



Andreia Sobreiro Ferreira

Licenciatura Engenharia Química e Biológica

**Validação da Determinação de Teobromina
em amostras de cacau e seus derivados por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
(HPLC)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, FCT-UNL
Co-orientadora: Dra. Sandra Lampreia Silva, SGS

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes – FCT/UNL

Arguente: Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves – FCT/UNL

Vogais: Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão – FCT/UNL

Dr^a Sandra Lampreia Silva – SGS Portugal, S.A



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2013



Andreia Sobreiro Ferreira

Licenciatura Engenharia Química e Biológica

**Validação da Determinação de Teobromina
em amostras de cacau e seus derivados por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
(HPLC)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2013

“Validação da determinação de Teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)”, Copyright de Andreia Sobreiro Ferreira, FCT-UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja um trabalho individual, muitos foram aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para o findar desta etapa da minha vida académica, marcado por este projeto, e como tal não posso deixar de lhes agradecer:

Os meus agradecimentos terão de ser dirigidos em primeiro lugar à Sociedade Geral de Superintendência – SGS, S.A. pela disponibilização de todos os meios técnicos e humanos e sem a qual não teria sido possível a realização desta dissertação. Agradeço à Eng.^a Ana Machado por me ter recebido gentilmente no Laboratório da SGS e ter possibilitado a realização deste trabalho.

À Professora Benilde Mendes, Professora Coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar da FCT-UNL, agradeço a sua dedicação e constante preocupação pelo interesse dos alunos.

À Professora Ana Lúcia Leitão, agradeço a partilha de conhecimento e experiência científica ao longo de todo o percurso académico. Agradeço a motivação, confiança, carinho, paciência que sempre me concedeu e pelo permanente estímulo que se tornaram decisivos em determinados momentos. Agradeço os conselhos que foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação, bem como toda a disponibilidade demonstrada.

À Sandra Silva, responsável pelo laboratório de Química da SGS, o meu sincero agradecimento pela forma como me acolheu, e pela partilha de conhecimento e experiência científica necessários à realização desta dissertação. Um especial reconhecimento por toda a disponibilidade, apoio e amizade dispensados neste estágio.

A todos aqueles que trabalharam comigo no Laboratório da SGS, especialmente aos técnicos do laboratório de Química Rita, Mauro, Lurdes e Dona Armandina e á minha colega de curso também estagiária na Química, Soraia. A todos agradeço o apoio dispensado e a amizade, alegria e carinho transmitidos.

Às meninas de Lisboa, Carina, Dina, Miriam e Joana pelo apoio e amizade incondicional demonstrados ao longo destes anos e pela confiança que sempre depositaram em mim e permitiram que depositasse nelas. Obrigada por terem feito parte desta etapa tão importante na minha vida.

A todos os meus amigos que me incentivaram e apoiaram ao longo da realização deste trabalho e em especial, à Licas, Juliana, Inês e Tânia. Obrigada.

Ao Tiago pela amizade, amor e paciência em dias menos bons, agradeço com um carinho muito especial a presença, a partilha, a compreensão e o incentivo fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento muitíssimo especial e sentido à Daniela, pelo apoio, paciência, carinho e amizade que demonstrou ao longo destes anos em que partilhamos a mesma casa.

Por fim, mas não menos importante, pelo contrário, um agradecimento muito especial aos meus pais. Obrigada por tudo o que fizeram por mim, pelo incessante apoio, carinho, força e incentivo demonstrado nos momentos mais difíceis e que foram imprescindíveis e fundamentais na motivação para a realização e conclusão do presente trabalho. Um obrigado também à minha irmã Rute, por toda a força transmitida. Agradeço a toda a minha família, tios, primos, padrinho, avós e Paula por proporcionarem momentos tão bons. O que sou hoje, a eles devo.

RESUMO

O cacau é uma das sementes mais consumidas no mundo especialmente como ingrediente de chocolates, bolos e bebidas. Apesar do elevado consumo do chocolate estar relacionado com os aspetos sensoriais, a presença de compostos farmacologicamente ativos é também, atualmente, uma razão para o interesse e consumo deste produto. Dos vários compostos presentes no chocolate, as metilxantinas, principalmente a teobromina é conhecida pelos seus efeitos psicoativos, daí o interesse da sua determinação em amostras de cacau.

De modo a fazer face às necessidades do mercado, o presente trabalho teve como objetivo a implementação e validação de uma metodologia analítica para a determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados por cromatografia líquida de alta eficiência, no laboratório de Química da empresa SGS, expandindo desta forma as capacidades da empresa nesta área.

O método de análise usado foi publicado pelo "*Journal of the Association of Public Analysts*" e os parâmetros de validação definidos para este método englobaram linearidade, limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ), repetibilidade, precisão intermédia e exatidão de forma a garantir fiabilidade nos resultados analíticos obtidos.

Os resultados mostram que o método é linear para uma gama de trabalho entre 25,0 e 300,0 mg/L de teobromina. O método permite detetar e quantificar o analito a partir de 8,1 mg/L e 24,3 mg/L, respetivamente. O método de HPLC apresentou repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis, com coeficientes de variação inferiores a 2% e 5% respetivamente. A exatidão do método foi aferida recorrendo a ensaios de recuperação, tendo-se obtido percentagens de recuperação entre 96-99%.

Palavras – Chave: Teobromina, Quantificação, HPLC, Implementação, Validação

:

ABSTRACT

Cocoa is one of the world most consumed seeds especially as an ingredient of chocolates, candies, pastries and beverages. Despite its high consumption, being related to the sensory aspects, the presence of pharmacologically active compounds is also one reason for the interest and growing consumption of this product. Among the various compounds present in chocolate, methylxanthines, especially, theobromine is known for its psychoactive effects.

In order to meet market needs, this work aims the implementation and validation of an analytical methodology for the determination of theobromine in cocoa samples and derivatives by high performance liquid chromatography in the chemistry laboratory of SGS, thereby, expanding the company's capabilities in this area.

The analysis method used was published by the "Journal of the Association of Public Analysts" and the validation parameters defined for this method encompassed linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), repeatability, intermediate precision and accuracy in order to ensure reliability in the analytical results.

The results showed linearity in the range of concentrations from 25.0 to 300.0 mg/L. This method allowed to detect and quantify the analyte from 8.1 mg/L and 24.3 mg/L, respectively. The HPLC method had acceptable intermediate precision and reproducibility with coefficients of variation lower than 2% and 5%, respectively. The method accuracy was checked with recovery assays, giving recovery percentages of 96-99%.

Keywords: Theobromine, Quantification, HPLC, Validation, Implementation

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE GERAL	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIX
1. OBJETIVO E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	1
1.1. ENQUADRAMENTO.....	1
1.2. ESTRUTURA	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. DA PLANTA AO CHOCOLATE	3
2.1.1. Introdução.....	3
2.1.2. Importância do cacau na medicina ao longo dos tempos	4
2.1.3. Tecnologia pós-colheita.....	8
2.1.3.1. Fermentação	8
2.1.3.2. Secagem	9
2.1.3.3. Preparação do processamento da matéria-prima	10
2.1.3.4. Esterilização	10
2.1.3.5. Alcalinização.....	10
2.1.3.6. Torragem	11
2.1.3.7. Moagem dos grãos.....	11
2.1.4. Cacau em pó	12
2.1.4.1. Prensagem	12
2.1.4.2. Moagem do bolo.....	12
2.1.4.3. Armazenamento cacau em pó	13

2.1.5.	Chocolate	13
2.1.5.1.	Mistura	13
2.1.5.2.	Refinação	14
2.1.5.3.	Conchagem	14
2.1.5.4.	Temperagem	15
2.1.5.5.	Moldagem	16
2.1.5.6.	Solidificação chocolate	16
2.1.5.7.	Desmoldagem	16
2.2.	COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO CHOCOLATE	17
2.2.1.	Macronutrientes	17
2.2.1.1.	Lípidos	17
2.2.1.2.	Glúcidos	18
2.2.1.3.	Proteínas	18
2.2.2.	Micronutrientes	18
2.2.2.1.	Minerais e Vitaminas	18
2.2.2.2.	Flavonóides	19
2.2.2.3.	Metilxantinas	20
2.3.	TEOBROMINA	20
2.3.1.	Características	20
2.3.2.	Metabolismo	21
2.3.3.	Predominância da teobromina	21
2.3.4.	Teobromina na saúde	22
2.3.4.1.	Efeitos psicofarmacológicos	22
2.3.4.2.	Efeitos fisiológicos	23
2.4.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	24

2.4.1.	Fundamentos Teóricos.....	24
2.4.2.	Cromatografia líquida e cromatografia líquida de alta eficiência	25
2.4.2.1.	Classificação de acordo com o mecanismo de retenção.....	26
2.4.2.1.1.	Cromatografia de adsorção	26
2.4.2.1.2.	Cromatografia de partição	27
2.4.2.1.3.	Cromatografia de troca iónica.....	27
2.4.2.1.4.	Cromatografia de exclusão molecular	28
2.4.2.1.5.	A cromatografia de afinidade.....	28
2.4.2.2.	Classificação de acordo com o método de operação	29
2.4.2.3.	Equipamentos.....	29
25.	DETERMINAÇÃO DE TEOBROMINA EM AMOSTRAS DE CACAU E SEUS DERIVADOS POR HPLC	35
2.6.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	37
2.6.1.	Curva de Calibração.....	38
2.6.1.1.	Gama de Trabalho.....	39
2.6.1.2.	Linearidade	39
2.6.2.	Limites analíticos do método de ensaio	40
2.6.2.1.	Limite de deteção	41
2.6.2.2.	Limite de quantificação.....	41
2.6.3.	Sensibilidade	42
2.6.4.	Precisão.....	42
2.6.4.1.	Repetibilidade	43
2.6.4.2.	Reprodutibilidade.....	43
2.6.4.3.	Precisão intermédia.....	44
2.6.5.	Exatidão.....	44

3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA	47
3.1. SGS–SOCIEDADE GERAL DE SUPERINTENDÊNCIA, SA.....	47
4. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	49
4.1. INTRODUÇÃO.....	49
4.2. REAGENTES.....	49
4.3. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES.....	50
4.4. EQUIPAMENTO E MATERIAL.....	50
4.4.1. Equipamento	51
4.4.2. Material.....	51
4.5. ESTUDOS PRELIMINARES.....	51
4.5.1. Método com extração de gordura	51
4.5.2. Método sem extração de gordura	54
5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	57
5.1. INTRODUÇÃO.....	57
5.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO	58
5.2.1. Gama de trabalho.....	60
5.2.2. Linearidade.....	62
5.3. Limiares analíticos	63
5.4. Precisão	63
5.4.1. Repetibilidade.....	63
5.4.2. Precisão intermédia.....	65
5.5. Exatidão	66
6. CONCLUSÃO	69
7. BIBLIOGRAFIA	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Diferentes subclasses dos flavonóides (adaptado de Fernández-Murga <i>et al.</i> , 2011)	19
Figura 2.2 Fórmula molecular da teobromina	21
Figura 2.3 Métodos Cromatográficos	25
Figura 3.1 Logotipo SGS, S.A.	47
Figura 3.2 Logotipo da SGS Multilab	47
Figura 5.1 Representação gráfica referente à curva de calibração de teobromina com padrões entre os 25 mg/L e 300 mg/L	59
Figura 5.2 Teste de RIKILT para avaliar a linearidade do método	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 Concentração de teobromina consoante o número de extrações de gordura	53
Tabela 4.2 Concentração de teobromina quantificada através da metodologia sem extração de gordura e com extração de gordura, em amostras com concentração conhecida.....	55
Tabela 5.1 Sinal cromatográfico referente á concentração dos padrões	57
Tabela 5.2 Concentração de teobromina em diferentes produtos à base de cacau.....	58
Tabela 5.3 Sinal cromatográfico referente á concentração dos padrões	59
Tabela 5.4 Área dos picos cromatográficos referentes ao padrão 25,0 mg/L e 300,0 mg/L	61
Tabela 5.5 Cálculo dos resíduos para o estudo da linearidade	62
Tabela 5.6 Valores dos limiares analíticos calculados para a determinação de teobromina.....	63
Tabela 5.7 Área dos picos cromatográficos e respetiva concentração obtidos no chocolate em pó para o estudo da repetibilidade em termos de CV (%)	64
Tabela 5.8 Área dos picos cromatográficos e respetiva concentração obtidos no chocolate em pó para o estudo da precisão intermédia em termos de CV (%)	65
Tabela 5.9 Valores de recuperação obtidos para a fortificação de chocolate branco com o padrão 25 mg/L	67
Tabela 5.10 Valores de recuperação obtidos para a fortificação de chocolate branco com o padrão de 300 mg/L	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
LDL – ox	Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas
UFC	Unidades formadoras de colônias
SNC	Sistema nervoso central
PARP-1	poli(ADP ribose)polymerase-1
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
BOCOF	<i>Big One Come Out First</i>
CFG	Cromatografia de filtração em gel
CPC	Cromatografia de permeação em gel
ε	Absortividade molar
c	Concentração molar
d	Comprimento da célula.
A	Absorvância
FSA	<i>Food Standards Agency</i>
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
VEMS	<i>Validated Enforcement Methods</i>
ISO	<i>International Standard Organisation</i>
NP	Norma Portuguesa
EN	<i>European Standard</i>
LD	Limite detecção
LQ	Limite quantificação
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
SGS	Sociedade Geral de Superintendência
ACHOC	Associação das Industrias de Chocolate e Confeitaria

1. OBJETIVO E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

1.1. ENQUADRAMENTO

Embora o consumo do chocolate seja principalmente associado à sua carga emocional e psicológica, nos últimos 50 anos este produto tem ganho visibilidade perante os seus benefícios para a saúde.

Segundo a ACHOC, Associação das Indústrias de Chocolate e Confeitaria, em 2012, as vendas de chocolate em Portugal cresceram 1,5%, em valor, e 3,3%, em volume, face ao ano anterior, tendo, nesse mesmo ano exportado um total de 10,8 milhões de euros de chocolate e outros alimentos contendo cacau e importou 150,8 milhões, principalmente de mercados europeus. Os portugueses consomem em média 1,9 quilos *per capita* por ano, um valor reduzido quando comparado com outros países.

Por exemplo, em Espanha ou Itália o mesmo consumo ultrapassa os 3 quilos e em países como a Inglaterra ou Alemanha, é de cerca de 10 quilos por ano. Nesses países o chocolate é considerado um alimento ideal para ser consumido a meio da manhã ou durante a tarde, como um complemento, ou suplemento nas refeições básicas. Em Portugal este produto era visto principalmente como uma prenda ou gratificação, mas nos últimos anos o seu consumo tem aumentado devido à sua associação aos efeitos benéficos para a saúde.

A teobromina, um composto presente no chocolate tem gerado um interesse crescente na comunidade científica pelas recentes descobertas associadas aos seus efeitos psicoativos e benéficos para a saúde. Aliado a este facto, os regulamentos em vigor na Europa, especificam as quantidades mínimas de cacau numa vasta gama de produtos derivados de cacau, o que incentivou os fabricantes de chocolate e laboratórios de investigação a realizarem análises de rotina a este tipo de produtos, sendo possível, através de um fator de conversão, determinar os sólidos totais de cacau isentos de gordura, a partir da determinação de teobromina.

Fazendo face às necessidades do mercado este trabalho teve como objetivo a implementação e validação de uma metodologia para a determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados no laboratório de Química da SGS Portugal.

Para a validação do método, o processo utilizado consiste em confirmar que o procedimento analítico utilizado para um teste específico é adequado para o uso pretendido.

Segundo o guia utilizado para a validação, guia Relacre, os requisitos mínimos para a validação, dependem do tipo de método analítico em estudo. Tendo em conta que no presente estudo o método a validar é uma técnica de ensaio conhecida, descrita em literatura científica, mas não existindo norma de ensaio correspondente, os parâmetros mínimos, a considerar no presente trabalho são:

- Gama de Trabalho/Linearidade;
- Limiares analíticos (Limite de deteção e Limite de quantificação);
- Sensibilidade;
- Precisão (Repetibilidade, Reprodutibilidade e Precisão Intermédia);
- Exatidão;

Os resultados de validação do método são usados para avaliar a qualidade, fiabilidade e consistência dos resultados analíticos.

1.2. ESTRUTURA

No **Capítulo 1** faz-se o enquadramento lógico do trabalho e é apresentada a estrutura do mesmo.

No **Capítulo 2** é abordada toda a revisão bibliográfica referente aos temas abordados durante o desenvolvimento do trabalho. Este capítulo inicia-se com a descrição dos processos que envolvem o fruto cacau, desde a sua colheita ao produto final, o chocolate, bem como a sua composição nutricional. Uma vez que este trabalho tem como objetivo a validação da determinação de teobromina pelo método de HPLC, neste capítulo de revisão bibliográfica a teobromina, o HPLC e a validação de métodos também serão abordados.

O **Capítulo 3** caracteriza a empresa Sociedade Geral de Superintendência, S.A. – SGS

No **Capítulo 4** é apresentado todo o desenvolvimento experimental que permitiu a posterior validação do método. Neste capítulo são referidos os estudos preliminares à validação do método e os resultados decorrentes do desenvolvimento deste trabalho.

No **Capítulo 5** é apresentado o desenvolvimento da validação do método.

No **Capítulo 6** são apresentadas as principais conclusões acerca do trabalho desenvolvido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DA PLANTA AO CHOCOLATE

2.1.1. Introdução

O nome científico *Theobroma cacao* foi atribuído, em 1753, pelo botânico suíço Carl Linnaeus, aquando a publicação do seu famoso livro "*Species Plantarum*". A árvore do cacau, *Theobroma cacao* L. pertencente à família das *Sterculiaceae*, cresce numa zona geográfica limitada, 10 graus para norte e sul do equador, em particular na América Central, América do Sul, África e Ilhas do Oeste da Índia (Paoletti *et al.*, 2012).

Existem três importantes variedades de cacau: Forastero, Criollo e Trinitario. A variedade Forastero é muito produtiva e resistente, sendo a que representa 95% da produção mundial de cacau. A Criollo proporciona sementes de cacau muito aromáticas, mas devido à sua sensibilidade perante as mudanças climáticas, é muito propícia a doenças e pragas, fazendo com que o seu rendimento seja muito baixo. Trinitario é um híbrido entre Criollo e Forastero, e apresenta características de ambas as variedades (Watson *et al.*, 2013).

Em cada árvore de cacau podem nascer 35.000 e 116.000 flores por ano, sendo que menos de 5% são polinizadas e menos de 1% desenvolvem uma fruta madura. Dependendo do genótipo do fruto de cacau este mostra cores e formas diferentes e o tamanho pode variar entre os 15 cm e 30 cm de comprimento. Um fruto do cacaueiro pode conter 50 sementes que estão ligadas a uma placenta e rodeadas por uma polpa que contém cerca de 10,0-13,0% de açúcar, 1,0% pectinas e 1,0-2,0% de ácido cítrico. A composição média das sementes de cacau, em matéria seca é de 40,0-60,0% de manteiga de cacau, 10,0-15,0% de proteínas, 6,0% de amido, entre 0,9-1,4% de teobromina e 0,2% de cafeína (a espécie Criollo pode conter até 1,3%) e 5,0-9,0% flavonóides. A composição interna é influenciada pela espécie, condições agronómicas e origem. A fim de se obter o sabor de chocolate desejado, as sementes e a polpa têm de ser separadas e tratadas posteriormente (Paoletti *et al.*, 2012).

O tratamento inicial das sementes de cacau tem início na colheita dos frutos maduros, pois considera-se que tem efeitos benéficos na qualidade e sabor dos grãos durante a fermentação e posterior processamento (Afoakwa, 2010).

Durante a sua abertura é necessário extremo cuidado para não danificar as sementes, uma vez que quando danificadas são mais propensas a ataques de fungos, podendo estes microrganismos filamentosos conduzir à produção de micotoxinas tais como ocratoxina A (Watson *et al.*, 2013).

2.1.2. Importância do cacau na medicina ao longo dos tempos

A utilização do cacau como produto natural medicinal já vem desde os Astecas, estes povos utilizavam os grãos de cacau formados nas vagens do cacauzeiro para acalmar problemas de estômago e intestinais, diarreia infantil, reduzir a febre, estimular a força nas pessoas mais fracas (Paoletti *et al.*, 2012).

Na Europa a relação do chocolate e a medicina data às viagens de Cristóvão Colombo nas descobertas ao Novo Continente. Naquela época muitos e novos alimentos invulgares começaram a aparecer nas mesas de jantar dos europeus, entre eles o chocolate, sendo que a sua aceitação não tenha sido de todo imediata. Nesses tempos o chocolate era visto como um produto “indígena”. Inicialmente era considerado pecaminoso e perigoso, por ser um produto preto quente e picante diziam que evocava as profundezas do inferno (Lippi, 2009).

Desde cedo adquiriu uma reputação intrigante, acabando por ter uma conotação positiva. O conquistador Hernán Cortés escreveu à coroa espanhola dizendo que era uma bebida milagrosa “um copo dá força suficiente a um soldado para marchar todo o dia” (Lippi, 2009).

Devido aos efeitos eufóricos do chocolate a uma dada altura o seu consumo só era permitido por razões medicinais, como tal os médicos apressaram-se a afirmar que o chá, café e principalmente o chocolate eram substâncias saudáveis, impulsionando o lucrativo comércio de importação deste produto exótico (Lippi, 2009).

O consumo do chocolate tornou-se conhecido principalmente no sul da Europa, mas a sua popularidade não foi generalizada, ficando limitada à elite social. Nesta época não existia um consenso na classe médica sobre os efeitos medicinais deste produto.

