



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E**  
**CIÊNCIA DE ALIMENTOS**



Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DE CACAU PARA IDENTIFICAÇÃO**  
**DE ADULTERAÇÕES EM CHOCOLATES**

Itapetinga-BA

2020

**INGRID ALVES SANTOS**

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DE CACAU PARA IDENTIFICAÇÃO  
DE ADULTERAÇÕES EM CHOCOLATES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do programa para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Profa. Dr<sup>a</sup>. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Itapetinga-BA

2020

633.74 Santos, Ingrid Alves.  
S235d Determinação do teor de sólidos de cacau para identificação de adulterações em chocolates. / Ingrid Alves Santos. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2020.

69 fl.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof. D. Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e coorientação do Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

1. Chocolate – Adulteração – Sólidos de cacau. 2. **Theobroma cacao – Compostos bioativos – Quimiometria.** I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Ferrão Sibelli Passini Barbosa. III. Santos, Leandro Soares. IV. Título.

**CDD(21): 633.74**

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Chocolate : Adulteração
2. Sólidos de cacau
3. *Theobroma cacao*
4. Compostos bioativos : Quimiometria



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDESTE DA BAHIA

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB  
R. José Carlos de Almeida, s/n - Vitória da Conquista - BA - 45064-000  
FONE: (75) 3635-3000 FAX: (75) 3635-3001



UESB



Governo do  
Estado da Bahia

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DE CACAU PARA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM CHOCOLATES.

**Autor (a):** INGRID ALVES SANTOS

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sibelli Passini Barbosa Ferrão

**Coorientador (a):** Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de *MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS*, pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Marcelo Franco  
UESB

Prof. Dr. Ben-Hun Ramos Ferrera Gonçalves  
Membro Externo - UFSB

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sibelli Passini Barbosa Ferrão  
Orientadora - UESB  
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 20 de fevereiro de 2020.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus, a espiritualidade e aos meus mentores do plano de luz que me acompanham desde sempre e que me ajudaram a ter a coragem necessária para buscar e realizar meus sonhos, a ter forças para ultrapassar as barreiras do medo e a enxergar esperançosamente um futuro com mais luz e felicidade.*

*Aos meus amados pais, Aidê e Amilton por me ensinarem sobre respeito e solidariedade, pelo infinito amor, dedicação, persistência e confiança de todos os dias.*

*À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Sibelli Ferrão pela dedicação, educação, paciência, disponibilidade, atenção, incentivo e confiança em realizar este trabalho.*

*À Marina pela paciência, amor, ajuda e companheirismo durante essa jornada, pelo incentivo e por sempre olhar com maturidade e tranquilidade frente às adversidades.*

*Ao meu maravilhoso co-orientador Dr. Leandro Soares, Leozinho, pela amizade, por partilhar tanto conhecimento, por ser um exemplo de profissional desde a graduação, por ensinar com a paixão de quem ama o que faz. A você minha gratidão!*

*À Márjorie, Marília, Cristina, Annie e Marcinha pela ajuda, companheirismo e amizade durante essa jornada.*

*À Amandinha, Mariana e Heliara, pessoas maravilhosas que tive a oportunidade de conhecer graças ao mestrado e que carregarei eternamente em meu coração.*

*Aos meus colegas de laboratório, especialmente a Daniele que foi tão paciente, que não mediu esforços para ajudar no meu mestrado e se tornou uma amiga querida. Espero que Deus a retribua generosamente.*

*À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.*

*E a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.*

*Muito obrigada!*

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO**

1. Introdução.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	15
2.1 Chocolate: aspectos gerais.....	15
2.2 Beneficiamento das amêndoas e processo de produção do chocolate.....	16
2.3 Constituintes bioativos no chocolate: metilxantinas e compostos fenólicos.....	20
2.4 Adulterações em chocolates .....	22
2.5 Métodos convencionais .....	23
2.6 Espectroscopia no Infravermelho .....	24
2.6.1 Espectroscopia no infravermelho próximo .....	25
2.6.2 Espectroscopia no infravermelho médio com Transformada de Fourier.....	26
2.7 Análise Multivariada de dados .....	27
2.7.1 Análise de componentes principais .....	27
2.7.2 Regressão por mínimos quadrados parciais.....	28
2.7.3 Regressão linear múltipla .....	29
3. Referências .....	30

### **CAPÍTULO II: OBJETIVOS**

1.1 Objetivo geral .....	38
1.2 Objetivos específicos.....	38

### **CAPÍTULO III: APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NIR E MIR PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO DO TEOR DE CACAU EM CHOCOLATES**

Resumo .....	40
1. Introdução .....	41
2. Material e métodos .....	42
2.1 Produção dos chocolates.....	42
2.2 Obtenção das amostras comerciais .....	43
2.3 Aquisições dos espectros.....	44
2.3.1 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) .....	44

2.3.2 Espectroscopia no infravermelho médio (MIR) .....	44
2.4 Análises estatísticas .....	44
2.4.1 Pré-processamentos dos dados espectroscópicos.....	44
2.4.2 Análise de componentes principais (ACP) .....	45
2.4.3 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) .....	45
3. Resultados e discussão.....	46
3.1 Características dos espectros obtidos por NIR e MIR .....	46
3.2 Análise de componentes principais (ACP).....	48
3.3 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....	51
4. Conclusão .....	53
Referências .....	53

## **CAPÍTULO IV: PREDIÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DE CACAU EM CHOCOLATES UTILIZANDO COMPOSTOS BIOATIVOS E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ASSOCIADOS À ANÁLISE MULTIVARIADA**

Resumo.....	57
1. Introdução .....	58
2. Material e métodos .....	59
2.1 Produção dos chocolates.....	59
2.2 Obtenção das amostras comerciais .....	60
2.3 Determinação de Constituintes Fenólicos Totais (CFT).....	60
2.4 Determinação da capacidade antioxidante - Método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	61
2.5 Quantificação de Teobromina, Cafeína, Epicatequina e Catequina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	61
2.6 Planejamento experimental.....	62
2.7 Análises Multivariadas .....	62
2.7.1 Análise de Componentes Principais (ACP) .....	62
2.7.2 Regressão Linear Múltipla (RLM) .....	62
3. Resultados e Discussão.....	63
3.1 Teor de compostos fenólicos totais, metilxantinas, fenólicos e capacidade antioxidante das amostras produzidas .....	63

3.2 Análise de Componentes Principais (ACP).....	65
3.3 Regressão Linear Múltipla (PLS) .....	67
4. Conclusão .....	69
Referências .....	69



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III: APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NIR E MIR PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO DO TEOR DE CACAU EM CHOCOLATES

**Tabela 1**- Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos chocolates. .... 69

### CAPÍTULO IV: PREDIÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DE CACAU EM CHOCOLATES UTILIZANDO COMPOSTOS BIOATIVOS E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ASSOCIADOS À ANÁLISE MULTIVARIADA

**Tabela 1**- Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos chocolates. ....59

**Tabela 2** - Compostos fenólicos totais, metilxantinas, fenólicos e capacidade antioxidante dos chocolates produzidos (valores mínimos, valores máximos, equações de regressão ajustadas e coeficientes de determinação ( $R^2$ ))...... 63

**Tabela 3** - Correlação das variáveis: compostos fenólicos totais, teobromina, cafeína, epicatequina e catequina com a capacidade antioxidante para os chocolates comerciais e produzidos. .... 65

**Tabela 4** - Ajuste dos modelos preditivos de RLM para o teor de sólidos de cacau. ....67

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1</b> – Estágios da conchagem na produção de chocolate .....	18
<b>Figura 2</b> – Curva de temperagem do chocolate .....	19
<b>Figura 3</b> – Etapas de fabricação do chocolate .....	20

### CAPÍTULO III: APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NIR E MIR COMO FERRAMENTA PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO DO TEOR DE CACAU EM CHOCOLATES

<b>Figura 1</b> – Espectro dos chocolates produzidos obtidos por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR).....	47
<b>Figura 2</b> – Espectro dos chocolates produzidos obtidos por Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR) - (a) espectro completo; (b) Ampliação da região 3600-2800 $\text{cm}^{-1}$ ; (c) Ampliação da região 1000-500 $\text{cm}^{-1}$ . .....	47
<b>Figura 3</b> – Gráfico de dispersão das amostras de chocolate para a ACP (a) NIR para chocolates produzidos (b) MIR para chocolates produzidos (c) NIR dos chocolates comerciais (d) MIR para chocolates comerciais.....	50
<b>Figura 4</b> – Gráfico de correlação para os valores reais e preditos pelo modelo PLS utilizando dados no (a) NIR para as amostras produzidas b) MIR para as amostras produzidas (c) NIR para chocolates comerciais (d) MIR para chocolates comerciais.....	52

### CAPÍTULO IV: PREDIÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DE CACAU EM CHOCOLATES UTILIZANDO COMPOSTOS BIOATIVOS E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ASSOCIADOS À ANÁLISE MULTIVARIADA

