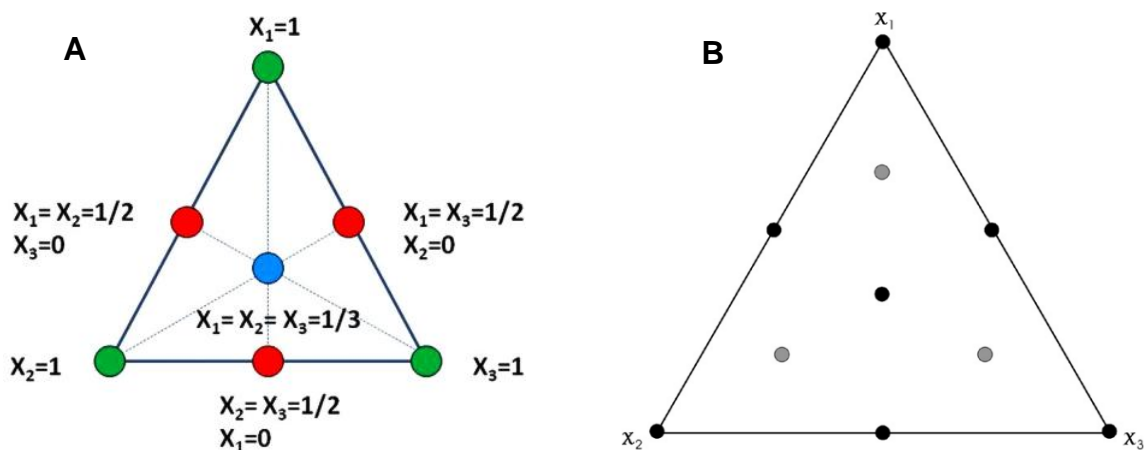


Figura 5. Representações gráficas de um planejamento centroide-simplex para três componentes. Na Figura 5A (VERA CANDIOTE *et al.*, 2014), os pontos nos vértices do triângulo (cor verde) se referem aos componentes puros. Os pontos nas laterais (cor vermelha) se referem a mistura binária 1:1 entre os componentes puros e o ponto no interior do triângulo se refere a uma mistura ternária 1:1:1. Na Figura 5B (FERREIRA, *et al.*, 2007), tem-se o complemento com os pontos axiais com uma proporção de 2/3 de um dos ingredientes e 1/6 dos outros dois.

Devido às características do desenho de um planejamento centroide-simplex, é possível testar o ajuste de um modelo linear, caso os termos lineares referentes aos componentes puros sejam significativos; um modelo quadrático, se os termos de interações binárias forem significativos ou um modelo cúbico especial, se os termos entre misturas ternárias forem significativos. A ampliação do modelo cúbico especial é o chamado cúbico completo, entretanto, para que seja possível calcular a falta de ajuste deste modelo, experimentos adicionais devem ser realizados de modo a se ter graus de liberdade suficientes (COSCIONE; DE ANDRADE; MAY, 2005).

A técnica de planejamento de misturas é frequentemente empregada na otimização de extrações com solventes ou em misturas de fases móveis em cromatografia líquida de alta eficiência para melhoria da separação dos componentes. O objetivo principal é verificar a ocorrência de efeitos sinérgicos entre os componentes da mistura. O efeito sinérgico é observado quando a interação entre dois ou mais componentes da mistura promove um aumento no valor da resposta, ou seja, a resposta obtido com os componentes misturados é sempre maior que a média dos componentes puros. Quando a interação entre os componentes

reduz o valor da resposta ( $b_{ij} < 0$  ou  $b_{ijk} < 0$ ), diz-se então que há um efeito antagônico (FERREIRA et al., 2007; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Para avaliar a ocorrência de efeitos sinérgicos na extração do conteúdo total bruto e fracionário das folhas da *Mikania laevigata*, Garcia et al. (2010) empregaram um planejamento de misturas centroide-simplex com cinco componentes (etanol, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e acetona). Foram testados o modelo quadrático e o cúbico especial, sendo que o modelo cúbico especial se mostrou mais adequado devido a significância do termo cúbico referente à mistura ternária entre etanol, acetato de etila e diclorometano. Como resultado, foram observados efeitos sinérgicos com a misturas binárias entre o etanol e os seguintes solventes: acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, e também misturas binárias entre acetato de etila e clorofórmio e acetato de etila e diclorometano.

Similarmente, para avaliar a composição de alguns metabólitos em folhas de café, Delaroza et al. (2014) utilizaram um planejamento de misturas centroide-simplex para quatro componentes (etanol, acetona, hexano e diclorometano) para avaliar o rendimento dos extratos nestes solventes. Os modelos quadrático e cúbico especial foram testados, sendo que o modelo cúbico especial não mostrou evidência de falta de ajuste. Rendimentos elevados foram obtidos com uso do etanol puro, devido ao elevado valor do seu coeficiente, contudo, houve interação sinérgica da mistura entre etanol e acetona, que mostraram-se melhores solventes extratores quando misturados. Deste modo, foi adotada o uso de uma mistura binária etanol-acetona para extração dos metabólitos.

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Amostragem

Foram coletadas um total de 22 amostras de chocolate artesanais com teores variados de cacau. As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais e em feiras de produtos artesanais na cidade de Ilhéus – BA. Entretanto, algumas amostras foram produzidas em outras regiões do país, como mostrado na descrição da Tabela 2.

Tabela 2 - Relação das amostras de chocolates de diferentes marcas e tipos adquiridas para análise.

Marca/teor declarado de cacau (%)	Descrição
DM65	Chocolate artesanal do cacau selvagem originário da Amazônia
DM67,5	Chocolate artesanal do cacau nativo do Maranhão
DM56	Chocolate artesanal <i>blend</i> de cacau
NO85	Chocolate orgânico do cacau do sul da Bahia
NO75	Chocolate orgânico do cacau do sul da Bahia
NO50	Chocolate orgânico do cacau do sul da Bahia
AB60	Chocolate artesanal produzido por pequenos produtores de Itabuna - BA
AB70	Chocolate artesanal produzido por pequenos produtores de Itabuna - BA
AB80	Chocolate artesanal produzido por pequenos produtores de Itabuna - BA
AB100	Chocolate artesanal produzido por pequenos produtores de Itabuna - BA
RE	Chocolate artesanal caseiro produzido por pequenos produtores de Rio do Engenho, Ilhéus-BA
MB	Chocolate artesanal caseiro produzido por pequenos produtores do Salobrinho, Ilhéus-BA
MCF56	Chocolate artesanal fino produzido em Itacaré - BA
MCF80	Chocolate artesanal fino produzido em Itacaré - BA
MCF70	Chocolate artesanal fino produzido em Itacaré - BA
CCW50	Chocolate artesanal produzido na Amazônia proveniente da agricultura familiar
CCW70	Chocolate artesanal produzido na Amazônia proveniente da agricultura familiar
ART70	Chocolate artesanal
CACB70	Chocolate fino artesanal produzido por produtores de Mascote – BA
CS28	Chocolate artesanal
CS55	Chocolate artesanal
CS85	Chocolate artesanal

ND = Não declarado no rótulo.

### 3.1.1 Pré-tratamento das amostras

As amostras de chocolate em barra foram removidas de suas embalagens originais, cuidadosamente raladas com auxílio de um ralador plástico, transferidas para recipientes plásticos estéreis de 50 mL e armazenadas em freezer na temperatura de -10 °C até a etapa de pré-tratamento.

## 3.2 Equipamentos e materiais utilizados

Para separação e quantificação dos analitos foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência, modelo Prominence LC-20A Shimadzu (Japão), equipado com detector UV-Vis ajustado para o comprimento de onda de 274 nm, sistema de quaternário de bombas, sistema de injeção manual com *loop* de 20 µL, forno de coluna com temperatura ajustada para 40 °C e coluna ShimPack Shimadzu (Japão) com 250 mm de comprimento, com fase ligada composta por grupos fenil (12,3 %), octadecil (20 %) e octil (12,5 %), tamanho de partícula de 4,6 µm e tamanho do poro de 12 nm. As amostras foram injetadas com auxílio de uma microseringa Hamilton de 50 µL. A fase móvel foi constituída de metanol grau cromatográfico e solução aquosa de ácido acético 0,1 % v/v. A separação foi efetuada utilizando gradiente iniciado com 100 % de solução aquosa de ácido acético 0,1 % (solvente C), mudando-se para 100 % de metanol (solvente A) após 9,85 minutos. Após obtenção de todos os picos, retornou-se para as condições iniciais, aguardando-se um tempo de 5 minutos de condicionamento para a corrida seguinte. A vazão da fase móvel foi de 0,74 mL min<sup>-1</sup>.

Para o preparo da fase móvel foi utilizado um pH-metro Metrohm (Herisau, Suíça) para medidas de pH, bomba de vácuo Vacuumbrand (Alemanha) para filtração a vácuo e banho ultrassônico Elamasonic Elma (Alemanha) para desgaseificação.

Para evaporação dos solventes foi utilizado um evaporador rotativo Quimis (Diadema, São Paulo, Brasil) equipado com banho termostatizado com controle de temperatura de 7 a 120 °C e controlador de rotação com velocidades variando de 10 a 200 RPM.

Um agitador de tubos tipo vortex AP-56 Phoenix foi utilizado para o processo de extração dos flavonoides.

### 3.2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de elevado grau analítico. Metanol grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido acético glacial Merck (Darmstadt, Alemanha), água deionizada com resistividade  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos os solventes constituintes da fase móvel foram filtrados em um sistema de filtração a vácuo contendo filtro de membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  e desgaseificados em um banho ultrassônico antes das análises.

Para calibração do cromatógrafo foram utilizados padrões de cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina), (+)-catequina e (-)-epicatequina, todos da marca Sigma Aldrich.

Para o procedimento de extração das metilxantinas foram utilizados acetato de etila P.A Sigma Aldrich, clorofórmio P.A da marca Quimex, diclorometano P.A da Fmaia, éter de petróleo P.A da Dinâmica, hexano P.A da Anidrol, éter etílico 99,8 % P.A da Neon, acetato de etila P.A da Sigma Audrich, hidróxido de sódio 99 % P.A da Biotec e solução aquosa de hidróxido de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . Para a extração dos flavonoides foram utilizados metanol P.A da Merck, etanol P.A Merck e acetona 99,5 % P.A da Moderna.

Para injeção das soluções de calibração foram preparadas soluções estoque de cafeína, teobromina, catequina e epicatequina na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Para isso, foram pesadas aproximadamente  $0,0100 \text{ g}$  de cada padrão sólido em balança analítica sendo posteriormente dissolvidos em uma pequena quantidade de água deionizada e transferidos para balões volumétricos de  $10 \text{ mL}$ . As soluções estoque dos padrões foram transferidas para tubos Falcon de  $15 \text{ mL}$  e armazenadas em um refrigerador em uma temperatura inferior a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para a etapa de otimização uma solução mista contendo padrões de cafeína, teobromina, epicatequina e catequina foi preparada por diluição das soluções estoque nas concentrações de  $8,3 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $400 \text{ mg L}^{-1}$  e  $50 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente.

### 3.3 Otimização da metodologia de separação da teobromina, catequina, epicatequina e cafeína

#### 3.3.1 Otimização multivariada da separação dos analitos

Baseando-se em estratégias multivariadas de separação já empregadas na literatura (BALLUS *et al.*, 2014; COUTINHO *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2015), foi proposto um planejamento composto central para separação da teobromina, catequina, epicatequina e cafeína. Deste modo, três variáveis foram otimizadas simultaneamente: porcentagem inicial de metanol, tempo de gradiente e vazão da fase móvel. A variável “porcentagem inicial de metanol na fase móvel” foi variada de 0 a 40 %. A segunda variável “tempo de gradiente” (para mudança até 100 % de metanol) foi variada de 5 a 20 minutos e a terceira variável “vazão da fase móvel” foi variada de 0,5 a 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

O tempo de análise (tempo de aquisição de todos os picos) e a resolução entre os pares de picos teobromina-catequina (Rs T-CT), catequina-epicatequina (Rs CT-E) e epicatequina-cafeína (Rs E-CF) foram selecionados como resposta experimental para a otimização. O cálculo da resolução foi efetuado levando-se em consideração a Equação 9.

$$R_s = \frac{2(Tr_2 - Tr_1)}{(B_2 + B_1)} \quad (9)$$

Onde,  $Tr_1$  e  $Tr_2$  referem-se aos tempos de retenção e  $B_1$  e  $B_2$  a largura da base do primeiro e segundo pico do par de pico em questão.

Para avaliação das condições experimentais ótimas foi aplicada a otimização simultânea de respostas múltiplas proposta por Derringer e Suich (1980). Para isso, os dados experimentais foram analisados com auxílio dos softwares Design Expert 6.0.4 (Minneapolis, USA) e o Statistica 7.0. Foram testados diferentes modelos matemáticos e também transformações matemáticas nas respostas experimentais. A validade dos modelos matemáticos gerados foi avaliada através da análise de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ), onde foram verificados o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a significância do modelo matemático e da falta de ajuste e a os gráficos de resíduos e dos valores reais versus valores preditos pelo modelo.

### 3.4 Otimização da extração das metilxantinas

#### 3.4.1 Estudo da partição com diferentes solventes

Para avaliar as melhores condições de extração das metilxantinas optou-se pela estratégia de extração por partição entre água e diferentes solventes orgânicos, procedendo de acordo com o método desenvolvido por Meinhart, et al (2011) com algumas modificações. Foram selecionados seis diferentes solventes imiscíveis com água: clorofórmio, diclorometano, éter de petróleo, hexano, éter etílico e acetato de etila. Inicialmente, uma amostra de chocolate com 100 % de cacau foi selecionada para o estudo. Visando saturar os solventes, aproximadamente 0,5000 g da amostra foi pesada em triplicata em balança analítica. Inicialmente, a amostra foi transferida para um funil de separação de 125 mL, sendo posteriormente adicionados 40,0 mL de clorofórmio. Em seguida, adicionou-se lentamente 10,0 mL de uma solução 0,2 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. A partição foi agitada cuidadosamente por 10 minutos, evitando-se a formação de emulsão. Posteriormente, a fase aquosa foi coletada e a fração orgânica referente ao solvente foi transferida para um balão de fundo redondo. O solvente foi evaporado em um evaporador rotativo na temperatura de 60 °C. Após evaporação, as amostras foram ressuspensas com 10 mL de água deionizada, filtradas em filtro Millex 0,45 µm de poro Merck (Alemanha) e injetadas no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Todo o procedimento foi repetido utilizando-se os demais solventes.

#### 3.4.2 Otimização empregando planejamento de misturas

Dentre os solventes estudados, selecionou-se três com melhor desempenho na extração para uma otimização empregando o planejamento de misturas centroide-simplex. Desde modo, buscou-se verificar principalmente a ocorrência de efeitos sinérgicos entre os componentes da mistura, ou seja, se a mistura entre dois ou três solventes puros aumentava a extração das metilxantinas. As extrações com os três melhores solventes foram realizadas repetindo-se o procedimento descrito na seção 3.4.1. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Para avaliação dos modelos matemáticos gerados no planejamento das misturas foi utilizado o software estatístico Statistica 7.0 Statsoft (USA). Para validação dos modelos foi empregada a análise de variância (ANOVA, p<0,05), onde os critérios para se considerar os



modelos válidos para previsão foram a avaliação da significância do modelo matemático e da falta de ajuste, avaliação dos resíduos e o coeficiente de determinação  $R^2$ .

### 3.4.3 Extração exaustiva empregando acetato de etila e clorofórmio

Com o objetivo de avaliar qual dos dois solventes extrairia a maior concentração dos analitos (teobromina e cafeína) no menor número de extrações, foi proposta uma extração exaustiva com acetato de etila e o clorofórmio, totalizando quatro ensaios distintos. No primeiro ensaio, foram realizadas quatro extrações com acetato de etila e com clorofórmio separadamente em cerca de 0,5000 g de amostra de chocolate com 100 % de cacau. A extração inicial foi conduzida com 40 mL de acetato de etila, repetindo-se a extração com três porções de 15 mL. As etapas posteriores foram realizados de modo análogo como descrito na seção 3.4.1. O mesmo procedimento foi repetido utilizando clorofórmio.

No segundo e terceiro ensaio, as massas foram reduzidas para 0,1000 e 0,0500 g, respectivamente, sendo realizada uma extração com 60 mL e mais três adicionais com 40 mL de acetato de etila. A área de pico para teobromina e cafeína foi avaliada em cada extração, sendo considerada uma extração satisfatória aquela que fornecesse mais de 90 % do analito em três extrações. A eficiência da extração foi confirmada com material de referência certificado de chocolate.

## 3.5 Otimização da extração dos flavonoides

### 3.5.1 Otimização multivariada da extração assistida por ultrassom

Para extração da catequina e epicatequina utilizando ultrassom foi proposto um planejamento composto central onde foram otimizados três fatores simultaneamente: tempo de sonicação, temperatura de extração e porcentagem da potência do ultrassom. O fator tempo foi variado de 1 a 20 minutos, a temperatura de 25 a 50 °C e a porcentagem da potência do ultrassom foi variada de 40 a 100 % com a frequência fixada em 35 kHz.

Para a escolha do solvente extrator foi aplicado um planejamento de misturas centroide-simplex com objetivo de avaliar a ocorrência de efeitos sinérgicos entre os componentes da mistura. Três diferentes solventes polares foram selecionados para extração de flavonoides: acetona, metanol e água deionizada. Deste modo, foi pesada, em duplicada,

aproximadamente 0,2500 g de uma amostra de chocolate com 100 % de cacau diretamente em tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável. Para cada amostra pesada foram adicionadas as proporções referentes ao planejamento de misturas centroide-simplex para três componentes. Em seguida, os tubos foram vedados e levados para agitação em um agitador vortex durante 1 minuto. Após agitação, as amostras foram levadas para sonicação em banho ultrassônico nas condições experimentais do ponto central do planejamento composto central proposto, que consistiu no emprego de uma temperatura de 35 °C, porcentagem da potência do ultrassom em 70 %, durante um tempo de 10 minutos e 30 segundos. O extrato foi transferido para balões volumétricos de 10 mL e o volume final foi completado com água deionizada. Os extratos foram filtrados em filtros Millex de 0,45 µm de poro Merck (Alemanha) e injetados no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. A resposta avaliada foi a área do pico correspondente a catequina e a epicatequina.

Após a definição do melhor solvente extrator foi aplicado o planejamento composto central com os fatores tempo, temperatura e porcentagem de potência do ultrassom para otimização das condições do equipamento. Depois de definir o melhor solvente extrator e as melhores condições de extração, foram realizados ensaios para definição da melhor relação massa de amostra/volume de solvente. Todos os experimentos referentes ao planejamento composto central e ao planejamento de misturas foram realizados em ordem aleatória.

### **3.6 Validação do procedimento analítico**

Para validação do procedimento proposto foram determinadas as seguintes figuras de mérito: limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), o intervalo de linearidade das curvas analíticas, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão.

O LD e LQ foram obtidos baseando-se nos parâmetros da curva analítica (RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007). Para isso, foram construídas curvas de calibração para todos os analitos em uma faixa de concentração próxima ao limite de detecção, onde foram calculados os desvios padrão do coeficiente linear ( $S_B$ ). O LD e LQ foram calculados multiplicando-se a razão entre o desvio padrão do coeficiente linear e o coeficiente angular da curva (a) de calibração por 3,3 e por 10, respectivamente, conforme mostram as Equações 10 e 11.

$$LD = 3,3 \times S_B/a \quad (10)$$

$$LQ = 10 \times S_B/a \quad (11)$$

Para avaliação da linearidade foram construídas curvas de calibração de seis níveis com concentrações variando de 2 a 102, 0,5 a 8,0, 1,0 a 21,0 e 1,0 a 11,0 mg L<sup>-1</sup> para teobromina, catequina, epicatequina e cafeína, respectivamente. Os padrões foram injetados em triplicata e os resultados foram submetidos à ANOVA (p<0,05) para avaliação da significância do modelo matemático e da falta de ajuste.