Os primeiros autores a documentar o consumo de cacau e chocolate com fim terapêutico tinham como base a experiência do povo do Novo Mundo (nome dado ao continente americano após a conquista de Cristóvão Colombo). Em 1536, M. de La Cruz, professor num colégio que foi fundado na cidade do México, pelos espanhóis, confirmou que o chocolate era utilizado no tratamento de anginas, constipações, problemas dentários, indigestão, fadiga entre outras doenças. Ao contrário dos padres que visitavam o novo mundo (América) e viam os seus habitantes como selvagens e de costumes ímpios, um monge espanhol, Bernardino de Sahagún, ficou curioso com a cultura medicinal mexicana e registou muito do seu conhecimento no manuscrito “Florentine Codex”, que ainda hoje se encontra preservado em Florença. Este manuscrito advertia para os efeitos de um consumo excessivo da bebida, mas recomendava o seu consumo com moderação, uma vez que a bebida era revigorante e refrescante. Se o padre Agustín Dávila Padilla afirmava que o consumo deste alimento curava doenças dos rins, Francisco Hernandez, em 1577, escreveu que a pasta de cacau pura preparada como bebida era utilizada no tratamento de febre e doenças do fígado (Lippi, 2009; Watson *et al.*, 2013).

Quando o consumo do chocolate se expandiu para o Sul da Europa as afirmações sobre este alimento deixaram de se basear apenas no seu uso prático assumindo um debate sobre as suas características médico-filosóficas, típica do Galenismo, que ainda era um ponto de referência incontornável na prática médica da época (Lippi, 2009).

Nos séculos XVII e XVIII o conceito de ciências médicas ainda estava muito envolvido na abordagem Hipócrates-Galeno, sendo que a saúde era o resultado da eucrasia dos quatro fluidos corporais, sangue, muco, bÍlis amarela e bÍlis preta, sendo-lhes atribuídas disposições e qualidades: quente, frio, húmido e seco. A terapia utilizada era a terapia alopática, uma forma de medicina alternativa, que acreditava que “opostos curam opostos”. O médico determinava a natureza da doença e escolhia o remédio adequado. Se a natureza da doença fosse frio o seu tratamento seria feito com remédios quentes, se o alimento fosse seco o remédio teria de ser húmido e sempre nesta ordem de ideias. Perante estas condições era necessário perceber a verdadeira natureza do chocolate e as substâncias adicionadas aquando a preparação da bebida, bem como as suas qualidades, possibilitando assim o uso deste alimento como remédio (Watson *et al.*, 2013).

No seguimento desta terapia Santiago de Valverde Turices discriminou a qualidade fria do cacau relativamente à quente e seca do chocolate, tendo de ser então usado para doenças frias e húmidas (Watson *et al.*, 2013).

Em 1624 o cacau foi considerado um autêntico remédio uma vez que a sua toma em pequenas quantidades tinha efeitos benéficos para o estômago e em grandes quantidades era benéfico a nível pulmonar (Lippi, 2009).

A discussão em torno do uso medicinal do cacau espalhou-se fora dos limites da Espanha e chegou ao Reino Unido onde se dizia que o chocolate deveria ser consumido uma ou duas vezes por dia de modo a aliviar o cansaço provocado no trabalho e afirmavam também que a ingestão do óleo de cacau era eficaz no tratamento de envenenamento por cravagem do centeio (Lippi, 2009).

Durante o século XVIII ainda foram muitas as declarações sobre o uso medicinal do cacau e do chocolate entre as quais, Carl von Linné (Linnaeus) botânico suíço, registou qualidades do chocolate, como alimento e como substância terapêutica. Linnaeus identificou três tipos de doenças em que o chocolate poderia ser usado de forma adequada: na perda de peso, como consequência de doenças pulmonares e musculares, hipocondria, e hemorróidas, acrescentando também que era um excelente afrodisíaco, confirmando uma tradição já existente na pré- cultura colombiana (Lippi, 2009; Watson *et al.*, 2013).

O nome científico *Theobroma cacao* foi atribuído ao cacau em 1753 pelo botânico suíço referido anteriormente, Carl Linnaeus, aquando a publicação do seu famoso livro *Species Plantarum*. O termo genérico *Theobroma* significa “alimento” (do Grego *broma*=alimento) “dos deuses” (do Grego *Theos*” deuses) e *cacao* deriva da palavra asteca “*xocolatl*, do “*xococ*” (amargo) e “*atl*” (água) (Paoletti *et al.*, 2012).

O século terminou com o trabalho de Antonio Lavedan, que alegou, novamente na base da tradição anterior, que o chocolate era uma espécie de medicina universal, uma vez

que estimula o calor natural e o coração, diminui a flatulência, cura constipações, ajuda a digestão, aumenta a virilidade, e abranda o crescimento do cabelo branco, prolongando significativamente a vida (Watson *et al.*, 2013).

Quando os livros de cozinha e dietética deixaram de ser subclasses de livros de medicina e adquiriram uma identidade diferente, resultado da época do Iluminismo Francês, a investigação da terapia e do gosto seguiram caminhos distintos, o que fez com que o chocolate, anteriormente tão vangloriado pelas suas capacidades medicinais, fosse rebaixado ao papel de excipiente, substância farmacologicamente inativa. Como consequência, com o passar dos tempos adquiriu uma conotação negativa, sendo-lhe associada a obesidade, problemas dentários e estilo de vida pouco saudável (Lippi, 2009; Watson *et al.*, 2013).

Este alimento que durante séculos, fora elogiado pelas suas capacidades medicinais, ainda que místicas, no início do século, passou a ser comercializado apenas como um alimento saboroso (Paoletti *et al.*, 2012).

A conotação positiva que lhe foi característica durante séculos, voltou apenas nos últimos anos, a partir de 1950, recuperando positivamente páginas das revistas científicas internacionais, restaurando assim o valor que Linnaeus deu ao chocolate quando o chamou de “Alimento dos Deuses” (Paoletti *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2013).

A partir da segunda metade do século 20, procurou-se provar os benefícios do chocolate anteriormente descritos. Através das ciências biomédicas começou-se a avaliar experimentalmente o potencial do chocolate no alívio de problemas de saúde, tal como se fazia para os fármacos. Ensaio experimentais cada vez mais complexos, com base em vários centros clínicos controlados eram realizados de modo a identificar padrões (Paoletti *et al.*, 2012).

Nesta época a eficácia terapêutica dos remédios e das práticas médicas foi reformulada dentro do molde de Medicina Baseada em Evidências. A partir de 1990 a tomada de decisões sobre o cuidado dos pacientes era feita com decisões conscientes e explícitas, baseada em factos. A experiência clínica era combinada com evidência biomédicas recém-suportadas obtidas através de pesquisas bibliográficas sistemáticas para garantir a prestação dos cuidados de saúde com elevada qualidade. Daí a necessidade de examinar todos os supostos benefícios do chocolate num contexto científico e médico (Paoletti *et al.*, 2012).

Os primeiros estudos realizados estavam relacionados com a riqueza em glúcidos e gordura, pois os compostos fenólicos naturais do chocolate impediam a rancificação das gorduras diminuindo assim a necessidade de adição de conservantes, que poderiam trazer os seus próprios riscos para a saúde (Paoletti *et al.*, 2012).

No final do século XX os efeitos afrodisíacos do chocolate foram estudados. Quando as pessoas estão apaixonadas há um aumento dos níveis de feniletilamina, embora que em pequenas quantidades o chocolate contém esta substância. O consumo de chocolate também promove aumentos da concentração de serotonina, que é o neurotransmissor que atua no cérebro provocando a sensação de sentimentos agradáveis. Após o seu consumo também ocorre a libertação de anandamida, provavelmente responsável pelo estado de euforia sentido

por algumas pessoas após o consumo deste alimento. Todas estas alterações psicofarmacológicas podem contribuir para percebidos efeitos afrodisíacos de chocolate (Paoletti *et al.*, 2012).

O consumo de chocolate sempre esteve associado com obesidade, diabetes ou cáries. Em 1996 Waterhouse *et al.* publicaram um artigo afirmando que o cacau e chocolate comerciais eram uma fonte de polifenóis, principalmente os flavonóides, como a catequina, epicatequina e procianidinas, e que estes compostos tinham um efeito considerável na proteção contra a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo esta oxidação a principal responsável pela aterosclerose (Fernández-Murga *et al.*, 2011; Watson *et al.*, 2013).

A atividade antioxidante dos flavonóides de cacau é atribuída à sua capacidade de neutralizar os radicais livres e inibir as enzimas responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio. A quercetina, um flavonóide em menor quantidade no cacau, e outros compostos que não flavonóides presentes no cacau, particularmente as metilxantinas, contribuem para a sua actividade antioxidante (Watson *et al.*, 2013).

A aterosclerose é considerada como um processo inflamatório crónico de baixo grau, resultante de interações entre as lipoproteínas do plasma, componentes celulares e da matriz extracelular da parede. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) exercem funções anti-inflamatórias, enquanto que, as lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDL – ox), lipoproteínas de muito baixa densidade e lipoproteína A são lipoproteínas aterogénicas que desempenham um importante papel nas reações pós inflamatórias. Portanto um aumento das concentrações séricas de HDL, a redução de níveis de concentração de LDL e a inibição da oxidação das partículas de LDL previnem o desenvolvimento de aterosclerose (Khan *et al.*, 2012).

Uma dieta saudável e alterações no estilo de vida são o primeiro passo na prevenção de doenças cardiovasculares. Outro fator que tem sido associado à redução de risco de doença cardíaca coronária é o consumo de alimentos ricos em polifenóis, entre eles o cacau e seus derivados. Um estudo realizado por Khan *et al.* no qual participaram 42 pessoas com elevado risco cardiovascular, cujo objetivo era que durante 4 semanas, metade dos indivíduos consumisse 40 g de cacau e 500 mL de leite magro por dia e outra metade consumisse apenas o leite. Neste estudo verificou-se que no grupo de pessoas que consumiu cacau e leite a concentração de HDL aumentou comparativamente aos indivíduos que consumiram apenas leite. Com este estudo foi possível demonstrar que o consumo de polifenóis de cacau pode contribuir para um aumento na concentração de HDL e que este aumento, em conjunto com a proteção antioxidante dos polifenóis incorporados em partículas de LDL, pode reduzir os níveis de LDL oxidado, principal responsável pelo desenvolvimento de aterosclerose. Sendo que a principal conclusão deste estudo é que o consumo regular de cacau é uma ferramenta útil contra fatores de risco para o desenvolvimento da doença cardíaca coronária (Khan *et al.*, 2012).

A redução da pressão arterial e a actividade anti-inflamatória do chocolate preto sugerem-no como sendo um agente terapêutico e preventivo, sendo que há estudos epidemiológicos que sugerem a sua associação na proteção contra a doença arterial coronária. Além de todos os benefícios associados ao chocolate preto este é o menos calórico e deve ser consumido com limite de 50 g por semana (Di Castelnuovo *et al.*, 2012).

Outra abordagem realizada aos benefícios do cacau prende-se na sua prevenção contra o cancro. Estudos realizados em animais mostraram que o cacau e os seus principais componentes fenólicos podem prevenir e/ou retardar o início ou progressão de diferentes tipos de cancro, tais como, o cancro da próstata, fígado, cólon, leucemia, etc. Além disso, vários estudos realizados em humanos relatam algumas mudanças favoráveis nos biomarcadores. No entanto, estudos adicionais devem de ser conduzidos de modo a avaliar o potencial do cacau, bem como em a dose ótima. Em geral estes estudos sugerem que a ingestão diária de pequenas quantidades de flavonóides e procianidinas de cacau ou chocolate, em conjunto com a ingestão habitual de flavonóides provenientes de outros alimentos, previne o cancro com o mínimo de toxicidade (Martin *et al.*, 2013).

A história do chocolate a nível de interesse biomédico é recente, uma vez que o estudo dos mecanismos de proteção só se iniciou na década de noventa do século XX. Apesar disso, em menos de duas décadas já existe uma quantidade substancial de literatura sobre a composição e propriedades do chocolate e seus flavonóides. No entanto, existem ainda inconsistências importantes que requerem esclarecimentos, especialmente a nível epidemiológicos. Esta mistura de expectativas e inconsistências garante o interesse continuado de pesquisa nesta área. Enquanto isso, deve ser tomado cuidado antes de recomendar o consumo de chocolate, em particular a indivíduos em risco, tais como as pessoas obesas e com diabetes, pois o processo de produção do chocolate, especialmente chocolate de leite, inclui açúcar, bem como outros produtos que aumentam o conteúdo calórico (Fernández-Murga *et al.*, 2011).

2.1.3. Tecnologia pós-colheita

2.1.3.1. Fermentação

A fermentação inicia-se na polpa, onde a actividade microbiológica leva ao início de vários processos bioquímicos, importantes para o desenvolvimento do sabor no interior dos grãos, processo que continua durante a fase de secagem (Watson *et al.*, 2013).

O principal objetivo do processo de secagem é a obtenção de sementes de cacau, microbiologicamente estáveis, por desidratação numa extensão em que o crescimento microbiano se torne impossível. O teor de 7,2% de água é o limite de segurança estabelecido. Durante o processo de secagem a disponibilidade de água diminui, o que implica a diminuição dos microrganismos capazes de se desenvolverem nestas condições, observando-se, uma redução acentuada no número de células viáveis e de esporos. Muitos fungos, tais como

Aspergillus spp., *Penicillium* spp., são capazes de crescer quando o valor da actividade da água é baixo, e caso a redução do teor de humidade durante a secagem, seja demasiado lenta, estes irão crescer, o que pode resultar na formação de sabor desagradável e formação de micotoxinas (Watson *et al.*, 2013).

Durante a fase inicial da fermentação, as condições são favoráveis ao crescimento de determinados microrganismos devido à elevada concentração de açúcares, ao meio ácido proveniente da elevada concentração de ácido cítrico e ao elevado teor de pectina e outros polissacáridos que tornam a polpa viscosa limitando assim a disponibilidade de oxigénio (Watson *et al.*, 2013).

Os microrganismos presentes na polpa, tais como leveduras e bactérias do ácido acético e do ácido láctico metabolizam os açúcares em etanol. Subsequentemente, parte do etanol é oxidado pelas bactérias do ácido acético, por meio de uma reação exotérmica, provocando um aumento na temperatura durante a fermentação, 55°C (Paoletti *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2013).

O etanol e os ácidos penetram na semente e esta alteração de pH e temperatura aceleram a morte da semente, isto é, a destruição do poder germinativo; as células da parede da semente também são destruídas iniciando-se assim, no interior da semente, processos bioquímicos que são os precursores do sabor no chocolate final (Beckett, 2009; Afoakwa, 2010).

Esta etapa ocorre durante 2-8 dias e é determinante para a boa qualidade dos grãos de cacau (Beckett, 2009).

2.1.3.2. Secagem

A fermentação é interrompida através da secagem das sementes, nesta etapa pretende-se diminuir a humidade inicial 40-60% para uma humidade de 6-7%. A secagem pode ser realizada ao ar ou através de secadores. Ao ar, há o risco de contaminação das sementes pelo ambiente ou insetos, pelo que devem ser tomadas as devidas precauções no seu manuseio quando chegam à fábrica de processamento. Quando se utiliza gás proveniente de madeira queimada, pode haver fugas de fumo da combustão dando um sabor desagradável às sementes impedindo a sua utilização, pelo que os secadores de ar forçado são uma opção mais segura (Afoakwa, 2010; Watson *et al.*, 2013).

Durante a secagem, continuam-se a desenvolver processos bioquímicos iniciados durante a fermentação, importantes para o desenvolvimento da cor e sabor dos grãos de cacau, sendo uma etapa essencial para a produção de chocolate de boa qualidade (Watson *et al.*, 2013).

A fermentação e a secagem são etapas onde é necessário um extremo cuidado, uma vez que nenhum outro processamento posterior é capaz de corrigir falhas existentes durante a fermentação e/ou secagem (Beckett, 2009).

Após a secagem adequada, as sementes de cacau, passam a denominar-se por grãos de cacau, pois nesta etapa as sementes já foram sujeitas a fermentação e secagem (Jumnongpon *et al.*, 2012).

Os grãos estão prontos para serem comercializados como a matéria-prima para a produção de derivados de cacau. Normalmente, os grãos são armazenados e transportados em sacos de juta ou a granel. Apesar de alguns países produtores de cacau terem estabelecido indústria para processamento dos grãos, grande parte dos grãos fermentados e secos são exportados diretamente para a Europa, Estados Unidos, Japão e outras partes do mundo industrializado (Watson *et al.*, 2013).

2.1.3.3. Preparação do processamento da matéria-prima

Após a chegada à fábrica de processamento, os grãos são limpos para remover metais, pedras e outros materiais estranhos que possam contaminar o produto. Esta etapa é realizada num edifício diferente da etapa da torra dos grãos, pois se a matéria-prima estiver contaminada, com este procedimento os grãos torrados não são contaminados (Beckett, 2009; Afoakwa, 2010).

Os grãos limpos são então quebrados, de modo a separar a casca exterior do grão de cacau, as conchas são reaproveitadas para cobertura de solos agrícolas ou utilizadas para adubar (Afoakwa, 2010).

2.1.3.4. Esterilização

A esterilização é a etapa onde os grãos de cacau são expostos a temperaturas suficientemente altas e durante o tempo necessário para destruir todos os microrganismos que estejam a contaminar os grãos provenientes de etapas anteriores e do seu manuseio. Este processo pode ser efetuado em lotes ou em contínuo, por humedecimento ou aquecimento com vapor de água garantindo assim que a contagem total em placa diminui para 500 UFC/g e que todos os patogénicos são destruídos. A esterilização pode ser realizada antes ou depois da torra dos grãos, pois apesar de a torragem ser feita a elevadas temperaturas podem existir esporos ou bactérias resistentes ao calor (Afoakwa, 2010).

2.1.3.5. Alcalinização

A torra dos grãos, pode ser realizada diretamente, ou então podem ser sujeitos a um processo de alcalinização. A alcalinização foi um método introduzido pela primeira vez por um holandês conhecido como Van Houten, em 1928 daí que seja chamado de processo “Dutching”. Este processo consiste no tratamento dos grãos de cacau com a pulverização de uma solução alcalina, tal como hidróxido de potássio ou carbonato de sódio, fazendo assim com que o pH ácido dos grãos (5,2 – 5,6) passe a neutro. Como tal, após a alcalinização os grãos ficam com pH entre 6,8 e 7,5. A alcalinização termina com uma secagem lenta com

temperatura inferior a 100°C. O principal efeito desta etapa são alterações na cor e sabor da pasta de cacau e o melhoramento da capacidade de dispersão ou suspensão do cacau na água (Beckett, 2008; Afoakwa, 2010).

2.1.3.6. Torragem

Na etapa de torragem, os grãos são torrados para continuar a desenvolver o sabor de cacau original, que existe sob a forma de precursores de sabor, gerados durante os processos de fermentação e secagem dos grãos (Afoakwa, 2010).

Para esta etapa são utilizadas temperaturas entre os 120-130°C, nunca ultrapassando os 150°C durante 10 a 35 minutos, estes parâmetros dependem da espécie, teor de humidade e amadurecimento. É necessário ter especial atenção ao tempo/temperatura adequados, pois caso contrário, nesta etapa pode perde-se, pelo menos, 50% dos flavonóides existentes no cacau (Paoletti *et al.*, 2012).

Após a torra dos grãos, a humidade é reduzida para 2-3%, resultando na oxidação dos compostos fenólicos e remoção do ácido acético, ésteres voláteis e outros aromas indesejáveis. Durante a secagem e a torragem os péptidos e aminoácidos livres, juntamente com os açúcares redutores, também presentes nos grãos fermentados, dão origem aos produtos de reações de oxidação lipídica, tal como por exemplo os produtos da reação de Maillard, responsáveis pelo aroma e cor característica do cacau (Watson *et al.*, 2013).

Para a produção de licor de cacau era muito usual realizar a torragem com grãos inteiros, uma vez que a torra facilita a remoção da casca. Mas por outro lado, durante o processo o calor faz com que alguma gordura fique agregada às cascas, resultando assim na perda de alguma manteiga de cacau. De modo a superar este problema a torrefação é realizada após a remoção prévia das cascas. A principal desvantagem é a maior dificuldade em separar a casca do grão que pode eventualmente resultar numa separação insuficiente, mas se for realizado um pré-tratamento térmico, a temperatura da superfície aumenta fazendo evaporar a humidade interna, que por sua vez cria uma pressão no interior do grão, provocando a desagregação da casca (Afoakwa, 2010).

2.1.3.7. Moagem dos grãos

A estrutura dos grãos contém cerca de 55% de manteiga de cacau sólida dentro das células, através da moagem esta gordura é removida do interior das células e com o aquecimento gerado na moagem, a manteiga de cacau funde, formando uma massa pastosa, a pasta de cacau. Para a produção de cacau em pó é importante obter uma moagem fina. A viscosidade da pasta de cacau obtida após a moagem está relacionada com a torra efetuada aos grãos e com a humidade dos mesmos (Beckett, 2008; Afoakwa, 2010).

2.1.4. Cacau em pó

2.1.4.1. Prensagem

A pasta de cacau refinada é aquecida em tanques de armazenamento a uma temperatura de cerca de 90-100°C. Esta pasta pré-aquecida é transferida para uma divisão da prensa. Quando a pressão aumenta a manteiga de cacau, que representa mais de metade do peso da pasta de cacau é removida através da prensagem e armazenada num recipiente adequado, enquanto que a pasta de cacau se transforma num bolo de cacau prensado (Beckett, 2009).