<b>Figura 1</b> – Gráfico de dispersão das amostras de chocolate para a ACP dos (a) chocolates produzidos (b) chocolates comerciais.....	66
<b>Figura 2</b> – Gráfico de correlação para os valores reais e preditos pelo modelo RLM (a) para chocolates produzidos (b) para chocolates comerciais.....	69

## RESUMO

SANTOS, I.A. **DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DE CACAU PARA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM CHOCOLATES**. Itapetinga-BA: UESB, 2020. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).\*

A concentração de sólidos de cacau presente em chocolates tem ganhado destaque no comércio atual e a informação referente ao teor desses constituintes tem sido alvo de adulterações por proporcionarem recompensas financeiras. Objetivou-se avaliar a utilização de métodos químicos e da espectroscopia no infravermelho associados à análise multivariada para determinar o conteúdo de sólidos de cacau em chocolates. Para controle, foram produzidas 5 formulações com diferentes concentrações de sólidos de cacau (30%, 45%, 60%, 75% e 90%) e adquiridas amostras comerciais com variadas concentrações de sólidos de cacau. Os chocolates produzidos e comerciais foram avaliados em relação aos compostos fenólicos totais, metilxantinas (teobromina e cafeína), fenólicos ((+)-catequina e (-)-epicatequina), capacidade antioxidante e por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) e Médio (MIR). Os dados espectroscópicos, assim como os referentes aos compostos bioativos e a capacidade antioxidante foram submetidos a técnicas multivariadas para a separação de grupos característicos e predição das quantidades de sólidos de cacau. Foram gerados gráficos de dispersão, modelos matemáticos de regressão linear múltipla e regressão por mínimos quadrados parciais que foram capazes de promover a separação das amostras em grupos característicos e quantificar a concentração de sólidos de cacau. Os resultados evidenciaram amostras comerciais cuja concentração de sólidos de cacau não condizem com a informada no rótulo do produto. Estes resultados apontam a eficácia das técnicas utilizadas para averiguar a veracidade das informações presentes nos rótulos dos chocolates com relação ao teor de sólido de cacau.

**Palavras-chave:** CLAE; compostos bioativos; FTIR; quimiometria; *Theobroma cacao*.

---

\* Orientadora: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, Dr<sup>a</sup>., UESB. Co-orientador: Leandro Soares Santos, Dr., UESB.

## ABSTRACT

SANTOS, I.A. **DETERMINATION OF THE COCOA SOLIDS CONTENT IN CHOCOLATES**. Itapetinga-BA: UESB, 2020. 71 p. Dissertation (Master in Engineering and Food Science, Area of Concentration in Food Science).\*

The concentration of cocoa solids present in chocolates has gained prominence in the current trade and the information regarding the content of these constituents has been subject to adulterations for providing financial rewards. The objective was to evaluate the use of chemical methods and infrared spectroscopy associated with multivariate analysis to determine the content of cocoa solids in chocolates. For control, 5 formulations were produced with different concentrations of cocoa solids (30%, 45%, 60%, 75% and 90%) and commercial samples with varying concentrations of cocoa solids were purchased. The produced and commercial chocolates were evaluated for total phenolic compounds, methylxanthines (theobromine and caffeine), phenolic ((+) - catechin and (-) - epicatechin), antioxidant capacity and by Near Infrared (NIR) and Medium (MIR). The spectroscopic data, as well as those related to the bioactive compounds and the antioxidant capacity were submitted to multivariate techniques for the separation of characteristic groups and prediction of the quantities of cocoa solids. Scatter plots, mathematical models of multiple linear regression and partial least squares regression were generated, which were able to separate samples into characteristic groups and quantify the concentration of cocoa solids. The results showed commercial samples whose concentration of cocoa solids does not match that reported on the product label. These results indicate the effectiveness of the techniques used to verify the veracity of the information present on the chocolate labels in relation to the cocoa solid content.

**Key-words:** HPLC; bioactive compounds; FTIR; chemometry; *Theobroma cacao*.

---

\* Advisor (a): Sibelli Passini Barbosa Ferrão, Dr<sup>a</sup>., UESB. Co-advisor: Leandro Soares Santos, Dr., UESB.

# Capítulo I

---

## Referencial Teórico

---

## 1. Introdução

O chocolate é um produto fabricado a partir do cacau (*Theobroma cacao* L.) que se tornou um dos alimentos mais consumidos em todo mundo. Ao ser ingerido o chocolate tem a capacidade de ativar neurotransmissores que promovem quase imediatamente uma sensação de bem-estar. Além disso, os chocolates com elevado teor de sólidos de cacau tem ganhado destaque em razão dos altos níveis de compostos bioativos provenientes das amêndoas do cacau (EFRAIM et al., 2011; TAN et al., 2019).

As metilxantinas e os compostos fenólicos são os principais compostos bioativos presentes no cacau e em seus produtos derivados. A teobromina e a cafeína são as metilxantinas que estão em maior proporção no chocolate e são responsáveis pelo efeito estimulante do sistema nervoso central, que aumenta a função cognitiva e a atenção. A (+)-catequina e a (-)-epicatequina são os principais compostos fenólicos presentes nos produtos derivados do cacau e também estão relacionados a diversos efeitos fisiológicos benéficos à saúde. Estes atuam como antioxidantes naturais ajudando a reduzir o risco de desenvolvimento de várias doenças crônicas (ALANÓN et al., 2016; BATISTA et al., 2016; QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2018).

Atualmente existem diversos tipos de chocolate disponíveis para consumo e uma tendência para produção com elevados teores de cacau. A concentração de sólidos de cacau presente nesses produtos tem ganhado destaque nos rótulos e se tornou alvo de questionamentos acerca da sua veracidade uma vez que quanto maior o teor de cacau mais oneroso o chocolate se torna. Com isso, a comercialização de um chocolate com menores concentrações de cacau do que o informado conferiria lucros ao produtor. A determinação dos sólidos de cacau pode ser realizada por meio do monitoramento dos bioativos através de técnicas cromatográficas (ACIERNO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018; TAN et al., 2019).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica analítica mais amplamente empregada tanto para determinação de metilxantinas quanto para determinação de flavonoides, uma vez que permite a separação e quantificação simultânea, com elevada precisão e sensibilidade. Além da cromatografia, outras técnicas têm sido utilizadas para o monitoramento de matrizes alimentares, dentre estas, a espectroscopia no infravermelho vem ganhando destaque (NASCIMENTO et al., 2016).

A espectroscopia no infravermelho fornece uma grande quantidade de informações referentes à vibração de grupos funcionais que constituem a estrutura química do produto a ser analisado. Associada a análise multivariada vem sendo amplamente utilizada como uma alternativa rápida e eficiente em análises de adulteração em produtos de diversos seguimentos.

Esta técnica dispensa o uso de reagentes químicos e evita a geração de resíduos danosos ao meio ambiente, além dos equipamentos serem relativamente fáceis de manusear (PAVIA et al., 2010; LOHUMI et al., 2015). A utilização da espectroscopia no infravermelho para determinar de forma rápida o teor de sólidos de cacau em chocolates seria uma alternativa viável.

Posto isso, essa dissertação visa estudar a determinação dos sólidos de cacau em chocolates e para isso foi dividida em quatro capítulos, sendo que neste primeiro é apresentado o referencial teórico utilizado como base para a execução do estudo. No segundo capítulo são apresentados os objetivos norteadores da presente pesquisa, no terceiro é avaliada a eficácia da utilização da espectroscopia no infravermelho associada à análise multivariada para determinar de forma rápida a concentração de sólidos de cacau em chocolates. Por fim, o quarto capítulo é dedicado à utilização de técnicas convencionais que determinam os compostos bioativos presentes nos chocolates associadas à análise multivariada para a predição dos sólidos de cacau.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Chocolate: aspectos gerais

O cacauzeiro é uma planta originária das cabeceiras do rio Amazonas, tendo se expandido para Guianas, América Central e sul do México, dado às características de solo e o clima tropical. Esta planta era cultivada pelos astecas e maias que além de consumirem os frutos, preparavam uma bebida amarga chamada “Chocolatl” feita com uma mistura de sementes torradas e trituradas com água, milho e especiarias. Os astecas e maias acreditavam na origem divina do cacauzeiro e as sementes de cacau eram tão valiosas que foram utilizadas como moeda de troca, a bebida feita do fruto só podia ser consumida em taças de ouro, além do cultivo ser acompanhado de cerimônias religiosas. Em homenagem a estas crenças, o botânico sueco Linnaeus chamou o cacauzeiro de *Theobroma cacao* do grego *Theos*=Deus e *broma*=alimento (ADEYEYE et al., 2010; AFOAKWA, 2016).

O chocolate como conhecemos atualmente originou-se com o “Chocolatl” e foi modificado e adaptado ao gosto europeu. Segundo Herme (2006), na época das grandes navegações marítimas, século XVI, Cristóvão Colombo levou pela primeira vez as sementes para a Europa, e a elas não foi dada nenhuma importância. Alguns anos depois, Hernando Cortez, em suas conquistas pelo México, descobriu uma bebida feita a base de cacau e a levou ao velho continente. Esta era considerada muito gordurosa, amarga e fria.