A repetibilidade foi avaliada através do desvio padrão relativo (RSD) de 10 injeções de uma solução mista dos padrões em um mesmo dia e a precisão intermediária foi avaliada através de 10 injeções dos padrões em três dias consecutivos.

A exatidão do método foi avaliada através da análise do material de referência certificado de chocolate, Chocolate Banking NIST 2384.

### **3.7 Determinação das metilxantinas e flavonoides em amostras de chocolates em barra com diferentes teores de cacau**

#### **3.7.1 Determinação da cafeína e da teobromina**

Foi pesada, em triplicata, cerca de 0,0500 g da amostra em balança analítica. Em seguida, as amostras foram transferidas para funis de separação de 125 mL. Adicionou-se 60,0 mL de acetato de etila e 10,0 mL de solução de hidróxido de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> ao funil de separação, agitando-se o lentamente por 10 minutos. Posteriormente, a fração orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo. O procedimento de extração foi repetido com mais duas porções de 40,0 mL de acetato de etila. O acetato de etila presente na fase orgânica foi evaporado em um evaporador rotativo na temperatura de 60 °C. Posteriormente, os extratos secos foram ressuspensos em 10,0 mL de água deionizada, filtrados em filtros Millex com porosidade de 0,45 µm e injetados no cromatógrafo. A identificação dos analitos foi realizada comparando-se os tempos de retenção dos padrões aquosos de cada composto com os tempos de retenção dos analitos na amostra.

### 3.7.2 Determinação da catequina e da epicatequina

Foi pesada, em triplicata, aproximadamente 0,1000 g da amostra diretamente em tubos de ensaio de vidro de 21,5 mL com tampa rosqueável. Em seguida, foram adicionados 5,0 mL de água deionizada e 5,0 mL de acetona. Os tubos foram tampados e submetidos a agitação em agitador vortex durante 1 minuto. Posteriormente, os tubos foram transferidos para o banho ultrassônico onde foram submetidos a extração assistida por ultrassom por 4 minutos e 54 segundos, com temperatura de 45 °C e 50 % da potência de 35 kHz. Os extratos foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água deionizada. Posteriormente, os extratos foram filtrados em filtros Millex com porosidade de 0,45 µm e injetados no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização simultânea da separação da teobromina, catequina, epicatequina e cafeína

A análise de solutos ionizáveis por cromatografia líquida em fase reversa requer uma redução no pH da fase móvel para obtenção de uma separação satisfatória (BORGES, GORAIEB, COLLINS, 2012). Isso deve ser levado em consideração durante a análise das metilxantinas (ARAGÃO et al, 2005; ARAGÃO et al, 2009) e também dos flavonoides. Deste modo, para a realização do planejamento composto central foi utilizada uma fase móvel acidificada composta por uma solução aquosa de ácido acético 0,1 % (CARILLO; LONDOÑO-LONDOÑO; GIL, 2014), com gradiente iniciado após 1 minuto de corrida (COUTINHO, 2015). Este procedimento reduziu o alargamento dos picos observado quando o gradiente com metanol é imediatamente iniciado. A Tabela 3 mostra as condições experimentais do planejamento composto central e as respectivas respostas expressas em resolução e tempo total de análise.

Tabela 3 - Planejamento composto central e as respectivas respostas expressas em resolução e tempo total de análise. Os valores codificados dos fatores são mostrados entre parênteses.

Experimento	Fatores			Resposta			
	MeOH (%)	TG (min)	V (mL min <sup>-1</sup> )	Rs T-CT	Rs CT-E	Rs E-CF	TA (min)
1	8,1 (-1)	8 (-1)	0,6 (-1)	1,44	1,69	1,34	14,19
2	31,9 (1)	8 (-1)	0,6 (-1)	0,64	1,16	1,25	13,59
3	8,1 (-1)	17 (1)	0,6 (-1)	1,75	2,34	1,09	17,80
4	31,9 (1)	17 (1)	0,6 (-1)	1,04	1,97	1,17	14,62
5	8,1 (-1)	8 (-1)	0,9 (1)	0,99	1,57	1,24	11,13
6	31,9 (1)	8 (-1)	0,9 (1)	0,78	1,39	1,12	9,73
7	8,1 (-1)	17 (1)	0,9 (1)	2,52	3,69	0,80	13,63
8	31,9 (1)	17 (1)	0,9 (1)	1,04	2,21	1,11	10,41
9	20 (0)	12,5 (0)	0,75 (0)	1,57	2,26	1,07	13,00
10	20 (0)	12,5 (0)	0,75 (0)	1,50	2,38	1,05	12,98
11	20 (0)	12,5 (0)	0,75 (0)	1,44	2,02	1,00	12,98
12	0 (-1,68)	12,5 (0)	0,75 (0)	1,51	2,02	1,07	14,76
13	40 (1,68)	12,5 (0)	0,75 (0)	0,85	1,54	1,22	11,07
14	20 (0)	5 (-1,68)	0,75 (0)	0,59	1,08	1,26	11,12
15	20 (0)	20 (1,68)	0,75 (0)	1,62	2,52	0,72	14,17
16	20 (0)	12,5 (0)	0,5 (-1,68)	1,29	1,70	1,14	17,71
17	20 (0)	12,5 (0)	1,0 (1,68)	1,39	2,26	1,04	10,50

MeOH (%) = concentração inicial de metanol; TG = tempo de gradiente; V = vazão da fase móvel; Rs T-CT = resolução entre teobromina e catequina, Rs CT-E = resolução entre catequina e epicatequina; Rs E-CF = resolução entre epicatequina e cafeína; TA = tempo de análise.

Através da matriz de planejamento gerada, foi possível realizar a modelagem utilizando o software Design Expert testando diferentes modelos e transformações matemáticas nas respostas originais, tais como:  $\sqrt{y}$ ,  $1/y$ ,  $1/\sqrt{y}$ ,  $\ln(y)$  e  $\log_{10}(y)$ , onde  $y$  se refere às respostas experimentais. Para as respostas  $R_s$  T-CT (resolução entre teobromina e catequina) e  $R_s$  E-CF (resolução entre epicatequina-cafeína), o modelo contendo termos lineares, quadráticos e interações de segunda ordem, usando como transformação matemática a aplicação da raiz quadrada como pré-tratamento nas respostas (em resolução) foi o que melhor se ajustou. No caso da resposta  $R_s$  CT-E (resolução entre catequina e epicatequina), o melhor ajuste foi obtido usando um modelo com termos lineares e interações entre as variáveis, empregando a raiz quadrada nas respostas originais. Para a resposta TA (tempo de análise) o modelo contendo termos lineares, quadráticos e interações entre variáveis foi o que melhor se ajustou, não havendo a necessidade de se empregar transformações matemáticas. Estes modelos, dentre todos os modelos testados, apresentaram valores de resíduos mais baixos, tornando-se adequados para fazer previsão das condições ótimas.

Com os modelos adequados, foi possível construir gráficos de Pareto de efeitos padronizados (Figura 6) para avaliar precisamente o efeito de cada fator sobre a resolução entre os pares de picos e também sobre o tempo de análise. Para a resolução entre os pares de picos teobromina e catequina foi possível observar os termos lineares dos fatores “porcentagem inicial de metanol” e o “tempo de gradiente” influenciaram significativamente na resolução dos picos. A porcentagem de metanol teve um efeito negativo na resposta, ou seja, o aumento do percentual de metanol leva a valores de resolução mais baixos para teobromina e catequina. Isto porque o metanol é um solvente de elevada força cromatográfica e o aumento de seu percentual na fase móvel durante o gradiente leva a uma redução no valor no fator de retenção dos analitos, reduzindo a interação dos compostos com a fase estacionária, e conseqüentemente, aumentando a velocidade de migração destes através da coluna. Como a teobromina e a catequina eluem em tempos de retenção próximos, o aumento da porcentagem de metanol acaba promovendo a coeluição entre estes dois analitos.

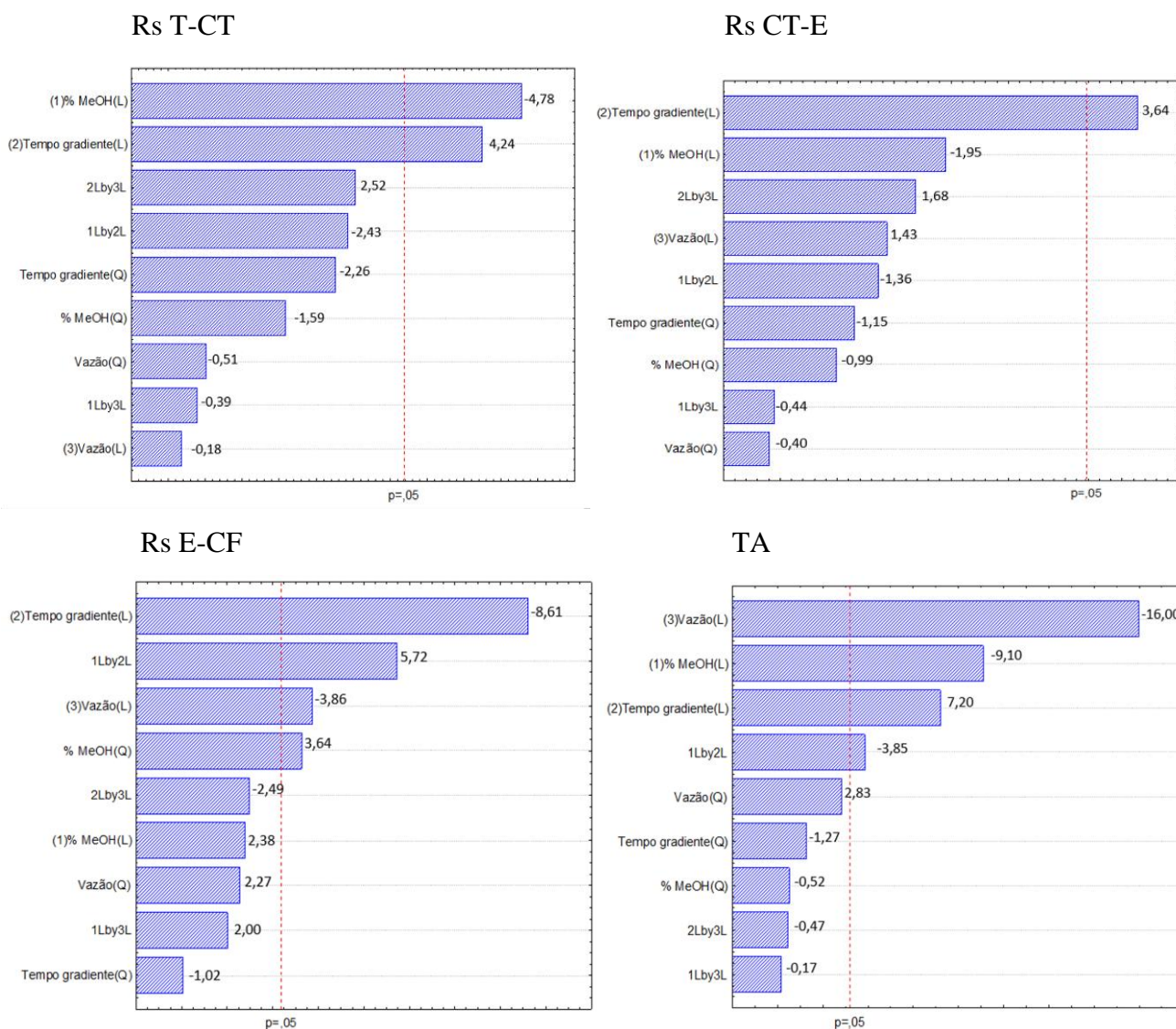


Figura 6. Gráficos de Pareto de efeitos padronizados das variáveis do planejamento composto central. Rs T-CT = resolução entre teobromina e catequina, Rs CT-E = resolução entre catequina e epicatequina; Rs E-CF = resolução entre epicatequina e cafeína; TA = tempo total de análise; MeOH (L) (%) = termo linear da concentração inicial de metanol; MeOH(Q)(%) = termo quadrático da concentração inicial de metanol; Tempo gradiente(L) = termo linear do tempo de gradiente; Tempo gradiente(Q) = termo quadrático do tempo de gradiente; Vazão(L) = termo linear da vazão da fase móvel; Vazão(Q) = termo quadrático da vazão da fase móvel;

O tempo de gradiente apresentou uma influência positiva na resolução entre os pares Rs T-CT e também entre a Rs CT-E. Com tempos de gradiente mais longos, o aumento da concentração de metanol na coluna ocorre de forma mais lenta e a interação entre os analitos e a fase estacionária é maior.

Em relação a resolução entre a Rs E-CF, observa-se que a porcentagem de metanol possui uma influência positiva na resolução. Estes dois analitos são mais fortemente retidos pela fase estacionária e também tem tempos de retenção próximos. O aumento da concentração de metanol, contribui para eluição da epicatequina, que interage menos com a

fase estacionária comparada a cafeína. Em contrapartida, tempos de gradientes mais longos e vazão mais rápida influenciam negativamente na resolução, contudo, um ajuste nos dois parâmetros pode contornar esta situação. Tempos de gradiente mais curtos, em que o metanol é adicionado mais rapidamente na coluna contribuem para separação entre a epicatequina e cafeína. Este fato é comprovado pela influência positiva da interação entre os fatores de termos lineares metanol e tempo de gradiente.

Os termos lineares dos fatores “porcentagem de metanol” e “vazão da fase móvel” influenciaram negativamente na resposta TA. Isto é desejável, pois eleva a frequência analítica devido ao menor tempo gasto durante a análise. Aumentando-se a vazão e a concentração de metanol, os analitos interagem menos com a fase estacionária e são eluidos rapidamente, reduzindo o tempo de análise, entretanto, isto leva a separações mais pobres. O tempo de gradiente influencia positivamente na resposta, porque um tempo de gradiente mais longo aumenta o tempo total de análise.

O gráfico apresentado na Figura 7 de valores observados experimentalmente *versus* valores preditos para cada modelo mostram, de modo geral, um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Os coeficientes de determinação,  $R^2$ , para as respostas Rs T-CT, Rs CT-E, Rs E-CF e TA, foram 0,9051, 0,8366, 0,8759 e 0,9695, respectivamente, mostrando que a maior parte da variação em torno dos dados são descritos pelas respectivas equações de regressão. Os gráficos de valores preditos *versus* resíduos mostram que os resíduos se distribuem aleatoriamente. O procedimento de se realizar uma transformação matemática na resposta original antes da modelagem (como no caso destes modelos, onde para três das quatro respostas efetuou-se a raiz quadrada das respostas originais) promoveu uma redução no valor dos resíduos, melhorando o ajuste do modelo sem a necessidade de se empregar termos mais complexos. Tal procedimento já é bem difundido e empregado na literatura (QAZI *et al.*, 2003; COUTO *et al.*, 2009; MAHAPOONYANONT *et al.*, 2010; LEE; DURBÁN; EILERS, 2013).



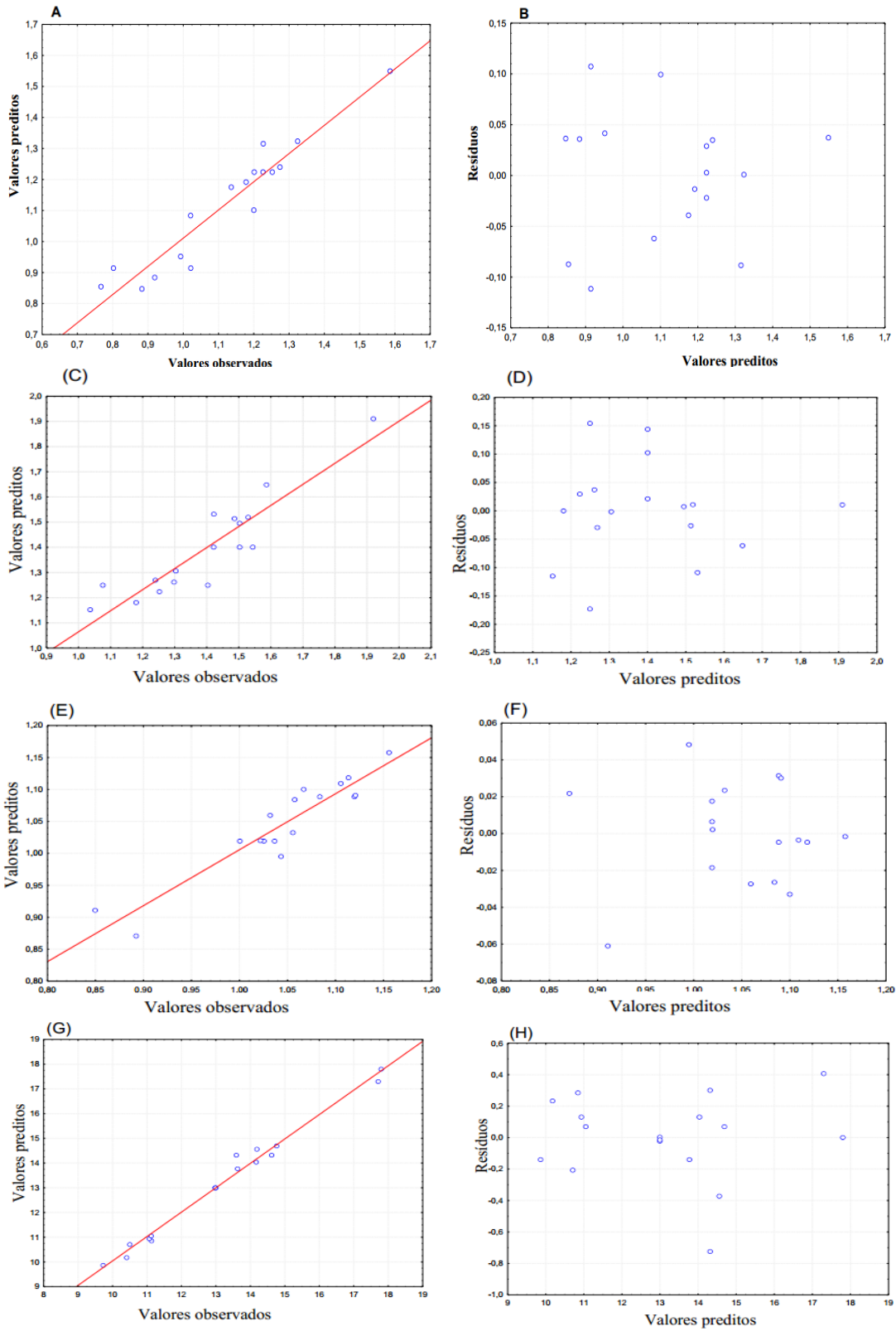


Figura 7. Gráficos de valores observados versus preditos e valores preditos versus resíduos para cada uma das respostas avaliadas. Os gráficos A e B se referem a resposta resolução entre teobromina e catequina (Rs T-CT); (C) e (D) a resolução entre catequina e epicatequina (Rs CT-E); (E) e (F) se referem a resolução entre epicatequina e cafeína (Rs E-CF) e (G) e (H) a resposta tempo de análise (TA).

Levando-se em consideração que não houve anormalidade na distribuição dos resíduos, os modelos matemáticos obtidos foram submetidos a validação através da Análise de Variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Um resumo da ANOVA com os valores do teste F para regressão e falta de ajuste são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para as respostas avaliadas.