Dependendo do tempo e das configurações da prensa, o “bolo” resultante pode conter gordura entre os 10% e 24%. Após esta etapa podem obter-se dois tipos de bolo de cacau: um bolo de alto teor de gordura, contendo entre 22 e 24% de gordura residual no bolo prensado e um bolo de baixo teor de gordura, contendo entre 10 e 12% de gordura residual no bolo prensado (Afoakwa, 2010).

2.1.4.2. Moagem do bolo

O bolo proveniente da prensagem, é quebrado em pequenos pedaços entre dois rolos perfurantes com rotações em sentidos opostos. Posteriormente é usado um moinho de pinos para moer finamente o pó. Como depois de passar no moinho a gordura continua líquida, é necessário arrefecer esta massa, para a gordura solidificar e não fazer grumos com o pó (Beckett, 2008).

Quando a cristalização da gordura é insuficiente pode dar-se uma descoloração do produto, denominando-se por “bloom” da gordura (Afoakwa, 2010).

Grande parte do pó produzido contém um teor em gordura de 20-22%. Sendo que é possível produzir cacau em pó com menos gordura, entre 15-17% ou 10-12%. E também pode ser produzido cacau em pó sem gordura para ser utilizado em produtos com baixo teor de gordura ou sem gordura. O cacau em pó pode ser misturado com outras gorduras para a produção de chocolate aromatizado ou para produzir coberturas para bolos e recheios, sendo que, uma quantidade muito grande é usada para fazer bebidas de chocolate. Estas são feitas a partir de açúcar, pó de cacau e lecitina. A lecitina pode ser adicionada ao bolo de prensagem e então moída com ele, garantindo assim, que a lecitina está estreitamente ligada ao cacau, especialmente à gordura. A lecitina actua como um emulsionante entre as partículas de gordura de cacau e a água. Deste modo quando a bebida é preparada o cacau em pó dissolve-se na água não formando grumos (Beckett, 2008).

Após a moagem realizada ao bolo para a produção de cacau em pó este pode perder cerca de 10% a 30% de flavonóides. Esta perda de flavonóides é devida ao facto de durante a moagem e o transporte pneumático do pó ser gerado muito calor devido à fricção. O calor, o baixo teor de oxigénio e a gordura existente, causa a oxidação dos flavonóides do cacau.

Outro processo que pode levar à oxidação de flavonóides é a alcalinização, devido à água e à solução alcalina adicionadas a elevadas temperaturas e por vezes a elevadas pressões. Sendo que a quantidade de flavonóides está diretamente relacionada com a extensão da alcalinização. O cacau em pó produzido sem recorrer à alcalinização, contém no mínimo 10% de flavonóides, contudo este cacau, dito natural, possui um sabor menos agradável que o que foi sujeito a alcalinização. Como tal, é possível ter cacau em pó com um sabor agradável e 6% de flavonóides, como tal é necessário ter em conta a extensão da alcalinização. Após todo o processamento é possível ter no mercado cacau em pó alcalinizado com cerca de 0,4% de flavonóides e sem ser alcalinizado com 1,5% (Paoletti *et al.*, 2012).

2.1.4.3. Armazenamento cacau em pó

O cacau em pó é muito sensível às temperaturas elevadas bem como às oscilações de temperatura, que podem resultar na fusão e re-cristalização da manteiga de cacau. Estas alterações são visíveis uma vez, que, há alterações na cor do pó. A fusão e re-cristalização da manteiga de cacau pode levar à formação de grumos, um problema comum que dificulta o processamento do cacau em pó. Devido à elevada higroscopicidade deste produto de cacau, os ambientes muito húmidos devem ser evitados, sendo que é necessária uma embalagem adequada para o armazenamento do produto. Quando o cacau em pó é armazenado sob condições adequadas o seu tempo de prateleira é de garantidamente três anos. Essas condições são: a temperatura de armazenamento deve estar entre os 18°C e os 22°C, evitar variações de temperatura, deve ser evitado a exposição a fontes de calor, como a luz solar, lâmpada e sistemas de aquecimento, o local de armazenamento deve ser limpo e seco e a humidade relativa não deve exceder os 50% (Beckett, 2009).

2.1.5. Chocolate

A maioria das pessoas pode pensar que o chocolate é sólido, uma vez que é assim que o encontra como produto final, no entanto, durante o processamento, é normalmente líquido e apenas é solidificado antes de estar pronto para ser embalado e vendido.

Para o fabrico de chocolate preto os ingredientes principais são o açúcar, manteiga de cacau e os grãos de cacau. Relativamente ao chocolate de leite a diferença do principal ingrediente é a adição de pó integral de creme de leite

O processo de fabricação de qualquer tipo de chocolate tem geralmente em comum algumas partes, tais como, a mistura, refinação, temperagem, conchagem, moldagem, solidificação e desmoldagem.

2.1.5.1. Mistura

A mistura de ingredientes durante o fabrico de chocolate é uma operação que tem de combinar o tempo/temperatura adequados para obter uma formulação de consistência constante. Na mistura, o chocolate contém a pasta de cacau, açúcar, manteiga de cacau,

gordura de leite e leite em pó (dependendo do tipo de produto) e estes ingredientes são cuidadosamente misturados, normalmente, durante 12-15 minutos a 40-50°C, obtendo assim, uma pasta com um teor de gordura entre os 8% e os 24% com uma textura um pouco dura e consistência plástica (Beckett, 2008; Afoakwa, 2010).

Para cada tipo de chocolate a quantidade de manteiga de cacau e de açúcar, bem como os ingredientes que se adicionam dependem do tipo de chocolate:

- Chocolate negro – 70% sólidos de cacau (manteiga de cacau e pasta de cacau) e 30% açúcar, lecitina e baunilha
- Chocolate de leite – 40% de pasta de cacau, 37% de açúcar e 23% de leite em pó, lactose, lecitina e baunilha
- Chocolate branco – 49% açúcar, 33% manteiga de cacau e 18% de leite em pó e soro de leite em pó, lecitina e baunilha (Richards e Wailes, 2011).

2.1.5.2. Refinação

A refinação de chocolate é muito importante para a obtenção da textura suave que é desejável em produtos de chocolate, sendo o seu principal objetivo, a diminuição das partículas da pasta obtida após a mistura, para um tamanho inferior a 30 μm , pois o tamanho das partículas finais influencia as propriedades reológicas e sensoriais do chocolate. Como tal, normalmente, utilizam-se refinadores de dois a cinco rolos. Um refinador de cinco rolos é constituído por uma matriz vertical de quatro cilindros ociosos com temperatura controlada por um fluxo de água interno, mantidos juntos por pressão hidráulica (Beckett, 2008; Afoakwa, 2010).

Uma película fina de chocolate é atraída pelo primeiro rolo a uma velocidade lenta e à medida que vai passando de rolo em rolo a velocidade também vai aumentando (Afoakwa, 2010).

O corte feito entre os rolos não só quebra as partículas, mas também reveste algumas das superfícies recém-criadas com gordura, manteiga de cacau. Além disso, como ocorre a rutura, as superfícies recém-formadas, que são quimicamente muito reativas, absorvem os compostos de aroma voláteis provenientes das partículas de cacau que ao mesmo tempo estão a ser quebradas. Uma lâmina de corte colocada contra a parte de trás do quinto cilindro remove o chocolate sob a forma de flocos ou de um pó (Beckett, 2008).

2.1.5.3. Conchagem

Conchagem é considerada a operação final no processamento de grandes quantidades de chocolate preto ou de leite. Este é um processo fundamental que contribui para o desenvolvimento da viscosidade, textura e sabor finais. Como tal o equipamento utilizado é chamado de “concha”. Trata-se de um tanque com três pás misturadoras com funções de corte e misturadora (Afoakwa, 2010).

A conchagem resume-se a dois processos distintos que ocorrem dentro do mesmo equipamento. O primeiro é o desenvolvimento do sabor. Os processos de fermentação e

torrefação, produzem os componentes de aroma de chocolate necessários, para a obtenção do seu sabor agradável, mas também originam alguns sabores indesejáveis, tais como o ácido acético, sendo necessária a sua remoção. O segundo processo consiste em transformar o chocolate a partir de um pó ou pasta seca (flocos), num líquido e que pode ser utilizado para fazer os produtos finais. Isto envolve o revestimento das superfícies das partículas sólidas com a gordura (Beckett, 2008).

O tempo do processo, varia conforme o tipo de equipamento, pois para conchas modernas de alta eficiência o tempo necessário é entre 6 e 24 horas, para equipamentos tradicionais são necessárias 72 horas. Relativamente à temperatura, esta depende do produto, para chocolate de leite, dura entre 16 e 24 horas no máximo a 60°C, no caso do chocolate preto o tempo é o mesmo que para o chocolate de leite, 16 a 24 horas, sendo que a temperatura é de 70°C e continua até aos 82°C. No chocolate de leite a temperatura é mais baixa devido às proteínas do leite, pois com elevadas temperaturas podem sofrer alterações, o que pode influenciar no sabor e textura final. Neste tipo de chocolate se o leite em pó for substituído por leite em pó magro e manteiga de cacau a temperatura de conchagem pode ir até aos 70°C (Afoakwa, 2010).

De modo a proporcionar uma viscosidade adequada ao chocolate, no final desta etapa pode adicionar-se manteiga de cacau e lecitina, para diluir ou liquefazer o chocolate antes da temperagem (Beckett, 2009; Afoakwa, 2010).

2.1.5.4. Temperagem

Devido à natureza polimórfica da manteiga de cacau, o chocolate deve ser temperado ou pré-cristalizado. A temperagem é um processo de cristalização controlada, que tem como objetivo induzir a formação de cristais estáveis, na manteiga de cacau. É uma das etapas mais importantes na fabricação do chocolate, sendo a responsável por diversas características da qualidade do produto, tais como, a dureza, o manuseamento, revestimento, brilho e rápido desprendimento do aroma, sabor na degustação e tempo vida útil. Além disso, quando realizada adequadamente, pode retardar a migração da gordura e posterior recristalização na superfície do chocolate, fenómeno conhecido como “fat bloom” (Beckett, 2008; Beckett, 2009; Afoakwa, 2010).

A temperagem envolve quatro etapas principais: aquecimento do chocolate até à completa fusão da fase lipídica, a temperaturas na faixa dos 50°C, arrefecimento lento com agitação da massa, até ao ponto de cristalização (32°C), cristalização, onde se formam os cristais estáveis e alguns instáveis (27°C) e ligeiro aquecimento para que somente os cristais instáveis sejam convertidos. Os equipamentos utilizados são permutadores de calor de vários estágios pelos quais passa o chocolate em fluxos muito diferentes, tornando difícil a identificação das condições ideais (Afoakwa, 2010).

2.1.5.5. Moldagem

Moldagem é o método mais simples de formação de chocolate e é o utilizado para fazer as usuais tabletes de chocolate. Durante muitos anos utilizaram-se moldes de metal, mas estes eram pesados, barulhentos e principalmente bastante caros, pois bastava o departamento de marketing alterar a forma para ser necessário alterar todos os moldes, podendo uma linha de montagem ter 1500 moldes. Actualmente a maior parte dos moldes são de plástico, que é um material mais leve e faz menos ruído. Tem também a vantagem de poder ser torcido, o que ajuda as barras sólidas a serem removidas quando ocorre a aglutinação. Se o chocolate temperado entra em contacto com uma superfície quente, os cristais irão derreter, por outro lado, o contacto com uma superfície fria pode perder-se o efeito de pré-cristalização, formando-se manchas e cristais instáveis na superfície. Pelo que é necessário apenas um ligeiro aquecimento dos moldes, a cerca de 10°C (Beckett, 2008).

O mesmo peso de chocolate é distribuído pelos moldes, de seguida o chocolate, tem de ser distribuído uniformemente em todo o molde e as bolhas de ar têm de ser removidas para evitar defeitos no produto final, como tal os moldes são sujeitos a vibração que assegura a distribuição uniforme do chocolate e a remoção de bolhas de ar (Afoakwa, 2010).

2.1.5.6. Solidificação chocolate

Após a moldagem, grande parte da gordura ainda se encontra no estado líquido. De maneira a que esta seja firme, de fácil manuseio e embalar, deve solidificar na forma cristalina correta. Isso requer a remoção de uma grande quantidade de calor (Beckett, 2009).

Existem três maneiras de um corpo perder calor, por condução, radiação e convecção. Neste caso específico utiliza-se a convecção, ou seja, através de arrefecedores é administrado frio sobre o chocolate, mas de maneira a que o ar do ambiente não condense e posteriormente escorra sobre o chocolate, dissolvendo parte do açúcar; é conveniente que a temperatura ambiente esteja acima da temperatura de orvalho, temperatura a partir da qual a humidade condensa (Beckett, 2008).

2.1.5.7. Desmoldagem

Teoricamente, se a temperagem e o arrefecimento forem realizados adequadamente, a desmoldagem é feita sem qualquer problema, sendo necessária apenas uma inversão brusca. Mas nem sempre tal acontece e é necessário recorrer a um martelo específico para o efeito, auxiliado por um mecanismo que torce os moldes. O produto é então desmoldado para as embalagens respetivas (Beckett, 2009).

2.2. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO CHOCOLATE

A composição nutricional e os efeitos para a saúde provenientes do chocolate dependem da sua percentagem em cacau, assim como se é de leite ou negro, da quantidade de açúcar adicionada, bem como de outros ingredientes, por exemplo nozes, amêndoas, avelã (Beckett, 2009).

A partir do ponto de vista nutricional, os componentes podem ser divididos em duas categorias principais, os macronutrientes: lípidos, glúcidos e proteínas e os micronutrientes, vitaminas, minerais, metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) e os flavonóides (Paoletti *et al.*, 2012).

2.2.1. Macronutrientes

2.2.1.1. Lípidos

Os lípidos são a maior fonte de energia do chocolate, fornecendo cerca de 9 kcal/g, em comparação com os glúcidos e proteínas que fornecem 5 kcal/g. Tal como fornecem energia também afetam os níveis de colesterol no sangue, o que pode levar ao aumento do risco de doenças cardíacas (Beckett, 2008).

A manteiga de cacau representa entre 50 e 57% do peso dos grãos de cacau, que constitui cerca de 30% no chocolate final, sendo também responsável pelas suas propriedades de fusão. Os ácidos gordos predominantes na manteiga de cacau são os saturados, o ácido esteárico e o ácido palmítico, numa proporção de 35% e 25% respetivamente e monoinsaturados, o ácido oleico (35%), sendo a restante gordura, aproximadamente 3%, proveniente do ácido gordo polinsaturado linoleico (Beckett, 2008; Paoletti *et al.*, 2012).

Como consequência do elevado teor em ácidos gordos saturados no chocolate e no cacau, estes são muitas vezes considerados prejudiciais para o sistema vascular. No entanto, relativamente aos efeitos de colesterol no sangue o ácido esteárico, predominante no chocolate, não se comporta como os outros ácidos gordos saturados, tendo um efeito neutro ou até mesmo de redução dos níveis de colesterol. Possíveis explicações para esta disparidade podem estar relacionadas com o comprimento da cadeia, a absorção ineficiente ou a cinética do metabolismo. O consumo de uma quantidade moderada de chocolate, na dieta alimentar, não causa efeitos no perfil lipídico e lipoproteico se a quantidade total de gordura e a ingestão calórica for mantida constante, mas se o consumo for superior ao necessário para as necessidades de manutenção estimada, pode contribuir para a obesidade e pode ter um impacto negativo na incidência de doenças cardiovasculares (Paoletti *et al.*, 2012).

2.2.1.2. Glúcidos

Os glúcidos são muito importantes na medida em que representam cerca de metade do peso do chocolate normal. A sacarose fornece a maior parte dos glúcidos presentes no chocolate, mas também há a lactose no leite em pó, ou pode ter sido adicionada como um ingrediente. A glicose também pode ser adicionada para reduzir o doce. Outro tipo de glúcido presente, em pequenas quantidades no chocolate é a fibra dietética do cacau (Beckett, 2008).

Os grãos de cacau não transformados têm um tegumento também denominado por farelo que corresponde a 15% do peso total do grão e é uma boa fonte de fibra insolúvel, cerca de 44% e cerca de 11% de fibra solúvel. O que é benéfico para reduzir os níveis de lípidos. Mas após o processamento dos grãos a quantidade de fibra diminui muito, uma vez que o cacau em pó contém menos de 2% de farelo e os produtos de chocolate possuem ainda uma menor quantidade. Assim, o consumo de chocolate contribui pouco para o consumo de fibra dietética, mas esta pequena quantidade presente no chocolate pode aumentar com a adição de ingredientes tais como os frutos secos (Beckett, 2009; Paoletti *et al.*, 2012).

A quantidade e o tipo de glúcidos presente são importantes devido ao seu efeito sobre o índice glicêmico (Beckett, 2009).

2.2.1.3. Proteínas

As proteínas representam cerca de 60% do azoto total presente nos grãos fermentados e constituem cerca de 10% a 15% das sementes, sendo o segundo componente mais abundante, depois da gordura de cacau (Watson *et al.*, 2013).

Os grãos de cacau contêm quatro tipos de proteínas, ou seja, albuminas, globulinas, prolaminas e glutelina. Albumina constitui a maior fração proteica 52% e a globulina 43%. A atividade antioxidante foi atribuída à histidina, tirosina, metionina e cisteína, sendo a, histidina a que possui maior atividade na eliminação de radicais. Além disso, a hidrofobicidade dos péptidos também parece ser um fator importante para a sua atividade antioxidante, devido à maior interação com os alvos hidrofóbicos por exemplo, ácidos gordos (Paoletti *et al.*, 2012).

Contudo o chocolate não é uma fonte significativa de proteínas e a digestibilidade é baixa; no entanto o leite do chocolate de leite é uma fonte de proteínas com elevado valor biológico (Beckett, 2009).

2.2.2. Micronutrientes

2.2.2.1. Minerais e Vitaminas

O cacau e o chocolate contêm muitos minerais essenciais incluindo o ferro, cobre, zinco, magnésio, fósforo, manganês e potássio. As quantidades variam com o tipo de solo em que o cacauzeiro foi plantado. O leite é uma boa fonte de cálcio e fósforo. O teor em minerais no produto final é, dependente das proporções de cacau em pó e de leite. Uma vez que o leite é uma fonte de cálcio e fósforo, o chocolate de leite é mais rico neste minerais, enquanto que

chocolate com o teor de cacau mais elevado e sem leite é mais rico em ferro, cobre e manganês. Relativamente às vitaminas o cacau em pó tem importância devido às vitaminas provenientes da manteiga de cacau, a vitamina E, enquanto o leite fornece a vitamina riboflavina e a vitamina B12 (Beckett, 2009).

2.2.2.2. Flavonóides

Os compostos de maior interesse no cacau são os flavanóis, uma subclasse dos flavonóides, que por sua vez são uma subclasse dos polifenóis. Os flavonóides podem agrupar-se em classes: flavanóis, antocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanonas e isoflavonas tal como demonstrado na figura 2.1. A concentração de flavanóis nos grãos de cacau é reduzida pelo processamento dos mesmos, que inclui fermentação e torragem.

A quantidade de polifenóis, normalmente, encontrada em chocolate preto oscila entre os 120 mg e 150 mg em 10 g de chocolate. Esta concentração é multiplicada por um fator de cinco no caso do cacau em pó, mas reduz-se substancialmente no chocolate de leite (Fernández-Murga *et al.*, 2011).

O chocolate é dos alimentos mais ricos em polifenóis seguido do chá e vinho, sendo o cacau em pó o que possui o teor mais elevado de flavonóis. A epicatequina foi avaliada como sendo o principal flavanol monomérico presente no cacau, representando aproximadamente 35% dos compostos fenólicos totais. A catequina e epicatequina têm sido encontradas em concentrações de 150-1580 mg/Kg de chocolate e 2530-3170 mg/Kg de pasta de cacau. O nível de flavonóides é correlacionado com os polifenóis totais determinados nesses produtos, os flavonóides também estão associados com a percentagem calculada de cacau (Paoletti *et al.*, 2012).

As principais atividades farmacológicas relacionadas com os flavonóides incluem os efeitos antioxidante, a proteção contra a doença cardiovascular e os efeitos anticancerígenos (Paoletti *et al.*, 2012).

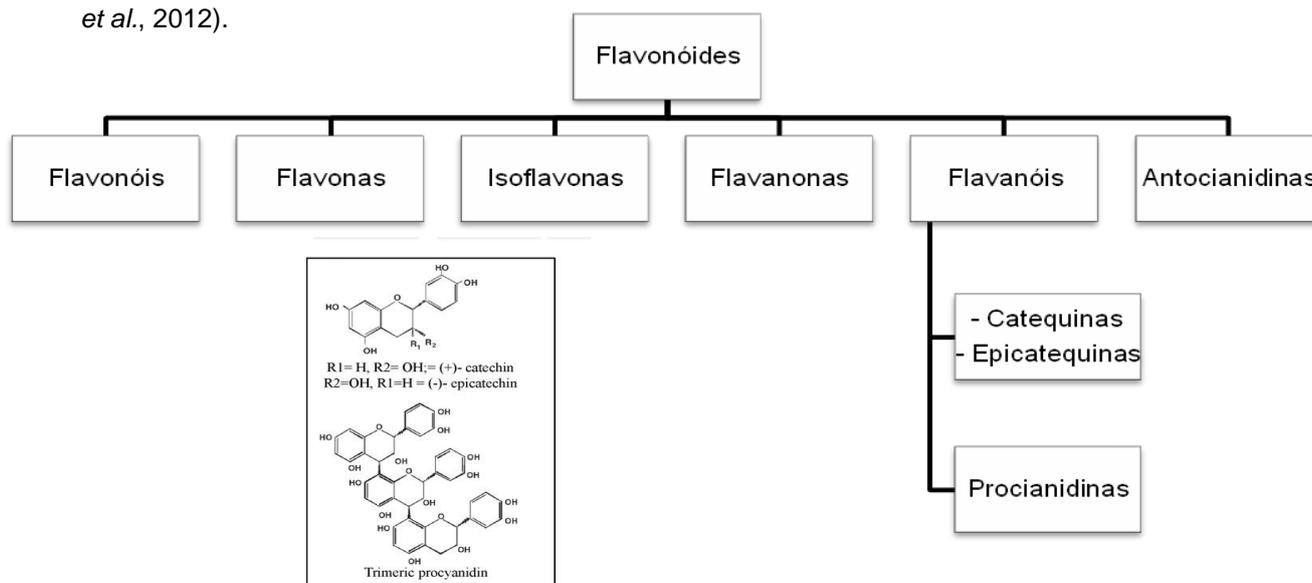


Figura 2.1 Diferentes subclasses dos flavonóides (adaptado de Fernández-Murga *et al.*, 2011)

2.2.2.3. Metilxantinas

Cacau e seus produtos são ricos em metilxantinas, ou seja, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina), e teofilina. A cafeína e a teobromina são alcalóides derivados da purina naturalmente presentes no chocolate e pertencem ao grupo de compostos químicos referidos como metilxantinas. O teor de teobromina no chocolate escuro é seis a sete vezes maior do que o teor em cafeína (Paoletti *et al.*, 2012).