Em 1828, o químico holandês Conrad Van Houtten inventou a prensa de cacau na Holanda, o que possibilitou a remoção de parte da gordura de cacau a partir das amêndoas

para a obtenção de um pó com cerca de 23% de gordura. A extração da gordura do cacau, denominada manteiga de cacau, tornou possível a produção de um chocolate líquido, comercialmente mais versátil que poderia ser moldado e também utilizado para cobrir outros produtos de confeitaria. Daniel Peters em 1876, na Suíça, foi o responsável pela invenção do chocolate ao leite em que o cacau moído (nibs de cacau) foi processado com sólidos de açúcar e leite, e o resultado foi um produto largamente produzido e consumido (MEURSING, 2009; MINIFIE, 2012; SOUZA e BLOCK, 2018).

Atualmente, compreende-se como chocolate uma suspensão de partículas sólidas (açúcar, sólidos de cacau e sólidos de leite) em uma fase gordurosa contínua, cuja contribuição é essencial não apenas para promover a forma do produto, mas também contribui com aroma, sabor e cor. O mesmo deve manter-se sólido à temperatura ambiente e derreter rapidamente em temperatura próxima a do corpo humano, caso contrário, poderá promover um baixo desprendimento de aroma e/ou sabor que são desejáveis ao consumidor (LEITE et al., 2013; AFOAKWA et al., 2016).

O *Códex Alimentarius* (1981) define chocolate como um produto homogêneo obtido da mistura de um ou mais dos seguintes componentes: nibs de cacau, massa de cacau, torta de cacau, cacau em pó, com ou sem adição de manteiga de cacau e ingredientes opcionais permitidos e/ou agentes aromatizantes. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005) define por chocolate o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao L.*), massa de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo no mínimo 25% (g.100<sup>-1</sup> g) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados.

De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados, a produção de chocolate está em constante crescimento no Brasil desde 2017 onde foram produzidos 630 mil toneladas (ABICAB, 2020). Para a produção de chocolate são necessárias etapas que iniciam desde a colheita do cacau que deve conter quantidades suficientes de açúcar e outros substratos em quantidades adequadas para uma boa fermentação. As etapas de fermentação e secagem das sementes de cacau, torração das amêndoas e conchagem do chocolate são de grande importância no processamento, pois possuem influência direta na composição e formação do sabor característico do produto final (EFRAIM et al., 2010; SOUZA e BLOCK, 2018).

## **2.2 Beneficiamento das amêndoas e processo de produção do chocolate**

Os primeiros estágios da produção tradicional de chocolate iniciam com o beneficiamento das amêndoas de cacau, que compreende inicialmente os processos de



fermentação e secagem. A fermentação é essencial para obtenção de produtos de boa qualidade, pois durante este processo ocorrem reações bioquímicas complexas que produzem etanol, ácido acético e ácido láctico resultando na criação de um ambiente adequado para o desenvolvimento dos compostos precursores do sabor característico do chocolate (CRUZ et al., 2013). O tempo necessário para esta etapa é variável, pois depende de vários fatores, como o tipo de cacau, as condições climáticas, a quantidade de matéria-prima a ser fermentada, entre outros aspectos. Durante esse processo, os compostos fenólicos entram em contato com enzimas como a polifenoloxidase e glicosidases presentes nas sementes, sofrendo reações de oxidação, complexações com proteínas, formação de compostos denominados quinonas, que por sua vez sofrem condensação covalente com os grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras. Dessa forma, durante essa etapa, o teor de compostos fenólicos totais diminui cerca de 70%, e o teor de epicatequina, composto fenólico do grupo dos flavanóis, diminui cerca de 90% (EFRAIM et al., 2010; KONGOR et al., 2016).

A secagem tem como principal objetivo interromper a fermentação e reduzir a umidade das amêndoas de cacau, tornando-as mais estáveis ao armazenamento. Muitas das reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam durante a secagem, permitindo a redução do amargor, da adstringência e da acidez das amêndoas, além do escurecimento dos cotilédones, contribuindo com a formação dos precursores de sabor desejáveis de chocolate (BECKETT, 2009; EFRAIM et al., 2010).

Após a fermentação e secagem, os próximos passos são torra e moagem. Durante a torrefação das amêndoas de cacau, o sabor típico de torrado e de chocolate são desenvolvidos e através das reações de Maillard e degradação de Strecker, os compostos voláteis indesejáveis (ácido acético) são eliminados, e o teor de água é reduzido para a faixa de 1 a 2%. As temperaturas de torrefação variam de 95 a 145°C, dependendo do processo, equipamento e ainda o produto final desejado (ŻYŻELEWICZ et al., 2016; ZZAMAN et al., 2016).

Ao final da torrefação, obtém-se o nibs de cacau e iniciam-se as etapas de processamento do chocolate propriamente dito, as quais envolvem processos físicos e químicos complexos, que determinam as características de reologia, o desenvolvimento do sabor e finalmente as propriedades de fusão e percepções sensoriais (AFOAKWA, 2016). As operações básicas de fabricação do chocolate incluem: mistura, refino, conchagem e temperagem (HINNEH et al., 2019).

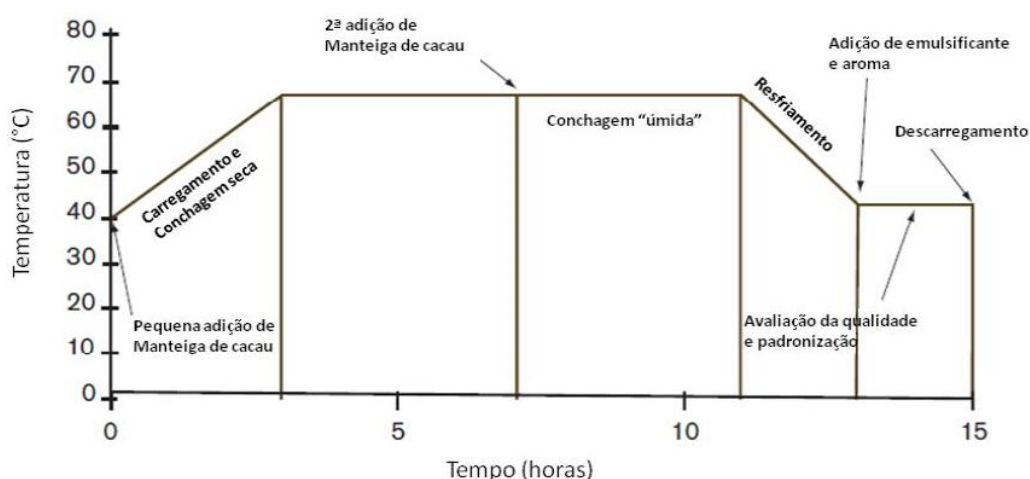
A mistura consiste em homogeneizar os ingredientes do chocolate nas proporções definidas na formulação, até a obtenção de uma massa homogênea e plástica para o refino. A mistura é comumente realizada em misturadores encamisados, que mantêm a temperatura

entre 55 e 60°C, o que contribui para conferir plasticidade à massa para que a mesma possa ser trabalhada nas próximas etapas (VARZAKAS e TZIA, 2015).

O refino promove a redução do tamanho das partículas dos ingredientes tornando o produto final macio e sem arenosidade. Para tal, o tamanho das partículas da massa refinada não deve ser superior a 25 µm (SOUZA, 2017). A conchagem é comumente dividida em três etapas (Figura 1), sendo esta de fundamental importância para o desenvolvimento do sabor característico do chocolate.

Na primeira etapa ocorre a conchagem seca cuja finalidade é reduzir a umidade que os ingredientes possuem e volatilizar os ácidos orgânicos provenientes das amêndoas torradas do cacau. Através do cisalhamento a temperatura aumenta e a mistura entra na segunda etapa da conchagem, onde a massa se torna pastosa. A temperatura nessa etapa deve permanecer entre 50 e 70°C (a depender do tipo de chocolate desejado) com cisalhamento e agitação constante (SOUZA, 2017). Nessa etapa, diversos compostos advindos da fermentação e transformados pela torrefação das amêndoas do cacau continuam a reagir formando o aroma característico do chocolate. As partículas sólidas, tais como o açúcar e o cacau, são revestidas com gordura e dissociadas pelo atrito tornam-se arredondadas. Na última etapa, parte da manteiga de cacau previamente reservada e emulsificantes são adicionados para padronizar as características reológicas, como viscosidade plástica e índice de fluidez (AFOAKWA et al., 2008; BECKETT, 2008; CAPAROSA e HARTEL, 2019).