Resposta	Regressão		Falta de ajuste	
	$MQ_R/MQ_r$ ( $gl_{MQ_R, MQ_r}$ )	F 95 %	$MQ_{faj}/MQ_{ep}$ ( $gl_{MQ_{faj}, MQ_{ep}}$ )	F 95 %
Rs T-CT	7,76 (9;7)	3,68	1,12 (4;3)	9,12
Rs CT-E	8,33 (6;10)	3,22	0,41 (7;3)	8,89
Rs E-CF	5,49 (9;7)	3,68	6,12 (4;3)	9,12
TA	57,15 (9;7)	3,68	0,95 (4;3)	9,12

$MQ_R/MQ_r$  ( $gl$ ) = média quadrática da regressão/média quadrática residual (graus de liberdade);  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  = média quadrática da falta de ajuste/média quadrática do erro puro (graus de liberdade); F 95 % = valor crítico de F ao nível de 95 % de confiança nos respectivos graus de liberdade.

Os valores da razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática residual,  $MQ_R/MQ_r$ , são maiores que o valor crítico de F ao nível de 95 % de confiança para os respectivos graus de liberdade. Isto significa que a regressão é estatisticamente significativa. Não houve evidência de significância da falta de ajuste ao nível de 95 % de confiança, uma vez que o valor da razão  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  foi inferior ao valor crítico de F. Deste modo, todos os modelos testados mostraram-se válidos para fazer previsões.

Os coeficientes dos modelos e seus respectivos erros-padrão são mostrados na Tabela 5. Como os erros-padrão são muito menores do que os coeficientes do modelo, estes coeficientes são estatisticamente significativos.

Tabela 5 - Coeficiente dos modelos matemáticos com seus respectivos erros-padrão. Os termos que não foram estatisticamente significativos não foram mostrados.

Resposta	Rs T-CT	Rs CT-E	Rs E-CF	TA
	Coeficiente $\pm$ erro-padrão			
Média global	$1,22 \pm 0,05$	$1,40 \pm 0,04$	$1,02 \pm 0,01$	$13,00 \pm 0,24$
MeOH(%)	$-0,13 \pm 0,03$	-	-	$-1,12 \pm 0,12$
TG	$0,11 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,04$	$-0,05 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,12$
Vazão	-	-	$-0,024 \pm 0,006$	$-1,96 \pm 0,12$
MeOH <sup>2</sup> (%)	-	-	$0,023 \pm 0,006$	-
MeOH(%) x TG	-	-	$0,05 \pm 0,01$	$-0,65 \pm 0,17$

Rs T-CT = resolução entre teobromina e catequina; Rs CT-E = resolução entre catequina e epicatequina; Rs E-CF = resolução entre epicatequina e cafeína; TA = tempo total de análise; MeOH(%) = termo linear para a porcentagem inicial de metanol; TG = termo linear para o tempo de gradiente; Vazão = termo linear para a

vazão;  $\text{MeOH}^2(\%)$  = termo quadrático para a porcentagem inicial de metanol; AB = termo de interação entre os fatores  $\text{MeOH}(\%) \times \text{TG}$ .

Com a obtenção de modelos validados, foi possível prever a melhor condição de separação, ou seja, a condição que melhor se adequa aos parâmetros definidos como desejáveis.

#### 4.1.1 Determinação das condições desejáveis e obtenção do ponto ótimo

A avaliação das condições desejáveis foi inicialmente conduzida observando-se os valores de resolução na Tabela 2 e simultaneamente realizando a inspeção visual dos cromatogramas buscando verificar a melhor separação em cada condição experimental testada. Para os pares de picos T-CT, CT-E e E-CF os valores de resolução variaram de 0,59 a 2,52, 1,08 a 3,69 e 0,72 a 1,34, respectivamente. Verificou-se que em uma resolução superior a 1,04 todos os picos se separavam completamente. Deste modo, para a respostas Rs T-CT, Rs CT-E e E-CF, estabeleceu-se como desejável um valor de resolução situado entre 1,3 a 2,0, 1,5 a 2,5 e 1,3 a 1,5 para cada resposta respectivamente. Não foram desejáveis resoluções com valores mais elevados devido à elevação do tempo de análise necessário para contemplar tais resoluções. Para a resposta TA (tempo de análise), cuja variação foi de 9,73 a 17,8 minutos, foi estabelecido como desejável o valor mínimo dentro deste intervalo que atendesse também aos intervalos desejáveis para as três resoluções. Este procedimento visou obter melhor separação no menor tempo possível.

Para determinação do ponto ótimo, ou seja, da melhor condição de separação, empregou-se a função desejabilidade desenvolvida por Deringer e Suich (1980) que analisa múltiplas respostas simultaneamente. Com auxílio do software Design Expert foram estabelecidos diferentes graus de importância (que varia de um a cinco) às respostas, onde para as respostas Rs T-CT, Rs CT-E e E-CF foi atribuído grau de importância igual a três e, para o tempo de análise, o grau cinco de importância. Pelo fato de haver somente três pares de picos, deu-se maior importância para o tempo de análise.

Com a análise dos dados, o software encontrou uma região experimental teórica que atendesse o máximo possível as condições determinadas como desejáveis. A solução prevista pelo software mostrou os seguintes valores de teóricos de resolução considerados como desejáveis: 1,30, 1,83 e 1,30 para a Rs T-CT, Rs CT-E, Rs E-CF, respectivamente. O tempo mínimo de análise para a obtenção destes valores de resolução foi de 13,6 minutos.

As condições experimentais teóricas para obtenção destes valores foram: concentração inicial de metanol em 0 % (iniciando com 100 % de solução de ácido acético 0,1 %), mantendo essas condições até o minuto 1, posteriormente mudando para 100 % de metanol no tempo de gradiente de 9,85 minutos, com vazão da fase móvel de 0,74 mL min<sup>-1</sup>. Essas condições levaram a um valor de desejabilidade igual a 1,000 para a variável resolução entre os pares de picos Rs T-CT, Rs CT-E, Rs E-CF, mostrando que todas as condições determinadas como desejáveis foram atendidas (Figura 8). Entretanto, para a variável tempo de análise, as condições consideradas como desejáveis não foram totalmente atendidas, o que levou a valores de desejabilidade intermediários entre 0,000 e 1,000. Deve-se levar em consideração que os valores de resolução se tornam menores com a redução do tempo de análise, logo, o tempo de 13,6 minutos foi o tempo necessário para obtenção de todos os picos separados.

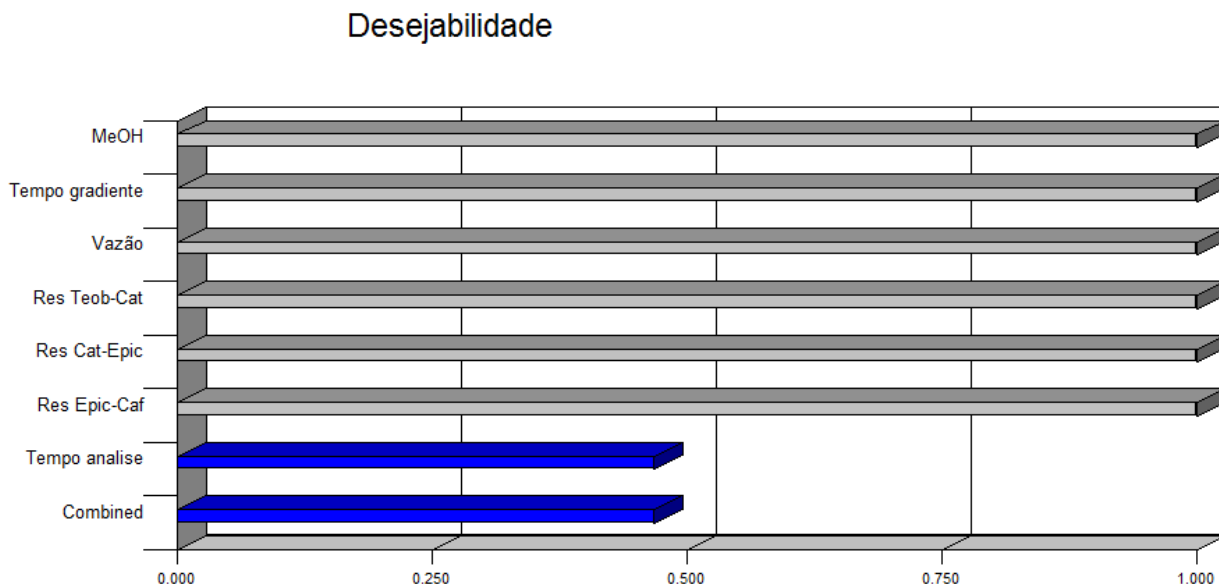


Figura 8. Gráfico de valores de desejabilidade para as respostas analisadas. MeOH = concentração inicial de metanol; Rs Teob-Cat = resolução entre a teobromina e a catequina; Rs Cat-Epic = resolução entre a catequina e a epicatequina; Rs Epic-Caf = resolução entre a epicatequina e a cafeína; combined = desejabilidade combinada.

Para avaliar a capacidade de previsão dos modelos matemáticos, foi realizada uma injeção em triplicada nas condições estabelecidas como desejáveis. Os valores de resolução e tempo de análise obtidos experimentalmente foram comparados com os valores teóricos da condição desejável. Os dados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Comparação entre os valores teóricos e os valores médios reais (experimentais) com intervalo de confiança ao nível de 95 %.

Resposta	Valor teórico	Valor real $\pm$ IC
Rs T-CT	1,30	1,30 $\pm$ 0,88
Rs CT-E	1,83	1,83 $\pm$ 0,05
Rs E-CF	1,30	1,28 $\pm$ 0,34
TA	13,43	13,87 $\pm$ 0,09

Rs T-CT = resolução entre teobromina e catequina, Rs CT-E = resolução entre catequina e epicatequina; Rs E-CF = resolução entre epicatequina e cafeína; TA = tempo total de análise; IC = intervalo de confiança.

De acordo com os dados da Tabela 6, pode-se verificar que as diferenças entre os valores teóricos e reais são muito pequenas, provando que os modelos avaliados tem boa capacidade de previsão. O cromatograma dos padrões injetados nas condições desejáveis é mostrado na Figura 9.

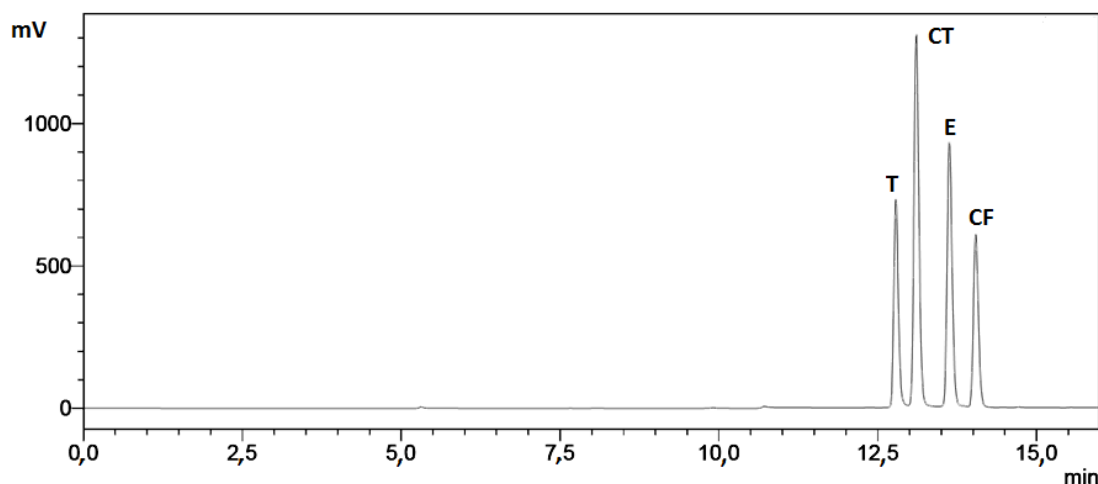


Figura 9. Cromatograma mostrando a separação das metilxantinas (cafeína e teobromina) e os polifenóis (catequina e epicatequina). T = teobromina, tempo de retenção (TR) 12,7 min; CT= catequina, TR 13,1 min; E = epicatequina, TR 13,6 min e CF= cafeína, TR 13,9 min.

A análise do cromatograma da Figura 9 mostra que a separação total de todos os pares de picos foi alcançada em um tempo de 13,9 minutos. Os picos obtidos possuem menor largura de base e são simétricos, mostrando melhora na eficiência da separação. Isso confere uma elevada sensibilidade e também maior precisão na integração das áreas. Essas características desejáveis podem ser atribuídas em parte ao uso da fase móvel acidificada com ácido acético 0,1 %, muito empregada para separação de solutos ácidos ou básicos (BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012).

No caso das metilxantinas, que são consideradas bases fracas (os valores de  $pK_a$  para teobromina e cafeína são de 10,5 e 14 respectivamente), a redução do pH da fase móvel para um valor inferior ao  $pK_a$  faz com que estas moléculas estejam em sua forma ionizada devido a protonação do nitrogênio do anel imidazólico, havendo um aumento de carga positiva nessa região (BISPO *et al.*, 2002). Deste modo, considerando a relação sigmoideal entre o fator de retenção e o pH para bases fracas, ocorre um aumento da interação destas moléculas com a fase móvel que tem elevada polaridade e, conseqüentemente, uma redução no fator de retenção. Devido a isso, as moléculas mais ionizadas tendem a ser eluidas primeiro (IVANOVIĆ *et al.*, 1995; ARAGÃO, *et al.*, 2009).

Comparando-se os dois pares de pico teobromina ( $pK_a$  de 10,5) e catequina ( $pK_{a1}$  de 8,68), verifica-se que sendo mais básica, a teobromina se encontra mais ionizada, o que garante uma maior interação com o solvente se comparado a catequina, e portanto, é eluída mais rapidamente. A catequina por sua vez, tem uma acidez maior e sua ionização é suprimida em meio ácido. Portanto, não se tem uma densidade de carga pronunciada em sua estrutura e sua interação com a fase estacionária aumenta. No caso dos pares epicatequina-cafeína, observa-se que estruturalmente a cafeína possui maior quantidade de substituintes metila, o que aumenta sua interação com a fase estacionária e, apesar de ter um maior valor de  $pK_a$  do que a epicatequina ( $pK_{a1}$  de 8,91) (HERRERO-MARTINEZ *et al.*, 2005), é mais fortemente retida. Deste modo, verifica-se que além do fator de retenção, o fator de seletividade dos compostos também é alterado.

#### **4.2 Estudo e otimização multivariada da extração de metilxantinas por partição com solvente**

Dentre os seis solventes avaliados (clorofórmio, éter de petróleo, hexano, éter etílico, diclorometano e acetato de etila), os que apresentaram melhor potencial de extração para a cafeína e a teobromina foram: clorofórmio, diclorometano e acetato de etila (Figura 10). As áreas dos picos foram normalizadas dividindo-se os valores de área pelas respectivas massas das amostras. Solventes apolares, como hexano e éter de petróleo não extraíram quantidades significativas de teobromina e cafeína. Isso porque, as metilxantinas são bases fracas e possuem substituintes em sua estrutura que conferem à molécula um momento de dipolo diferente de zero. Deste modo, poucas interações ocorrem entre as moléculas do solvente e as moléculas das metilxantinas, tornando a solubilidade mínima.

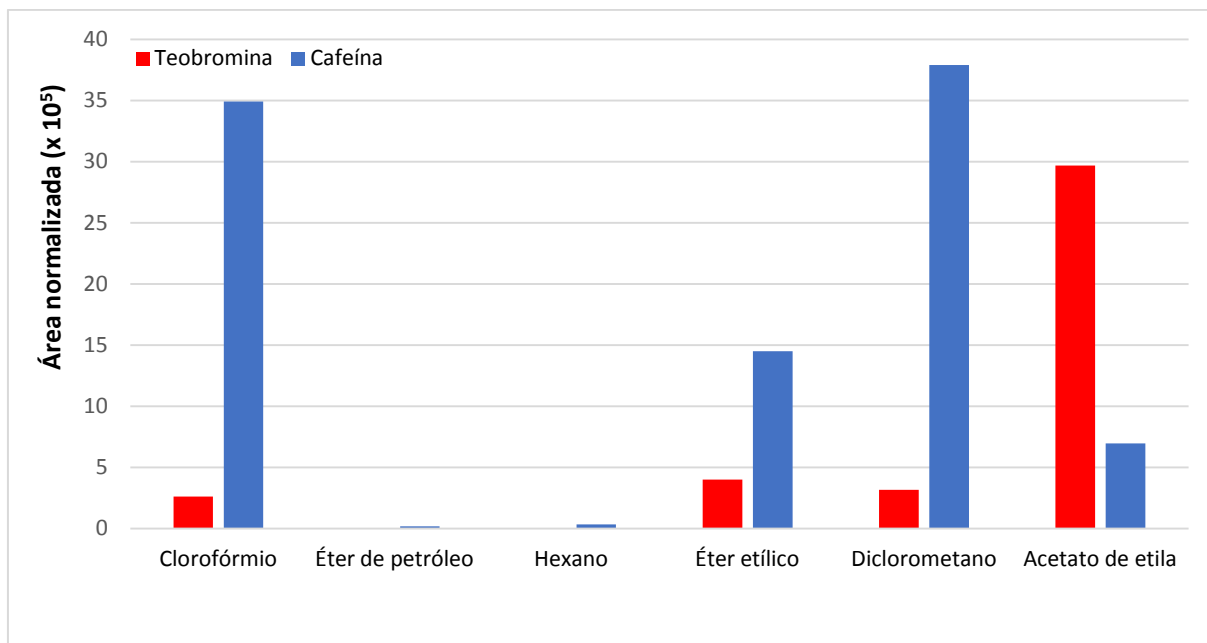


Figura 10. Gráfico de barras mostrando a eficiência dos solventes na extração da teobromina e cafeína.

Quantidades significativas de cafeína e teobromina foram extraídas com uso do éter etílico, entretanto, o clorofórmio e diclorometano mostram-se mais eficientes. Estes solventes organoclorados possuem polaridade intermediária e por isso apresentam um potencial maior para extração da cafeína, que devido ao maior grau de alquilação (presença de grupos metila (nas posições 1,3 e 7) (Figura 11) se torna mais solúvel nestes tipos de solventes (SHAW, 1984).



Figura 11. A) Estrutura química da cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) e B) estrutura química da teobromina (3,7 – dimetilxantina). Fonte: Bispo et al. (2002).

A teobromina por sua vez, devido à ausência de um grupo metila e a presença de um hidrogênio no anel pirimidínico, se solubiliza melhor em acetato de etila, que possui uma polaridade maior que os demais solventes. Detalhes sobre as propriedades físicas dos solventes são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7- Propriedades físico-químicas de alguns solventes utilizados na extração das metilxantinas. Adaptado de Sarker, Latif e Gray (2006).

<b>Solvente</b>	<b>Índice de Polaridade</b>	<b>Ponto de ebulição (°C)</b>	<b>Viscosidade (cPoise)</b>	<b>Solubilidade em água (%)</b>
Diclorometano	3,1	41	0,44	1,6
Clorofórmio	4,1	61	0,57	0,815
Acetato de etila	4,4	77	0,45	8,7
Hexano	0,0	69	0,33	0,001
Diclorometano	3,1	41	0,44	1,6

O método de extração líquido-líquido utilizando uma partição com solventes imiscíveis constitui uma importante técnica para extração de alcaloides, como as metilxantinas. Devido à elevação do pH da fase aquosa pelo uso da solução de hidróxido de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , as metilxantinas (que são bases fracas) apresentaram-se em sua forma neutra e, portanto, mostraram uma maior afinidade pelos respectivos solventes orgânicos em comparação com a fase aquosa. Os demais compostos naturalmente presente no chocolate (fenólicos e ácidos orgânicos) adquiram carga negativa devido a ionização em meio básico, permanecendo em meio aquoso (VERPOORTE, 2000). Este método de extração é particularmente importante quando se deseja reduzir a quantidade de interferentes na análise cromatográfica.

A etapa seguinte consistiu em otimizar o procedimento de extração através de um planejamento de misturas centroide-simplex com os solventes acetato de etila, clorofórmio e diclorometano. Este tipo de planejamento permite verificar se a interação entre dois e até mesmo três componentes na mistura provoca um aumento na extração dos analitos.