As metilxantinas, incluindo cafeína, teobromina e teofilina, são um grupo de compostos biologicamente ativos que estão presentes naturalmente em muitos alimentos e bebidas. Cada um destes compostos é provável que tenha efeitos fisiológicos semelhantes no corpo, incluindo a estimulação do sistema nervoso central (SNC), do músculo cardíaco e do músculo-esquelético, pode também ter efeitos diuréticos. No entanto, a sua força de ação difere bastante em cada parte do corpo afetada, bem como de indivíduo para indivíduo. A cafeína é um conhecido estimulante do SNC mas a teobromina é muito mais fraca, tendo cerca de um décimo do efeito da cafeína. O cacau e o chocolate contêm concentrações relativamente baixas de cafeína, mas cerca de dez vezes mais de teobromina, embora a teofilina seja apenas detetável no chocolate, a sua presença é normalmente ignorada (Beckett, 2009).

As metilxantinas estão entre as substâncias psicoativas mais consumidas no mundo. Embora a cafeína possa ser encontrada em vários produtos como o café, chá e guaraná, a teobromina é a metilxantina predominante no cacau, sendo que também pode ser encontrada noutros alimentos, mesmo que em pequenas quantidades, como é exemplo o guaraná, noz de cola e o chá (*Camilla sinensis*). No entanto, o chá, *Camellia ptilophylla*, não contém cafeína, mas sim teores elevados de teobromina, cerca de 15 a 18 vezes a quantidade encontrada deste alcalóide no chá verde, daí o seu nome familiar de chá de cacau (Beaudoin, Graham, 2011; Watson *et al.*, 2013).

Ao contrário de outros compostos presentes no chocolate com efeitos psicoativos, as metilxantinas, principalmente a cafeína têm sido estudadas de forma mais ampla, em relação à sua farmacodinâmica e propriedades farmacocinéticas (Watson *et al.*, 2013).

2.3. TEOBROMINA

2.3.1. Características

Como produto químico a teobromina tem a fórmula molecular $C_7H_8N_4O_2$, é um pó branco e é principalmente produzido através das cascas das sementes de cacau, sub produto do processamento de chocolate. É pouco solúvel em água à temperatura ambiente e álcool, sendo mais solúvel em água quente. Este composto é considerado diurético, relaxante muscular e vasodilatador. Ao contrário da cafeína é um estimulante suave do sistema nervoso central e também tem algumas características antioxidantes (Beaudoin, Graham, 2011).

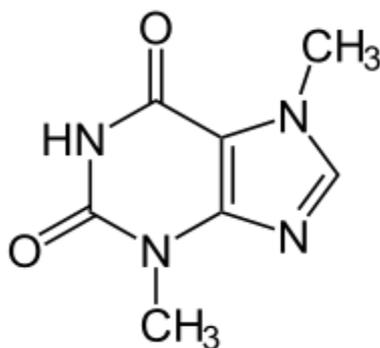


Figura 2.2 Fórmula molecular da teobromina

2.3.2. Metabolismo

Nos humanos as metilxantinas são metabolizadas por desmetilação envolvendo o Citocromo P450. Conseqüentemente, a teobromina (3,7-metil-xantina) é quebrada em 3-metil-xantina e 7-metil-xantina. Esta última é posteriormente metabolizada em ácido 7-metil-úrico pela enzima xantina oxidase. É de referir que a teobromina não é metabolizada noutras dimetil-xantinas (teofilina ou paraxantina), nem se converte em trimetil-xantina (cafeína), ao contrário da cafeína que se sofrer desmetilação forma a teobromina (Beaudoin e Graham, 2011).

Após a administração oral da teobromina no Homem, a sua absorção pelo trato intestinal é muito lenta comparada com a cafeína, sendo que o pico no plasma é de 2,5 horas para a teobromina e 30 minutos para a cafeína. Mas quando a ingestão de teobromina é feita através do consumo de chocolate o pico de teobromina no plasma ocorre em menos de 2 horas, o que pode ser causado pela estimulação da produção de bÍlis, que melhora absorção de teobromina (Beaudoin e Graham, 2011).

2.3.3. Predominância da teobromina

No cacaueteiro a teobromina acumula-se nas folhas verdes, sendo que com o passar do tempo a sua concentração diminui. No fruto do cacaueteiro a teobromina é sintetizada pelo pericarpo (parte externa das sementes) e pelos cotilédones (embrião da semente) do cacau novo, no entanto à medida que o fruto amadurece a concentração de teobromina no pericarpo diminui e aumenta nos cotilédones. Sugerindo assim, que o principal local de síntese de teobromina é na própria semente de cacau. Outro processo responsável pela alteração na concentração de teobromina ocorre durante a preparação das sementes, mais especificamente durante a fermentação, a teobromina migra da semente para a casca, causando uma diminuição da concentração de teobromina de cerca de 25% (Beaudoin e Graham, 2011).

A concentração de metilxantinas, incluindo a teobromina, nos grãos de cacau, varia dependendo da espécie do fruto, embora não exista um consenso na comunidade científica quanto à espécie com maior concentração. Brunetto e colaboradores determinaram que nos

grãos de cacau a concentração varia entre 0,7% e 2,0%, sendo que a variedade Forastero era aquela, cuja concentração de teobromina era mais elevada, enquanto que Hammestone e colaboradores determinaram uma concentração mais elevada de teobromina na variedade Criollo (Hammerstone *et al.*, 1994; Brunetto *et al.*, 2007; Beaudoin e Graham, 2011).

Os procedimentos analíticos utilizados em ambos os estudos são semelhantes, mas qualquer alteração, por mais pequena que seja, pode ser considerada significativa para as diferenças obtidas (Beaudoin e Graham, 2011).

2.3.4. Teobromina na saúde

2.3.4.1. Efeitos psicofarmacológicos

O chocolate tem sido associado à felicidade e ao aumento do humor. Apesar do seu elevado consumo, estar relacionado com os aspetos sensoriais, a presença de compostos farmacologicamente ativos é também, nos dias de hoje, uma razão para o interesse e consumo crescente deste produto. Dos diversos compostos presentes no chocolate, as metilxantinas, teobromina e cafeína são conhecidas pelos seus efeitos psicoativos (Smit *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2011).

Embora a teobromina seja a metilxantina mais predominante no chocolate, a pesquisa realizada sobre os seus efeitos em animais ou no Homem é relativamente escassa, quando comparada com os estudos realizados sobre os efeitos da cafeína (Beaudoin e Graham, 2011).

Mumford e colaboradores, realizaram um estudo com placebo e cafeína e placebo e teobromina, tendo assim como principal objetivo determinar os efeitos individuais das metilxantinas. Sendo esses efeitos o aumento do bem-estar, energia, disposição social e atenção cognitiva. Neste estudo foi possível perceber que houve alterações em todos os indivíduos relativamente à ingestão de cafeína, mas no caso da teobromina apenas cinco dos sete indivíduos em estudo, apresentaram alterações estatisticamente significantes. Destes cinco, quatro apresentaram alterações significativas aquando o consumo de 560 mg/dia e apenas um sentiu alterações com 100 mg/dia. Apesar deste estudo ter sido realizado apenas com sete indivíduos é possível concluir que o consumo de teobromina pode ter alguns efeitos, mas muito menores que o consumo de cafeína (Mumford *et al.*, 1994).

Smit e colaboradores, efetuaram dois estudos que tinham como objetivo medir os efeitos cognitivos, tempo de reação e humor provocados pelas metilxantinas. No primeiro estudo utilizaram-se umas cápsulas que continham metilxantinas nas quantidades encontradas numa barra de chocolate preto de 50,0 g, com cacau em pó (11,6 g), teobromina (250,0 mg) e cafeína (19,0 mg), e outra cápsula com água. No segundo estudo foram preparadas 3 cápsulas com quantidades de metilxantinas representativas de 60,0 g dos três tipos de chocolate, o branco (sem metilxantinas), de leite (8,0 mg cafeína e 100,0 mg de teobromina) e preto (20,0 mg cafeína e 250,0 mg de teobromina). Após esta investigação, foi possível concluir, que, no primeiro estudo houve melhorias a nível de humor, função cognitiva e energia aquando o consumo das cápsulas de chocolate preto; no segundo estudo também se observaram efeitos

positivos nas funções psicológicas anteriormente descritas nos indivíduos que consumiram chocolate preto e de leite; o mesmo não se verificou nos indivíduos que consumiram chocolate branco, tal como aconteceu com as cápsulas de água. Deste modo os resultados apresentados neste estudo indicam que as metilxantinas, teobromina e cafeína são as únicas substâncias presentes no chocolate que proporcionam efeitos psicostimulantes (Smit *et al.*, 2004).

Mais recentemente, 2011, foi realizado um estudo por Mitchell e colaboradores cujo objetivo era verificar se a cafeína e a teobromina tinham uma ação sinérgica sobre o humor, atenção e pressão arterial. Sendo que a proporção cafeína/teobromina no chocolate é de 1:5 e o chocolate escuro contém 120-150 mg de cafeína e 700–800 mg de teobromina, os autores deste estudo utilizaram doses semelhantes às presentes nesta matriz. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a teobromina tem uma contribuição insignificante nos efeitos de atenção cognitiva, sendo que este alcalóide diminui a pressão arterial enquanto a cafeína a faz aumentar (Mitchell *et al.*, 2011).

Além destes, poucos estudos têm investigado os efeitos comportamentais em indivíduos submetidos a uma dieta com teobromina, pelo que não é possível extrair uma conclusão clara sobre este tema, apenas se pode inferir que, a teobromina produz menores efeitos psicofarmacológicos que a cafeína, e que os efeitos sobre o humor e cognição não são concordantes, o que confirma a necessidade de um maior número de estudos nesta área (Smit *et al.*, 2004; Beaudoin e Graham, 2011; Mitchell *et al.*, 2011).

2.3.4.2. Efeitos fisiológicos

Num estudo realizado por Geraets e colaboradores foi estudada a capacidade de inibição de poli(ADP ribose)polymerase-1 (PARP-1) pela cafeína e os seus vários metabolitos, tais como outras metilxantinas. Após o estudo foi possível verificar que os metabolitos da cafeína são inibidores de PARP-1 e o metabolito principal da cafeína, a teobromina, tem atividade inibidora sobre a PARP-1 nas células epiteliais e endoteliais cultivadas em condições fisiológicas. Esta inibição pode ter implicações importantes para o tratamento nutricional de patologias inflamatórias agudas e crónicas, como a prevenção de lesões derivadas da isquemia (restruturação do fluido de sangue, após um período de privação de oxigénio tecidual) ou complicações vasculares em pacientes com diabetes (Geraets *et al.*, 2006).

2.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

2.4.1. Fundamentos Teóricos

De acordo com a definição IUPAC a cromatografia é um método físico de separação, em que os componentes a separar são distribuídos entre duas fases, a fase estacionária e a fase móvel, esta move-se numa direção definida. A fase móvel é um fluido que se infiltra através, ou ao longo do leito estacionário, sendo correntemente utilizados três tipos de fluidos: líquido, gás e supercrítico. A cromatografia é nomeada principalmente pela natureza da fase móvel - cromatografia líquida, cromatografia gasosa e cromatografia de fluido supercrítico (Nollet, 2000).

A cromatografia é uma técnica analítica baseada na separação de moléculas, devido às diferenças na sua estrutura e/ou composição. Em geral, a cromatografia implica a passagem dos componentes da amostra através de um meio com o qual interatuam fisicamente - a fase estacionária, sendo arrastados por um fluido - a fase móvel. As moléculas na amostra possuem diferentes afinidades e interações com a fase estacionária, conduzindo à separação de moléculas. Componentes da amostra que exibam interações mais fortes com a fase estacionária irão mover-se mais lentamente através da coluna, do que os componentes com interações mais fracas. Compostos diferentes podem ser separados uns dos outros à medida que se movem através da coluna. As separações cromatográficas podem ser realizadas utilizando uma variedade de fases estacionárias, incluindo sílica imobilizada em placas de vidro (cromatografia em camada fina), gases voláteis (cromatografia gasosa), papel (cromatografia de papel) e os líquidos (cromatografia líquida) (Kupiec, 2004).

Em 1906 o botânico russo Mikhael Semenovich Tswett conseguiu separar pigmentos de cloroplastos em folhas verdes de plantas, utilizando uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, ocorrendo a separação dos componentes em faixas coloridas, esta ocorrência deu origem ao nome de cromatografia (*chrom* = cor e *grafie* = escrita), embora o processo não dependa da cor. Apesar de, anteriormente, se terem feito estudos semelhantes, Tswett foi o primeiro a compreender e interpretar este processo tal como é aceite atualmente, sendo-lhe assim atribuída a descoberta da cromatografia como técnica analítica.

Até ao ano de 1930 a técnica cromatográfica foi praticamente ignorada, sendo redescoberta por Kuhn e Lederer que aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, separando e identificando as xantofilas da gema de ovo. A montagem utilizada por estes dois investigadores foi semelhante à utilizada por Tswett, com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel. A partir daí a cromatografia foi aperfeiçoada e, em conjunto com os avanços tecnológicos, foi levada a um alto grau de sofisticação que resultou num potencial de aplicação em diversas áreas.

De modo a selecionar a técnica mais adequada ao composto a analisar, ou seja, a que melhor o identifique e caracterize, é necessário conhecer as propriedades estereoquímicas e polaridade do composto, pois cada método cromatográfico possui um campo de aplicabilidade mais ou menos específico e, para que a sua utilização seja a mais adequada, é fundamental o

conhecimento dos seus princípios, as vantagens e, sobretudo, as limitações mais relevantes de cada um deles. Fatores como o tipo de informação pretendida, quantidade de amostra disponível, exatidão e precisão do método, as interferências analíticas, possíveis contaminações e o tempo e custos necessários, devem ser tidos em consideração na escolha do método analítico mais apropriado (Causon, 1997; Épshtein, 2004).

Ao longo dos anos foram desenvolvidos vários métodos cromatográficos, sendo os mais importantes a cromatografia de camada fina, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida, existindo algumas variantes destes métodos tal como demonstrado na figura 2.1.

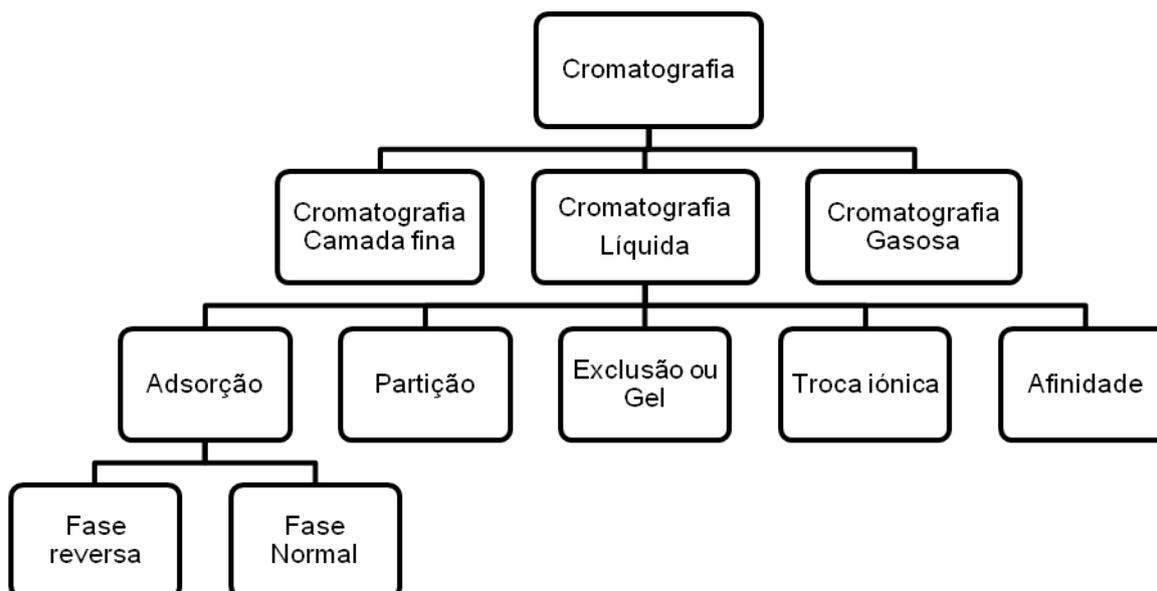


Figura 2.3 Métodos Cromatográficos

2.4.2. Cromatografia líquida e cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida (LC) que é uma das formas de cromatografia, é uma técnica analítica de separação, que envolve a injeção de um pequeno volume de amostra líquida num tubo cheio de partículas porosas, fase estacionária, onde os componentes individuais da amostra são transportados ao longo do tubo de enchimento, a coluna, por um líquido movido pela força da gravidade, fase móvel. A separação ocorre porque, no âmbito de um conjunto ótimo de condições, cada componente de uma mistura irá interagir física e quimicamente com as duas fases de modo diferente em relação aos outros componentes da mistura. A cromatografia líquida é o nome genérico utilizado para descrever qualquer procedimento de cromatografia em que a fase móvel é um líquido. Com o avanço da cromatografia em coluna, desenvolveu-se a utilização de suportes com partículas menores responsáveis por uma melhor eficiência e como tal tornou-se necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, daí o desenvolvimento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Neste tipo de cromatografia os componentes são separados pelo enchimento da coluna que envolve várias interações físicas ou químicas entre as moléculas e as partículas de

enchimento. Estes componentes são detetados à saída da coluna por um detetor. A cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência funcionam do mesmo modo, mas a velocidade, eficiência, sensibilidade e facilidade de operação da cromatografia líquida de alta eficiência é muito superior. Os componentes básicos de um instrumento de HPLC são o injetor, uma bomba, uma coluna e um detetor (Weston e Brown, 1997). Existem duas formas de classificar os métodos da cromatografia líquida. A primeira e mais comum é a classificação baseada no mecanismo de retenção. Por exemplo o modo da fase normal, pode ser executada tirando vantagens tanto do mecanismo de adsorção como do mecanismo de partição. O modo filtração em gel, pode ser realizado usando o mecanismo de exclusão de tamanho. A segunda classificação é baseada no princípio de separação e é mais comumente encontrada na literatura publicada antes da década de 1990 (Weston e Brown, 1997).

2.4.2.1. Classificação de acordo com o mecanismo de retenção

O esquema de classificação mais popular decorre da maneira em que o analito interage com a fase estacionária. Com esta abordagem a cromatografia pode ser subdividida em cinco mecanismos de separação: adsorção, partição, por exclusão de tamanho, afinidade e de permuta iónica, tal como demonstrado na figura 2.1.

2.4.2.1.1. Cromatografia de adsorção

É baseada na competição por analitos neutros entre a fase móvel líquida e a fase estacionária sólida neutra. Os analitos interagem com a fase estacionária de acordo com a premissa “igual com igual”, onde o soluto polar é retido mais tempo por uma fase estacionária polar e solutos não polares serão melhor retidos por fases estacionárias não polares, ou seja a separação é baseada nas diferenças de afinidade dos componentes da amostra pela superfície da fase estacionária. Na cromatografia de adsorção, a retenção da amostra é directamente proporcional à área de superfície da fase estacionária. A área de superfície deve ser mantida abaixo de 400 m²/g, porque as áreas de superfície superior são obtidas à custa de poros menores, o que pode levar a uma má transferência de massa e baixa eficiência da coluna.

Quando a afinidade é entre compostos polares, diz-se que a cromatografia é de fase “normal”, e os compostos apolares são os primeiros a eluir. Contudo se são introduzidas cadeias alquil ligadas covalentemente à matriz da coluna, a ordem de eluição é invertida sendo por isso designada por cromatografia de “fase reversa”. Neste caso são eluídos em primeiro lugar as moléculas polares, sendo as apolares retidas na coluna.

Fase Normal

A cromatografia de fase normal é utilizada para designar um sistema cromatográfico em que a fase estacionária polar é empregue e uma fase móvel menos polar é utilizada para a eluição dos analitos. Neste método, os solutos neutros em solução são separados com base na sua polaridade, quanto maior a polaridade do soluto, maior a sua retenção na coluna, logo os compostos apolares são os primeiros a eluir. Uma vez que a fase móvel é menos polar que a

fase estacionária, o aumento da polaridade na fase móvel resulta na redução da retenção do soluto. Embora a cromatografia de fase normal possa ser executada utilizando os mecanismos de partição ou adsorção, o mecanismo dominante é a adsorção. Como consequência a cromatografia de fase normal é também conhecida na literatura como cromatografia de adsorção ou cromatografia líquido-sólido.