**Figura 1** – Estágios da conchagem na produção de chocolate.

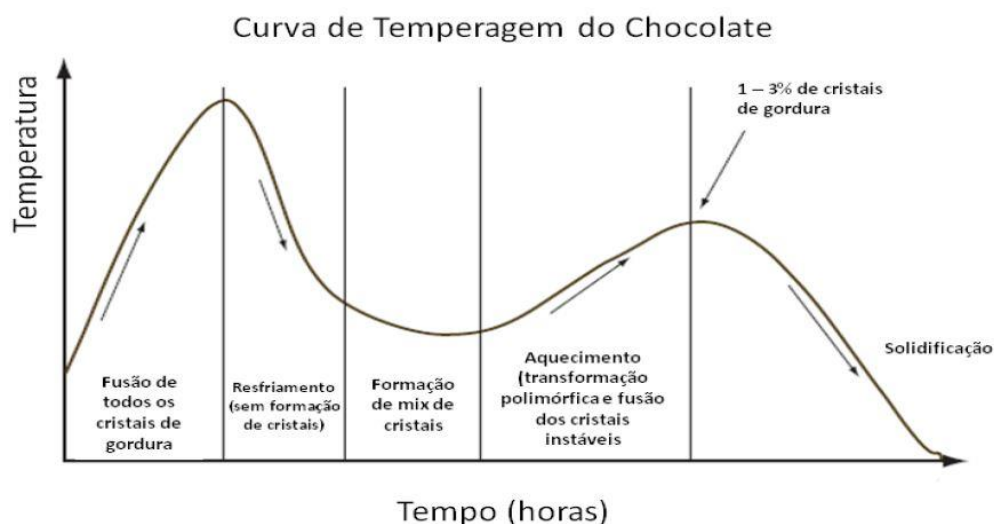


Fonte: Meursing (2009)

O processo de temperagem é uma das etapas mais críticas para obtenção de um produto com uma forma cristalina estável da manteiga de cacau, que será responsável pelas propriedades de fusão, *snap* (dureza e quebra à temperatura ambiente), brilho, resistência ao

*fat bloom* (migração da gordura para a superfície do chocolate) e contração para desmolde do chocolate (SILVA et al., 2017). A temperagem (Figura 2) inicia-se com o aquecimento do chocolate em temperaturas próximas a 40 e 46°C permitindo a fusão completa da fase gordurosa. Em seguida é feito um resfriamento controlado para a faixa de 27 a 29°C, sob agitação, para induzir à cristalização da gordura. Nessa etapa, além da formação dos cristais desejados do tipo  $\beta$ , também ocorre a formação de quantidades menores de cristais indesejáveis que possuem temperatura de fusão mais baixa, e são eliminados com um aquecimento da massa a 30-32°C (COHEN et al., 2004).

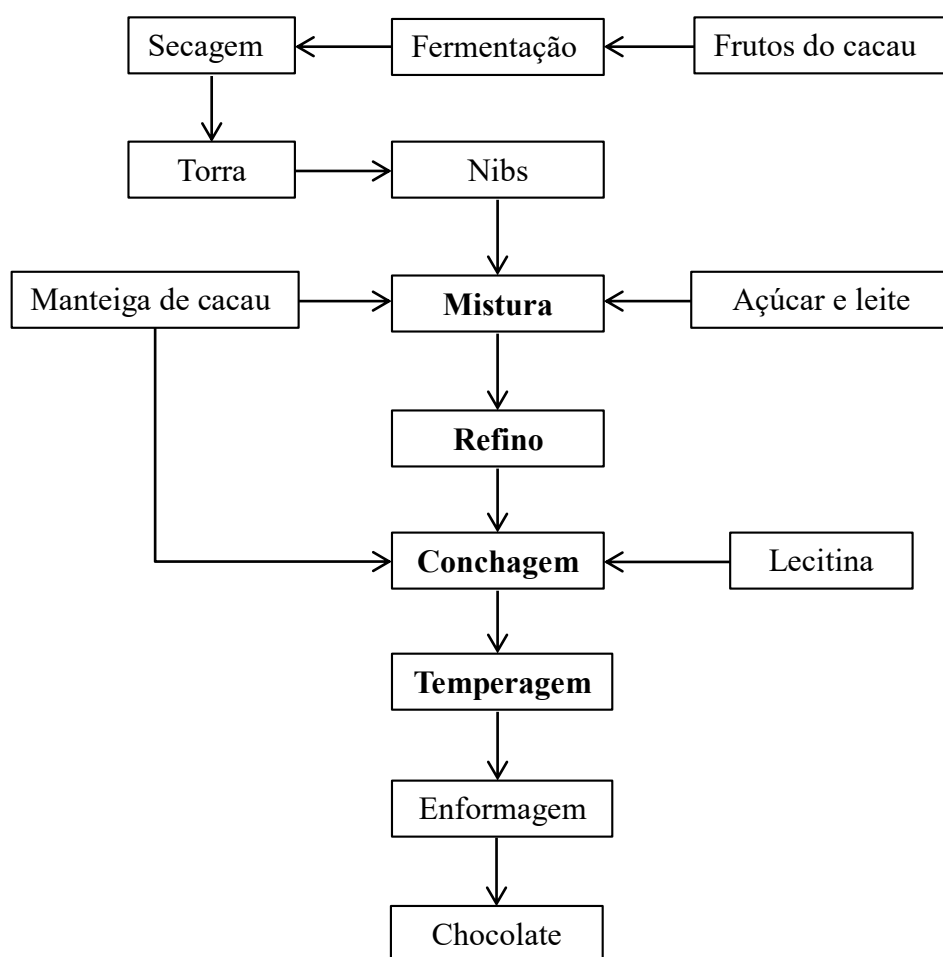
**Figura 2** – Curva de temperagem do chocolate.



Fonte: Meursing (2009)

Após a etapa de temperagem os chocolates são depositados em formas para adquirir a forma desejada e são direcionados a uma mesa vibratória evitando a formação de bolhas de ar em sua superfície, sendo resfriados em seguida sob temperatura de refrigeração e embalados (BECKETT, 2008; BELITZ et al., 2009). Todas as etapas para produção de chocolate estão organizadas em fluxograma (Figura 3).

**Figura 3** – Etapas de fabricação do chocolate



Fonte: Adaptado de SOUZA et al., 2013.

### 2.3 Constituintes bioativos no chocolate: metilxantinas e compostos fenólicos

O consumo dos produtos derivados do cacau bem como a demanda por chocolates com maiores teores de sólidos de cacau, tem se tornado uma tendência no mercado atual. A maior proporção de cacau no chocolate, além de agradar o paladar de parte dos consumidores, tem sido atrelada à demanda por alimentos funcionais com redução calórica de açúcares e de gorduras, ricos em constituintes bioativos como metilxantinas e compostos fenólicos naturalmente encontrados no cacau (BATISTA et al., 2016).

O cacau e seus produtos derivados são ricos em metilxantinas, destacando-se a presença de teobromina (3,7-dimetilxantina), cafeína (1,3,7- trimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina), sendo que as duas primeiras encontram-se em maior quantidade. Estes compostos são incolores, inodoros e capazes de conferir um gosto levemente amargo aos produtos. Os alimentos que contem metilxantinas podem ser submetidos ao processo de torra sem que haja redução significativa no teor desses compostos bioativos uma vez que os

mesmos apresentam elevado ponto de fusão. Além disso, as metilxantinas são altamente solúveis em água quente, entretanto a cafeína é mais solúvel em água à temperatura ambiente do que a teobromina e a teofilina (EICHER et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2016).

As sementes de cacau possuem cerca de 1 a 4% de teobromina e 0,2 a 0,5% de cafeína, sendo que a teofilina é encontrada a nível de traços. Devido à considerável estabilidade térmica das metilxantinas, sua concentração não é significativamente reduzida nas etapas posteriores de processamento do cacau para produção do chocolate, como secagem, torra e conchagem, nas quais se eleva consideravelmente a temperatura (NASCIMENTO et al., 2016).

Cada um destes compostos tem efeitos fisiológicos semelhantes no corpo incluindo a estimulação do sistema nervoso central, do músculo cardíaco e do músculo esquelético. No entanto, a sua força de ação difere bastante em cada parte do corpo, bem como de indivíduo para indivíduo (LI et al., 2012). A teobromina é a metilxantina predominante no chocolate, sendo que sua concentração chega a ser 10 vezes maior do que a concentração de cafeína. 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. A teofilina tem predominantemente efeito broncodilatador. Já a cafeína exerce efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, músculos cardíacos, sistema respiratório e secreção de ácido gástrico (BEAUDOIN e GRAHAM, 2011; MITCHELL et al., 2011; FRANCO et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2016).

Os compostos fenólicos ou polifenóis correspondem à outra classe de bioativos presentes em chocolates, são conhecidos como um dos maiores grupos de compostos antioxidantes naturais presentes nas plantas e englobam uma ampla variedade de moléculas capazes de transferir átomos de hidrogênio que neutralizam a ação dos radicais livres. Estes correspondem a átomos, moléculas ou íons com elétrons não emparelhados altamente instáveis e ativos para reações químicas com outras moléculas causando efeitos deletérios a saúde humana e aos produtos alimentícios (BREWER, 2011; FONTANA et al., 2013).

Os compostos fenólicos têm atraído muita atenção devido à sua capacidade antioxidante inibindo ou retardando processos oxidativos no organismo o que resulta em possíveis implicações benéficas à saúde humana, particularmente em relação a alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias (SNYDER et al., 2011; TANAKA et al., 2012; SILVA et al., 2014; BATISTA et al., 2016). Estes compostos são produtos do metabolismo secundário das plantas e estão envolvidos no crescimento, na reprodução e na proteção contra a radiação ultravioleta, agentes patogênicos, parasitas e predadores (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2014; MARTINS et al., 2015).