Os dados experimentais do planejamento de misturas são mostrados na Tabela 8. Em relação à resposta Teobromina, os maiores valores em área de pico foram observados com o uso do solvente acetato de etila puro (experimento 1) e também com o emprego de uma mistura (1:1) de acetato de etila e clorofórmio (experimento 6). As misturas binárias entre clorofórmio e acetato de etila, clorofórmio e diclorometano e acetato de etila e diclorometano apresentaram efeitos sinérgicos, uma vez que os valores de área de pico dessas misturas foram maiores do que a média de seus componentes puros. Estes efeitos sinérgicos também são observados nas misturas ternárias dos experimentos 7 e 8, onde predomina o acetato de etila e o clorofórmio, respectivamente.



Tabela 8 – Dados experimentais do planejamento de misturas centroide-simplex. As respostas foram normalizadas efetuando-se a razão entre a área do pico e a massa da amostra.

Experimento	Variáveis			Resposta	
	Acetato de etila	Clorofórmio	Diclorometano	Teobromina	Cafeína
1	1	0	0	16537837	6556987
2	0	1	0	8318390	8216109
3	0	0	1	1847863	7820182
4	0	0,5	0,5	10197340	7982576
5	0,5	0	0,5	15044317	6373952
6	0,5	0,5	0	16710854	6437436
7	0,66	0,17	0,17	13736822	5546623
8	0,17	0,66	0,17	14305613	7828564
9	0,17	0,17	0,66	6746598	7366164
10	0,33	0,33	0,33	7917175	7434170
11	0,33	0,33	0,33	5803851	7483330
12	0,33	0,33	0,33	5836681	6625589
13	0,33	0,33	0,33	5420485	7723434

Para a resposta Cafeína, o emprego do clorofórmio puro (experimento 2) resultou no maior valor de resposta, não sendo observados efeitos sinérgicos nas misturas binárias e ternárias.

Os modelos gerados pelo planejamento da Tabela 8 foram testados sequencialmente pela ANOVA ( $p < 0,05$ ), iniciando-se pelo modelo linear, posteriormente o quadrático e o cúbico especial. Para a resposta Teobromina, tanto o modelo linear quanto o modelo quadrático apresentaram falta de ajuste significativa, e, portanto, não se mostraram válidos. Ao testar um modelo cúbico especial, verificou-se que este se ajustou melhor aos dados experimentais, com regressão significativa, onde o valor  $MQ_R/MQ_T$  foi de 8,55, superior ao valor crítico de F (4,28) ao nível de 95 % de confiança, não havendo evidência de significância da falta de ajuste. Os gráficos da Figura 12 evidenciam a qualidade do ajuste de cada modelo.

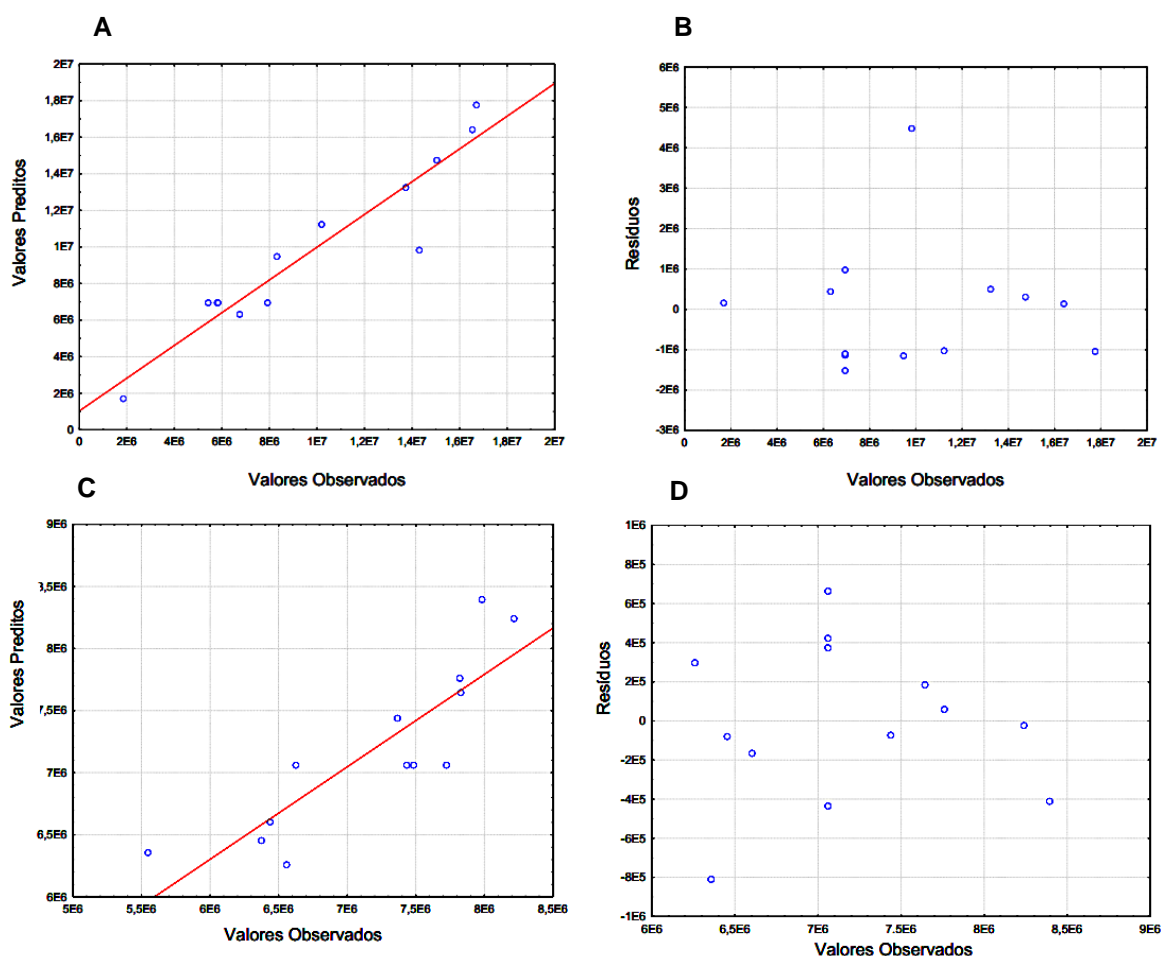


Figura 12. Gráficos de valores observados *versus* preditos e valores preditos *versus* resíduos para cada uma das respostas avaliadas. Os gráficos A e B se referem ao modelo cúbico especial ajustado para a resposta Teobromina,  $R^2 = 0,8953$ . Os gráfico C e D referem-se ao modelo quadrático ajustado para a Cafeína,  $R^2 = 0,7448$ .

Para a resposta Cafeína foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico especial. Dentre todos estes, o modelo quadrático foi o que melhor se ajustou, com regressão significativa e sem evidência de significância da falta de ajuste (Tabela 9), contudo, os gráficos de valores preditos *versus* valores observados e o gráfico de resíduos da Figura 12 mostram que o modelo apresenta uma capacidade de previsão razoavelmente eficiente e deixa uma quantidade considerável de resíduos. Entretanto, o percentual de erro nas previsões com resíduos de valores mais elevados foram inferiores a 12,7 %, sendo considerado aceitável.

Os dados resumidos da ANOVA para os modelos ajustados para as duas respostas são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resumo da ANOVA dos modelos avaliados para as respostas Teobromina e Cafeína.

Resposta	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F(F <sub>crítico95 %</sub> )	P
Teobromina	Modelo Cúbico Especial	2,557894 x 10 <sup>14</sup>	6	4,263156 x 10 <sup>13</sup>	8,55 (4,28)	0,009744
	Resíduo	2,990542 x 10 <sup>13</sup>	6	4,984237 x 10 <sup>12</sup>		
	Falta de ajuste	2,606809 x 10 <sup>13</sup>	3	8,689364 x 10 <sup>12</sup>	6,79 (9,28)	0,074955
	Erro puro	3,837330 x 10 <sup>12</sup>	3	1,279110 x 10 <sup>12</sup>		
	Total	2,856948 x 10 <sup>14</sup>	12	2,380790 x 10 <sup>13</sup>		
Cafeína	Modelo Quadrático	5,659897 x 10 <sup>12</sup>	5	1,131979 x 10 <sup>12</sup>	4,09 (3,97)	0,046802
	Erro total	1,939129 x 10 <sup>12</sup>	7	2,770184 x 10 <sup>11</sup>		
	Falta de ajuste	1,254498 x 10 <sup>12</sup>	4	3,136245 x 10 <sup>11</sup>	1,40 (9,12)	0,413362
	Erro puro	6,846309 x 10 <sup>11</sup>	3	2,282103 x 10 <sup>11</sup>		
	Total	7,599026 x 10 <sup>12</sup>	12	6,332521 x 10 <sup>11</sup>		

SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = valor de F calculado; F crítico 95 % = valor de F tabelado ao nível de 95 % de confiança; P < 0,05 = valor de P inferior a 5 %.

Em relação a resposta Teobromina, o modelo cúbico especial ajustado é mostrado na Equação 12. Somente os termos estatisticamente significativos são mostrados.

$$T = 1,6 \times 10^7 \text{ AcEt} + 9,5 \times 10^6 \text{ CFL} - 2,5 \times 10^8 \text{ AcEt} \times \text{CLF} \times \text{DCM} \quad (12)$$

Onde: T é a resposta prevista para teobromina;

AcEt e CLF são os termos lineares referentes aos componentes acetato de etila e clorofórmio, respectivamente;

AcEt x CLF x DCM é o termo de interação ternária referente aos componentes acetato de etila, clorofórmio e diclorometano.

De acordo com a Equação 12, verifica-se que os termos lineares AcEt e CFL foram significativos, entretanto, um maior valor de área de pico é obtido com o uso do AcEt puro. Apesar de existir interações sinérgicas entre misturas binárias e ternárias onde predomina acetato de etila e clorofórmio, os coeficientes destes termos não foram estatisticamente significativos e, portanto, não foram inseridos na equação do modelo. O valor negativo resultante da interação entre os três componentes mostra uma forte interação antagônica entre a mistura dos três solventes em proporções iguais, contribuindo para redução do valor da resposta.

A Figura 13 mostra as curvas nível obtidas para a extração da teobromina e da cafeína, a máxima extração para teobromina é obtida com o uso do acetato de etila puro. Avaliando-se

as curvas de nível para Cafeína obtidas a partir de um modelo quadrático, observa-se que se tem uma região de máxima resposta que engloba os componentes puros da mistura, ou seja, diclorometano (DCM) e clorofórmio (CLF) situados nos vértices do triângulo e os termos de interação situados nos lados do triângulo, que se refere a uma mistura (1:1) dos dois solventes. Isso mostra que o modelo quadrático é realmente adequado já que é capaz de descrever a variação nas respostas resultante dos componentes puros e das interações binárias entre estes componentes, contudo, analisando-se os valores dos coeficientes dos modelos para a resposta Cafeína, verificou-se que os termos de interações entre os componentes da mistura não são significativos e a resposta máxima tende ao componente puro clorofórmio. A equação do modelo quadrático ajustado para a resposta Cafeína (CF) é mostrada na Equação 13.

$$CF = 6,3 \times 10^6 \text{ AcEt} + 8,2 \times 10^6 \text{ CLF} + 7,8 \times 10^6 \text{ DCM} \quad (13)$$

Onde: CF é a resposta prevista para cafeína;

AcEt, CLF e DCM são os termos lineares referentes aos componentes acetato de etila, clorofórmio e diclorometano, respectivamente;

De acordo com a equação, somente os termos lineares foram significativos, sendo que o elevado valor do coeficiente CLF indica que o uso do clorofórmio puro contribui para o aumento da extração da cafeína.

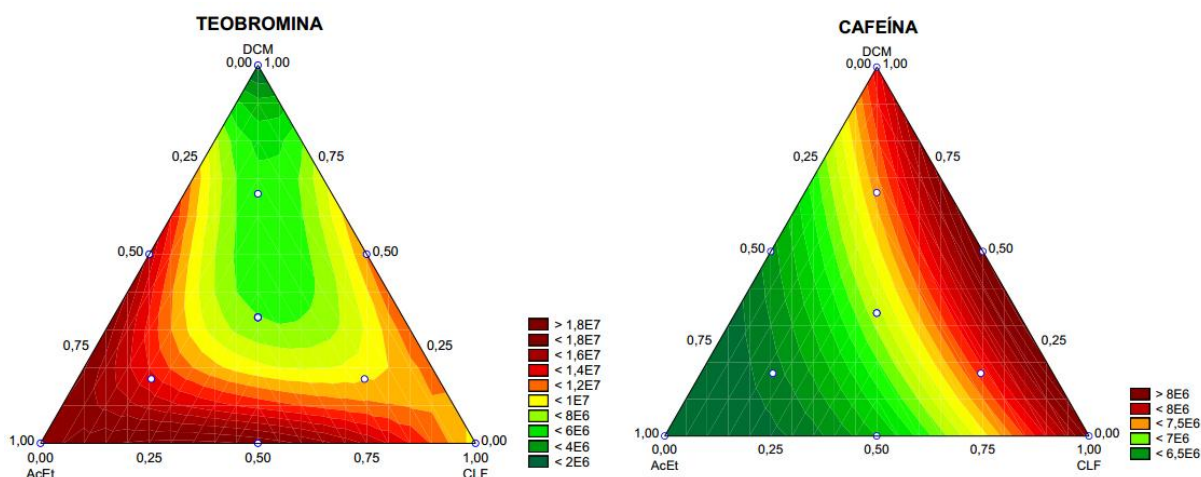


Figura 13. Curvas de nível referentes ao modelo cúbico especial ajustado para Teobromina e quadrático ajustado para cafeína. AcEt = solvente acetato de etila; DCM = solvente diclorometano; CLF = solvente clorofórmio. A região de cor vermelha em cada gráfico é a região de máxima resposta ou região ótima. As cores mais claras são as regiões onde a resposta tem valores mínimos.

Considerando a extração simultânea da teobromina e da cafeína, foi observado que cada analito possuía um solvente diferente como melhor extrator e, diante deste impasse, foi proposta uma extração exaustiva empregando o acetato de etila e o clorofórmio. Como pode ser visto na Figura 14, além de se mostrar um solvente melhor para a extração da teobromina, o acetato de etila também se mostrou eficiente para extração da cafeína, extraindo quantidades similares ao clorofórmio na primeira extração com 40 mL do solvente e quantidades superiores nas extrações subsequentes.

Os alcaloides não são compostos muito estáveis e sua estabilidade é influenciada pela temperatura e também pelo tipo de solvente utilizado. Apesar de mostrarem-se bons solventes para extração de alcaloides, os organoclorados clorofórmio e diclorometano podem promover formação de artefatos através da *N*-oxidação. A estabilidade destes compostos é maior em solventes como acetato de etila, soluções alcoólicas e tolueno (VERPOORTE, 2000). Deste modo, optou-se pelo uso do acetato de etila para os ensaios seguintes, já que apresenta vantagens interessantes em relação ao clorofórmio, como baixa toxicidade e maior ponto de ebulição.

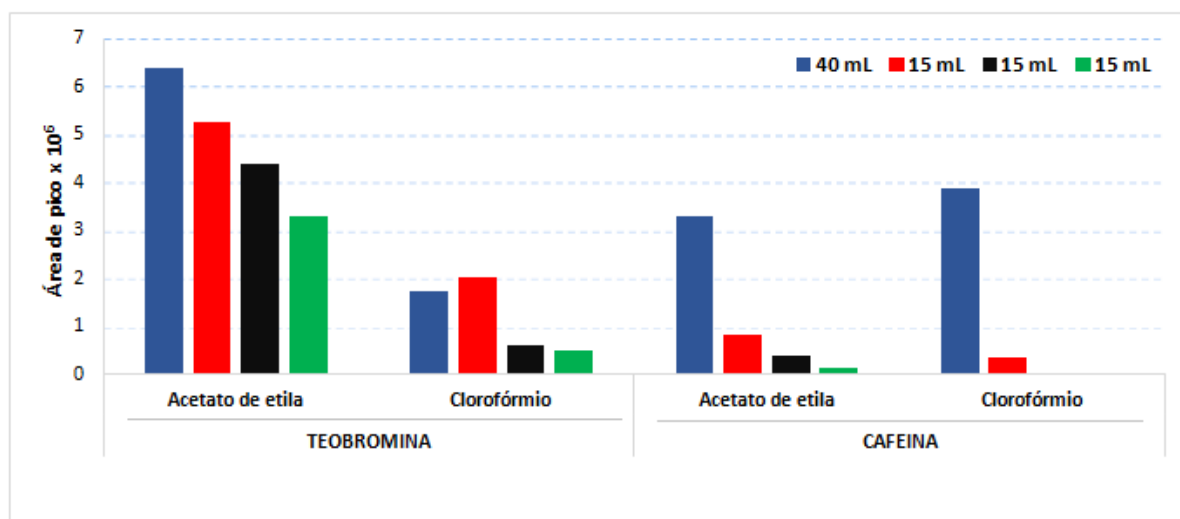


Figura 14. Avaliação da eficiência dos solventes acetato de etila e clorofórmio na extração exaustiva da teobromina e da cafeína. As respostas são fornecidas em área de pico normalizada.

A concentração de teobromina no cacau e no chocolate é quase 10 vezes maior do que a concentração de cafeína (CARRILLO; LONDOÑO-LONDOÑO; GIL, 2014; FRANCO; OÑATIBIA-ASTIBIA; MARTÍNEZ-PINILLA, 2013; SRDJENOVIC *et al.*, 2008). Deste modo, para extrair mais eficientemente a teobromina foi necessário reduzir gradualmente os valores de massa de chocolate e aumentar o volume de acetato de etila utilizado.

No segundo ensaio, onde foi utilizada uma massa de 100 mg de amostra, a porcentagem de extração para teobromina e cafeína foi de 88,6 e 98,5 %, respectivamente. No terceiro ensaio, com a redução da massa da mostra para 50 mg, as porcentagens aumentaram para 92,0 e 99,9 %, sendo consideradas satisfatórias. Deste modo, adotou-se o terceiro ensaio (50 mg de amostra e três extrações, sendo a primeira com 60 mL e mais três com 15 mL de acetato de etila) como procedimento de extração.

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração adotado, o experimento foi repetido em uma amostra certificada de chocolate, onde os valores determinados para a teobromina e cafeína foram  $10804 \pm 1026 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $1058 \pm 87 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores não foram estatisticamente diferentes dos valores certificados, os quais foram  $11600 \pm 1100 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $1060 \pm 50 \text{ mg kg}^{-1}$  para a teobromina e cafeína, respectivamente.

#### **4.3 Estudo e otimização da extração dos flavonoides assistida por ultrassom**

Solventes de média e alta polaridade como acetona, metanol, etanol e água são mais frequentemente utilizados para extração de flavonoides, como as catequinas e epicatequinas devido a elevada solubilidade destes compostos em solventes polares (GADKARI; BALARAMAN, 2015). Entretanto, o uso de misturas de solventes tem se mostrado mais eficiente do que o uso de solventes puros (SARKER; LATIF; GRAY, 2006). Em função destas características, foi aplicado um planejamento de misturas (Tabela 10) para escolha do solvente extrator utilizado para extração da catequina e da epicatequina, que foi realizado nas seguintes condições: temperatura de 35 °C, porcentagem da potência do ultrassom em 70 %, e tempo de 10 minutos e 30 segundos.

De acordo com os dados da Tabela 10 é possível verificar que os maiores valores de área de pico foram obtidos com uma mistura 1:1 de água e acetona (experimento 4) e com misturas ternárias de proporções iguais de cada solvente, como observado nas repetições do ponto central (experimentos 10, 11, 12 e 13). Em relação aos componentes puros, pode-se verificar que a água apresentou o melhor desempenho na extração da catequina e da epicatequina quando comparada à acetona ou metanol, contudo, os efeitos sinérgicos são observados nas misturas binárias e ternárias, mostrando que a mistura entre os componentes puros melhora a extração destes analitos.