Fase reversa

Cromatografia em fase reversa, é a cromatografia mais amplamente utilizada devido aos compostos analisados serem maioritariamente polares e altamente solúveis em água, e tem como objetivo separar as moléculas neutras em solução com base na sua hidrofobicidade. Tal como o nome sugere, a cromatografia de fase reversa é o inverso de cromatografia de fase normal no sentido de que envolve a utilização de uma fase estacionária não polar e uma fase móvel moderadamente polar (mistura de uma solução aquosa e um solvente orgânico, como metanol e acetonitrilo, como moduladores). Os analitos são retidos até eluição com um solvente ou mistura de solvente suficientemente polares (no caso de gradiente na fase móvel). Como tal, uma diminuição da polaridade da fase móvel tem como consequência numa diminuição de retenção de soluto.

A cromatografia de fase reversa moderna refere-se tipicamente à utilização das fases estacionárias quimicamente ligados, em que um grupo funcional está ligado a sílica. Por esta razão, a cromatografia de fase reversa é muitas vezes referida na literatura como a cromatografia de fase ligada. Contudo, ocasionalmente, são utilizadas as fases estacionárias poliméricas tais como polimetacrilato ou poliestireno, ou fases estacionárias sólidas, tais como carvão ou grafite porosa (Weston e Brown, 1997; Gratzfeld-Hüsgen e Schuster, 2001).

2.4.2.1.2. Cromatografia de partição

Cromatografia de partição, baseia-se na competição para analitos neutros, mas neste caso, a fase estacionária é considerada um líquido neutro. Devido à instabilidade de fases estacionárias líquidas, a verdadeira cromatografia de partição não é usualmente utilizada. Em vez disso, as colunas de cadeia longa (C18) ligadas em fase foram desenvolvidas, em que, cadeias longas alquilo são consideradas para se comportarem como um líquido. Assim o processo é denominado partição quando o soluto é transferido de uma fase para outra, então as moléculas do soluto são completamente envolvidas por moléculas de apenas uma fase.

2.4.2.1.3. Cromatografia de troca iónica

Na cromatografia de troca iónica as espécies são separadas na base das diferenças nas cargas elétricas e no princípio que os opostos se atraem, sendo usada para separar analitos carregados. A separação dos analitos é baseada na incorporação de grupos funcionais na coluna de cromatografia com cargas opostas às cargas a separar, deste modo os componentes são seletivamente adsorvidos da fase móvel.

A fase estacionária ou troca iónica é classificada como material de troca aniónica quando o ião fixo tem carga positiva e como troca catiónica quando o ião fixo tem carga negativa. Este método pode ser aplicado a qualquer soluto que possa adquirir carga em solução. Assim, mesmo os glúcidos que não possuem carga abaixo de pH 12, podem ser separados por cromatografia de troca iónica a um pH suficientemente elevado (Weston e Brown, 1997; Swadesh, 2001).

2.4.2.1.4. Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão permite separar misturas simples cujos componentes possuem peso molecular bastante diferente, baseando-se no princípio da peneiração. As partículas da fase estacionária possuem uma ampla gama de tamanhos de poros, fazendo com que a fase móvel se comporte como uma peneira molecular. Como resultado desta peneiração os solutos são separados com base no seu tamanho, sendo os de maior tamanho os primeiros a eluir, seguindo o princípio de BOCOF *big one come out first* (maiores saem primeiro). Para moléculas pequenas, a diferença do peso molecular tem de ser superior a 10% para a resolução ser aceitável, relativamente às macromoléculas é necessária uma diferença de duas vezes o peso molecular. Este tipo de cromatografia pode ser usada para indicar a complexidade de uma amostra e para fornecer os valores aproximados de peso molecular para os componentes. É uma técnica fácil de entender e pode ser aplicada para a separação das biomacromoléculas delicadas, bem como para a separação de polímeros orgânicos sintéticos (Weston e Brown, 1997; Hanai, 1999).

Existem dois modos de cromatografia de exclusão de tamanho: cromatografia de filtração em gel (CFG) e cromatografia de permeação em gel (GPC). Em GFC, as fases móveis aquosas e o empacotamento hidrofílico são utilizados para separar e identificar macromoléculas biológicas, por outro lado, a GPC é utilizada para isolar compostos de baixo peso molecular de amostras que contenham compostos com elevados pesos moleculares como óleos ou gorduras. A separação é baseada nas diferenças de tamanho, em que os compostos com elevado peso molecular são menos retidos que os compostos com baixo peso molecular. Este método é usado com sucesso para separar vitaminas A, D e E de glicéridos e na eliminação de pesticidas em especiarias (Weston e Brown, 1997; Hanai, 1999; Gratzfeld-Hüsgen e Schuster, 2001).

2.4.2.1.5. A cromatografia de afinidade

Na cromatografia de afinidade as interações bioquímicas altamente específicas, proporcionam os meios de separação. A fase estacionária contém grupos específicos de moléculas que adsorvem apenas amostras com determinadas condições estereoquímicas e relacionadas com a carga, como por exemplo a interação entre antígenos e anticorpos. Este método cromatográfico pode ser utilizado para isolar proteínas, lípidos a partir de misturas complexas sem envolver muitos gastos. Este processo é, baseado na capacidade das

macromoléculas biológicas reconhecerem e liguem-se a outras moléculas. O processo de separação é vantajoso relativamente ao mecanismo de chave-fechadura que prevalece em sistemas biológicos. A estratégia é completamente reversível, pois, não só é possível que os antígenos sejam usados para a purificação de anticorpos, mas os anticorpos também podem ser utilizados para purificar antígenos (Weston e Brown, 1997; Meyer, 2010).

2.4.2.2. Classificação de acordo com o método de operação

O Segundo esquema de classificação é menos comum que o primeiro. É baseado no método de operação, ou no mecanismo em que a amostra é removida da coluna e, portanto dependente da natureza da fase móvel. Esta classificação que foi introduzida em 1940 por Tiselius, inclui o desenvolvimento da eluição, o desenvolvimento do deslocamento e a análise frontal. Na prática apenas a eluição e em menor extensão o desenvolvimento do deslocamento, são utilizados. No desenvolvimento da eluição um pequeno volume de amostra é introduzido na parte superior da coluna e os componentes são adsorvidos na fase estacionária em vários graus. Os solutos são eluídos da coluna usando uma fase móvel que apresenta maior afinidade com os componentes da amostra do que com a fase estacionária. Uma vez que os componentes podem ser completamente separados com uma zona de fase móvel, entre eles, a cromatografia de eluição é comumente utilizada para separações analíticas onde a quantificação e caracterização pode ser importante. Este tipo de cromatografia pode ser subclassificada de acordo com a "continuidade" da fase móvel. Eluição isocrática é o termo utilizado quando a amostra é introduzida na coluna e eluiu-se a partir dela sob o mesmo conjunto de condições de fase móvel, sendo a forma mais comum de remover solutos a partir de uma coluna. É adequada quando os componentes têm afinidades semelhantes com a fase estacionária e, portanto, são eluídos rapidamente, um após o outro. O gradiente de eluição é mais utilizado na cromatografia de fase reversa, mas também é usado noutros métodos tais como cromatografia de troca iónica. Trata-se de uma mudança contínua na composição da fase móvel para obter a separação de componentes da amostra de afinidades muito diferentes pela fase estacionária. Uma fraca fase móvel de eluição é utilizada no início da corrida, e a força de eluição é aumentada ao longo do decurso da separação, permitindo assim uma resolução suficiente dos primeiros solutos fracamente retidos, assegurando que o tempo de eluição dos picos posteriores não é demasiado longo. Um gradiente binário refere-se a um gradiente utilizando dois eluentes diferentes, um gradiente ternário refere-se a um sistema em que são utilizados três eluentes diferentes, e um gradiente quaternário é aquele em que são utilizados quatro eluentes diferentes. A composição do solvente de gradiente pode ser linear, convexa ou côncava e pode envolver uma alteração da concentração, pH, polaridade, ou força iónica (Weston e Brown, 1997).

2.4.2.3. Equipamentos

Os componentes básicos de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência são o eluente, os recipientes para a fase móvel, uma bomba para deslocar o eluente e a amostra

através do sistema, um dispositivo de injeção para permitir a introdução da amostra, uma coluna para proporcionar a separação de solutos, um detetor para visualizar a separação dos componentes, um recipiente para o solvente utilizado, e um dispositivo de recolha de dados para auxiliar na interpretação e armazenamento dos resultados (Weston e Brown, 1997).

A bomba, o injetor, a coluna e o detetor são ligados com tubos de diâmetro interno estreito. O diâmetro interno do tubo que é usado entre o injetor e coluna e também entre a coluna e o detetor tem de ser o mais pequeno possível (0,25mm ou menos) para minimizar o alargamento da banda. A escolha do detetor é baseada nas propriedades intrínsecas do soluto.

Bombas

As bombas são a peça de equipamento mais crítica para o sucesso da cromatografia líquida de alta eficiência. O seu desempenho depende fortemente do comportamento do fluxo de mistura de solventes usados como fase móvel, a variação do fluxo dos solventes resulta na variação dos tempos de retenção e áreas. Uma bomba de HPLC moderna deve ter um fluxo contínuo, uma taxa de fluxo com alta precisão e baixo volume morto. Além disso, deve ser possível o controlo da pressão máxima e pelo menos duas fontes de solvente para gradientes de fase móvel, bem como a precisão e exatidão na composição de mistura dos gradientes (Gratzfeld-Hüsgen e Schuster, 2001)

As bombas de alta pressão são necessárias para fazer fluir a fase móvel através da fase estacionária. São normalmente conhecidas por serem robustas, mas a manutenção adequada deve ser realizada para manter essa característica. A incapacidade no aumento da pressão ou fugas de líquido pode indicar mau funcionamento da bomba (Kupiec, 2004).

Uma bomba de HPLC unifica duas características diferentes. Deve ser um equipamento robusto capaz de gerar altas pressões 350bar ou até mesmo 500bar e deve ter a exatidão a elevado fluxo e precisão a qualquer caudal escolhido. A gama de fluxo varia entre 0,1mL/min a 5,0 ou 10,0mL/min e pode ser estabelecido em quaisquer valores em intervalos de 0,1mL/min. Outros requisitos referem-se à facilidade de operação, pois a bomba deve estar pronta para utilizar, com apenas algumas manipulações simples, incluindo a lavagem e enchimento das válvulas de retenção com a nova fase móvel. O seu volume interno deve ser baixo de modo a permitir uma rápida mudança de solvente, apesar de um determinado volume adicional ser necessário para amortecimento de pulsação. Toda a manipulação de manutenção e reparação tem de ser simples e de fácil execução. Na cromatografia líquida de alta eficiência a elevada pressão por si só não é o que se pretende, pois ela provem, do facto da fase móvel ser um líquido com uma viscosidade relativamente elevada, que necessita de ser pressionado através de um leito de partículas densas muito finas. As pequenas partículas têm caminhos de difusão curtos e, portanto, produzem um elevado número de pratos teóricos por unidade de comprimento (Meyer, 2010).

Hoje em dia, as bombas são compostas por êmbolos com válvulas de regulação que controlam o fluxo com uma maior precisão. Há dois tipos de bombas com estas características:

as pneumáticas e as mecânicas, capazes de controlar a pressão e manter o fluxo constante, respetivamente

Bombas pneumáticas

As bombas pneumáticas utilizam-se quando são aplicadas pressões acima de 500bar. Neste tipo de bomba, um gás exerce uma pressão, ativando a maior área de secção transversal do pistão e a outra extremidade encontra-se em contato com o eluente sobre uma área muito menor. A força é a mesma dos dois lados do pistão, mas a pressão é maior na área menor, de acordo com a proporção das duas áreas. A pressão pode ser amplificada 70 vezes, isto significa que uma pressão de gás de 10bar pode gerar um eluente com pressão de 700 bar (Meyer, 2010).

Bombas mecânicas

As bombas mecânicas podem ser subdivididas em bombas de pistão recíproca e bombas tipo seringa:

Bombas de pistão recíprocas

O tipo mais comum de bombas em HPLC são as bombas de pistão recíprocas. A fase móvel é bombeada pelo deslocamento de um pistão controlado por um motor, enquanto as válvulas abrem ou fecham o líquido segue na direção apropriada. Com cada movimento, o êmbolo transmite uma pequena quantidade de líquido, normalmente na gama de 100 µL (Meyer, 2010).

Bombas tipo seringa

Para caudais muito baixos de solventes o tipo de bombas utilizado não transmite o líquido por cursos rápidos, mas funciona como uma seringa, onde o movimento lento do pistão impulsiona a fase móvel diretamente do reservatório, a este tipo de bombas dá-se o nome de bombas de deslocamento contínuo. Estas bombas são formadas por um pistão que se move por ação de um mecanismo de rosca, sustentado por um motor, o fluxo é contínuo e sem pulsações, porém tem capacidade total limitada, sendo necessário parar o enchimento após o fornecimento de uma quantidade relativamente baixa de solvente. A operação é mais vantajosa com uma bomba de dois pistões, onde um impulsiona o eluente enquanto o outro simultaneamente enche o reservatório (Weston e Brown, 1997; Meyer, 2010).

Injeção da amostra

Para se obter uma boa eficiência em análises cromatográficas, um fator muito importante a considerar é a maneira como se introduz a amostra na coluna, pois mesmo a melhor coluna produz um resultado de separação fraco se a injeção não for feita com cuidado (Meyer, 2010).

O volume de injeção máximo pode ser controlado mediante um *loop* (capilar de amostragem) na válvula de injeção. A reprodutibilidade da injeção manual depende da perícia do operador, sendo os requisitos básicos para a análise quantitativa, a utilização de um *loop* de amostra pequeno e uma injeção com excesso de solução de amostra de modo a que o *loop* seja totalmente lavado com a amostra. A maior reprodutibilidade de injeção é obtida com um injetor automático com um *loop* de amostra fixa (Hanai, 1999)

Os injetores de válvula são normalmente utilizados em instrumentação comercial, pois a amostra é introduzida, com o mínimo de interrupção do fluxo. Os dispositivos de injeção são a base para a injeção manual e automática devido à sua facilidade de uso, fiabilidade e facilidade de automação. Uma válvula de injeção típica é a válvula de seis portas, possuindo duas posições: a posição de carga e a posição de injeção. Para introduzir a amostra, a válvula é ligada pela primeira vez para a posição de carga, nessa posição, a fase móvel ultrapassa o *loop* de amostra e flui directamente a partir da bomba através da válvula para a coluna. Ao mesmo tempo, a amostra é introduzida no *loop* de amostra através do orifício da agulha, sem interromper o fluxo de eluente. Para introduzir a amostra no cromatógrafo, a válvula é ligada para a posição de injeção e a fase móvel é utilizada para impulsionar a amostra para a coluna (Weston e Brown, 1997).

A dimensão do *loop* de amostra pode variar, dependendo do volume da amostra. Normalmente o *loop* de amostra varia entre os 5µL e 5mL e cada um deve ser removido manualmente antes que o outro seja colocado no lugar. A substituição de um tamanho de *loop* por outro é a maior desvantagem dos injetores manuais. A precisão deste tipo de injetores varia com a dimensão do *loop*, desde cerca de 5%, para um *loop* de 2mL a 30% para um *loop* 5µL. A necessidade da injeção autónoma e precisa de amostra, levou ao desenvolvimento de uma grande variedade de injetores automáticos (Weston e Brown, 1997).

Os injetores automáticos contêm uma versão acionada mecanicamente da válvula de seis portas encontrada em injetores manuais, o funcionamento é semelhante ao dos manuais, mas a amostra é introduzida automaticamente a partir dos *vials* (frascos que contêm a amostra preparada para a análise) que se encontram num carrossel (suporte com poços onde se colocam os *vials*). O formato de carrossel é um meio confiável e rápido de transporte de amostras para posterior injeção. A amostra pode ser introduzida no *loop* de amostra de diversas maneiras: o frasco pode ser pressurizado para forçar a amostra para fora, ou pode ser utilizada uma seringa. A seringa é geralmente controlada por um motor de modo a que diferentes volumes de amostra possam ser injetados reprodutivelmente, preenchendo parcialmente o *loop* de amostra. Uma vez o *loop* de amostra carregado, a válvula atua eletricamente (Weston, Brown, 1997; Gratzfeld-Hüsgen, Schuster, 2001).

Pré-coluna

A pré-coluna, como o nome indica, é colocada antes da coluna e serve de proteção entre o injetor e a coluna. Contém o mesmo enchimento da coluna analítica impedindo a contaminação por impurezas, evitando assim alterações no desempenho da coluna e aumentando o seu tempo de vida. A pré coluna também funciona como saturador da fase móvel impedindo assim o seu arrastamento na coluna (Meyer, 2010).

Colunas

A coluna cromatográfica permite separar uma mistura nos seus componentes. A seletividade, capacidade e eficiência da coluna são afetados pelo material de enchimento da coluna ou material de construção (Weston e Brown, 1997).

A maioria das colunas de HPLC é feita de aço inoxidável de grau 316, que é aço austenítico de cromo-níquel-molibdênio, resistente à pressão habitual em HPLC e também relativamente inerte à corrosão química. O interior da coluna não deve ter superfícies ásperas, sulcos ou estruturas microporosas, de modo que os tubos de aço devem ser perfurados com precisão ou polidos ou eletropolido após a fabricação comum (Meyer, 2010).

Os enchimentos mais modernos de HPLC são micropartículas de vários tamanhos, formas e porosidades. A superfície das partículas pode ser modificada em qualquer meio físico ou químico de modo a permitir o acesso a qualquer tipo de cromatografia clássica. A sílica em gel é a principal fase estacionária para a cromatografia de adsorção, embora a utilização de outros óxidos metálicos, tais como alumina e zircônio, bem como carbono e hidroxiapatita também tenham sido descritas. A sílica é abundante, barata e disponível numa grande variedade de formas, tamanhos e porosidade. Além disso, os grupos funcionais podem ser facilmente ligados aos silanóis. A principal desvantagem da sílica é a sua instabilidade em altos e baixos pH, isto é, acima de pH 8, ou abaixo de pH 2, o que limita os eluentes que podem ser utilizados. Têm-se verificado a utilização crescente de enchimento à base de resina tal como poliestireno ou polímeros à base de acrílico, sendo estes particularmente utilizados na cromatografia por exclusão de tamanho e cromatografia de permuta iónica, no entanto, as colunas de fase inversa à base de resina também estão comercialmente disponíveis. Embora as colunas de resina possam ser utilizadas numa ampla gama de pH (pH 1-13), elas são mais limitadas em termos de pressão que as colunas à base de sílica (Weston e Brown, 1997).

Micropartículas porosas são as partículas da fase estacionária mais comuns em HPLC. O tamanho dos poros dita a superfície com a qual a amostra interage. Partículas com poros pequenos apresentam uma elevada área superficial e, portanto, têm uma maior retenção. As moléculas grandes, tal como as proteínas, podem ser excluídos dos poros pequenos, logo para este tipo de moléculas é preferível um enchimento com maior tamanho de poro. O comprimento da coluna afeta tanto a eficiência como a velocidade da separação. Colunas mais longas resultam em longos tempos de análise, mas no entanto, a eficiência da coluna tende a aumentar com o tempo de análise. Em geral, são utilizadas colunas curtas para separações simples. As colunas analíticas podem variar de 30 a 300mm de comprimento.

De seguida ficam alguns dos requisitos fundamentais para o bom funcionamento das colunas em cromatografia líquida de alta eficiência. As partículas devem ser esféricas e com tamanhos que devem variar de 3 a 10 μm , estas devem de ser resistentes a pressões típicas encontradas na HPLC 6,1-20,5 MPa, mas de preferência superior a 27,2 MPa e não devem encolher ou inchar com a natureza do eluente. A gama de diâmetros de poro médio deve ser entre 0,01 e 0,1 μm . A superfície interna do material deve ser homogénea. O material de enchimento deve ser quimicamente inerte em todas as condições de pH e composição do eluente. As características físico-químicas do material devem ser reproduzíveis de lote para lote e de fabricante para fabricante (Weston e Brown, 1997).

Detetor

Os dispositivos utilizados para a deteção de sinal numa cromatografia em coluna baseiam-se tipicamente nas diferenças das propriedades físicas ou químicas entre o eluente e o analito. Alternativamente, o solvente pode ser evaporado para permitir a deteção por espectrometria de massa de ionização de chama, ou através de outros meios de deteção. Propriedades exploradas na deteção de analitos na presença da fase móvel incluem absorção de luz na gama do infravermelho, visível ou ultravioleta, a fluorescência de luz absorvida, dispersão de luz, refração da luz, viscosidade, condutividade, reatividade eletroquímica, reatividade química, volatilidade, rotação ótica, e constante dielétrica. Apesar dos diversos detetores todos devem possuir determinadas características, tais como, serem igualmente sensíveis a todos os picos eluídos ou registar apenas aqueles de interesse; não serem afetados por mudanças na temperatura ou na composição da fase móvel; terem a capacidade de controlar as pequenas quantidades de composto; não contribuírem para o alargamento do pico; reagir rapidamente de modo a obter picos estreitos que passam rapidamente pela célula; serem de fácil manipulação, robustos e baratos (Swadesh, 2001; Meyer, 2010).

Dos detetores referidos anteriormente, os mais comuns são os que se baseiam na absorvância de luz ultravioleta e na refração da luz (Swadesh, 2001).