Destacam-se como antioxidantes fenólicos de fonte natural os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (ANGELO e JORGE et al., 2007). A classe predominante de compostos fenólicos presentes no cacau pertence ao grupo dos flavonoides. São pertencentes a esta, as unidades monoméricas (+)-catequina e (-)-epicatequina ou mais comumente chamadas de flavan-3-óis ou catequinas, juntamente com as proantocianidinas (STEINBERG et al., 2003; RUSCONI e CONTI, 2010). O nibs de cacau utilizado para a produção de chocolate possui alto teor de compostos fenólicos, cerca de 12-18% (peso seco), e 95% desses são monômeros ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e oligômeros de procianidina (EFRAIM et al., 2011).

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

No Brasil, entre 2006 e 2008, fabricantes de chocolate de pequeno, médio e grande porte lançaram chocolates com teores acima de 50% de cacau no mercado nacional. Desde então a comercialização e a produção de chocolates com altos teores de sólidos de cacau tem crescido. Esse aumento na produção está diretamente relacionado aos benefícios conferidos a saúde humana pelos compostos bioativos presentes no chocolate, com destaque aos compostos fenólicos ((+)-catequina e (-)-epicatequina). Apesar das catequinas não serem consideradas compostos essenciais à nutrição humana, elas contribuem para o melhoramento da saúde, ajudando prevenir diversas doenças, principalmente porque são consideradas potentes antioxidantes (STEINBERG et al., 2003; EFRAIM et al., 2010; GADKARI e BALARAMAN, 2015; ALAÑÓN et al., 2016).

## **2.4 Adultrações em chocolates**

O chocolate é suscetível às mais variadas adultrações cujas principais causas estão relacionadas à substituição de ingredientes advindos do cacau como nibs de cacau e manteiga de cacau. Esses ingredientes possuem compostos fitoquímicos, responsáveis por diversas características tecnológicas necessárias à produção de chocolate e ao desenvolvimento de atributos sensoriais (BATISTA, 2016; QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2018).

A manteiga de cacau, por exemplo, é frequentemente substituída sem indicação no rótulo por outras gorduras que causam alteração nas características do produto final desejado pelo consumidor (SOUZA e BLOCK, 2018). Outro tipo de adultração em chocolates refere-

se à presença de amido de milho e farinha de soja em sua composição sem a indicação destes no rótulo para conhecimento do consumidor (ZAMBONI et al., 1988).

Os chocolates com elevados teores de sólidos de cacau tem ganhado destaque no mercado atual pela diversidade de sabores provenientes do cacau e presença de compostos bioativos que conferem vantagens à saúde humana. As adulterações são motivadas principalmente por considerações econômicas, ou seja, obter um preço mais alto por produtos de menor qualidade. Com essa crescente demanda por chocolates com maiores porcentagens de sólidos de cacau, o teor indicado nas embalagens pode não ser equivalente aos teores reais, fazendo com que os rótulos dos chocolates comerciais tenham sua veracidade questionada (SUN et al., 2008).

A análise de autenticidade do chocolate é difícil devido à matriz complexa e à longa cadeia de processamento que torna o produto acabado diferente da matéria-prima inicial, as amêndoas de cacau. Ainda assim, para determinar a quantidade de sólidos de cacau presentes em chocolates, sabe-se que os constituintes fenólicos são capazes de atuar como marcadores químicos e a partir desta quantificação o teor de cacau pode ser estimado (OLIVEIRA et al., 2018).

## **2.5 Métodos convencionais**

Os métodos convencionais tradicionais utilizados para a determinação da composição química e caracterização físico-química de chocolates são importantes porque fornecem informações que são utilizadas para o controle de qualidade desse produto. Alguns componentes presentes nos chocolates, como os compostos fenólicos, possuem grupos cromóforos que podem ser determinados por técnicas colorimétricas. Essas técnicas se baseiam no comportamento químico destas substâncias, mas são incapazes de discriminar diferentes classes de polifenóis, sendo portanto, não específicas (ROBBINS et al., 2013).

Técnicas cromatográficas tem sido preferencialmente utilizadas para a obtenção de resultados mais específicos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica analítica mais empregada tanto para determinação de metilxantinas quanto para determinação de flavonoides, uma vez que permite a separação e quantificação simultânea, com elevada precisão e sensibilidade (WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

As determinações de constituintes presentes em chocolates também podem ser utilizadas para detectar adulterações e contaminantes (ZAMBONI et al., 1988; MAN et al., 2005). Entretanto, métodos clássicos como titulação, colorimetria e cromatografia exigem tempo e recursos humanos intensivos, além de utilizarem comumente reagentes onerosos que em muitos casos ocasionam prejuízos ao meio ambiente (SILVA e COLLINS, 2011). A

Espectroscopia no Infravermelho tem sido extensamente estudada por ser um método rápido e econômico, dispensando o uso de reagentes (SOUZA e POPPI, 2012). Aliada à análise multivariada de dados, surge como uma alternativa para estimar diversos compostos de interesse.

## 2.6 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia é comumente descrita como a interação de qualquer tipo de radiação eletromagnética com a matéria. A energia da radiação infravermelha pode provocar transições vibracionais e rotacionais. As transições rotacionais são aquelas em que a molécula se move em torno de seu centro de gravidade, enquanto nas transições vibracionais cada átomo se move individualmente com relação aos demais átomos (SKOOG et al., 2002).

Estas vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais (ou de estiramento) e deformações angulares (ou dobramento) de grupos funcionais. Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem a variações ritmadas de ligações que tem um átomo em comum ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem (SILVERSTEIN, 2007). As frequências e intensidades dos picos ou bandas exibidas no espectro de um composto que absorve no infravermelho são distintas e, tendo-se em vista que moléculas com grupos funcionais distintos apresentam diferentes modos vibracionais, pode-se utilizar este fenômeno tanto para caracterização quanto para quantificação de componentes (PAVIA et al., 2010).

Além da sensibilidade para identificar grupos funcionais, as técnicas de espectroscopia no infravermelho são rápidas e se tornaram importantes ferramentas para lidar com uma ampla gama de questões relacionadas a diversas áreas do conhecimento. Propriedades espectroscópicas, como absorbância, podem fornecer informações sobre a identidade, concentração, energia, conformação ou dinâmica das moléculas (PARSON, 2007).

A radiação eletromagnética no infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de número de onda que varia de  $14290\text{ cm}^{-1}$  a  $200\text{ cm}^{-1}$ . Esta é dividida em três regiões: o infravermelho próximo (NIR), que compreende entre 780 a 2500nm ( $14290$  a  $4000\text{cm}^{-1}$ ), o infravermelho médio (MIR), correspondendo à escala de 2500 a 50000nm ( $4000$  a  $200\text{cm}^{-1}$ ) e infravermelho distante (FIR), de 50 a 1000 $\mu\text{m}$  (SKOOG et al., 2002).

A região espectral do infravermelho distante, potencialmente muito útil, teve seu uso limitado devido a dificuldades experimentais. As fontes dessa radiação são notoriamente



fracas e são ainda mais atenuadas pela necessidade de filtros de seleção que precisam ser usados para evitar que outras radiações causem interferências. Com o passar dos anos essas limitações foram reduzindo, no entanto, o NIR e o MIR tornaram-se frequentemente mais utilizados (SKOOG et al., 2002).

Um dos maiores apelos para utilização dessas tecnologias incluem a rapidez das análises, ausência de preparação de amostras, simplicidade de procedimento e melhor repetibilidade em comparação ao tradicional método de análises químicas (MARTÍN-DEL-CAMPO et al., 2007).

### **2.6.1 Espectroscopia no infravermelho próximo**

O uso primário da espectroscopia no infravermelho próximo NIR relaciona-se com a quantificação de compostos contendo grupos funcionais constituídos de hidrogênio ligado a carbono, nitrogênio e oxigênio. A espectroscopia NIR baseia-se em absorções de energia por parte das ligações existentes nas moléculas de uma amostra que são causadas por três mecanismos diferentes: sobreposições de vibrações fundamentais; combinações de vibrações fundamentais e ainda absorções eletrônicas, gerando no espectro NIR bandas de absorção com baixa seletividade. Estas bandas possuem uma menor absorvidade quando comparadas com a espectroscopia MIR. Ainda assim, as aplicações da espectroscopia NIR abrangem diversas áreas e tem fornecido resultados satisfatórios para quantificar e identificar compostos (SKOOG et al., 2002).

A intensidade de radiação que é refletida da superfície da amostra e analisada como uma função de comprimento de onda é usualmente apresentada como espectro de absorbância. Como a intensidade de uma banda de absorção é proporcional à concentração do componente que causa esta banda, a quantidade de um composto existente numa amostra pode ser determinada através de uma curva de calibração construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do composto em questão, através de uma análise multivariada devido ao elevado número de variáveis obtidas num espectro NIR (ALMEIDA, 2009; PAVIA, 2010).