Tabela 10 – Planejamento de misturas centroide simplex de três componentes para extração da catequina e epicatequina. A resposta é dada em área de pico normalizada.

Experimento	Variáveis			Respostas	
	Metanol	Acetona	Água	Catequina	Epicatequina
1	1	0	0	316732	886344
2	0	1	0	57643	855098
3	0	0	1	856922	1562810
4	0	0,5	0,5	1226467	2414796
5	0,5	0	0,5	752833	1713736
6	0,5	0,5	0	543721	1121214
7	0,66	0,17	0,17	870583	1966363
8	0,17	0,66	0,17	953537	2253741
9	0,17	0,17	0,66	638636	961756
10	0,33	0,33	0,33	1082296	2023954
11	0,33	0,33	0,33	1188794	2358299
12	0,33	0,33	0,33	1206274	2407694
13	0,33	0,33	0,33	1094437	2168029

Para avaliar quantitativamente os efeitos dos componentes da mistura e suas interações na resposta, os dados experimentais foram submetidos a ANOVA ( $p < 0,05$ ) para construção e validação dos modelos matemáticos. Para a resposta Catequina, foram testados sequencialmente o modelo linear, quadrático e cúbico especial. O modelo linear não foi significativo e apresentou falta de ajuste significativa. Ao ajustar um modelo quadrático aos dados experimentais, observou-se que o mesmo apresentou regressão significativa com valor de  $MQ_R/MQ_T$  igual a 21,09 e  $R^2$  igual a 0,9462, não havendo evidência de significância da falta de ajuste ao nível de 95 % de confiança ( $p = 0,2568$ ).

Mesmo com o ajuste do modelo quadrático, optou-se pelo uso do modelo cúbico especial. O valor da razão  $MQ_R/MQ_T$  passou de 21,09 (modelo quadrático) para 38,20 (modelo cúbico especial) e o valor de  $R^2$  de 0,9462 para 0,9789, mostrando que uma grande parte da variação dos dados passou a ser explicada pela regressão devido à adição dos termos cúbicos (Tabela 11). Não houve evidência de significância de falta de ajuste com o modelo cúbico especial e, devido ao melhor ajuste obtido, optou-se por este modelo para realizar as previsões.

Tabela 11 – Resumo da ANOVA dos modelos avaliados para as respostas Catequina e Epicatequina. Os modelos estatisticamente significativos apresentam-se destacados.

<b>Resposta</b>	<b>Fonte de variação</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F(F<sub>crítico95 %</sub>)</b>	<b>p</b>
Catequina	Modelo cúbico especial	1,659353 x 10 <sup>12</sup>	6	2,765589 x 10 <sup>11</sup>	38,20 (4,95)	0,000509
	Resíduo	3,619640 x 10 <sup>10</sup>	5	7,239280 x 10 <sup>9</sup>		
	Falta de ajuste	8,465308 x 10 <sup>9</sup>	2	4,232654 x 10 <sup>9</sup>	0,46 (9,55)	0,670583
	Erro puro	2,773109 x 10 <sup>10</sup>	3	9,243697 x 10 <sup>9</sup>		
	Total	1,695550 x 10 <sup>12</sup>	11	1,541409 x 10 <sup>11</sup>		
Epicatequina	Modelo cúbico especial	3,397541 x 10 <sup>12</sup>	6	5,662569 x 10 <sup>11</sup>	8,55 (4,95)	0,016247
	Erro total	3,311862 x 10 <sup>11</sup>	5	6,623725 x 10 <sup>10</sup>		
	Falta de ajuste	2,372152 x 10 <sup>11</sup>	2	1,186076 x 10 <sup>11</sup>	3,79 (9,55)	0,151141
	Erro puro	9,397103 x 10 <sup>10</sup>	3	3,132368 x 10 <sup>10</sup>		
	Total	3,728727 x 10 <sup>12</sup>	11	3,389752 x 10 <sup>11</sup>		

SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = valor de F calculado; F crítico 95 % = valor de F tabelado ao nível de 95 % de confiança; P < 0,05 = valor de P inferior a 5 %.

De modo análogo, os modelos linear, quadrático e cúbico especial também foram testados para a resposta Epicatequina. O modelo linear não foi significativo, apresentando falta de ajuste significativa. O modelo quadrático apresentou regressão significativa, com  $MQ_R/MQ_r$  igual a 9,54 e também não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,1690$ ). Para o modelo quadrático, o valor de  $R^2$  foi de 0,8883, entretanto, os valores de resíduos foram elevados. Deste modo, o modelo cúbico foi testado para avaliar a possibilidade de melhoria do ajuste. A  $MQ_R/MQ_r$  foi de 8,55, inferior ao valor do modelo quadrático, contudo, o valor de  $R^2$  passou a ser 0,9112, mostrando uma melhoria significativa no ajuste. De modo geral, os valores de resíduos foram baixos comparado ao modelo quadrático, com somente três previsões contendo resíduos mais altos, conforme mostrado nos gráficos C e D da Figura 15. Devido a isso, o modelo cúbico especial foi selecionado para realizar previsões.



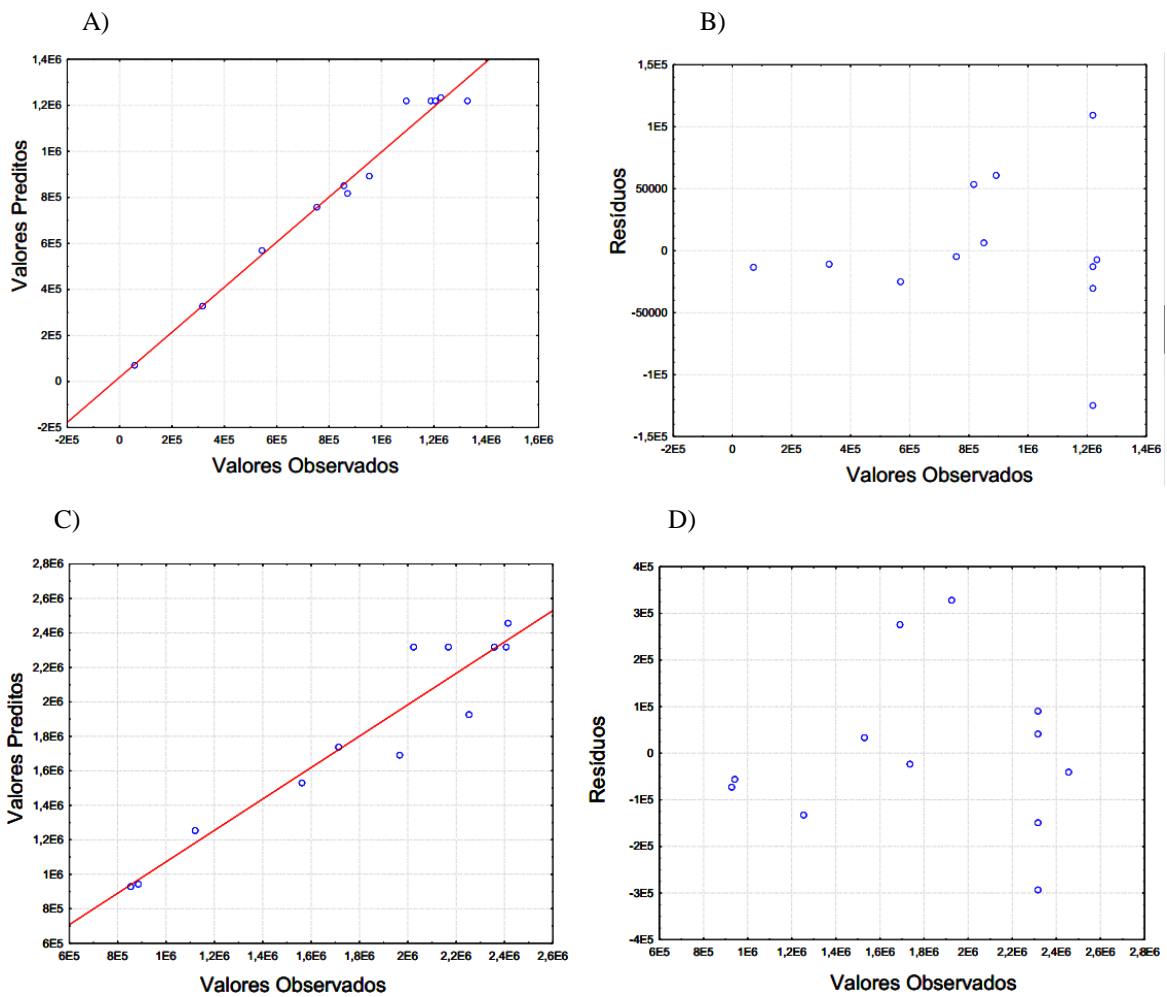


Figura 15. Gráficos de valores observados versus preditos e valores preditos versus resíduos para extração da catequina e epicatequina. Os gráficos A e B se referem ao modelo cúbico especial ajustado para a resposta Catequina,  $R^2 = 0,9789$ . Os gráfico C e D referem-se ao modelo cúbico especial ajustado para a resposta Epicatequina,  $R^2 = 0,9112$ .

Os efeitos dos componentes da mistura na extração da catequina e epicatequina podem ser melhor visualizados nas curvas de nível da Figura 16, construídas utilizando o modelo cúbico especial para cada resposta.

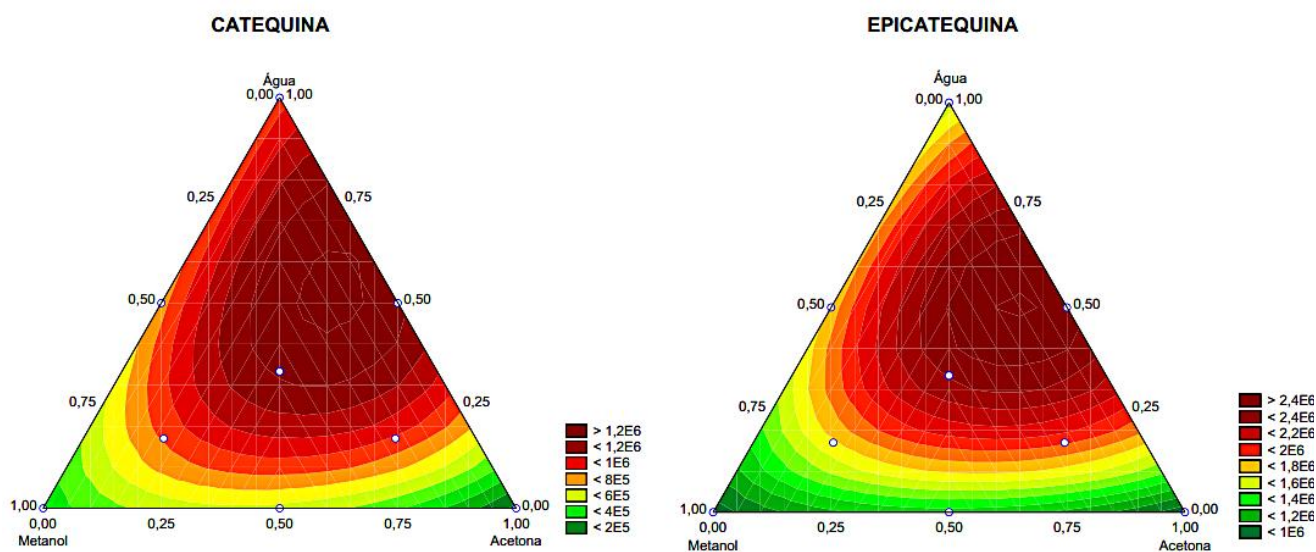


Figura 16. Curvas de nível referentes ao modelo cúbico especial ajustado para as respostas Catequina e Epicatequina.

Em relação a resposta Catequina, pode-se observar uma região de máxima resposta com o uso de uma mistura binária contendo 50 % de acetona e 50 % de água e também na região correspondente à mistura ternária com partes iguais de metanol, acetona e água. A equação simplificada do modelo cúbico especial para extração da catequina é mostrada na Equação 14. Somente os termos estatisticamente significativos são mostrados.

$$CT = 3,3 \times 10^5 M + 8,5 \times 10^5 A + 1,5 \times 10^6 M \times A + 3,1 \times 10^6 Ac \times A + 5,9 \times 10^6 M \times A \times Ac \quad (14)$$

Onde: CT é a resposta prevista para catequina;

M e A são os termos lineares referentes aos componentes metanol e água, respectivamente;

M x A é o termo de interação binária entre os componentes metanol e água;

Ac x A é o termo de interação binária entre os componentes acetona e água;

M x A x Ac é o termo de interação ternária referente aos componentes metanol, água e acetona.

Os elevados valores dos coeficientes dos termos de interação binária entre acetona e água e de interação ternária entre metanol, água e acetona sugerem que os maiores rendimentos na extração da catequina é obtido com uma mistura binária ou ternária destes solventes.

Em relação a extração da epicatequina, verifica-se que a região de máxima resposta corresponde às mesmas misturas observadas para catequina. A equação simplificada do modelo cúbico especial para extração da epicatequina é mostrada na Equação 15.

$$E = 9,4 \times 10^5 M + 9,3 \times 10^5 Ac + 1,5 \times 10^6 A + 4,9 \times 10^6 Ac \times A \quad (15)$$

Onde: E é a resposta prevista para epicatequina;

Ac, M e A são os termos lineares referentes aos componentes acetona, metanol e água, respectivamente;

Ac x A é o termo de interação binária entre os componentes acetona e água;

Em relação à epicatequina, os maiores valores do termo de interação binária entre a água e acetona sugerem maiores rendimentos na extração da epicatequina quando uma mistura entre estes dois solventes é empregada. Considerando a extração simultânea da catequina e da epicatequina, optou-se por utilizar a mistura binária entre água e acetona na proporção 1:1 (v/v). Apesar da mistura ternária (metanol, acetona e água) ter um maior poder extrator para catequina devido ao elevado valor do seu coeficiente, ela não apresentou efeito significativo na extração da epicatequina. Como já mencionado, as catequinas são compostos polares e portanto, são mais solúveis em solventes polares, como água e acetona (GADKARI; BALARAMAN, 2015). A estrutura molecular das catequinas possui cinco substituintes hidroxila e um oxigênio heterocíclico (Figura 17), e deste modo, uma mistura de solventes polares como água e acetona aumenta a solvatação da molécula devido às ligações de hidrogênio formadas entre a mistura de solventes e os substituintes hidroxila e os átomos de oxigênio heterocíclico (PAULI *et al.*, 2014).

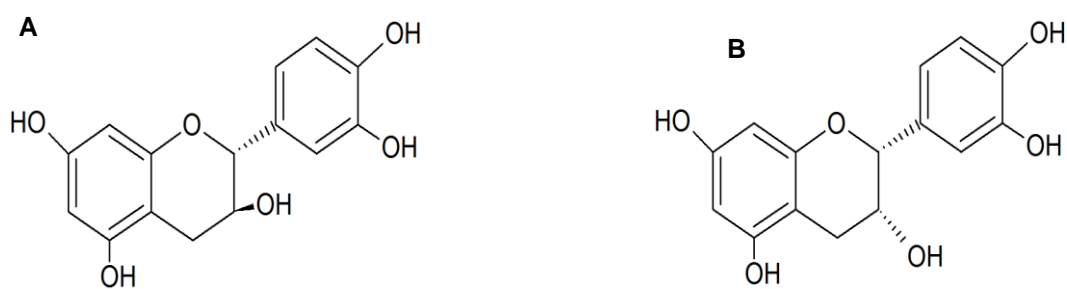


Figura 17. Estrutura química da A) (+) - catequina e B) (-) – epicatequina.

De modo geral, é comum observar elevados rendimentos na extração com estes solventes, entretanto, poucos trabalhos tem empregado o planejamento de misturas visando estabelecer proporções ótimas destes solventes para extração simultânea de catequina e epicatequina em chocolate.

Na proporção de 1:1 (v/v) de acetona/água, o modelo matemático previu uma área de pico normalizada de 1233781 para catequina e 2455740 para a epicatequina. Esses valores são muito próximos dos valores experimentais da Tabela 10 (1226467 e 2414796 para catequina e epicatequina, respectivamente), obtidos quando essa proporção de solventes foi empregada (experimento 4). Este fato comprova a boa capacidade previsão do modelo matemático.

Após a definição do solvente extrator, foi empregado o planejamento composto central para avaliar as melhores condições experimentais para extração da catequina e da epicatequina por ultrassom. O planejamento utilizado é mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Planejamento composto central para otimização da extração assistida por ultrassom. Os valores entre parênteses são os valores codificados para cada valor experimental da variável independente. A resposta é dada em área de pico normalizada.

Experimento	Fatores			Resposta	
	Tempo (min)	T (°C)	P (%)	Catequina	Epicatequina
1	4,9 (-1)	30 (-1)	50 (-1)	1216374	2358393
2	16,1 (1)	30 (-1)	50 (-1)	1272950	2531291
3	4,9 (-1)	45 (1)	50 (-1)	1296225	2519381
4	16,1 (1)	45 (1)	50 (-1)	1253491	2508445
5	4,9 (-1)	30 (-1)	90 (1)	1263425	2458157
6	16,1 (1)	30 (-1)	90 (1)	1304325	2454636
7	4,9 (-1)	45 (1)	90 (1)	1166620	2320460
8	16,1 (1)	45 (1)	90 (1)	1297002	2517038
9	10,5 (0)	35 (0)	70 (0)	1249796	2400140
10	10,5 (0)	35 (0)	70 (0)	1321147	2382250
11	10,5 (0)	35 (0)	70 (0)	1291699	2500755
12	1,0 (-1,68)	35 (0)	70 (0)	1168083	2252843
13	20 (1,68)	35 (0)	70 (0)	1289381	2490495
14	10,5 (0)	25 (-1,68)	70 (0)	1193915	2186233
15	10,5 (0)	50 (1,68)	70 (0)	1255667	2393977
16	10,5 (0)	0 (0)	40 (-1,68)	1324405	2488714
17	10,5 (0)	0 (0)	100 (1,68)	1287017	2491242

T(°C) = temperatura em graus Celsius; P(%) = porcentagem da potência aplicada.

A inspeção dos dados mostra que a porcentagem da potência aplicada não influenciou significativamente na extração dos analitos. Isso porque, fixando-se a potência em seu maior valor (35 kHz), não foram observadas variações com diferentes percentuais dessa energia. Deste modo, é possível que a extração máxima tenha ocorrido independentemente da

porcentagem da potência aplicada. A temperatura e o tempo de extração contribuíram para um pequeno aumento no rendimento da extração. Isso é porque um moderado aumento na temperatura eleva solubilidade das catequinas em solventes polares (GADKARI; BALARAMAN, 2015), entretanto, tempos de extração prolongados e temperaturas muito elevadas podem resultar em perdas do solvente extrator por volatilização ou até mesmo degradação destes compostos.

Os dados da Tabela 12 foram analisados com o software Statistica 7.0 para construção e validação dos modelos matemáticos através da ANOVA ( $p < 0,05$ ). Para as respostas Catequina e Epicatequina, a ANOVA mostrou que não houveram termos lineares, quadráticos e interações significativas, ao nível de 95 % de confiança. Também não foram observadas significância de falta de ajuste para os modelos testados. Isso pode ser atribuído a pouca variação na resposta ao se mudar de nível. As variações entre os níveis foram menores do que a variação do ponto central, fazendo que não houvessem efeitos significativos.

Devido a isso, não foi possível utilizar um modelo matemático para fazer previsão do ponto ótimo e a escolha da melhor condição de extração foi realizada avaliando-se os experimentos da Tabela 12 levando-se em consideração critérios, tais como: maior valor de área de pico, menor tempo de análise e menor quantidade de interferentes, através da inspeção visual do cromatograma.