A função do detetor é monitorizar a luz que passa através do eluente. Quando um composto de absorção de UV, se dissolve no eluente, passa através do detetor, que absorve uma parte da luz, impedindo-o assim de atingir o sensor de luz. A diminuição da luz resulta numa saída elétrica que é alimentada a partir do detetor no sistema de dados. A concentração de soluto e a intensidade da luz transmitida através da célula de fluxo estão relacionadas de acordo com a lei de Lambert-Beer,

$$A = \epsilon cd$$

Onde ϵ representa a absorvidade molar, c a concentração molar, d o comprimento da célula. A é o produto de todos estes fatores, sendo conhecido com a absorvância (Weston e Brown, 1997; Meyer, 2010).

Quanto maior for a absorvidade molar do soluto e/ou quanto maior for a concentração de soluto, maior será o sinal (Weston e Brown, 1997).

A fase móvel deve ser selecionada para a transparência ótica no detetor de luz de comprimento de onda, ou seja, a sua absorvância deve ser zero ou, pelo menos, ser eletronicamente ajustável para zero. Se for este o caso, o sinal do detetor em si também é igual a zero, e o integrador está definido para a posição desejada e produz a linha de base. De acordo com a equação acima, a altura do pico é a função da absorvância molar e a concentração de uma substância que passa através da célula do detetor. Compostos com uma capacidade de absorção molar mais elevada produzem picos maiores do que aqueles de baixa absorvância molar, quando a mesma quantidade de composto é injetada (Meyer, 2010).

Processador de dados

O Processador de dados, não só controla todos os módulos do aparelho de HPLC, como também converte o sinal do detetor e usa-o para determinar o tempo de eluição (tempo de retenção) dos componentes da amostra (análise qualitativa) e a quantidade de amostra (análise quantitativa), apresentando o sinal do t em forma de cromatograma (Gratzfeld-Hüsgen e Schuster, 2001).

2.5. DETERMINAÇÃO DE TEOBROMINA EM AMOSTRAS DE CACAU E SEUS DERIVADOS POR HPLC

Os regulamentos em vigor na Europa, especificam as quantidades mínimas de cacau numa vasta gama de produtos derivados de cacau, e fizeram com que os fabricantes de chocolate e laboratórios de investigação realizassem análises de rotina a este tipo de produtos (Richards e Wailes, 2012).

Os alcalóides, teobromina e cafeína, estão naturalmente presentes no cacau, como tal, a determinação dos sólidos totais de cacau isentos de gordura, é realizada utilizando um fator de conversão calculado a partir de análise de amostras de cacau destes alcalóides genuínos. Nos últimos 50 anos, pouco trabalho sistemático foi feito para determinar se o nível de alcalóides mudou, como resultado de diferentes métodos de produção ou fatores ambientais. Para fazer face a esta lacuna foi calculado um fator de conversão atualizado, através de um estudo realizado a partir de 191 amostras pelo projeto Q01122 da FSA (*Food Standards Agency*). A partir deste estudo determinou-se que o fator de conversão médio para determinar os sólidos totais de cacau isentos de gordura, a partir da determinação de teobromina é 40,7 e a partir dos alcalóides totais é 36,1 (Richards e Wailes, 2012).

Vários métodos de extração de teobromina de produtos de cacau têm sido descritos ao longo dos anos com o objetivo de obter métodos cujo rendimento fosse mais elevado.

O primeiro relatório sobre este tema foi publicado em 1894 no jornal *The analyst* por William Kunze. Este estudo consistiu em analisar todos os métodos utilizados na época para a determinação de alcalóides e adaptá-los a um método cujos resultados fossem melhores.

Sendo que o método final consistiu na realização de uma digestão ácida ao cacau, seguido de precipitação dos alcalóides e proteínas para posteriormente se separarem os alcalóides com hidróxido de bário. Os alcalóides foram extraídos com clorofórmio e o resíduo da evaporação foi analisado pelo azoto total (Kunze, 1894).

Em 1921 e 1935 outros métodos, semelhantes ao anterior, foram publicados, sendo que a digestão e extração de teobromina sofreu alterações, mas a quantificação também era realizada pela determinação de azoto total. Em 1950 o método publicado necessitava de extração da gordura da amostra antes de extrair os restantes resíduos de cacau e a determinação de teobromina era feita através de titulação com nitrato de prata (Naik, 2001; Richards e Wailes, 2011).

Mais tarde começou-se a utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação de teobromina em amostra de cacau e seus derivados. As vantagens da utilização desta técnica são a eficiência, sensibilidade e especificidade quando comparada com outras técnicas. Outra vantagem deste método é a possibilidade de quantificação de mais do que um alcalóide na mesma análise (Naik, 2001).

Mesmo após a utilização da técnica de HPLC muitos métodos foram alterados e melhorados.

O método desenvolvido por Kreiser and Martin envolvia a extração da gordura com éter de petróleo e após a amostra estar desengordurada era extraída com água quente, filtrada e injetada no HPLC. Timbie et al, Liang et al e Watanable et al. desenvolveram o método que envolviam o refluxo das amostras com álcool e posterior filtração e análise por HPLC (Naik, 2001).

A *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC), também desenvolveu um método com extração de gordura utilizando éter de petróleo e posteriormente ao resíduo era adicionada água e colocado num banho de água a 100°C durante 25 minutos. Após o arrefecimento era transferido para um tubo de centrifugação e centrifugado. O líquido sobrenadante era utilizado para a quantificação de teobromina por HPLC. Mais tarde a AOAC publicou outros métodos, esses métodos descreviam a extração utilizando água e ácido acético, água quente, ácido sulfúrico e mais métodos utilizando solventes para extração de gordura das amostras (Richards e Wailes, 2011).

Mas todos estes métodos tinham desvantagens na preparação das amostras e a sua aplicação limitada a apenas um alcalóide e uma vez que este tipo de análises se efetua em laboratórios de rotina ou em fábricas de processamento são necessários métodos cuja preparação seja fácil e rápida, bem como ter uma vasta gama de aplicação, ou seja determinar mais de um alcalóide ao mesmo tempo, teobromina e cafeína (Naik, 2001).

A teobromina é apenas moderadamente solúvel em água fria. No entanto, é solúvel em água quente e ácidos minerais ou bases. Devido à natureza dos produtos de cacau, em que um elevado teor de gordura está presente, alguns métodos utilizam uma etapa de processo de desengorduramento antes da extração do alcalóide, no entanto a teobromina é quase insolúvel em gordura e, portanto, esta etapa seria desnecessária (Richards e Wailes, 2011).

Caudle et al. realizaram um estudo com dois métodos, para a determinação de teobromina, um dos métodos é o indicado pela AOAC e prevê uma fase de extração de gordura, enquanto o outro método apenas utiliza extração aquosa. A principal conclusão foi que de facto a remoção dos lípidos é desnecessária (Caudle *et al.*, 2000).

O método utilizado atualmente por grande parte dos laboratórios foi publicado no catálogo de métodos VEMS (*Validated Enforcement Method*). Este método permite quantificar a teobromina e cafeína ao mesmo tempo e a preparação da amostra é rápida e fácil, neste método a amostra homogeneizada é fervida após a adição de ácido clorídrico e água. Após o seu arrefecimento são adicionados os reagentes de clarificação Carrez. A mistura é depois filtrada e injetada no HPLC, usando uma coluna RP-18 a 40°C e quantificada a 205 nm (Richards e Wailes, 2011).

2.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O objetivo de qualquer medida analítica é a obtenção de dados confiáveis, consistentes e precisos. Métodos analíticos validados desempenham um papel fundamental na execução deste objetivo (Huber, 2010).

Os resultados da validação de um método podem ser utilizados para avaliar a qualidade, confiabilidade e consistência dos resultados analíticos, que é parte integral das boas práticas analíticas. Quando se trata de laboratórios envolvidos no contexto de gestão de qualidade e acreditação, a validação dos métodos é exigida pelas normas de padrões de qualidade, garantindo assim total confiança dos resultados obtidos (Huber, 2010).

Ao longo dos tempos várias definições de validação têm sido descritas na literatura. De acordo com a ISO 8402:1994, a validação é “Confirmação mediante controlo e apresentação de evidências objetivas de que são cumpridos os requisitos específicos de um determinado uso pretendido” (Feinberg, 2007).

Segundo a NP/EN/ISO 17025:2005 a validação é necessária para confirmar a aptidão para a utilização de um determinado método analítico, isto é, verificar que um protocolo definido para o método é aplicável a um produto específico a testar e a uma gama de concentração definida do analito (17025:2005).

Nas mais recentes diretrizes IUPAC o método de validação deve realizar um conjunto de ensaios, que testa todos os pressupostos no qual o método analítico se baseia, estabelecendo e documentando o desempenho do método, demonstrando assim a sua adequação para um determinado objetivo. Sendo as características de desempenho do método a aplicabilidade, seletividade, calibração, exatidão, precisão, recuperação, gama de trabalho, limite de quantificação e de deteção, sensibilidade e robustez. Além destes parâmetros também é necessário ter em conta a incerteza associada (Thompson *et al.*, 2002).

No presente estudo os parâmetros necessários à validação do método foram avaliados segundo o guia Relacre nº13. Este documento tem como objetivo uniformizar os critérios

utilizados de modo a demonstrar que um método interno de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. Demonstrando assim, através da validação, que o laboratório dispõe de meios e critérios objetivos, que, conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida (Relacre, 2000).

De acordo com o Guia Relacre 13 o estudo de determinados parâmetros, entre os quais se destacam, a curva de calibração, os limiares analíticos e a sensibilidade, permite interpretar as informações veiculadas pelos estudos e ensaios efetuados (Relacre, 2000).

2.6.1. Curva de Calibração

A curva de calibração em análises quantitativas diz respeito, à relação existente entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito (Relacre, 2000).

Para o procedimento de calibração analítica são preparadas uma série de soluções padrão cuja concentração do parâmetro a dosear é conhecida. Estas são medidas no equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar, em que, para cada uma, o instrumento irá gerar um sinal proporcional à concentração do analito estabelecendo-se assim uma curva de calibração, permitindo, através de interpolação determinar a concentração do parâmetro nas amostras (Relacre, 2000).

Os padrões de calibração devem distribuir-se equitativamente pela gama de trabalho, tendo em conta que o branco de calibração tem muitas vezes valor diferente de zero e que nestas condições deve ser incluído na curva de calibração. Na eventualidade de ser utilizado o método dos mínimos quadrados, o eixo vertical y , representa a resposta instrumental do equipamento e o eixo horizontal x , representa as concentrações dos padrões, uma vez que se assume que os erros associados aos valores de x são desprezáveis face aos de y (Relacre, 2000).

Quando a curva de calibração representa uma função polinomial de primeiro grau, isto é, uma reta e caso seja utilizado o método dos mínimos quadrados para as regressões lineares, prevê-se uma distribuição normal para os erros e é necessário garantir a homogeneidade de variâncias ao longo da reta (Relacre, 2000).

A forma algébrica da equação da reta é dada por $y = a + bx$, em que, a representa a ordenada na origem e b o declive da reta. A reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes $(x_1, y_1); \dots; (x_N, y_N)$ que N deverá corresponder a N pontos marcados na reta. Geralmente o ponto (x_1, y_1) pertence ao branco. A média dos valores de x correspondente à concentração dos padrões utilizados representa-se por \bar{x} e a média dos valores de y referente ao sinal instrumental representa-se por \bar{y} (Relacre, 2000).

Um dos parâmetros de avaliação da calibração analítica é o coeficiente de correlação (\bar{r}). Este parâmetro pode tomar valores entre -1 e +1, mas para efeitos de validação de métodos, o seu valor deve ser superior a 0,995 (Relacre, 2000).

2.6.1.1. Gama de Trabalho

Gama de trabalho define-se como sendo o intervalo entre a concentração mais baixa e a concentração mais alta do analito da amostra, para o qual se verifica que o procedimento analítico tem um adequado nível de precisão e exatidão (Thompson *et al.*, 2002).

Segundo o guia Relacre 13, quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado da curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias, para este teste e de acordo com a ISO 8466-1 o número de padrões não deve ser inferior a cinco, sendo que o recomendado são dez e devem distribuir-se equitativamente na gama de concentrações (Relacre, 2000).

O primeiro e o último padrão são analisados em dez réplicas independentes de modo a determinar as variâncias associadas aos mesmos, S^2_1 e S^2_{10} , do seguinte modo,

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

em que

$$\bar{y} = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j})}{n_i},$$

sendo i o número do padrão e j o número de repetições efetuadas para cada padrão.

As variâncias são testadas de modo a examinar as diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho efetuando o cálculo do valor teste PG

$$a) PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$$

$$b) PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$$

a) Quando $S_{10}^2 > S_1^2$

b) Quando $S_1^2 > S_{10}^2$

Compara-se o valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para $n-1$ graus de liberdade:

- Se $PG \leq F$ a diferença de variâncias não é significativa e a gama de trabalho está ajustada.
- Se $PG > F$ a diferença de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser ajustada até que a diferença entre variâncias relativas ao primeiro e último padrão sejam aceites.

2.6.1.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade do procedimento analítico, obter resultados de ensaios, proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de uma determinada gama de trabalho (Huber, 2010).

A representação gráfica da resposta do sinal em função da concentração de analito (curva de calibração) juntamente com o cálculo e análise do coeficiente de correlação (r^2) são a forma mais simples de observar a linearidade do método. Mas este coeficiente apenas é bom indicador de correlação, mas não necessariamente de linearidade. Dai que este teste de linearidade não deve ser analisado isoladamente (Relacre, 2000).

O teste das áreas normalizadas, o teste de análise de resíduos, o teste de RIKILT e ainda o modelo estatístico definido pela norma 8466-1, são testes de linearidade complementares ao coeficiente de correlação de modo a garantir uma avaliação fiável, onde se seguem os objetivos de cada um (Silva, 2010):

Teste áreas normalizadas tem como objetivo avaliar a dispersão entre os resultados obtidos na calibração em relação aos valores teóricos, e verificar que esta dispersão não é superior ao intervalo previamente estabelecido.

Teste de resíduos baseia-se na avaliação da diferença entre os valores experimentais e valores ideais da reta de calibração, quando esta diferença é superior a 15% o resíduo em causa deve ser excluindo, reduzindo assim a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até à obtenção do requisito.

Teste RIKILT permite analisar a linearidade em cada ponto da reta. Como tal determina-se a razão entre cada sinal instrumental e a concentração respetiva e é traçado um gráfico de modo a avaliar o seu comportamento linear.

O valor médio atribuído é 100%, indicando assim a linearidade perfeita. Para admitir a linearidade do método cada ponto de calibração deve estar entre os 90% e 110%. Caso algum não verifique este requisito é excluído e o gráfico é realizado novamente até que se comprove a linearidade.

Modelo estatístico de acordo com a norma 8466-1 baseia-se na diferença de variâncias obtidas a partir dos desvios padrão residuais da função de calibração linear e não linear. Partindo deste valor determina-se o valor teste PG, que é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher para n-1 graus de liberdade e uma probabilidade de 95 %:

Se $PG \leq F$ a função é linear

Se $PG > F$ a função de calibração não é linear.

2.6.2. Limiares analíticos do método de ensaio

Com base nos padrões escolhidos para a teobromina determinaram-se os respetivos limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação).

2.6.2.1. Limite de detecção

Limite de detecção é o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença de analito na amostra em teste, com uma certeza estatística razoável. Ou seja, corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que é possível detetar, mas não necessariamente quantificar como valor exato.

Uma leitura inferior ao limite de detecção, não significa a ausência de analito na amostra, apenas significa que, com uma probabilidade definida, a concentração do analito em questão é inferior a um determinado valor (INAB, 2012).

Para uma correta definição do limite de detecção é necessário introduzir dois conceitos de estatística: erro tipo I e erro do tipo II:

Erro tipo I (α) é a probabilidade de concluir pela presença do componente em análise, quando de facto não existe esse componente na amostra;

Erro tipo II (β) é a probabilidade de concluir pela ausência do componente em análise, quando ele de facto existe (Relacre, 2000).

Para uma correta análise dos limiares analíticos estes dois erros devem ser minimizados, segundo recomendações da IUPAC $\alpha = \beta = 5\%$ (INAB, 2012).

Quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear, o limite de detecção é calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, de acordo com a expressão:

$$L.D. = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b}$$

Onde,

3,3 corresponde ao valor K, que é um fator numérico escolhido de acordo com o nível de confiança requerido, neste caso 99,7%

$S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração

b corresponde ao declive da mesma.

2.6.2.2. Limite de quantificação

Corresponde à concentração mais baixa medida, a partir da qual é possível a quantificação do analito, com determinada exatidão e precisão. Normalmente este limiar analítico corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco) (Thompson *et al.*, 2002).

Segundo as recomendações IUPAC, após a sua determinação este deve ser testado de modo a averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória. Para este teste determina-se em condições de precisão intermédia, uma série de padrões internos com concentrações próximas ao limiar de quantificação, cujo coeficiente de variação deve ser inferior a 10% (Relacre, 2000).

$$L.Q. = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b}$$

No limite de quantificação o valor $K=10$, significa que o desvio padrão relativo é de 10% (Taverniers *et al.*, 2004).

A atualização dos limiares analíticos – limite de deteção e limite de quantificação – deverá ser efetuada sempre que ocorram alterações de factores de influência, tais como mudança de analista, alteração dos reagentes ou equipamentos usados na determinação, entre outros, ou sempre que se elabora uma nova curva de calibração, e se utiliza os dados da mesma para o cálculo dos limiares, sendo que, poderá ser feito um estudo ao longo do tempo e adotar como limiares analíticos a média aritmética dos limites de deteção e quantificação calculados recorrendo a uma série significativa de curvas de calibração, desde que se observe estabilidade nos valores dos limiares obtidos ao longo do tempo (Relacre, 2000).

2.6.3. Sensibilidade

A sensibilidade do método é o gradiente de resposta da curva, ou seja, permite avaliar a capacidade de um método ou equipamento para distinguir pequenas variações de concentração de um analito. Esta grandeza é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da reta de calibração, quando a curva de calibração, é definida por um modelo linear (Relacre, 2000; Taverniers *et al.*, 2004)

Um método é chamado sensível quando uma pequena variação na concentração do analito causa uma grande variação no sinal medido (Taverniers *et al.*, 2004).

A sensibilidade tem bastante interesse pelo seu aspecto relativo, ou seja, quando se pretende averiguar a sua evolução ao longo do tempo ou quando se pretende compará-la entre diferentes métodos analíticos, baseados em modelos lineares, para o mesmo analito ou ainda quando se compara a sensibilidade para vários analitos (Relacre, 2000).

2.6.4. Precisão

A precisão tem como objetivo avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, semelhantes ou padrões, em condições definidas. De modo a minimizar efeitos de matriz é mais realista estudar a precisão sobre amostras (Relacre, 2000).

Este parâmetro é normalmente avaliado usando o valor do desvio padrão relativo também conhecido como coeficiente de variação, em circunstâncias específicas de medição, como a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade (Thompson *et al.*, 2002).

Além do coeficiente de variação e desvio padrão, os limites de repetibilidade (r) e reprodutibilidade (R) são parâmetros adicionais, mas muito importantes na avaliação da precisão. Estes critérios indicam o valor abaixo do qual se devem situar, com uma probabilidade de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio obtidos nas condições de repetibilidade ou reprodutibilidade (Taverniers *et al.*, 2004).

2.6.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade é o parâmetro que dá a percepção da variabilidade existente entre resultados de medições sucessivas, aquando a sua realização, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e num curto intervalo de tempo. Permitindo estimar as diferenças prováveis entre resultados de réplicas obtidas durante a análise de um mesmo lote ou série analítica (Eurachem, 1998; Relacre, 2000).

Para determinar a repetibilidade efetuam-se séries de medições ($n \geq 10$) sobre a mesma amostra, em condições de repetibilidade.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo:

$$r = 2,8 \cdot \sqrt{S_{ri}^2}$$

Em que, S_{ri} é o desvio padrão da repetibilidade associado aos resultados obtidos (Relacre, 2000).

Este parâmetro indica se a diferença entre análises duplicadas é significativa em termos de repetibilidade (Eurachem, 1998).

O coeficiente de variação é numericamente igual ao desvio padrão da repetibilidade a dividir pela média dos valores considerados, sendo dado por:

$$C.V.(\%) = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100$$

Coefficiente de variação inferior a 1%, é o critério exigido para garantir a repetibilidade do método (Shabir, 2004).

2.6.4.2. Reprodutibilidade

A precisão sob condições de reprodutibilidade refere-se aos resultados de medições independentes obtidos com o mesmo método, em amostras idênticas, em laboratórios diferentes, por diferentes operadores e equipamentos (INAB, 2012).

O limite de reprodutibilidade (R) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica, 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas (Relacre, 2000).

Para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade (R) é avaliado segundo:

$$R = 2,8 \cdot \sqrt{S_{Ri}^2}$$

Em que, S_{Ri} é o desvio padrão da reprodutibilidade associada aos resultados obtidos.

O coeficiente de variação é numericamente igual ao desvio padrão da reprodutibilidade a dividir pela média dos valores considerados, sendo dado por:

$$C.V. (\%) = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \times 100$$

Coeficiente de variação inferior a 1%, é o critério exigido para garantir a reprodutibilidade do método (Shabir, 2004).

2.6.4.3. Precisão intermédia

Precisão intermédia, refere-se à concordância entre resultados obtidos sobre a mesma amostra, no mesmo laboratório, em dias de análise diferente, mas com variação de determinadas condições, como por exemplo o analista ou equipamento. Estas condições têm de ser definidas (Eurachem, 1998).