O desenvolvimento de modelos preditivos baseados na análise de amostras referência tem se difundido. A correlação dos dados espectrais com características químicas e físicas constituem a etapa da calibração que irá gerar um modelo de predição. Essas equações de predição possibilitam a determinação dos parâmetros em estudo de novas amostras sem a necessidade de que estas sejam avaliadas no laboratório (FILHO, 2003; SOUZA et al., 2011).

Sunoj et al. (2016) estudando a eficácia do NIR em prever através da calibração multivariada índice de fermentação, pH e compostos fenólicos em amêndoas de cacau

também obtiveram modelos de predição que indicaram resultados precisos para estes indicadores de qualidade. Quelal-Vásconez et al. (2018) a partir do uso do NIR combinados com análise multivariada identificaram e determinam a quantidade de cacau em pó presente em uma mistura adulterada de cacau em pó com farinha de alfarroba.

### **2.6.2 Espectroscopia no infravermelho médio com Transformada de Fourier**

A Análise de Espectroscopia no Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FTIR) pode ser definida como uma técnica que permite obter informações físicas e químicas sobre estrutura molecular, níveis de energia e ligações químicas de compostos presentes em determinado material estudado. Esta técnica estuda a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, com o objetivo de avaliar as ligações químicas, sendo muito utilizada nas determinações qualitativas e quantitativas das espécies orgânica e inorgânica, como também no controle do processo de separação e acompanhamento de reações. A esta técnica pode-se adicionar o acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR), que obtém espectros rápidos para uma ampla variedade de tipos de amostras com um mínimo de preparação possível (SKOOG et al., 2002; DOMINGO et al., 2015).

A espectroscopia no infravermelho médio é uma técnica robusta e reprodutível, o que permite a medição de pequenas variações dos componentes de uma amostra. Quando comparada com o NIR, possui sinais mais bem definidos, mais seletivos e de maior intensidade o que permite a detecção de componentes em concentrações mais reduzidas. Na análise de amostras menos complexas é possível inclusive encontrar números de ondas mais seletivos, que permitem desenvolver modelos de calibração univariados, ao contrário do que acontece com o uso do NIR. Esta técnica é comumente empregada para avaliar adulterações em diversos produtos alimentícios, como manteiga de cacau, chocolate e para determinar a qualidade das amêndoas de cacau (BATISTA et al., 2016; THERMO, 2019).

Man et al. (2005) utilizando o FTIR-ATR combinado com a regressão linear por mínimos quadrados parciais (PLS) concluíram que foi possível determinar o teor de banha quando misturado com manteiga de cacau em chocolates.

Batista et al. (2016) utilizaram o FTIR e determinaram o conteúdo fenólico total, capacidade antioxidante e os teores de cafeína e teobromina em amostras de chocolate e concluíram que a técnica espectroscópica é indicada para avaliar antioxidantes e quantificar parâmetros fenólicos presentes em derivados do cacau de uma maneira rápida e confiável.

Hu et al. (2016) concluíram que o FTIR-ATR pode ser utilizado para quantificar e prever a capacidade antioxidante, compostos fenólicos e concentração de catequina em

chocolate, sendo esta uma técnica rápida e que reduz custos com reagentes e tempo com obtenção de resultados precisos e iguais aos obtidos com análises químicas demoradas.

## **2.7 Análise Multivariada de dados**

A estatística multivariada é comumente definida como um conjunto de métodos estatísticos utilizados em situações nas quais várias variáveis são medidas simultaneamente (MINGOTI, 2005). É importante destacar que a análise multivariada vem sendo amplamente utilizada uma vez que a estatística univariada tornou-se limitada em estudos que pretendem avaliar, simultaneamente, muitas variáveis (SOUZA et al., 2011).

Na calibração multivariada, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedade. Dessa forma, os métodos de análise multivariada, em se tratando do emprego de técnicas espectroscópicas no infravermelho, possibilitam manipular dados de absorvância espectral associados a mais de uma frequência ao mesmo tempo, sendo possível modelar propriedades químicas e físicas de amostras a partir de seus dados espectroscópicos (NICOLAOU et al., 2010; BOTELHO et al., 2015).

Com base nisso, quando aplicada à área de alimentos e associada a métodos instrumentais, a análise multivariada possibilita o agrupamento de amostras desconhecidas, podendo fornecer ainda informações de composição, propriedades físicas e sensoriais (INON et al., 2004; SOUZA et al., 2011).

### **2.7.1 Análise de componentes principais**

A análise de componentes principais (ACP) é uma das técnicas multivariadas mais utilizadas, uma vez que promove a redução da dimensionalidade de conjuntos de dados complexos mantendo o máximo de informações originais possíveis. Através dessa técnica, um conjunto de variáveis que são correlacionadas é transformado em um novo conjunto de variáveis ortogonais chamadas componentes principais, de modo que a maior quantidade possível da variação total dos dados observados seja relatada por um pequeno número de componentes principais (LYRA et al., 2010).

Os componentes principais são obtidos em ordem decrescente de máxima variância. Dessa forma, o componente principal 1 é a combinação linear de maior variância, detendo mais informação dos dados originais que o componente principal 2, que por sua vez tem mais informação que o componente principal 3, e assim sucessivamente (MINGOTI, 2005; SOUZA e POPPI, 2012). Ao se realizar uma análise de componentes principais, espera-se que quase a totalidade das informações das variáveis originais esteja guardada nos primeiros

componentes principais promovendo uma simplificação estrutural dos dados, ao mesmo tempo em que preserva ao máximo as informações originais (PEREIRA e PEREIRA, 2004; PACHECO et al., 2013).

A redução da dimensionalidade proporcionada pela ACP faz com que as amostras passem a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas definidos pelas componentes principais, por exemplo, bi- ou tridimensionais o que permite uma visualização geral das amostras facilitando a realização de inferências a respeito de algum fenômeno, sobre todo o grupo de variáveis (FERREIRA, 2011). A importância da ACP está relacionada ainda com sua capacidade de identificar *outliers*, amostras responsáveis por maiores variações entre os dados (SOUZA e POPPI, 2012).

A ACP foi utilizada por Filho (2009) para realizar um estudo preliminar da estrutura dos dados espectrais originadas de 3 tipos de chocolate (escuro, branco e ao leite). As duas primeiras componentes principais, CP1 e CP2, foram capazes de representar 98,41% da variação total dos dados e permitiram que os autores observassem que os chocolates amargos avaliados formaram grupos visivelmente distintos dos chocolates ao leite e brancos.

Quelal-Vásquez et al. (2019) objetivando determinar o teor de casca de cacau em cacau em pó, por meio de espectroscopia e análise multivariada, utilizaram a ACP para identificar a formação de grupos em seu conjunto de dados e para encontrar e remover *outliers*. Um total de 98% da variância dos dados foi explicada pelos dois primeiros componentes principais. As amostras de casca de cacau foram claramente separadas das restantes e as amostras de cacau em pó contendo porcentagens elevadas de casca de cacau (40%) ficaram visualmente mais próximas das amostras de casca de cacau.

### **2.7.2 Regressão por mínimos quadrados parciais**

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*) é um método de calibração multivariada bem conhecido da comunidade científica, foi desenvolvido na década de 1960 por Herman Wold, como uma técnica econométrica, mas seus maiores defensores são engenheiros químicos. É amplamente aplicada em calibração de espectrometria, no monitoramento e controle de processos industriais, em que um processo pode ter centenas de variáveis controláveis e dezenas de saídas. Outras aplicações foram em medicina, psicologia e agropecuária, entre outras áreas (TOBIAS, 1995; GARCIA et al., 2015).

A PLS é uma poderosa ferramenta que relaciona uma ou mais variáveis resposta com diversas variáveis independentes, baseada no uso de fatores ou variáveis latentes visando utilizar combinações lineares das variáveis que predizem a análise, em vez de usar as

variáveis originais (PERALTA-ZAMORA et al., 1997; VARMUZA e FILZMOSER, 2016). Na PLS as variáveis que apresentam maior correlação com as variáveis de resposta são atribuídas maior peso, pois segundo o modelo elas serão mais eficazes na previsão (CALEGARI et al., 2019).

Este método admite com eficiência trabalhar com conjuntos de dados onde haja variáveis altamente correlacionadas e que apresentam ruído aleatório considerável. Na PLS a calibração multivariada é realizada utilizando a informação do espectro inteiro para construir um modelo da regressão, relacionado à propriedade de interesse, o que aumenta a robustez do modelo, por esta razão é chamado de método *full-spectrum* (BORIN e POPPI, 2005).

Os modelos de calibração multivariados após determinados podem prever novas propriedades analíticas de um novo conjunto amostral. Estes devem ser avaliados para que realmente apresentem certa confiabilidade e validade, isto se dá através da verificação de alguns parâmetros como coeficiente de correlação, erros padrões de calibração, validação, predição externa e interna cruzada (FERREIRA et al., 1999; KONZEN, et al., 2003).

Teye et al. (2014) fizeram uso da PLS para identificação rápida de amêndoas de cacau fermentados e não fermentados, onde o modelo construído apresentou um coeficiente de correlação de 99% no conjunto de dados referentes ao treinamento e 98% para o conjunto de predição.