Os experimentos 1, 7, 12 e 14 foram desconsiderados como pontos ótimos devido ao menor valor de área de pico, o que mostra baixa eficiência na extração dos analitos. Levando-se em consideração dos demais critérios, optou-se por adotar o experimento 3 (tempo de 4 minutos e 54 segundos, temperatura de 45 °C e 50 % da potência máxima) que além de apresentar um cromatograma com menor quantidade de interferentes, apresentou um valor elevado de área de pico em um tempo inferior a 5 minutos. Levando-se em consideração a frequência analítica na determinação destes compostos em várias amostras, um tempo de análise curto é considerado vantajoso.

Após definir o solvente extrator e as melhores condições de extração, foi avaliada a melhor relação massa de amostra/solvente extrator, visto que se trabalhou com uma massa de 250 mg, a qual se situa próxima à saturação do solvente. O gráfico da Figura 18 mostra que o maior valor de área de pico é obtido com o uso de uma massa de 100 mg. O emprego da massa de 50 mg resulta em uma queda acentuada no valor da resposta. Portanto, a massa de 100 mg de amostra foi selecionada para o procedimento de extração.

Para avaliar a eficiência da extração, uma amostra de material de referência certificado de chocolate (Chocolate Banking NIST 2384) foi submetida a extração com o procedimento otimizado. Os valores encontrados para catequina e epicatequina foram  $220 \pm 32 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $1159 \pm 240 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores não diferiram significativamente dos valores certificados, que para catequina e epicatequina foram  $245 \pm 51 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $1220 \pm 240 \text{ mg kg}^{-1}$ .

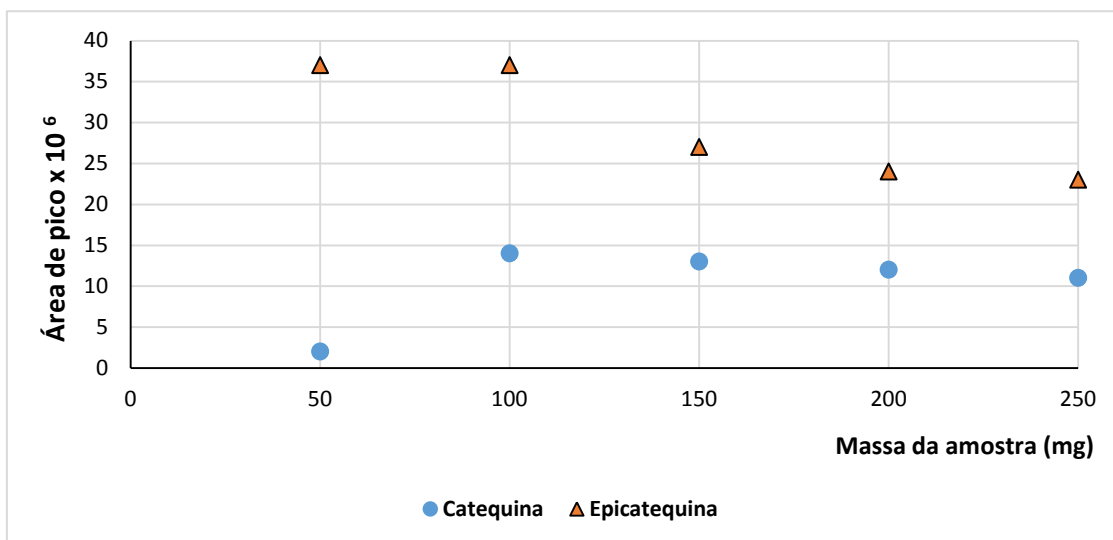


Figura 18. Avaliação do rendimento da extração assistida por ultrassom com a diminuição da massa da amostra. A resposta é dada em área de pico normalizada.

#### 4.4 Validação do procedimento analítico

O procedimento analítico foi avaliado segundo os parâmetros de validação mostrados na Tabela 13.

Tabela 13- Parâmetros de validação para o procedimento proposto.

Composto	Linearidade	R <sup>2</sup>	Valor p (Faj)	Repetibilidade (n=3)	Precisão intermediária (n=10)	LD	LQ
	mg L <sup>-1</sup>			(RSD %)			
Teobromina	2,0 - 102	0,9997	0,5310	0,799	2,02	0,002	0,008
Catequina	0,5 - 8,0	0,9992	0,4923	0,270	1,39	0,030	0,090
Epicatequina	1,0 - 21,0	0,9996	0,4146	0,259	1,43	0,008	0,020
Cafeína	1,0 - 11,0	0,9996	0,5579	0,196	1,71	0,004	0,010

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; p (Faj) = valor de p < 0,05 para falta de ajuste; RSD % = desvio padrão relativo, do Inglês *Relative Standard Deviation*; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

Em relação a linearidade, foi observada uma região linear para teobromina, catequina, epicatequina e cafeína nas faixas de concentração de 2,0 a 102, 0,5 a 8,0, 1,0 a 21,0 e 1,0 a 11,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, não havendo evidência de falta de ajuste significativa em nenhuma das regressões.

Em relação a repetibilidade, o procedimento proposto se mostrou bastante preciso, com valores de desvio padrão relativo inferiores a 0,8 % para todos os analitos. A precisão intermediária também apresentou valores de RSD baixos, mostrando que há pouca variação no comportamento do instrumento com o decorrer dos dias. Os limites de detecção e de quantificação também foram baixos, mostrando que o procedimento analítico possui uma boa sensibilidade.

A exatidão do procedimento proposto foi avaliada através da análise do material de referência certificado de chocolate (Chocolate Banking 2384) com 100 % de cacau (NIST, 2015). A fim de verificar se a diferença entre o valor medido e o valor certificado tem significância estatística, foi realizado uma análise estatística recomendada pela Comunidade Europeia (LENSINGER, 2005) e pelo *Guide to the expression of uncertainty in measurement* – (ISO, 1993). Essa avaliação leva em consideração os valores medidos e os valores certificados e suas respectivas incertezas. As incertezas são combinadas e as incertezas expandidas são comparadas com a diferença entre o valor medido e o valor certificado. Para obtenção do valor absoluto da diferença entre o valor medido e o valor certificado,  $\Delta_m$ , empregou-se a Equação 16:

$$\Delta_m = |C_m - C_{CRM}| \quad (16)$$

Onde,  $C_m$  é o valor medido experimentalmente e  $C_{CRM}$  é o valor certificado do CRM.

Levando-se em consideração que o resultado de uma medida é sempre afetado por sua incerteza e deste modo, só pode ser conhecida dentro os limites desta incerteza, é importante levar em consideração as incertezas advindas tanto do valor medido, quanto do valor certificado. Assim, a incerteza combinada,  $u_\Delta$ , obtida através da soma entre a incerteza da medida experimental com a incerteza do material certificado pode ser calculada pela Equação 17 (LENSINGER, 2005).

$$u_\Delta = [u_m^2 - u_{CRM}^2]^{1/2} \quad (17)$$

Em que,  $u_m^2$  se refere a incerteza do valor medido e  $u_{CRM}^2$  a incerteza do valor certificado. O valor de  $u_\Delta$  permite calcular o valor da incerteza expandida  $U_\Delta$ , conforme mostra a Equação 18 (LENSINGER, 2005).

$$U_\Delta = u_\Delta \times k \quad (18)$$

Onde  $k$  é um fator de expansão e é disponibilizado nos certificados dos materiais de referência. No caso do CRM de chocolate utilizado neste trabalho, o fator de expansão e os demais parâmetros são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Comparação entre os valores encontrados empregando o procedimento otimizado e os valores certificados. Os valores são apresentados com média e intervalo de confiança ao nível de 95 %.

Composto	Valor encontrado (mg kg <sup>-1</sup> )	Valor certificado (mg kg <sup>-1</sup> )	Fator de expansão, $k_e$	$\Delta_m$	$u_\Delta$	$U_\Delta$
Teobromina	10804 ± 1026	11600 ± 1100	2,40	796	380	912
Catequina	220 ± 32	245 ± 51	2,45	25	11	28
Epicatequina	1159 ± 122	1220 ± 240	2,37	61	54	128
Caféina	1058 ± 87	1060 ± 50	2,23	2,00	23	56

Para avaliar o desempenho do procedimento proposto, comparou-se os valores de  $\Delta_m$  com  $U_\Delta$ . Se  $\Delta_m \leq U_\Delta$ , então a diferença entre o valor medido e o valor certificado não é significativa. Observando-se os dados da Tabela 14, verifica-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre o valor medido e o valor certificado dos compostos avaliados, comprovando a exatidão do procedimento proposto. O cromatograma obtido da análise do CRM é mostrado na Figura 19.



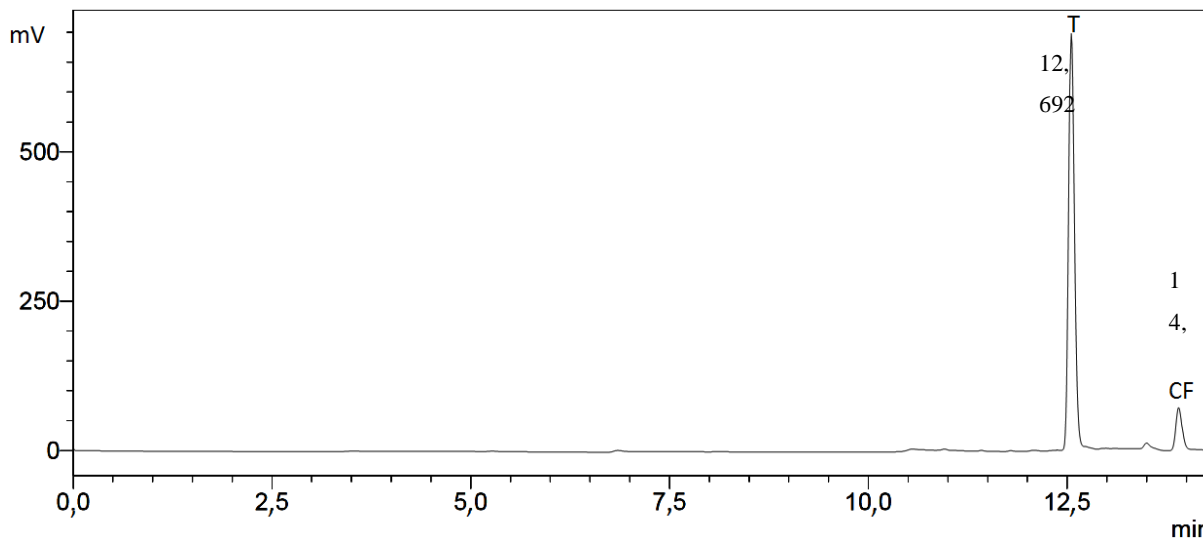


Figura 19. Cromatograma da análise do CRM de chocolate. T = teobromina e CF = cafeína. Os tempos de retenção para teobromina e cafeína foram 12,692 e 14,050 minutos respectivamente.

#### 4.5 Aplicação do procedimento analítico em amostras de chocolates artesanais com diferentes teores de cacau

O procedimento proposto foi empregado na determinação de teobromina, catequina epicatequina e cafeína em 22 amostras de chocolate com teores variados de cacau. A Tabela 15 mostra os valores determinados, expressos em média ( $n=3$ ) e intervalo de confiança. Os valores de desvio padrão relativo (RSD) também são mostrados.

Para facilitar a interpretação dos dados e observar possíveis correlações entre as variáveis foi utilizada a Análise Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA). Deste modo, foi construída uma matriz de dados composta de 54 amostras dispostas em linhas e 4 variáveis referentes as concentrações de teobromina, catequina, epicatequina e cafeína em colunas. Os dados foram pré-processados através do autoescalamamento, que consiste em subtrair cada valor da amostra para uma mesma variável (coluna) do valor médio e dividir pelo desvio padrão do conjunto de dados (CORREIA; FERREIRA, 2007). Isso faz com que todas as variáveis apresentem a mesma importância, ou seja, o mesmo peso, independentemente da escala. O software Statistica 7.0 foi utilizado para a geração dos gráficos de pesos e escores mostrados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Tabela 15 – Valores médios de concentração, em mg g<sup>-1</sup>, para as metilxantinas e flavonoides determinados nas amostras de chocolate com diferentes teores de cacau. A incerteza é dada em intervalo de confiança ao nível de 95 % (n=3).

Amostras	Teobromina (mg g <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Catequina (mg g <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Epicatequina (mg g <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Cafeína (mg g <sup>-1</sup> )	RSD (%)
DM56	6,81 ± 1,18	7,0	0,122 ± 0,004	0,1	1,14 ± 0,05	1,7	0,610 ± 0,039	2,6
DM65	8,62 ± 0,83	3,9	0,210 ± 0,032	6,2	1,02 ± 0,01	0,5	0,853 ± 0,082	3,9
DM67,5	8,15 ± 1,23	6,1	0,425 ± 0,004	0,3	0,958 ± 0,037	1,6	0,741 ± 0,040	2,2
NO50	6,42 ± 1,89	3,3	0,186 ± 0,073	4,4	1,26 ± 0,32	2,8	1,06 ± 0,03	1,2
NO75	8,40 ± 1,60	2,1	0,184 ± 0,034	2,1	1,28 ± 0,31	2,7	1,10 ± 0,17	6,1
NO85	10,0 ± 0,2	0,6	0,176 ± 0,004	0,3	1,57 ± 0,15	3,8	1,32 ± 0,04	1,1
AB60	7,75 ± 0,27	1,4	0,306 ± 0,044	5,8	1,27 ± 0,24	7,7	0,962 ± 0,153	6,4
AB70	8,13 ± 5,16	7,1	0,400 ± 0,065	6,6	1,36 ± 0,05	1,3	1,07 ± 0,07	2,8
AB80	11,5 ± 0,4	1,5	0,475 ± 0,055	4,7	1,47 ± 0,07	2,0	1,23 ± 0,10	3,3
AB100	13,9 ± 0,6	1,7	0,607 ± 0,093	6,2	1,67 ± 0,35	8,3	1,52 ± 0,11	2,8
RE	5,28 ± 0,49	3,8	0,056 ± 0,003	2,0	0,346 ± 0,045	1,5	0,712 ± 0,123	7,0
MB	5,36 ± 0,60	4,5	0,281 ± 0,005	0,2	1,07 ± 0,06	0,6	0,563 ± 0,063	4,5
MCF70	8,28 ± 1,30	6,3	0,066 ± 0,017	2,9	1,68 ± 0,23	1,6	1,12 ± 0,16	5,7
MCF80	7,90 ± 1,08	5,5	0,125 ± 0,008	0,7	1,09 ± 0,00	0,0	1,33 ± 0,09	2,7
CCW50	4,55 ± 0,96	8,5	0,062 ± 0,002	1,2	0,549 ± 0,030	2,2	0,578 ± 0,032	2,2
CCW70	8,28 ± 1,30	6,3	0,055 ± 0,002	0,3	0,951 ± 0,006	0,3	1,12 ± 0,16	5,7
MCF56	6,90 ± 0,60	3,5	0,091 ± 0,013	5,6	0,860 ± 0,031	1,5	1,25 ± 0,06	1,8
ART70	7,60 ± 0,80	4,3	0,115 ± 0,012	1,2	1,38 ± 0,06	1,8	1,26 ± 0,14	4,3
CACB70	8,30 ± 1,84	8,9	0,047 ± 0,001	0,5	1,57 ± 0,02	0,5	1,22 ± 0,11	3,7
CS28	1,56 ± 0,01	0,3	0,018 ± 0,003	6,6	0,048 ± 0,004	3,1	0,235 ± 0,021	3,7
CS55	4,79 ± 0,91	2,1	0,074 ± 0,016	2,3	0,370 ± 0,003	0,1	0,605 ± 0,053	1,0
CS85	11,1 ± 2,2	8,0	0,343 ± 0,027	3,1	1,12 ± 0,05	2,0	1,51 ± 0,36	2,7

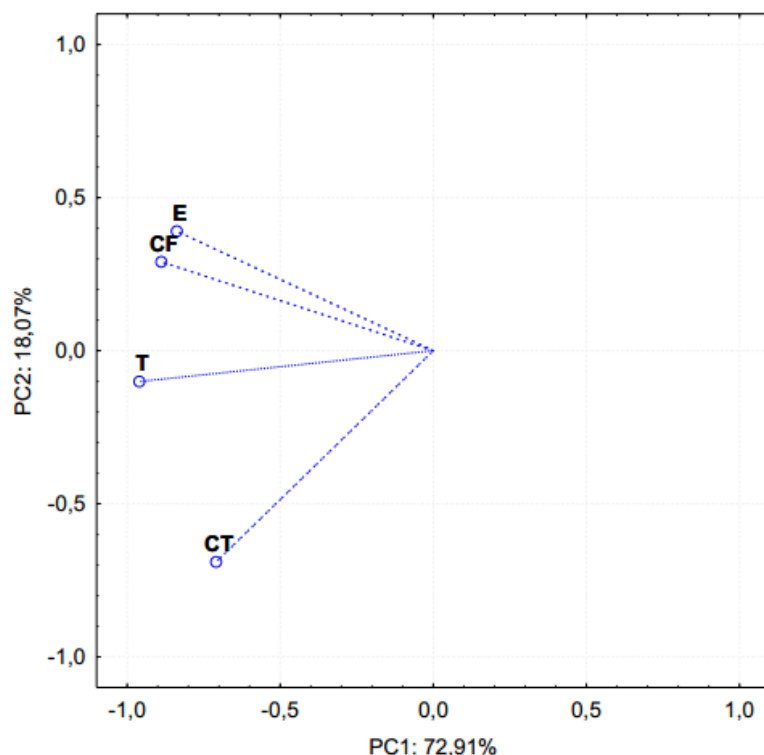


Figura 20. Gráfico de pesos PC1 x PC2 com as variáveis teobromina (T), catequina (CT), epicatequina (E), cafeína (CF). As duas primeiras componentes principais explicam 90,98 % da variância total dos dados.

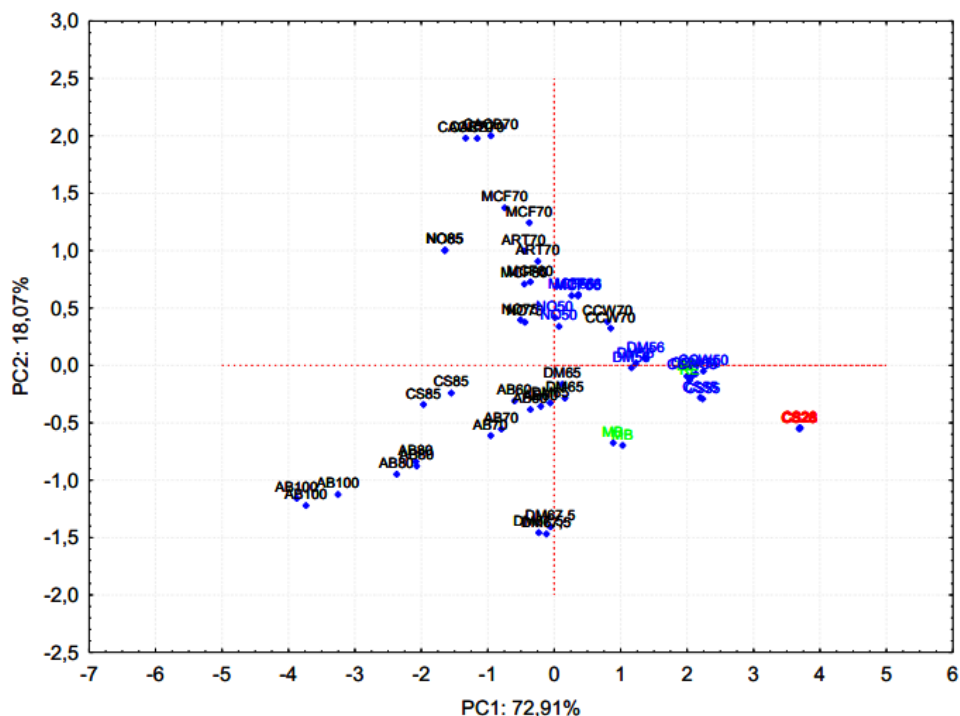


Figura 21. Gráfico de escores PC1 x PC2 das amostras de chocolates artesanais. As amostras de chocolate ao leite são mostradas na cor vermelha (teor de cacau 20 a 39 %); amostras em azul são de chocolate meio amargo (teor de cacau (teor de cacau 40 a 59 %)); amostras na cor preta correspondem ao chocolate amargo ou escuro (60 a 100 %) e as amostras marcadas em verde são de chocolates caseiros sem informações a respeito do teor de cacau.