Para a determinação da precisão intermédia recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados do laboratório. Segundo a norma ISO 5725:3, a precisão intermédia pode ser avaliada de três formas distintas: através de cartas de controlo de amplitudes aplicadas a réplicas, a duplicados da amostra e a padrões, quando se realizam n ensaios sobre t amostras ou padrões ou quando se realizam n medições sobre uma mesma amostra, amostras supostamente idênticas ou o mesmo padrão. De acordo com esta norma o método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação for inferior a 5.0% (Relacre, 2000; Thompson *et al.*, 2002).

$$C.V. (\%) = \frac{S_{PI}}{\bar{x}} \times 100$$

2.6.5. Exatidão

O ICH, *International Conference on Harmonisation*, define a exatidão de um procedimento analítico, como o grau de concordância entre o valor de referência aceite e o valor do resultado de um ensaio (Huber, 2010).

A exatidão quando aplicada a uma série de resultados de ensaio está dependente da combinação de componentes de erros aleatórios e erros sistemáticos (Relacre, 2000).

A avaliação deste parâmetro pode ser efetuada de diversas maneiras, entre elas destacam-se algumas tais como, a comparação de resultados do método a validar com resultados de um método de referência estabelecida, nesta abordagem é necessário o conhecimento da incerteza do método referência. Outra alternativa à avaliação da precisão é por meio da análise de uma amostra com concentrações conhecidas, por exemplo uma amostra de controlo ou materiais de referência certificados (MRC) e comparar o valor medido com o valor real, conforme fornecido pelo material. Caso não haja disponibilidade referente aos MRC ou a amostras de controlo, outra alternativa é, análise à matriz da amostra fortificada com concentração conhecida de analito (Huber, 2010).

O documento ICH recomenda que a exatidão seja avaliada através de um mínimo de nove determinações ao longo de um período mínimo de três níveis de concentração cobrindo a faixa especificada. Uma das maneiras de avaliar este parâmetro é segundo a percentagem de recuperação, através do ensaio da quantidade conhecida de analito adicionado (Eurachem, 1998; Huber, 2010).

3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

3.1. SGS – SOCIEDADE GERAL DE SUPERINTENDÊNCIA, S.A.



Figura 3.1 Logotipo SGS, S.A.

Fundada originalmente em 1878 em Rouen como um entreposto Francês para a inspeção do comércio internacional de cereais a granel, a companhia foi registada como Société Générale de Surveillance em 1919, em Genebra.

Atualmente a SGS   a maior organiza o mundial no domínio da Inspe o, Verifica o, Análise e Certifica o, com sede em Genebra, Su a esta empresa

está presente em cerca de 140 países operando em mais de 1.500 escritórios e laboratórios com o logotipo apresentado na figura 3.1.

A SGS Portugal foi fundada em 1922 pelo grupo SGS, tendo determinado que esta afiliada desenvolvesse a sua atividade pelos mesmos princípios geradores da aço do próprio Grupo a Independência, a Integridade, a Confidencialidade e a Inova o.

Originalmente dedicada ao controlo de opera es de carga e descarga de cereais a granel, a SGS Portugal foi alargando a sua atividade a outros setores adaptando-se às exigências do mercado. Os serviços abrangem inspe es, análises e ensaios, verifica o metrológica acreditada, inspe es e auditorias técnicas nos mais diversos ramos. Possuindo laboratórios acreditados nas áreas Agroalimentar, Detergentes, Produtos de Higiene, Cosméticos, Dispositivos Médicos, Ensaios Não Destrutivos, Ambiental e Segurança Ocupacional. A SGS assegura que os seus produtos cumprem os padrões internacionais, garantindo assim a segurança do consumidor.

Laboratório SGS

O laboratório alimentar da SGS   composto pela sala de rece o de amostras, laboratório de microbiologia e laboratório química, onde foi inserido o estágio.

O laboratório agroalimentar SGS foi fundado   25 anos de modo a dar suporte ao controlo de opera es de cereias. A partir dai começou a desenvolver as análises de química clássica, tendo neste momento uma posi o muito robusta e consistente no mercado a nível de análises nutricionais.

Mais recentemente foram desenvolvidas análises a águas, detergentes e cosméticos e na vertente alimentar, o laboratório de Química da SGS, atualmente, tem apostado no desenvolvimento e implementa o de metodologias de química



Figura 3.2 Logotipo da SGS Multilab

instrumental, nomeadamente espectroscopia de absorção atômica e métodos cromatográficos. O estágio curricular teve como fim continuar a expansão na área de trabalho referida anteriormente, sendo o principal objetivo a implementação e validação de uma metodologia associada à cromatografia líquida de alta eficiência.

4. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da metodologia para a determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados por HPLC decorreu no laboratório de Química da SGS – Sociedade Geral de Superintendência S.A., em Lisboa. Como tal utilizou-se os equipamentos e materiais disponíveis nestas instalações.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica, foram realizadas inúmeras experiências preliminares que levaram à seleção dos parâmetros mais adequados para esse fim.

Ao longo dos anos têm sido descritos diversos métodos para a extração de teobromina em produtos de cacau, cuja principal diferença se baseia, principalmente, na extração ou não da gordura. Como tal, foram realizadas experiências preliminares, aos dois tipos de métodos, que levaram à seleção do método mais adequado para o desenvolvimento da metodologia “Determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados”.

Nesta secção são descritos, os reagentes, materiais e instrumentos necessários para ambas as metodologias, a sua descrição e os resultados obtidos em cada uma.

4.2. REAGENTES

Os reagentes utilizados para o método **com extração de gordura** foram o metanol e ácido acético glacial para HPLC adquiridos respetivamente na Carlo Erba e Panreac, água Milli-Q da Millipore, teobromina grau pureza 99% adquirido na Alfa Aesar, éter de petróleo, hexano, soluções de Carrez I e Carrez II.

Relativamente ao método **sem extração de gordura** os reagentes utilizados foram acetonitrilo para HPLC, água Milli-Q da Millipore, ácido acético glacial e ácido clorídrico, ambos adquiridos na Sharlau, teobromina grau pureza 99% da Alfa Aesar, solução Carrez I e Carrez II e tampão fosfato.

Para as soluções Carrez I e II foi utilizado hexacianoferrato de potássio trihidratado $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ de grau analítico, adquirido na Merck e sulfato de zinco heptahidratado $ZnSO_4.7H_2O$ de grau analítico, adquirido na Panreac. Relativamente ao tampão fosfato utilizou-se ortofosfato de sódio dihidrogenado (NaH_2PO_4) e hidróxido de sódio (NaOH), ambos da Panreac.

- **Ácido Clorídrico (0,5M)**

Adicionar 44,5mL de ácido clorídrico em água e diluir num balão de 1L.

- **Solução Carrez I**

Dissolver 219g de sulfato de zinco dihidratado em água contendo 30g de ácido acético glacial. Transferir para um balão de 1L e perfazer com água.

- **Solução Carrez II**

Dissolver 106g hexacianoferrato(II) potássio trihidratado em água, num balão de 1L e perfazer o volume.

- **Fase Móvel A**

Acetonitrilo, grau HPLC.

- **Fase Móvel B: Tampão fosfato, pH =5**

Dissolver 3,12g de ortofosfato de sódio dihidrogenado em água ultra pura num balão de 1L e perfazer. Ajustar o pH com solução hidróxido de sódio, 0,1M, até pH=5.

- **Solução Hidróxido Sódio, 0,1M**

Dissolver 4,0g de hidróxido de sódio em água ultra pura. Deixar arrefecer e perfazer o volume do balão de 1L.

4.3. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

Fase móvel

Tal como mencionado anteriormente, a fase móvel é o eluente que irá separar os compostos da amostra ao longo da fase estacionária, dependendo da afinidade dos compostos da coluna.

Para o método que necessita da **extração da gordura** a fase móvel é constituída por metanol, água ultra pura e ácido acético para HPLC, nas proporções de 20:79:1 (v:v) respetivamente.

Relativamente ao método **sem extração de gordura**, a fase móvel é constituída por tampão fosfato e acetonitrilo para HPLC na proporção 90:10 (v:v).

Solução mãe e padrões de teobromina

- **Solução mãe de teobromina (500 mg/L)**

Pesar rigorosamente 250 mg de teobromina para um balão volumétrico de 500 mL. Dissolver em água quente, deixar arrefecer e perfazer o volume.

- **Preparação Soluções Padrão**

Pipetar 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 mL de solução mãe para um balão de 50 mL e dissolver com água, para obter as concentrações de 25, 50, 100, 200 e 300 mg/L.

4.4. EQUIPAMENTO E MATERIAL

No decorrer deste trabalho foram utilizados os equipamentos e material corrente do laboratório.

4.4.1. Equipamento

- Balança analítica, com precisão $\pm 0,1$ mg da marca Mettler, modelo AE200
- Banho de água, marca Raypa, modelo Termostatic Bath;
- Banho ultrassons, marca Sonorex
- Placa aquecimento, marca P Selecta
- Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), eluição isocrática, com detetor UV, injeção automática e sistema de aquisição de dados, da marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity
- Coluna cromatográfica: Zorbax Eclipse Plus C18 de 4,6 x 100 mm de 3,5 μm ;

4.4.2. Material

- Tubos de centrifugação
- Balões de 50, 500 e 1000 mL
- Centrifugadora HERMLE Z-206A
- Pipetas volumétricas
- Vial
- Filtros 0,45 μm

4.5. ESTUDOS PRELIMINARES

4.5.1. Método com extração de gordura

Este método resulta do procedimento “Teobromina e cafeína – Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência” em cacau e produtos de chocolate, descrito no livro Instituto Adolfo Lutz - Métodos Físico Químicos para análises de alimentos (Kimura *et al.*, 2004).

Numa fase inicial, o estudo incidiu sobre duas amostras, uma vez que a sua concentração em teobromina era conhecida, possibilitando assim perceber se este método seria ou não adequado.

Dependendo do tipo de amostra é necessário, ou não, a preparação prévia das amostras. Amostras sólidas necessitam de recurso a moinhos adequados, de forma a promover a sua homogeneização. No caso de amostras liofilizadas, ou líquidas não há necessidade de qualquer preparação prévia.

A toma depende da percentagem de cacau da amostra. Neste caso como apenas se utilizaram duas amostra e sendo ambas de chocolate com 60% cacau a toma considerada foi de 1,0 g.

Amostra fortificada

Para cada ensaio realizado é necessário fortificar uma amostra de modo a garantir que possíveis interferências de matriz não interferem na detecção do analito, neste caso a teobromina. Um ensaio apenas é considerado válido se a percentagem de recuperação relativamente à amostra fortificada for $100\pm 20\%$.

O procedimento para a amostra fortificada é realizado tal como para as amostras sujeitas a quantificação, mas estas são sujeitas à adição de um padrão em concentração conhecida.

Na presente metodologia adiciona-se 5mL da solução mãe (500 mg/L) logo após a introdução da amostra no tubo de centrifugação. Deste modo sabe-se que se fortificou a amostra com 25 mg/L, segundo a seguinte equação:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$
$$500 \text{ mg/L} \times 5 \text{ mL} = C(\text{mg/L}) \times 100 \text{ mL} \leftrightarrow C = 25 \text{ mg/L}$$

- **Extração gordura**

Pesa-se cerca de 1 g de amostra para um tubo de centrifugação de 15 mL, onde se adiciona cerca de 10 mL de éter de petróleo e agita-se vigorosamente durante dois minutos. Coloca-se o tubo na centrifugadora a 2500 rpm durante 15 minutos. Decanta-se o solvente e repete-se a extração até utilizar 60 mL de éter de petróleo.

Após a extração com o solvente coloca-se o tubo num banho de água o tempo necessário à evaporação do solvente residual.

- **Clarificação amostra**

Depois de evaporar o restante solvente de extração, a amostra é transferida, com auxílio de 50 mL de água quente, para um balão de 100 mL, sendo de seguida colocada num banho de água a 100°C durante 20 minutos. Após arrefecimento da amostra adiciona-se 5 mL de cada um dos reagentes de clarificação Carrez I e Carrez II e perfaz-se o volume com água ultra-pura. Agitar bem e deixar repousar aproximadamente 30 minutos, que é o tempo necessário para a completa precipitação das proteínas e eventuais vestígios de gordura. Com uma pipeta de Pasteur rejeitar os primeiros mililitros do sobrenadante e em seguida filtrar com um filtro de seringa (0,45 μm) diretamente para o vial.

A amostra deve ser analisada imediatamente após preparação.

Condições de operação

As condições cromatográficas de trabalho para a determinação de teobromina foram:

- Fluxo: 1,0mL/min;
- Temperatura do forno: 35°C ;
- Volume de injeção: 5,0 μL .
- Tempo de corrida: 10 minutos
- Detetor UV a 280 nm

Uma vez estabelecido o fluxo da fase móvel e a pressão correspondente estiver estável, os padrões e posteriormente as amostras, são injetados automaticamente.

Resultados e observações

De modo a verificar se esta metodologia seria adequada efetuaram-se ensaios incidindo sobre duas amostras cujo valor da concentração de teobromina é conhecido:

Amostra 1 – 588,0 mg/100 g; Amostra 2 – 608,0 mg/100 g

Ao longo dos ensaios foram-se fazendo alterações ao protocolo com o objetivo de obter um resultado próximo do valor de referência.

Como descrito anteriormente a extração da gordura é feita através de sucessivas centrifugações com éter de petróleo. Através dos ensaios efetuados verificou-se qual o número de extrações necessárias de modo a obter resultados favoráveis. Como tal efetuaram-se 5 ensaios para cada número de extrações. Na tabela 4.1 é possível verificar a concentração média obtida.

Tabela 4.1 Concentração de teobromina consoante o número de extrações de gordura

Número de extrações	Concentração média teobromina (mg/100 g)	
	Amostra 1	Amostra 2
2	379,6±10,4	507,1±10,2
3	402,3±10,7	510,5±15,3
4	516,1±12,9	524,6±14,4
5	497,8±15,6	521,8±12,3
6	516,2±12,3	524,1±15,8
	n=5	

Após análise da tabela 4.1, chegou-se à conclusão que são necessárias, no mínimo 4 extrações para obter resultados favoráveis, pois como se pode verificar a realização de um maior número de extrações não melhora o rendimento da metodologia.

No entanto os valores máximos obtidos não são próximos dos valores referência e uma vez que este método não é prático para um laboratório de rotina devido à necessidade de efetuar sucessivas centrifugações optou-se por outro método, desta vez sem a extração de gordura.

4.5.2. Método sem extração de gordura

Este método resulta do procedimento “Medição dos alcalóides teobromina e cafeína em produtos de cacau e chocolate” descrito no “*Journal of the Association of Public Analysts*” (Richards e Wailes, 2012).

Preparação amostra

Uma vez que neste estudo preliminar as amostras utilizadas foram chocolates que necessitavam de homogeneização prévia, foi necessário moê-los num moinho adequado.

Após a fase de preparação das amostras estas são pesadas diretamente para balões de 50mL. A toma depende da percentagem de cacau da amostra. Neste caso como ambas as amostras utilizadas possuíam 60% cacau a toma foi de 1,0 g.

- **Extração de teobromina**

A amostra é pesada diretamente para um balão de 50 mL. De seguida adicionam-se 25 mL de água quente, 2 mL de ácido clorídrico (2 M) e agita-se vigorosamente. Colocam-se os balões na placa de aquecimento, quando a solução entrar em ebulição transferem-se para um banho de água a 100°C durante pelo menos 20 minutos.

- **Clarificação amostra**

Após arrefecimento da amostra adiciona-se 1mL de cada um dos reagentes de clarificação, Carrez I e Carrez II. Perfaz-se o volume do balão com água ultra pura e deixa-se repousar a amostra durante pelo menos 30 minutos.

Com uma pipeta de Pasteur rejeitar os primeiros mililitros do sobrenadante e de seguida filtrar com um filtro de seringa (0,45 µm) diretamente para o vial.

Condições de operação

As condições cromatográficas de trabalho para a determinação de teobromina foram:

- Fluxo: 1,0 mL/min;
- Temperatura do forno: 40°C;
- Volume de injeção: 5,0 µL.
- Tempo de corrida: 5 minutos
- Detetor UV a 205 nm

Resultados e observações

Utilizando a metodologia sem a extração da gordura, a quantidade de teobromina nas amostras estudadas foi muito superior à quantificada no método com extração de gordura.

Tabela 4.2 Concentração de teobromina quantificada através da metodologia sem extração de gordura e com extração de gordura, em amostras com concentração conhecida.

	Concentração mg/100 g		
	Concentração referência	Metodologia sem extração gordura	Metodologia com extração gordura
Amostra 1	588,0	592,0±9,8	516,2±12,3
Amostra 2	608,0	623,0±12,3	524,1±15,8
			n=5

Tendo em conta os bons resultados obtidos e o facto do tempo de preparação ser bastante inferior à metodologia anterior, este foi o método escolhido para a implementação da metodologia no laboratório.

5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

5.1. INTRODUÇÃO

Após a seleção do método adequado e uma vez que o laboratório da SGS recebe todo o tipo de amostras, foi necessário realizar ensaios com diferentes amostras, de modo a obter uma curva de calibração abrangente a todo o tipo de produtos, permitindo assim a análise simultânea a amostras com diferentes percentagens de cacau, logo diferentes concentrações de teobromina (tabela 5.1).

Este estudo incidiu sobre cacau em pó, chocolate preto, chocolate em pó, chocolate de leite, biscoitos e bolos à base de chocolate, produtos com quantidades vestigiais de cacau (chocolate branco), leite achocolatado.

Após injeção de padrões e através da respetiva equação da reta $y = 38,168x + 112,8$ foi possível determinar as concentrações das mais variadas amostras (tabela 5.2).

Tabela 5.1 Sinal cromatográfico referente à concentração dos padrões

Concentração (x) (mg/L)	Sinal (y)
25,1	1039,4
50,1	1997,8
100,2	3972,5
200,4	7845,6
300,6	11525,6

Como se pode verificar na tabela 5.2, a amostra com uma concentração menor de teobromina é o leite achocolatado com 18,1 mg/100 mL e o cacau em pó é a amostra com uma concentração mais elevada, contendo 892,2 mg/100 g. Como a discrepância de concentrações é muito grande foi necessário efetuar um estudo utilizando diferentes tomas de cada amostra com o objetivo de encontrar a toma correta de modo a que as áreas correspondentes a cada amostra se encontrassem, entre a área do padrão mais baixo e a do padrão mais alto.

Tabela 5.2 Concentração de teobromina em diferentes produtos à base de cacau

Amostra	Toma	Área	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/kg)	Concentração (mg/100 g)
Leite Chocolate	15 mL	2233,6	54,4	181,3	18,1
Biscoitos	5,0 g	1752,3	41,6	415,5	41,6
Chocolate Leite (20 - 40 % cacau)	3,0 g	2975,5	74,1	1236,0	123,6
Chocolate preto (70% cacau)	1,0 g	4552,2	116,1	5807,4	580,7
Cacau pó	0,5 g	6890,0	178,4	8921,6	892,2
Bombons	3,0 g	7603,1	197,4	3290,5	329,1
Chocolate em pó (> 50% cacau)	1,0 g	4240,2	107,8	5391,7	539,2

Posteriormente seguiu-se a validação do método que tem como objetivo evidenciar que o método permite obter resultados com qualidade adequada aos fins pretendidos.

A amostra utilizada na validação foi o chocolate em pó, com 35% de teor em cacau.

5.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para a construção de uma curva de calibração para a substância a analisar preparou-se uma solução padrão mãe com concentração de 500 mg/L, da qual se diluiu, posteriormente, obtendo-se padrões com concentração de 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L e 300 mg/L. De forma a facilitar a escrita e a compreensão dos resultados, às diluições anteriores, passa-se a designar por padrão 1, padrão 2, padrão 3, padrão 4 e padrão 5, respetivamente.

Na figura seguinte consta um cromatograma obtido para a solução padrão 4 (200 mg/L), onde se evidencia o sinal cromatográfico relativo ao composto em estudo, assim como o respetivo tempo de retenção.

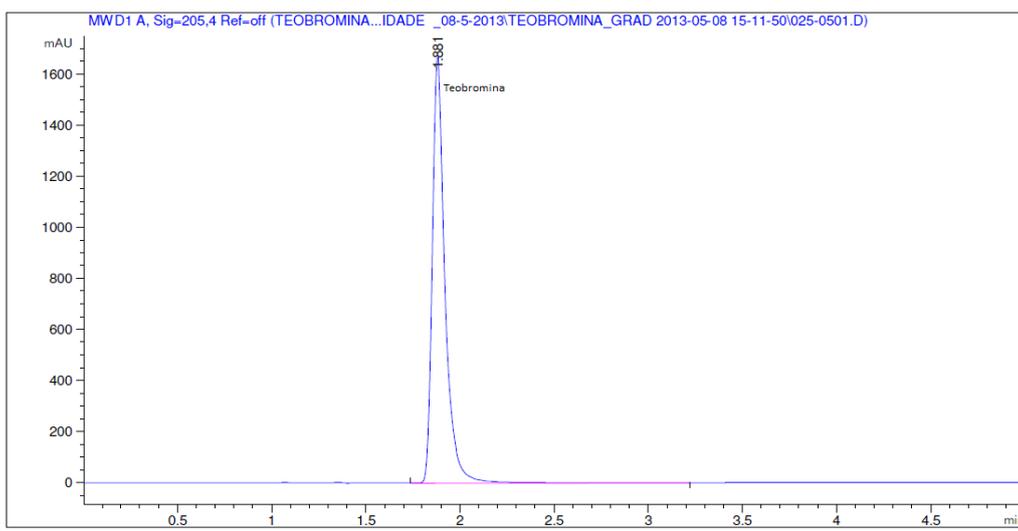


Figura 5.1 Cromatograma correspondente à solução padrão 200 mg/L

Na tabela seguinte encontram-se registados os valores obtidos para cada padrão, bem como a respetiva área do pico cromatográfico.