### **2.7.3 Regressão linear múltipla**

A análise de regressão é uma das ferramentas mais empregadas para a análise de dados, sendo adotada em praticamente todas as áreas do conhecimento. A análise de regressão múltipla (RLM) é uma técnica estatística que tem o objetivo de obter uma equação matemática que pode ser usada para analisar a relação entre uma única variável dependente (critério) e várias variáveis independentes (preditoras) (HAIR JR. et al., 2010 ).

O intuito da análise de regressão múltipla é usar as variáveis independentes cujos valores são conhecidos para predizer o valor dependente único selecionado pelo pesquisador. Cada variável independente é ponderada pelo procedimento de análise de regressão para garantir a previsão máxima do conjunto de variáveis independentes. Os pesos denotam a contribuição relativa das variáveis independentes para a predição global e facilitam a interpretação quanto à influência de cada variável em fazendo a predição. A RLM apresenta um desempenho semelhante à PLS, mas gera um modelo mais simples e requer que o número de amostras seja maior que o número de variáveis. Essa técnica também é útil para selecionar

as variáveis significativas (variáveis preditoras) que contribuem para uma melhor descrição do modelo (FILHO, 2009; HAIR JR. et al., 2010).

Filho (2009) utilizou RLM juntamente com a espectroscopia no infravermelho próximo para prever de forma rápida a concentração de sacarose em chocolate branco, amargo e ao leite. O modelo construído apresentou um desempenho excelente com baixos erros de previsão o que sugere que possa ser usado para determinar o teor de sacarose em chocolates dispensando a utilização de análises químicas.

### 3 Referências

ABICAB. Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados. Disponível em: <<http://clientes.focoimg.com.br/abocab/storage/app/public/editor/15586162645ce698c86f974.pdf>> Acesso em 10 de janeiro 2020.

ACIERNO, V.; YENER, S.; ALEWIJN, M.; BIASIOLI, F.; RUTH, S. Factors contributing to the variation in the volatile composition of chocolate: Botanical and geographical origins of the cocoa beans, and brand-related formulation and processing. **Food Research International**, v. 84, p. 86-95, 2016.

ADEYEYE, E.I.; AKINYEYE, R.O.; OGUNLADE, I.; OLAOFE, O.; BOLUWADE, J.O. Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. **Food Chemistry**, v.118, p.357–363, 2010.

AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. 2 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2016.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 840-857, 2008.

ALANÓN, M.E.; CASTLE, S.M.; SISWANTO, P.J.; CIFUENTES-GÓMEZ, T.; SPENCER, J.P.E. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. **Food chemistry**, v. 208, p. 177-184, 2016.

ALMEIDA, F.M.N. **Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) na caracterização de farinhas para alimentação pueril**. Dissertação de mestrado. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2009. 73p.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, p. 232-240, 2007.

BATISTA, N. N.; ANDRADE, D. P.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. **Food Research International**, v. 90, p. 313-319, 2016.

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

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

BECKETT, S.T. **The Science of Chocolate**. 2 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4.ed. Heidelberg: Springer, 2009.

BORIN, A.; POPPI, R.J. Application of mid infrared spectroscopy and iPLS for the quantification of contaminants in lubricating oil. **Vibrational Spectroscopy**, v.37, p.27-32, 2005.

BOTELHO, B. G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L. S.; SENA, M. M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**. v. 181, p. 31-37, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 264, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chocolate e Chocolate Branco. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2005.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.221-247, 2011.

CALEGARI, M.A.; AYRES, B.B.; TONIAL, L.M.S.; ALENCAR, S.M.; OLDONI, T. L.C. Fourier transform near infrared spectroscopy as a tool for predicting antioxidant activity of propolis. **Journal of King Saud University**. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.006>. Acesso em : 13 de agosto de 2019.

CAPAROSA, M. H., HARTEL, R. W. Structure and Properties of Chocolate. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 1, p. 61-65, 2019.

CODEX ALIMENTARIUS. Standard for chocolate and chocolate products. CODEX STAN 87 – 1981. Disponível em: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS\\_087e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS_087e.pdf)> Acesso em: 14 de abril de 2020.

COHEN, K. O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M. Revisão: temperagem ou pré-cristalização do chocolate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, p.23-30, 2004.

CRUZ, J. F. M.; LEITE, P.B.; SOARES, S.E.; BISPO, E.S. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in Southern Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 5218-5225, 2013.

DOMINGO, E. do C.; TIRELI, A.A.; NUNES, C.A.; BATISTA, A.V.; GUERREIRA, M.C.; PINTO, S.A. Rapid extraction of melamine in powdered milk for direct electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 132, p. 535-540, 2015.

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

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

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

FERREIRA, D.F. **Estatística multivariada**. Lavras: Editora UFLA, 2011.

FERREIRA, M. M.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.

FILHO, P.A.C. **Estudo comparativo entre técnicas de inteligência artificial e modelos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo**. Dissertação de doutorado. Campinas: Instituto de Química, 2003. 215p.

FILHO, P.A.C. Rapid determination of sucrose in chocolate mass using near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, p. 206-211, 2009.

FONTANA, A.R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI R. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8987-9003, 2013.

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

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

GARCIA, S. R.; NETO, A. C.; ORO, S. R.; MAFIOLETE, T. R.; JUNIOR, C.N. Modelo de regressão por mínimos quadrados parciais para dados de monitoramento de barragens. **Revista Engenharia**, v.11, p.11, 2015.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; MORO, C.; MANCHÓN, N.; GONZALO-RUIZ, A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M.; MATEO-VIVARACHO, L. In vitro antiinflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food Chemistry**, v. 161, p. 216–223, 2014.

HAIR JR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E. **Multivariate Data Analysis**. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2010. 785 p.

HERME, P. **Larousse do Chocolate**. 1 ed. São Paulo: Editora Larousse, 2006.

HINNEH, M.; WALLE, D. V.; HAECK, J.; ABOTSI, E.E.; WINNE, A.; SAPUTRO, A.D.; MESSSENS, K.; DURME, J.V. Applicability of the melanger for chocolate refining and



Stephan mixer for conching as small-scale alternative chocolate production techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 253, p. 59-71, 2019.

HU, Y.; PAN, Z. J.; LIAO, W., Li, J.; GRUGET, P.; KITTS, D. D.; LU, X. Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.202, p.254–261, 2016.

INON, F. A.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and Chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 401-412, 2004.

KONGOR, J. E.; HINNEH, M.; WALLE, D. V.; AFOAKWA, E. O.; BOECKX, P.; DEWETTINCK, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. **Food Research International**, v. 82, p. 44-52, 2016.

KONZEN, P. H. D. A.; FURTADO, J. C.; CARVALHO, C. W.; FERRÃO, M. F.; MOLZ, R. F.; BASSANI, I. A.; HÜNING, S. L. Otimização de métodos de controle de qualidade de fármacos usando algoritmo genético e busca tabu. **Pesquisa operacional**, v. 23, p. 189-207, 2003.

LEITE, P. B. ; LANNES, S. C. S. ; RODRIGUES, A. M. ; SOARES, F. A. S. M. ; SOARES, S. E. ; SILVA, E. B. . Estudo da estrutura de chocolates elaborados com cultivares resistentes ao fungo *Moniliophthora perniciosa* e cultivar tradicional. **Brazilian Journal of Food Technology (Online)**, v. 16, p. 192-197, 2013.

LI, Y.; FENG, Y.; ZHU, S.; LUO, C.; MA, J.; ZHONG, F. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.25, p.17-23, 2012.

LOHUMI, S. H.; LEE, S.; LEE, H.; CHO, B-K. A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. **Trends in Food Science e Technology**, v. 46, p. 85-98, 2015.

LYRA, W. S.; DA SILVA, E. C.; DE ARAÚJO, M. C. U.; FRAGOSO, W. D.; VERAS, G. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 33, p. 1594-1597, 2010.

MAN, Y.B C.; SYAHARIZA, Z.A.; MIRGHANI, M.E.S.; JINAP, S.; BAKAR, J. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 90, p. 815-819, 2005.

MARTÍN-DEL-CAMPO, S. T.; PICQUE, D.; COSÍO-RAMÍREZ, R.; CORRIEU, G. Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 835–845, 2007.

MARTINS, N.; BARROS, L.; SANTOS-BUELGA, C.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I.C.F.R. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 170, p. 378–385, 2015.

MEURSING, E. H. **The De Zaan® Cocoa Manual**. 1 ed. Netherlands: ADM Cocoa BV, 2009.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.

MINIFIE, B. **Chocolate, Cocoa and Confectionery: Science and Technology**. 3 ed. Hayward: Springer Science & Business Media, 2012.

MITCHELL, E. S.; SLETTENAAR, M.; Vd MEER, N.; TRANSLER, C.; JANS, L.; QUADT, F.; BERRY, M. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. **Physiology & behavior**, v. 104, p.816-822, 2011.

NASCIMENTO, M. M. **Estratégias analíticas para determinação de metilxantinas e flavonoides em amostras de chocolates artesanais com diferentes teores de cacau**. Dissertação de Mestrado. Ilhéus: Programa de Pós-Graduação em Química/UESC, 2016. 103p.