O gráfico de pesos da Figura 20 mostra que as duas primeiras componentes principais explicam 90,98 % da variância total. Todas as variáveis apresentaram pesos negativos em PC1 e, em PC2, as variáveis E e CF foram separadas com pesos positivos das variáveis T e CT, que apresentaram pesos negativos. Uma comparação com o gráfico de escores da Figura 21 mostra que a discriminação das amostras de chocolate ocorreu em função do teor de cacau em cada uma delas. As amostras de chocolate amargo (cor preta) foram separadas das amostras de chocolate meio amargo (cor azul), ao leite (cor vermelha) e também das amostras de chocolate caseiro (cor verde) em função das concentrações de cafeína, teobromina, catequina e epicatequina. Exceções são observadas para as amostras CCW70 e DM65 que mesmo sendo classificadas como chocolate amargo, foram alocadas juntamente com as amostras de chocolate meio amargo.

A discriminação em relação ao teor de cacau dentro de amostras de mesma marca também é observada. A amostra AB100 que possui 100 % de sólidos de cacau, segundo informações do rótulo, é separada das demais amostras com 80, 70 e 60 % de cacau, principalmente devido a elevada concentração de catequina (CT). Uma correlação negativa é observada em relação a amostra CS28, apresentando baixas concentrações tanto das metilxantinas quanto dos polifenóis avaliados. Isso se deve ao menor teor de massa de cacau na composição dessas amostras, que possui uma maior quantidade de leite e manteiga de cacau. As amostras de chocolate meio amargo com teores de cacau na faixa de 50 a 56 % também apresentaram baixas concentrações dos constituintes orgânicos.

Em PC2 pode-se observar que as amostras CACB70, MCF70 e NO85 foram separadas com pesos positivos das demais devido a influência da variável E, indicando elevada concentração de epicatequina nessas amostras. Uma correlação negativa também é observada comparando-se essas amostras com as amostras de chocolate meio amargo e ao leite.

Para avaliação de possíveis semelhanças entre as amostras de chocolate com base em sua composição química e para confirmar as tendências observadas no gráfico de escores da Figura 21, foi utilizada a HCA empregando o método de Ward e distância Euclidiana, onde foi construído o dendograma mostrado na Figura 22.

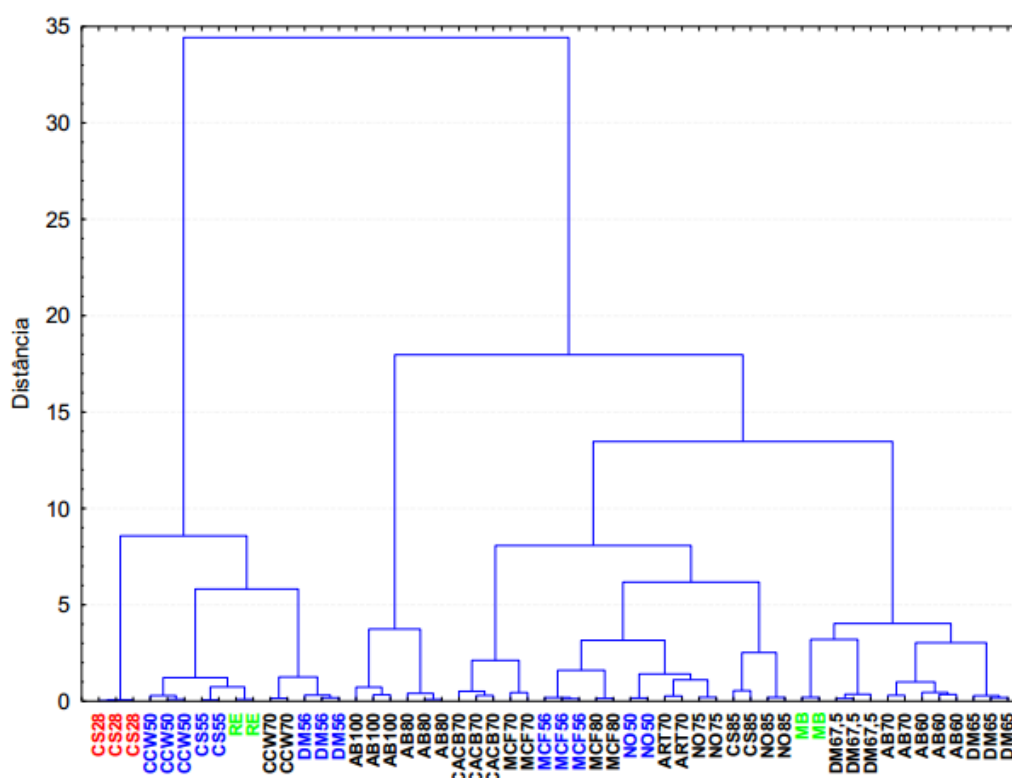


Figura 22. Dendrograma obtido pelo agrupamento das amostras de chocolates artesanais. Método de Ward e distância Euclidiana. As amostras de chocolate ao leite são mostradas na cor vermelha (teor de cacau 20 a 39 %); amostras em azul são de chocolate meio amargo (teor de cacau 40 a 59 %); amostras na cor preta correspondem ao chocolate amargo ou escuro (60 a 100 %) e as amostras marcadas em verde são de chocolates caseiros sem informações a respeito do teor de cacau.

A análise do dendrograma mostra a formação de dois grandes grupos: o primeiro formado pelas amostras CS28, CCW50, CS55, RE, CCW70 e DM56, as quais possuem baixo e intermediário teor de cacau e o segundo grupo que é formado majoritariamente por amostras de chocolate amargo, como observado no gráfico de escores da Figura 21. A amostra CCW70 se mostrou uma exceção no primeiro grande grupo, sendo agrupada juntamente com as amostras de chocolate meio amargo, possuindo composição química similar. Exceções também são observadas analisando-se o segundo grupo contendo as amostras de chocolate meio amargo e de chocolate caseiro.

As amostras AB100 e AB80 mostraram-se similares, principalmente devido ao elevado teor de cacau e também por serem da mesma marca. As amostras CACB70 e MCF70 foram agrupadas juntas mostrando similaridade entre si. Ambas as amostras são de chocolate fino e foram produzidas na região sul da Bahia, conforme mostram as informações da Tabela 2. Deste modo, é possível que fatores como regionalidade, variedade genética das amêndoas e o padrão de processamento tenham influenciado na composição química dessas amostras.

Uma análise componentes principais realizada por Carrillo, Londoño-Londoño e Gil (2013) mostrou que amêndoas de cacau cultivadas em uma mesma área apresentaram composição química semelhante, e portanto, apresentaram uma tendência à formação de grupos.

A amostra ART70 foi agrupada juntamente com as amostras de chocolate orgânico NO50 e NO75, principalmente devido às elevadas concentrações de cafeína e epicatequina. Nenhuma informação a respeito da amostra ART70 foi disponibilizada no rótulo, entretanto, como as amostras de chocolate orgânico são produzidas com amêndoas do sul da Bahia, é possível que a amostra ART70 também tenha sido produzida com amêndoas da região.

As amostras de chocolate caseiro RE e MB foram comercializadas como sendo de elevado teor de cacau, segundo relato dos produtores, contudo, somente a amostra MB foi agrupada juntamente com a amostra DM67,5 de chocolate amargo. A amostra RE apresentou composição química semelhante às amostras de chocolate ao leite e meio amargo.

#### 4.5.1 Avaliação das concentrações de teobromina e cafeína

Analisando-se a Tabela 15, verifica-se que a concentração de teobromina nas amostras de chocolate foram predominantes em relação aos demais analitos. As amostras com elevado teor de sólidos de cacau apresentaram elevadas concentrações de teobromina e cafeína. Nas amostras NO85, AB80, AB100 e CS85 as concentrações de teobromina foram superiores a  $10 \text{ mg g}^{-1}$  (Tabela 15). As concentrações de cafeína nessas amostras também foram elevadas, sendo superiores a  $1,2 \text{ mg g}^{-1}$ . A concentração de teobromina e cafeína na amostra de chocolate ao leite CS28 foi  $1,56 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$  e  $0,235 \pm 0,021 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente, mostrando-se inferiores às demais amostras do conjunto. Isso se deve ao baixo teor de sólidos de cacau nessas amostras. A amostra de mesma marca CS55, classificada como chocolate meio amargo, também apresentou baixos teores destes constituintes, onde a concentração de teobromina foi  $4,77 \pm 0,91 \text{ mg g}^{-1}$  e de cafeína  $0,605 \pm 0,053 \text{ mg g}^{-1}$ .

Os principais motivos que justificam o elevado consumo dos chocolates são as suas excelentes propriedades sensoriais e também a elevada concentração de substâncias psicoativas, como a cafeína e a teobromina (SMIT; GAFFAN; ROGER, 2004). Foi demonstrado que após 1 hora da ingestão de 700 mg de teobromina e 120 mg de cafeína foi possível sentir efeitos relacionados a cafeína, como melhora significativa do humor, aumento da percepção e da velocidade de processamento de informações. A diminuição da pressão sanguínea foi o principal efeito atribuído a teobromina, devido a sua ação vasodilatadora

(MITCHEL et al., 2011). Levando-se em consideração estas informações, verifica-se que o consumo de 60 e 80 g das amostras NO85, AB80 e CS85 fornecem quantidades suficientes de teobromina e cafeína respectivamente, para obtenção dos mesmos efeitos.

Considerando-se o estudo realizado por Gaffan e Roger (2004), onde os efeitos psicoativos da cafeína e teobromina foram observados com a ingestão de 250 mg de teobromina e 19 mg de cafeína, apenas 22 g de chocolate artesanal das marcas NO85, AB80 e CS85 permitiria obter os efeitos vasodilatadores da teobromina e 13 g seria suficiente para sentir os efeitos estimulantes da cafeína. Estes dados mostram que as amostras de chocolate com elevado teor de cacau são ricas fontes destas metilxantinas.

Um estudo realizado por Tokusoglu e Unal (2002), em que foram analisadas 11 amostras de chocolates industrializados, mostrou que as maiores concentrações de teobromina foram observadas nas amostras de chocolate amargo da marca *Ulker Balmond* ( $1,93 \text{ mg g}^{-1}$ ) e na amostra de chocolate ao leite de marca *Milka* ( $1,96 \text{ mg g}^{-1}$ ), enquanto que para cafeína, as marcas de chocolate ao leite *Milka* ( $0,94 \text{ mg g}^{-1}$ ) e *Nestle Nesquik* ( $0,87 \text{ mg g}^{-1}$ ) apresentaram as maiores concentrações. Comparando os valores determinados pelos autores com as concentrações encontradas neste trabalho, observa-se que, com exceção da amostra CS28, todas as amostras de chocolates artesanais apresentaram concentrações de teobromina superiores. Em relação à concentração de cafeína, 13 das 22 amostras de chocolates artesanais apresentaram concentrações superiores às determinadas no trabalho de Tokusoglu e Unal (2002).

Esses resultados também estão de acordo com os resultados obtidos por Belscak et al. (2009), que analisaram 13 tipos de produtos de cacau, sendo oito tipos de chocolates industrializados. Amostras compostas por sólidos de cacau (100 % de cacau) apresentaram as mais altas concentrações de teobromina, sendo que somente no pó de cacau a concentração de teobromina foi de  $15,5 \text{ mg g}^{-1}$ , próxima da concentração da amostra de chocolate artesanal com 100 % de cacau AB100 ( $13,9 \pm 0,6 \text{ mg g}^{-1}$ ).

As amostras de chocolate artesanal AB80 e AB100 apresentaram teores de teobromina superiores às amostras de chocolates analisadas por Langer et al. (2011), os quais analisaram 14 marcas de chocolates, incluindo chocolates finos importados, e observaram que a maior concentração de teobromina foi de  $11,1 \text{ mg g}^{-1}$ , pertencentes a uma amostra de chocolate amargo da marca *Green & Black's Dark Chocolate*. Os valores são próximos aos encontrados para a amostra CS85 ( $11,1 \pm 2,2 \text{ mg g}^{-1}$ ) e para a amostra de chocolate orgânico NO85 ( $10,0 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$ ). Além disso, o trabalho destes autores também mostrou uma elevação da

concentração de teobromina e cafeína com o aumento do teor de sólidos de cacau nas amostras de chocolate, corroborando com o comportamento observado para as amostras de chocolates artesanais.

Mais recentemente Todorovic et al. (2015) analisaram os teores de metilxantinas, polifenóis e a atividade antioxidante de 12 marcas de chocolates com diferentes teores de sólidos de cacau, produzidas na Sérvia. Quatro amostras de chocolate amargo apresentaram valores de teobromina elevados, os quais foram  $14,6 \pm 0,8$ ,  $13,6 \pm 1,4$ ,  $12,4 \pm 0,7$  e  $12,3 \pm 0,8$  mg g<sup>-1</sup>. Estes valores foram superiores aos encontrados para as amostras de chocolates artesanais analisadas, contudo, os níveis de teobromina das demais amostras determinadas por estes autores foram inferiores aos valores das amostras de chocolates artesanais AB 80 e CS85. Em relação aos níveis de cafeína, os valores determinados para as amostras CS85 e AB100 foram superiores aos valores mais elevados determinados pelos autores.

As diferenças nos teores de teobromina e cafeína entre os tipos de amostras de chocolate dependem de vários fatores, entretanto, dois fatores que devem ser considerados são: a variedade genética do fruto e o processo de fermentação. Ainda não se tem uma definição clara a respeito das variedades de cacau que possuem maiores teores de teobromina e cafeína, contudo, pode-se observar em alguns trabalhos que a variedade “Forasteiro” apresenta a maior relação teobromina/cafeína, enquanto que o cacau “Trinitário” e “Criollo” apresentam níveis intermediários e baixos de teobromina/cafeína, respectivamente (BRUNETTO et al., 2007; CARRILLO; LONDOÑO-LONDOÑO; GIL, 2013). Deste modo, é possível que a elevada concentração de teobromina em algumas amostras seja devido ao uso de amêndoas da variedade “Forasteiro”, a qual é vastamente utilizada na produção de chocolate.

As metilxantinas encontram-se distribuídas em várias partes da semente do cacau e, nos primeiros dias de fermentação, ocorre a migração destes constituintes orgânicos da polpa para o interior da semente devido a sua maior permeabilidade nessa etapa. Em compensação, a concentração de teobromina, cafeína e teofilina cai significativamente nos últimos dias de fermentação, devido a migração destas metilxantinas da semente para a casca (BRUNETTO et al, 2007). Considerando-se que as amostras de chocolates artesanais são produzidas em uma escala reduzida quando comparada às grandes indústrias chocolateiras, o controle sobre a seleção das variedades e da etapa de fermentação são geralmente mais rigorosos. Deste modo, um tempo de fermentação mais reduzido em conjunto com variedades



mais ricas em metilxantinas pode influenciar na diferenciação entre os valores encontrados para amostras de chocolates artesanais e chocolates industrializados.

#### 4.5.2 Avaliação das concentrações de catequina e epicatequina

Como pode ser observado na Tabela 15, as amostras de chocolate amargo apresentaram as maiores concentrações dos flavonoides avaliados. A epicatequina mostrou-se como flavonoide predominante, com valores de concentração superiores aos da catequina. As concentrações mais elevadas de catequina foram observadas nas amostras da marca AB, as quais AB80 e AB100 apresentaram concentrações de catequina variando de 0,475 a 0,607 mg g<sup>-1</sup>. Concentrações elevadas também foram verificadas na amostra DM67,5 que apresentou valores de catequina de 0,425 ± 0,004 mg g<sup>-1</sup> e nas amostras AB60 e CS85 as quais apresentaram concentrações acima de 0,300 mg g<sup>-1</sup>.

Nas amostras NO85, AB100, MCF70 e CACB70, as concentrações de epicatequina foram as mais elevadas, com valores acima de 1,5 mg g<sup>-1</sup>. As amostras de chocolate meio amargo DM56, NO50 e MB apresentaram concentrações elevadas de catequina e epicatequina, com faixa de concentração variando de 0,122 a 0,281 e 1,070 a 1,261 mg g<sup>-1</sup> para catequina e epicatequina, respectivamente. Essas concentrações foram comparáveis às obtidas para as amostras de chocolate amargo. Em contrapartida, concentrações de catequina inferiores a 0,100 mg g<sup>-1</sup> foram observadas na amostra CCW56 e também nas amostras RE, MCF70, CCW50, CCW70, CACB70, CS55, as quais ficaram abaixo do limite de quantificação (LQ). A concentração de catequina na amostra de chocolate ao leite CS28 ficou abaixo do limite de detecção (LD). Dentre estas, as amostras RE, CCW50, CS55 e CS28 também apresentaram as mais baixas concentrações de epicatequina, sendo inferiores a 0,6 mg g<sup>-1</sup>.

Os baixos valores na concentração dos flavonoides estão associados a fatores diversos, dentre eles: a variedade genética do fruto e as etapas de processamento (RAMIREZ-SANCHEZ et al., 2010). Para a produção do chocolate artesanal, como por exemplo o chocolate fino, muitas vezes se utiliza a variedade “Criollo”, por apresentar um sabor mais suave e notas aromáticas. O amargor é característica da presença de compostos fenólicos e, deste modo, a variedade “Criollo” possui concentrações inferiores comparado à outras variedades, como o cacau “Forasteiro”, o qual possui 30 a 60 % mais compostos fenólicos (AFOAKWA, 2010).

Durante a etapa de fermentação das amêndoas de cacau podem ocorrer reações de oxidação e complexação de compostos fenólicos, reduzindo a concentração desses compostos (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998). Neste processo, o teor de polifenóis é reduzido a 70 % do valor total, sendo que a (-)-epicatequina tem 90 % da sua concentração inicial reduzida. Além disso, durante as etapas de produção do chocolate, aquecimentos prolongados em temperaturas elevadas podem reduzir ainda mais a concentração dos compostos fenólicos, os quais são facilmente degradados em temperatura elevada (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011). Deste modo, as condições de processamento utilizado na produção dos chocolates pode justificar os baixos valores de concentração para as catequinas em algumas amostras de chocolates artesanais.

Uma comparação com dados de trabalhos publicados na literatura mostra que as amostras de chocolate amargo da marca AB60, AB70, AB80, AB100, DM67,5 e CS85 apresentaram concentrações de catequina na faixa de 0,306 a 0,607 mg g<sup>-1</sup>, as quais foram superiores às amostras de chocolate amargo analisadas por Todorovic et al. (2015), que variaram de 0,057 a 0,183 mg g<sup>-1</sup>. Todas as amostras de chocolate artesanais com elevado teor de cacau apresentaram concentrações de epicatequina superiores ao determinado por estes autores.

Todas amostras de chocolates artesanais apresentaram concentrações de catequina e epicatequina inferiores às determinadas por Tokusoglu e Unal (2002), que para uma amostra de chocolate ao leite (Milka) foram verificadas concentrações de catequina e epicatequina de 0,71 e 6,23 mg g<sup>-1</sup> e para uma amostra de chocolate amargo 0,66 e 2,08 mg g<sup>-1</sup> para catequina e epicatequina, respectivamente. É importante salientar que os compostos fenólicos em chocolates com elevado teor de leite podem interagir com a caseína, dificultando a digestão e conseqüentemente, a absorção dos polifenóis (ZHOU et al., 2015).