Tabela 5.3 Sinal cromatográfico referente à concentração dos padrões

Concentração (x) (mg/L)	Sinal (y)
25,1	1039,4
50,1	1997,8
100,2	3972,5
200,4	7845,6
300,6	11525,6

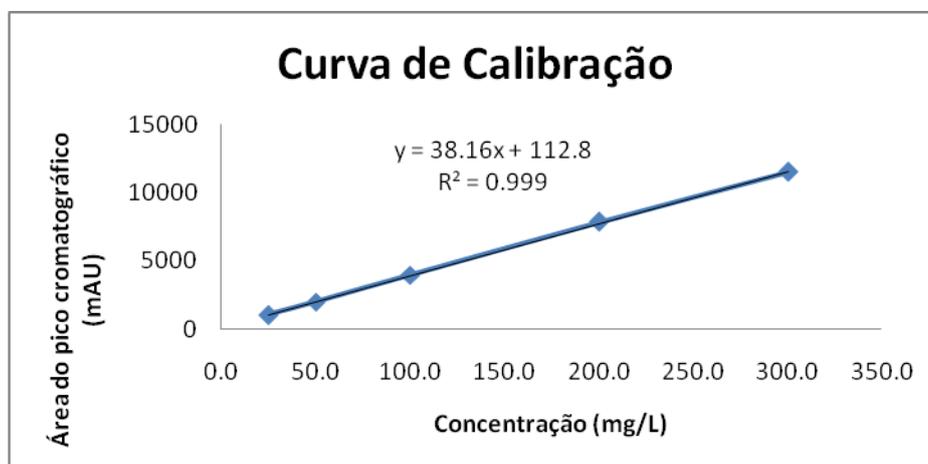


Figura 5.2 Representação gráfica referente à curva de calibração de teobromina com padrões entre os 25,0 mg/L e 300,0 mg/L

O modelo de regressão linear é aceite quando o coeficiente de correlação linear é superior a 0,995. Na figura 5.1. é possível verificar que a equação que melhor se ajusta aos pontos experimentais é $y=38,168x + 112,8$, possuindo um coeficiente de correlação linear de 0,9998. Portanto este modelo de regressão linear é válido.

5.2.1. Gama de trabalho

Segundo o Guia Relacre quando uma metodologia envolve o traçado da curva de calibração a gama de trabalho deve ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias. Para tal são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações (Relacre, 2000).

Para a validação da gama de trabalho do método em estudo foram selecionados cinco padrões. Estes não se encontram distribuídos uniformemente, contudo foram admitidos para a avaliação deste critério, tendo em conta que após a realização de diversas curvas de calibração com os mesmos padrões verificou-se que a irregularidade nos intervalos entre concentrações não é significativa.

Para efetuar o teste estatístico, foram preparadas soluções padrão e dez réplicas independentes, do primeiro e do último padrão de calibração, a partir das quais se calcularam as respetivas variâncias, de modo a determinar o valor experimental (PG). Pois este teste tem como base a distribuição unilateral F de Fisher, onde o valor experimental (PG) obtido é comparado com um valor crítico tabelado a 99% de confiança (F).

Como hipóteses de trabalho assume-se que a hipótese nula (H0) indica que a diferença que existe entre as variâncias não tem significado estatístico. Por sua vez, a hipótese alternativa (H1) indica que as variâncias são estatisticamente diferentes.

Pela análise da tabela 5.4, e considerando 5,35 o valor crítico calculado a um nível de confiança de 99% para n-1 graus de liberdade (N-1=9), é possível verificar que, o valor experimental (PG) é inferior ao valor crítico, **PG<5,35**. Como tal, a este nível de confiança, a hipótese nula é aceite, ou seja, verifica-se homogeneidade da variância nos resultados obtidos para a curva de calibração.

A gama de trabalho linear fica estabelecida com uma faixa de concentrações de 25,0 a 300,0 mg/L.

Tabela 5.4 Área dos picos cromatográficos referentes ao padrão 25,0 mg/L e 300,0 mg/L

	Área picos cromatográficos	
	Padrão 1 (25,0 mg/L)	Padrão 5 (300,0 mg/L)
N=10	1018,8	11337,8
	1000,2	11298,2
	1035,1	11339,1
	1001,7	11339,7
	1030,2	11346,3
	1043,3	11343,8
	1003,7	11307,5
	1025,4	11303,3
	1003,2	11354,6
	1002,7	11310,5
Média	1016,4	11328,1
Desvio Padrão	16,2	20,7
Variância	262,4	428,5
PG (S^2_{300}/S^2_{25})	1,63	
Valor tabelado da distribuição F de Snedecor/ Fisher ($\alpha=1\%$, $n-1=9$)	5,35	

5.2.2. Linearidade

Através do estudo da reta de calibração sabe-se que o coeficiente de correlação é aceitável, contudo não comprova a linearidade da reta. Usualmente o estudo da linearidade da curva de calibração em cromatografia é realizado de acordo com o teste RIKILT. Este permite avaliar a linearidade através do estudo dos resíduos.

Na aplicação deste teste utilizaram-se as concentrações dos cinco padrões utilizados na curva de calibração e as respetivas respostas instrumentais.

Tabela 5.5 Cálculo dos resíduos para o estudo da linearidade

n	X_i	Y_i	$(y_i/x_i)/(y_i/x_i)_m$ (%)
1	25,1	1039,4	104
2	50,1	1997,8	100
3	100,2	3972,5	100
4	200,4	7845,6	99
5	300,6	11525,6	97

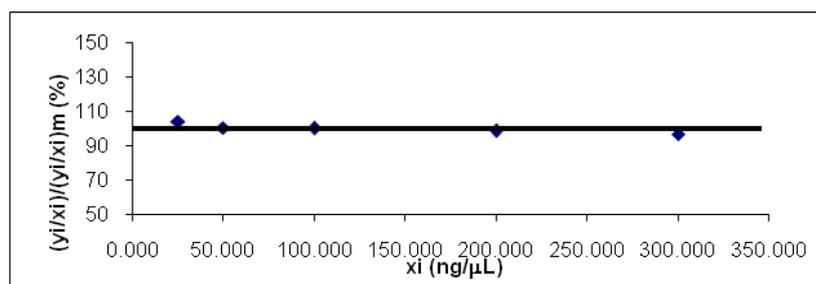


Figura 5.3 Teste de RIKILT para avaliar a linearidade do método

A condição de linearidade deste método observa-se caso os valores do teste de RIKILT se situem entre os 90% e os 110%. Através do gráfico verifica-se então a linearidade do método, sendo a função de calibração linear.

5.3. Limiares analíticos

Os limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) são parâmetros importantes pois, indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar, respetivamente, a substância em análise.

Como dito anteriormente, quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear os limites de deteção e quantificação são calculados através do declive da reta e do desvio padrão residual de acordo com as equações no capítulo referente à validação de métodos analíticos.

Na Tabela 5.6. encontram-se os limites de deteção e de quantificação teóricos obtidos para o método, calculados através de parâmetros da recta de regressão lineares $y = 38,168x + 112,8$.

Tabela 5.6 Valor dos limiares analíticos calculados para a determinação de teobromina

Declive reta B	Desvio padrão residual $S_{y/x}$	Limite deteção L.D.	Limite quantificação L.Q.
38,168	93,81	8,07 mg/L	24,46 mg/L

5.4. Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia

5.4.1. Repetibilidade

O ensaio de repetibilidade consiste em repetir o mesmo ensaio, sobre a mesma amostra, pelo mesmo analista, mesmo equipamento e mesmos reagentes, em curtos intervalos de tempo. Para se determinar a repetibilidade do método efetuaram-se 10 repetições do ensaio para a amostra de chocolate em pó nas condições anteriormente descritas.

O método considera-se preciso em termos de repetibilidade se o coeficiente de variação for inferior a 1,0% (Shabir, 2004).

Tabela 5.7. Área dos picos cromatográficos e respetiva concentração obtidos no chocolate em pó para o estudo da repetibilidade em termos de CV (%)

Amostra	Área	Concentração (mg/Kg)
Chocolate em pó	4198,3	5374,2
	4236,7	5421,0
	4192,6	5364,1
	4197,6	5372,8
	4240,2	5430,5
	4205,2	5385,9
	4229,0	5405,1
	4257,0	5404,8
	4247,4	5420,9
	4256,6	5446,9
Desvio padrão	25,4	27,6
Média	4226,1	5402,6
N	10	
Repetibilidade	71,1	77,4
Repetibilidade %	1,7	1,4
CV (%)	0,60	0,51

Como se pode verificar pela tabela anterior, relativamente ao sinal instrumental, a repetibilidade é de 1,7%, valor relativo, e o coeficiente de variação 0,60%. Quanto à concentração a repetibilidade é de 1,4% e o coeficiente de variação 0,51%.

Pela análise dos coeficientes de variação pode-se considerar o método validado em termos de repetibilidade uma vez que os valores obtidos para o coeficiente de variação são inferiores a 1,0%.

5.4.2. Precisão intermédia

Para a determinação da precisão intermédia efetuaram-se 10 ensaios no mesmo dia em condições de repetibilidade, da amostra chocolate em pó, mas de embalagens diferentes do mesmo lote. Na semana seguinte repetiu-se o ensaio com o mesmo analista, utilizando 5 das embalagens utilizadas anteriormente.

Tabela 5.8. Área dos picos cromatográficos e respetiva concentração obtidos no chocolate em pó para o estudo da precisão intermédia em termos de CV (%)

Data	Amostra	Área	Concentração (mg/L)
15-5-2013	1	4708,4	129,2
	2	4379,9	119,7
	3	4373,0	119,5
	4	4242,5	115,8
	5	4253,5	116,1
	6	4251,4	116,0
	7	4286,0	117,0
	8	4240,7	115,7
	9	4155,2	113,3
	10	4536,7	124,3
21-5-2013	1	4485,5	116,4
	2	4345,7	112,7
	3	4194,5	108,7
	4	4489,6	116,5
	5	4156,6	107,7
	Média	4339,9	116,6
	Desvio Padrão	157,5	5,4
	CV (%)	3,6	4,6

No cálculo da precisão intermédia pode-se concluir que os coeficientes de variação para a amostra em análise apresentam valores aceitáveis (tabela 5.8), uma vez que segundo a norma o coeficiente de variação não deve exceder os 5,0%. Considerando assim o método validade para a precisão intermédia.

5.5. Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método procedeu-se à preparação de 20 amostras de chocolate branco, cuja concentração de teobromina foi 0 mg/L, 10 fortificadas com o padrão mais baixo e 10 com o padrão mais alto, ou seja 25,0 mg/L e 300,0 mg/L respetivamente.

Posteriormente compararam-se os valores obtidos com o padrão de referência, na mesma gama de concentrações.

O valor da recuperação da amostra é dado através da seguinte expressão:

$$\%recuperação = \frac{C_R - C_A}{C_P} \times 100$$

Considerando,

C_R – Concentração de analito na amostra fortificada

C_A – Concentração de analito na amostra não fortificada

C_P – Concentração do padrão utilizado para fortificar a amostra

Com base nos resultados obtidos na Tabela 5.9 e 5.10, pode-se afirmar que a recuperação não é afetada na gama de concentrações estudada, obtendo-se valores de recuperação entre 96% e 99%, com um coeficientes de variação entre 0,8% e 1,4%.

Sendo assim possível afirmar que a matriz não afeta a determinação de teobromina.

Tabela 5.9 Valores de recuperação obtidos para a fortificação de chocolate branco com o padrão 25 mg/L

Amostra	Concentração obtida mg/L	Concentração teórica mg/L	% Recuperação
1	24,1	25,1	96,1
2	25,0		99,5
3	24,4		97,2
4	24,1		96,1
5	24,8		98,7
6	24,9		99,2
7	24,3		96,8
8	24,6		98,1
9	24,9		99,4
10	24,8		98,9
	Média		98,0
	Desvio Padrão		1,4
	CV (%)		1,4

Tabela 5.10 Valores de recuperação obtidos para a fortificação de chocolate branco com o padrão 300 mg/L

Amostra	Concentração obtida mg/L	Concentração teórica mg/L	%Recuperação
1	290,2	300,6	96,5
2	289,3		96,2
3	296,8		98,7
4	290,4		96,6
5	290,8		96,7
6	288,5		96,0
7	290,4		96,6
8	288,3		95,9
9	290,2		96,5
10	291,1		96,8
	Média		96,7
	Desvio Padrão		0,8
CV (%)			0,8

6. CONCLUSÃO

Concluindo, verifica-se que a elaboração deste trabalho acerca da validação e implementação de um método para a determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados é importante devido às recentes descobertas acerca dos efeitos benéficos para a saúde provocados por esta metilxantina.

A inexistência de uma norma internacional referente a este método requer estudos prévios à sua implementação e validação, num laboratório de análises, de modo, a optar-se por um método simples e fiável para ser utilizado como método para análises de rotina de um grande número de amostras.

Após o estabelecimento do método adequado procedeu-se à sua validação, verificando-se que, a concentração de padrões conhecidos correlaciona-se linearmente com a resposta das respetivas áreas do pico cromatográfico, dada a proximidade do coeficiente de correlação à unidade.

A linearidade foi verificada entre as concentrações de 25,0 mg/L e 300,0 mg/L sendo que, qualquer valor fora desta gama trata-se de extrapolação. De modo a evitar incertezas associadas aquando a utilização de concentrações fora da gama linear, deve-se, nesses casos, proceder à diluição da amostra para concentrações superiores a 300,0 mg/L, e caso a concentração for inferior a 25,0 mg/L deve pesar-se uma quantidade maior de amostra na preparação da mesma. O método possui um limite de deteção de 8,1 mg/L e um limite de quantificação de 24,5 mg/L.

Em termos de repetibilidade, a metodologia encontra-se validada uma vez que o coeficiente de variação foi inferior a 1,0%. Tendo em conta este estudo de repetibilidade efectuado, também se determinou o limite de repetibilidade deste método 77,4 mg/kg, ou seja, esta é a diferença máxima entre dois duplicados em condições de repetibilidade, garantido assim que o método se encontra validado.

Numa análise de precisão intermédia, apenas se fez variar o dia em que se realizaram as análises, verificando-se um desvio padrão de precisão intermédia de 5,4 mg/L, este valor é aceite para a variabilidade dos resultados deste método, uma vez que o coeficiente de variação foi inferior a 5,0%.

Para a avaliação da exatidão do método, recorreu-se à realização de ensaios de recuperação com uma amostra de chocolate branco, tendo se fortificado a amostra com o padrão mais baixo e o padrão mais alto. Uma vez que internamente o critério de aceitação é entre 90% e 110% de recuperação, confirmou-se assim a exatidão do método.

Após o cumprimento de todos os requisitos de cada etapa da validação, o método considera-se validado. A importância da validação rege-se no facto desta ser fundamental para definir se os métodos desenvolvidos se adequam aos objetivos a que se destinam, a fim de obter dados confiáveis que possam ser satisfatoriamente analisados

Conclui-se, assim, que é indispensável que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos a fim de demonstrar, por meio de validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Neste caso específico, verifica-se que este método permite a obtenção de resultados confiáveis para a determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados.

O método analítico passou assim a fazer parte dos recursos do laboratório de química da empresa SGS.

7. BIBLIOGRAFIA

17025:2005, I.I. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

Afoakwa, E.O. (2010). Chocolate Science and Tecnology Singapore, Wiley Blackwell 275.27-33; 35-37; 64-66; 108-109

Richards, A., Wailes, B. (2011). "Measurement of theobromine content in cocoa for determining cocoa solids content in chocolate and chocolate products." from <http://randd.defra.gov.uk/default.aspx>.

Richards, A., Wailes, B. (2012). "Estimation of Fat-Free Cocoa Solids in Chocolate and Cocoa Products – Global Survey of Typical Concentrations of Theobromine and Caffeine Determined by HPLC." Journal of the Association of Public Analysts **40**: 01-12.

Beaudoin, M.S., Graham, T.E. (2011). "Methylxanthines and human health: epidemiological and experimental evidence." Handbook of Experimental Pharmacology **200**: 509-548.

Beckett, S.T. (2008). The science of chocolate. York, U.K. , The Royal Society of Chemistry.240.54-57; 59-68; 103; 133-144; 197-198

Beckett, S.T. (2009). Industrial chocolate manufacture and use. Oxford, Blackwell Publishers.732.135-137; 137-139; 170-172; 276-278; 331-336; 623- 625; 625-628

Brunetto, M.A.D.R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Galignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G.,Romero, C. (2007). "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 **100**(2): 459-467.

Caudle, A.G., Gu, Y., Bell, L.N. (2000). "Improved analysis of theobromine and caffeine in chocolate food products formulated with cocoa powder." Food Research International **34**: 599–603.

Causon, R. (1997). "Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion." Journal of Chromatography B **689**: 175-180.

Di Castelnuovo, A., Di Giuseppe, R., Lacoviello, L., De Gaetano, G. (2012). "Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease." European Journal of Internal Medicine **23**(1): 15-25.

Épshtein, N.A. (2004). "Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control." Pharmaceutical Chemistry Journal **38**(4): 212-228.

Eurachem (1998) "Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics."

Feinberg, M. (2007). "Validation of analytical methods based on accuracy profiles." Journal of Chromatography A **1158**(1-2): 174-183.

Fernández-Murga, L., Tarín, J.J., García-Perez, M.A., Cano, A. (2011). "The impact of chocolate on cardiovascular health." Maturitas **69**(4): 312-321.

Geraets, L., Moonen, H.J.J., Wouters, E.F.M., Bast, A., Hageman, G.J. (2006). "Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 at physiological concentrations." Biochemical Pharmacology **72**(7): 902-910.

Gratzfeld-Hüsgen, A., Schuster, R. (2001). HPLC for food analysis. Germany, Agilent Technologies. 60-84; 88-90. 146

Hammerstone, J.F., Romanczyk, L.J., Aitken, W.M. (1994). "Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*." Phytochem **35**: 1237-1240.

Hanai, T. (1999). HPLC A Practical Guide. United Kingdom Royal society of chemistry. 144. 65-90;

Huber, L. (2010). Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies. Germany.

INAB (2012). PS15 Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories Ireland. **3**: 1-36.

Jumnongpon, R., Chaiseri, S., Hongsprabhas, P., Healy, J.P., Meade, S.J., Gerrard, J.A. (2012). "Cocoa protein crosslinking using Maillard chemistry." Food Chemistry **134**(1): 375-380.

Khan, N., Monagas, M., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Lamuela-Raventós, R.M., Estruch, R. (2012). "Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease." Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases **22**(12): 1046-1053.

Kimura, I.D.A., Martins, M.S., Dias, N.A. (2004). Determinação de teobromina e cafeína em cacau e produtos de chocolate por cromatografia líquida de alta eficiência. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz 1004.180-190

Kunze, W.E. (1894). "The quantitative separation and estimation of the alkaloids of cocoa." The analyst **19**: 194-207.

Kupiec, T. (2004). "Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography." International Journal of Pharmaceutical Compounding **8**(3): 223-227.

Lippi, D. (2009). "Chocolate and medicine: Dangerous liaisons?" Nutrition **25**(11-12): 1100-1103.

Martin, M.A., Goya, L., Ramos, S. (2013). "Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer." Food and Chemical Toxicology **56**: 336-351.

Meyer, V.R. (2010). Practical High-Performance Liquid Chromatography. Switzerland, John Wiley and Sons.59-63; 91-107; 117-130; 173-190; 231-244; .428

Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002). "Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis." Pure and Applied Chemistry **74**: 835-855.

Mitchell, E.S., Slettenaar, M., vd Meer, N., Transler, C., Jans, L., Quadt, F.,Berry, M. (2011). "Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure." Physiology & Behavior **104**(5): 816-822.

Mumford, G.K., Evans, S.M., Kaminski, B.J., Sannerud, C.A., Silverman, K.,Griffiths, R.R. (1994). "Discriminative stimulus and subjective effects of theobromine and caffeine in humans." Psychopharmacology **115**: 1-8.

Naik, J.P. (2001). "Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**: 3579-3583.

Nollet, L.M.L. (2000). Food analysis by HPLC. New York, Marcel Dekker.1170.3-55

Paoletti, R., Poli, A., Conti, A.,Visioli, F. (2012). Chocolate and Health. Italy, Springer.153.1-13; 23-26; 42-60; 128

Relacre, G. (2000). Validação de Métodos internos de ensaio em análise química. Lisboa

Shabir, G.A. (2004). "A Practical Approach to Validation of HPLC Methods Under Current Good Manufacturing Practices." Journal of Validation Technology **10**(3): 210.

Silva, S.I.C.V. (2010). Limonina em citrinos: análise, bioconversão e bioactividade. Controlo de qualidade e toxicologia dos alimentos. Lisboa, Faculdade de F armacia - Universidade de Lisboa.

Smit, H.J., Gaffan, E.A., Rogers, P.J. (2004). "Methylxanthines are the psychopharmacologically active." Psychopharmacology **176**: 412-419.

Swadesh, J.K. (2001). HPLC Practical and Industrial Applications CRC Press LLC.142-170; 215-260; .480

Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004). "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance." TrAC Trends in Analytical Chemistry **23**(8): 535-552.

Watson, R.R., R.Preedy, V., Zibadi, S. (2013). Chocolate in Health and Nutrition, Springer.542.12-16; 20-23;40-45; 290-292

Weston, A., Brown, P.R. (1997). HPLC and CE Principles and practice. London, Academic Press.295.2-12; 24-56; 71-100