As concentrações de catequina e epicatequina nas amostras de chocolates artesanais com elevado teor de cacau foram superiores às concentrações determinadas por Miller et al. (2009) para chocolates com mesmo teor de cacau. A faixa de variação para concentração de catequina nas amostras de chocolate amargo determinada por estes autores foi de 0,070 a 0,233 mg g<sup>-1</sup>, enquanto que para epicatequina foi de 0,312 a 0,371 mg g<sup>-1</sup>. A maioria das amostras de chocolates artesanais com teores de cacau intermediário e elevado apresentaram concentrações de epicatequina superiores a 1,00 mg g<sup>-1</sup>, resultados comparáveis aos obtidos para as amostras de barra de chocolate com 100 % de cacau determinadas por estes autores. O mesmo foi observado para as concentrações de catequina.

Em compensação, as concentrações de epicatequina das amostras de chocolates artesanais com elevados teores de cacau foram inferiores às determinadas por Langer et al. (2011), que encontraram concentrações de epicatequina variando de 0,298 a 2,70 mg g<sup>-1</sup> para 14 marcas de chocolate amargo.

Comparado a outras fontes de flavonoides, como por exemplo o vinho, foi demonstrado que o chocolate amargo, composto de 70 % de sólidos de cacau fornece a mesma quantidade de catequinas que 196 mL de vinho Tannat (PIMENTEL et al., 2010). Deste modo, considerando os elevados valores de epicatequina para as amostras de chocolate amargo NO85, MCF70, ART70, CACB70 e AB80, verifica-se que são boas fontes deste composto.

## 5 CONCLUSÕES

O emprego do planejamento composto central na otimização da separação cromatográfica permitiu separar a teobromina, catequina, epicatequina e cafeína com resoluções adequadas em um único experimento, fornecendo vantagens como a economia de tempo e de reagentes.

A otimização da extração das metilxantinas através do planejamento de misturas mostrou que os componentes puros se mostraram melhores extratores do que as misturas entre eles e uma extração exaustiva com acetato de etila e clorofórmio mostrou que o acetato de etila foi mais eficiente para extração da teobromina, além de extrair satisfatoriamente a cafeína. Como o chocolate é mais conhecido por ter uma elevada concentração de teobromina, o acetato de etila se mostrou mais adequado.

O uso do planejamento de misturas se mostrou eficiente para extração simultânea da catequina e da epicatequina. As interações binárias entre água e acetona forneceram os maiores valores de resposta e uma mistura de solventes composta por 50 % de água e 50 % de acetona foi empregada. Em relação a otimização das melhores condições de extração empregando ultrassom, foi observado que não foi possível a construção de um modelo matemático adequado para previsão do ponto ótimo utilizando o planejamento composto central, entretanto, foi possível escolher as melhores condições avaliando-se a maior valor de resposta obtido no menor tempo de extração. As melhores condições foram obtidas em um tempo de 4 minutos e 54 segundos, temperatura de 45 °C com 50 % da potência máxima.

Através da análise de componentes principais e a análise de agrupamento hierárquico, foi possível discriminar as amostras em função do teor de sólidos de cacau. As amostras de chocolates artesanais com maiores teores de sólidos de cacau apresentaram também elevados teores dos constituintes orgânicos avaliados, sendo que a concentração destes compostos nas diferentes amostras de chocolates artesanais dependem da variedade e do processamento utilizado na confecção destes produtos.

## **6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS**

- a) Avaliar a atividade antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH.
- b) Determinar as concentrações de macro e microelementos nas amostras avaliadas e fazer uma correlação com os constituintes orgânicos determinados através da análise exploratória.
- c) Avaliar as diferenças entre a composição química das amostras de chocolates artesanais e as amostras de chocolates industrializados comercializados na região.

## 7 REFERÊNCIAS

ANDRADE JÚNIOR, D. R. DE et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60–68, 2005.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 6, p. 290–298, 2007.

AFOAKWA; E. O. **Chocolate science and technology**. Wiley-Blackwell Publishers, Oxford, UK, p. 36, 2010.

ARAGÃO, N. M. et al. Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 67, n. 5, p. 1007–1013, 2005.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; BISPO, M.S.; ANDRADE, J.B. Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2482–2486, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATES, CACAU E AMENDOIM, BALAS E DERIVADOS (ABICAB). Setor de chocolate fecha semestre com queda. Disponível em: < <http://www.abicab.org.br/setor-de-chocolate-fecha-o-semester-com-queda/>>. Acessado em: 17 set de 2015a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATES, CACAU E AMENDOIM, BALAS E DERIVADOS (ABICAB). Setor de chocolate cresce mais de 4 % no primeiro semestre de 2012. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br/setor-de-chocolates-cresce-mais-de-4-no-primeiro-semester-de-2012/>>. Acessado em: 22 set 2015b.

BAKALOVA, R.; ZHELEV, Z.; AOKI, I.; SAGA, T. Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis: From early to terminal stages of cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 2503–2517, 2013.

BALLUS, C. A. et al. Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 558–568, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.102>>.

BALLUS, C. A. et al. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 83, n. 4, p. 1181–1187, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Campinas: Bookman, 2010, 413p.

BARNETT, C. F. et al. Pharmacokinetic, partial pharmacodynamic and initial safety analysis of (-)-epicatechin in healthy volunteers. **Food Function**, v. 6, n. 3, p. 824–833, 2015.

BEAUDOIN, M.S., GRAHAM, T.E. "**Methylxanthines and human health**: epidemiological and experimental evidence." Handbook of Experimental Pharmacology 200: p. 509-548, 2011.

BECKETT, S.T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1994. 432 p.

BELITZ, H. ; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2ed. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1997. 1087 p.

BELŠČAK, A. et al. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 707–716, 2009.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BISPO, M. S. et al. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatographic science**, v. 40, n. 1, p. 45–48, 2002.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 3–14, 2001.

BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. O Desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: Algumas alternativas para melhorar as separações. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 993–1003, 2012.

BOX, G. E.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal Royal Statistical Society**: series B, v. 13, n.1, p. 1-38. 1951.

BRASIL. Centro de Vigilância Sanitária. Portaria 5, de 12 de maio de 2005a. Disponível em: <[http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/E\\_PT-CVS-05\\_120205.pdf](http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/E_PT-CVS-05_120205.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 38, de 23 de Junho de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. Disponível em: <<http://www.ceplacpa.gov.br/site/wp-content/uploads/2012/03/IN38.pdf>>. Acessado em: 21 set 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC /RDC 2 n.264, de 22 de setembro de 2005b. Aprova Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chocolate e Chocolate Branco. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5e63cd804745929d9afede3fbc4c6735>>. Acesso em: 27 mar. 2015.

BRUNETTO, M. D. R. et al. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 459–467, 2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statística**. Rio de Janeiro: e-papers Serviços Editoriais, 2003. 260p.

CALIGIANI, A. et al. Application of <sup>1</sup>H NMR for the characterisation of cocoa beans of different geographical origins and fermentation levels. **Food chemistry**, v. 157, p. 94–9, 15 ago. 2014.

CAMARGO, S. Produtores tradicionais plantam e exportam variedades mais finas do fruto para espantar a maldição da vassoura-de-bruxa. O Renascimento do cacau baiano, 19 set. 2015. Revista PIB, disponível em: < <http://www.revistapib.com.br/pdf/PIB-ed18.pdf> >. Acessado em: 19 set. 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2014. 444p.

CORDERO-HERRERA, I. et al. Cocoa and cocoa flavanol epicatechin improve hepatic lipid metabolism in in vivo and in vitro models. Role of PKC $\zeta$ . **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 761–773, 2015.

CARRILLO, L. C.; LONDOÑO-LONDOÑO, J.; GIL, A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. **Food Research International**, v. 60, p. 273–280, jun. 2014.

COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA (CEPLAC). Cacau: História e Evolução. Disponível em:<[http://www.ceplac.gov.br/radar/radar\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm)>. Acesso em: 21 out. 2014.

COOPER, K. A. et al. Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 260–265, 2008.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481–487, 2007.

COSCIONE, A. R.; DE ANDRADE, J. C.; MAY, G. M. O modelamento estatístico de misturas: Experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1116–1122, 2005.

COUTINHO, J. P. et al. Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. **Talanta**, v. 134, p. 256–263, 2015.

COUTO, M. R. M. et al. Transformações de dados em experimentos com abobrinha italiana em ambiente protegido. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1701–1707, 2009.



CRAFACK, M. et al. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 103–116, 2013.

DELAROZA, F. et al. Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 1929–1938, 2014.

DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. **International journal of food microbiology**, v. 161, n. 2, p. 121–33, 1 fev. 2013.

DERRINGER, G.; SUICH R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, 1980.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. 2 ed. Nottingham: John Wiley & Sons Ltd., 2002, 515 p.

DIAS, C. B. et al. Multivariate Optimisation and Validation of a Method for the Separation of Five Artificial Sweeteners by UPLC-DAD in Nine Food Matrices. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 7, p. 1824–1835, 2015.

EICHER, T. HAUPTMANN, S.; SPEICHER, A. **The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications**. 2 ed. Weinheim: WILEY-VCH. 2003, 570.

EFRAIM, P. et al. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. v. 30, p. 142–150, 2010.

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**, 2011.

FARAH, R. **Chocolate: energia e saúde**. São Paulo: Alaúde, 2008. 147p.

FERREIRA, S. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry? review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2–14, 2007.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. 1 ed. Salvador: Vento Leste, 2015. 190p.

FRANCO, R.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 4159–4173, 2013.

GARCIA, L. M. Z. et al. Statistical mixture design - Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 103, n. 1, p. 1–7, 2010.

GADKARI, P. V.; BALARAMAN, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, n. August 2013, p. 122–138, 2015.

GREENBERG, J. A. Chocolate intake and diabetes risk. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 129–133, 2015.

GRIVETTI, L. E.; SHAPIRO, HOWARD-YANA. **Chocolate: History, Culture and Heritage**. California: Wiley, 2009. 975 p.

GUERRA, R. O.; BERNARDO, G. C.; GUTIÉRREZ, C. V. Cafeína e esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 6, n. 2, p. 60–62, 2000.

HALFDANARSON, T. R.; JATOI, A. Chocolate as a cough suppressant: rationale and justification for an upcoming clinical trial. **Supportive cancer therapy**, v. 4, n. 2, p. 119–22, 2007.

HANSEN, C. E.; OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. **J Sci Food Agric**, v. 5, 1998.

HERRERO-MARTINEZ, J. M. et al. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, n. 10, p. 1886–1895, 2005.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 2–13, 2012.

HUE, C. et al. Impact of fermentation on nitrogenous compounds of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from various origins. **Food Chemistry**, v. 192, p. 958–964, 2016.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICO). Production - Latest figures from the Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Disponível em: <[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.htm](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.htm)>. Acessado em: 13/08/2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION, Guide to the expression of uncertainty in measurement., ISO, Genebra. ISBN 92-67-10188-9, 1993. Disponível em: <[www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf)>. Acessado em 19 set. 2015.

IVANOVIĆ, D. et al. Effect of pH on the retention behaviour of some preservatives-antioxidants in reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 40, n. 11-12, p. 652–656, 1995.

JUSTE, M. Chocolate gera renda e protege a mata. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), 08 set. 2005, disponível em: <<http://www.pnud.org.br/Noticia.aspx?id=465>>. Acessado em: 18 set. 2015.

KUHNERT, N.; PATRAS, M. A.; MILEV, B. P.; VRANCKEN, G. Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC–MS. **Food Research International**, 2014.

LANGER, S. et al. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: A study of the correlation with nonfat cocoa solids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 8435–8441, 2011.

LE COUREUR, P.; BURRESON, J. **Os botões de Napoleão: As 17 moléculas que mudaram a história**. Rio de Janeiro: Zahar, 2006. 346 p.

LEE, D. J.; DURBÁN, M.; EILERS, P. Efficient two-dimensional smoothing with P-spline ANOVA mixed models and nested bases. **Computational Statistics and Data Analysis**, v. 61, p. 22–37, 2013.

LELO, A. et al. Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 177–182, 1986.

LINSINGER, T. Comparação do resultado de uma medição com o valor certificado. **Application Note 1**, European Reference Materials, 2005.

LOPES, U. V.; PIRES, G. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; PERES, K. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, p.73–81, 2011.

MAHAPOONYANONT, N. et al. Power of the test of one-way ANOVA after transforming with large sample size data. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 9, p. 933–937, 2010.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, S. et al. Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. **Food Research International**, 2014.

MARTINS, J. M.; SANTOS, J. H. F.; SILVA, W. S.; SILVA, V. B.; ARRUDA, J. A. P.; NASCIMENTO, J. A. R.; DORTAS, L. C.; FREITAS, A. J.; RAMOS, A. A. Melhoria da qualidade do cacau. Ilhéus: CEPLAC/CENEX, 2011, 45 p. Disponível em:<[http://www.ceplac.gov.br/restrito/publicacoes/cartilhas/CT\\_04.pdf](http://www.ceplac.gov.br/restrito/publicacoes/cartilhas/CT_04.pdf)>. Acessado em: 20 set 2015.

MATISSEK, R. Evaluation of xanthine derivatives in chocolate - nutritional and chemical aspects. **Zeitschrift fr Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v. 205, n. 3, p. 175–184, 1997.

MEINHART, A. D. et al. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 237–244, 2011.

MILLER, K. B. et al. Survey of commercially available chocolate- and cocoa-containing products in the United States. 2. Comparison of flavan-3-ol content with nonfat cocoa solids, total polyphenols, and percent cacao. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9169–9180, 2009.

MITCHELL, E. S. et al. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 5, p. 816–822, 2011.

MOREIRA, I. M. D. V. et al. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 9–17, nov. 2013.

MORORÓ, R. C. Agroindústria como alternativa de agregação de valores. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Artigos/artigo18.htm>>. Acessado em: 24 set 2015.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). Certificate of Analysis. Standard Reference Material 2384 Banking Chocolate, 2015. Disponível em: <<https://www.nist.gov/srmors/certificates/2384.pdf?CFID=34012747&CFTOKEN=439130fe04a07c8b-115A8024-AAAD-D974-A2466B4C1C18D83A>>. Acessado em: 24 set 2015.

OBERLEY, L. W. Inhibition of tumor cell growth by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. **Age**, v. 21, n. 15, p. 95–97, 1998.

PAULI, E. D. et al. Mixture design analysis of solvent extractor effects on epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and antioxidant activities of the *Camellia sinensis* L. leaves. **Analytical Chemistry Research**, v. 2, p. 23–29, 2014.

PIMENTEL, F. A. et al. Chocolate and red wine – A comparison between flavonoids content. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 109–112, 2010.

PTOLEMY, A. S., TZIOUMIS, E., THOMKE, A., RIFAI, S., KELLOGG, M. Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, p. 409–416, 2010.

QAZI, S. et al. Evaluating dissolution profiles of an anti-HIV agent using ANOVA and non-linear regression models in JMP software. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, n. 1-2, p. 27–39, 2003.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RAMIREZ-SANCHEZ, I. et al. Fluorescent detection of (-)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin-Ciocalteu method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 8, p. 790–793, 2010.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 201–205, 2007.

ROBBINS, R. J. et al. Flavanol and procyanidin content (by degree of polymerization 1-10) of chocolate, cocoa liquors, cocoa powders, and cocoa extracts: First action 2012.24. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 4, p. 705–711, 2013.

RULL, G. et al. Effects of high flavanol dark chocolate on cardiovascular function and platelet aggregation. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 70–78, 2015.

RUSCONI, M.; CONTI, A. Theobroma cacao L., the Food of the Gods: a scientific approach beyond myths and claims. **Pharmacological research** : the official journal of the Italian Pharmacological Society, v. 61, n. 1, p. 5–13, jan. 2010.

SANDHYA, M. V. S. et al. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (Theobroma cacao) fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 731–738, 2016.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**. 2d. New Jersey: Humana Press, 2006. 529 p.

SCHNORR, O. et al. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 211–215, 2008.

SCHWAN, R. F.; MOREIRA, I. M. V.; MIGUEL, M. G. C. P.; DUARTE, W. F.; DIAS, D. R. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids. **Food Research International**, v. 54, p. 9-17, 2013.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 4, p. 205–21, jan. 2004.

SENA, M. M. et al. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química nova**, v. 23, n. 4, p. 547–556, 2000.

SHAW, G. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**: Comprehensive Heterocyclic Chemistry. Bradford: Elsevier, 1984, p.469-605.

SILVA, A. A. DA; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.

SMIT, H. J.; GAFFAN, E. A.; ROGERS, P. J. Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate. **Psychopharmacology**, v. 176, n. 3-4, p. 412–419, 2004.

SOARES, P. K. Planejamento quimiométrico para otimização do solvente extrator e análise exploratória da impressão digital cromatográfica de *Erythrina speciosa* Andrews, 2010, 240p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, São Paulo.

SONG, J. M.; LEE, K. H.; SEONG, B. L. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. **Antiviral Research**, v. 68, n. 2, p. 66–74, 2005.

SRDJENOVIC, B. et al. Simultaneous HPLC determination of caffeine, theobromine, and theophylline in food, drinks, and herbal products. **Journal of chromatographic science**, v. 46, n. 2, p. 144–149, 2008.

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **The American Dietetic Association**, n. 15, p. 215–223, 2003.

TARLEY, C. R. T. et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, p. 58–67, 2009.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

TEYE, E.; HUANG, X.; DAI, H.; CHEN, Q. Rapid differentiation of Ghana cocoa beans by FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate classification. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 183–189, 2013.

TODOROVIC, V. et al. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 137–143, 2015.

TOKUSOGLU, Ö.; ÜNAL, M. K. Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC. **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 4, p. 340–346, 2002.

TZANAVARAS, P. D.; ZACHARIS, C. K.; THEMELIS, D. G. Rapid determination of methylxanthines in real samples by high-performance liquid chromatography using the new Fast Gradient?? narrow-bore monolithic column. **Talanta**, v. 81, n. 4-5, p. 1494–1501, 2010.

VERA CANDIOTI, L. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

WASHBURN, D. K.; WASHBURN, W. N.; SHIPKOVA, P. A. Cacao consumption during the 8th century at Alkali Ridge, southeastern Utah. **Journal of Archaeological Science**, v. 40, n. 4, p. 2007–2013, 2013.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 423–447, 2000a.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. **Food Research International**, v. 33, p. 449–459, 2000b.

WORLD COCOA FOUNDATION (WCF). Cocoa Market Update. Disponível em: <<http://worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Cocoa-Market-Update-as-of-4-1-2014.pdf>>. Acessado em: 09 ago. 2014a.

WORLD COCOA FOUNDATION (WCF). History of Cocoa. Disponível em: <<http://worldcocoafoundation.org/about-cocoa/history-of-cocoa/>>. Acessado em: 21 out. 2014c.

WORLD COCOA FOUNDATION (WCF): Cocoa market statistics. Compiled by the world cocoa foundation from published reports and resources. Disponível em: <<http://worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Cocoa-Market-Update-as-of-3.20.2012.pdf>>. Acessado em: 07 ago. 2014b.

VEPOORT, R. Liquid Chromatography: Definitions and classification of Alkaloids. In: WILSON, D.; EDWARD, R. A.; COOKE, M.; POOLE, C. **Encyclopedia of Separation Science**. Amsterdam: Academic Press, 2000.

ZACHARIS, C. K. et al. Development and validation of a rapid ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of methylxanthines in herbal infusions. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 927, p. 218–222, 2013.

ZHOU, S. et al. Interactions of caseins with phenolic acids found in chocolate. **Food Research International**, v. 74, p. 177–184, 2015.