NICOLAU, N.; XU, Y.; GOODACRE, R. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. **Journal of Dairy Science**. v. 93, p. 5651-5660, 2010.

OLIVEIRA, D.N.; CAMARGO, A.C.B.; MELO, C. F.O.R.; CATHARINO, R.R. A fast semi-quantitative screening for cocoa content in chocolates using MALDI-MSI. **Food research international**, v. 103, p. 8-11, 2018.

PACHECO, J.; CASADO, S.; PORRAS, S. Exact methods for variable selection in principal component analysis: Guide functions and pre-selection. **Computational Statistics and Data Analysis**, v.57, p. 95–111, 2013.

PARSON, W. W. **Modern Optical Spectroscopy**. 2ed. Heidelberg: Springer, 2007.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PERALTA-ZAMORA, P.; CORNEJO-PONCE, L.; NAGATA, N.; POPPI, R. J. Alternativas quimiométricas para a resolução de problemas analíticos clássicos. Determinação espectrofotométrica de misturas de zircônio e háfnio. **Química Nova**, p.469-474, 1997.

PEREIRA, E. B. B.; PEREIRA, M. B. Um critério para o descarte de variáveis na análise de componentes principais. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**. v.23, p. 1-7, 2004.

QUELAL-VÁSCONEZ, M.A. PÉREZ-ESTEVE, E. ARNAU-BONACHERA, A.; BARAT, J.M.; TALENS, P. Rapid fraud detection of cocoa powder with carob flour using near infrared spectroscopy. **Food control**, v. 92, p. 183-189, 2018.

QUELAL-VÁSCONEZ, M.A.; LERMA-GARCÍA, M.J.; PÉREZ-ESTEVE, É.; ARNAU-BONACHERA, A. BARAT, J. M.; TALENS, P. Fast detection of cocoa shell in cocoa powders by near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Food Control**, v. 99, p.68-72, 2019.

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

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

SILVA, C. G.A.; COLLINS, C.H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v.34, p. 665-676, 2011.

SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N.M.P.S; VIEIRA, I.G.P.; FIGUEIREDO, R.W.; BRASIL, I.M.; GOMES, C.L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v.143, p.398-404, 2014.

SILVA, T. L. T., GRIMALDI, R., GONÇALVES, L. A. G. Temperature, time and fat composition effect on fat bloom formation in dark chocolate. **Food Structure**, v. 16, p. 1-16, 2017.

SILVERSTIEN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ed. Porto Alegre:Bookman, 2002.

SNYDER, S. M.; REBER, J. D.; FREEMAN, B. L.; ORGAD, K.; EGGETT, D. L.; PARKER, T. L. Controlling for sugar and ascorbic acid, a mixture of flavonoids matching navel oranges significantly increases human postprandial serum antioxidant capacity. **Nutrition research**, v.31, p.519-526, 2011.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte 1. **Revista Química Nova**, v. 35, p. 223-229, 2012.

SOUZA, C. S.; BLOCK, J. M. Impact of the addition of cocoa butter equivalent on the volatile compounds profile of dark chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 767-775, 2018.

SOUZA, C.S. **Efeito da substituição parcial de manteiga de cacau por gordura CBE no perfil de compostos voláteis de chocolate meio amargo**. Dissertação de Mestrado. Florianópolis: Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFSC, 2017. 95p.

SOUZA, J.; HADLICH, D. P. F.; MAAHS, T. R. Automação da produção de chocolates em escala não industrial. **Revista Liberato**, v. 14, p. 113-238, 2013.

SOUZA, S. S.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; CELEGHINI, R. M. S.; FERREIRA, M. M. C.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A. S. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 124, p. 692-695, 2011.

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. **Journal of the American dietetic association**, v. 103, p. 215-223, 2003.

SUN, D-W. **Modern Techniques for Food Authentication**. 2 ed. Canada: Academic Press, 2008.

SUNOJ, S.; IGATHINATHANE, C.; VISVANATHAN, R. Nondestructive determination of cocoa bean quality using FT-NIR spectroscopy. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 124, p. 234-242, 2016.

TAN, J.; LI, R; JIANG, Z. T; TANG, S. H; WANG, Y. Rapid and non-destructive prediction of methylxanthine and cocoa solid contents in dark chocolate by synchronous front-face fluorescence spectroscopy and PLSR. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.77, p.20-27, 2019.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v. 17, p.3202-3242, 2012.

TEYE, E.; HUANG, X-Y.; LEI, W.; DAI, HUANG. Feasibility study on the use of Fourier transform near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate and quantify adulteration in cocoa beans. **Food research international**, v. 55, p. 288-293, 2014.

THERMO. **Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry**. Thermo Nicolet, Madison, USA. Disponível em: [http://www.niu.edu/analyticallab/\\_pdf/ftir/FTIRintro.pdf](http://www.niu.edu/analyticallab/_pdf/ftir/FTIRintro.pdf). Acesso em: 11 de Agosto de 2019.

TOBIAS, R. D. **An introduction to partial least squares regression**, USA. 1995. Disponível em: <https://stats.idre.ucla.edu/wp-content/uploads/2016/02/pls.pdf>. Acesso em 11 de agosto de 2019.

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. **Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics**. 1 ed. Nova York: CRC Press, 2016.

VARZAKAS, T.; TZIA, C. **Handbook of Food Processing: Food Safety, Quality, and Manufacturing Processes**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

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

ZAMBONI, C. D. Q.; ALVES, H. I.; RODRIGUES, R.; SPITERI, N.; ATUI, M. B.; BATISTIC, M. A. Suidades e fraudes em chocolates. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.48, p. 37-41, 1988.

ŻYŻELEWICZ, D.; KRYSIAK, W.; ORACZ, J.; SOSNOWSKA, D.; BUDRYN, G.; NEBESNY, E. The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. **Food Research International**, v.89, p. 918-929, 2016.

ZZAMAN, W.; BHAT, R.; YANG, T. A. Impact of convectional and superheated-steam roasting on the physicochemical and microstructural properties of cocoa butter extracted from cocoa beans. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.4, p.1-8, 2016.

# Capítulo II

---

## Objetivos

---

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Determinar por meio de dados espectroscópicos no infravermelho e métodos convencionais aliados à análise estatística multivariada a concentração de sólidos de cacau presentes em amostras de chocolate.

### 1.2 Objetivos específicos

- Produzir chocolates com diferentes concentrações de sólidos de cacau (30%, 45%, 60%, 75% e 90%);
- Adquirir amostras comerciais de chocolates com variadas concentrações de sólidos de cacau;
- Obter dados de absorvância a partir do NIR e MIR das amostras de chocolate;
- Determinar a capacidade antioxidante, o conteúdo de compostos fenólicos totais, as metilxantinas (teobromina e cafeína) e as catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) dos chocolates;
- Aplicar a técnica de ACP e PLS utilizando os dados do NIR e MIR para promover a separação das amostras em seus grupos característicos de acordo com a porcentagem de sólidos de cacau e quantificar os mesmos;
- Aplicar a técnica de ACP e RLM utilizando os dados referentes à capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais, metilxantinas e catequinas para promover a separação das amostras em seus grupos característicos de acordo com a porcentagem de sólidos de cacau e quantificar os mesmos;
- Obter modelos matemáticos capazes de identificar de maneira rápida o conteúdo de sólidos de cacau em amostras comerciais.

# **Capítulo III**

---

## **Artigo 1**

---

# APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NIR E MIR PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO DO TEOR DE CACAU EM CHOCOLATES

Ingrid Alves Santos<sup>a</sup>, Daniele Gomes Conceição<sup>a</sup>, Marília Borges Viana<sup>a</sup>, Grazielly de Jesus Silva<sup>a</sup>, Leandro Soares Santos<sup>a</sup>, Sibelli Passini Barbosa Ferrão<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil

## Resumo

A Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) e Médio (MIR) associada a técnicas quimiométricas foram utilizadas para determinar o teor de sólidos de cacau em chocolates e verificar possíveis adulterações. Para controle, foram produzidas 5 formulações de chocolates com diferentes concentrações de sólidos de cacau (30%, 45%, 60%, 75% e 90%) e adquiridas 110 amostras comerciais com variadas concentrações de sólidos de cacau (30-88%). Os chocolates produzidos e comerciais foram avaliados por NIR e MIR. Os dados espectroscópicos foram submetidos às técnicas multivariadas de Análise de Componentes Principais (ACP) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Para ambas as técnicas de espectroscopia a ACP das 5 formulações formaram grupos distintos com relação aos sólidos de cacau e as amostras comerciais apresentaram um padrão de comportamento semelhante às amostras produzidas. Para PLS as equações de regressão apresentaram alta capacidade preditiva com coeficientes de correlação acima de 90 e baixos valores de RMSE, 0,70 e 1,22 para NIR e MIR, respectivamente. Estes modelos foram capazes de prever o conteúdo de sólidos de cacau dos chocolates e destacaram, aproximadamente, 14% das amostras comerciais como possíveis produtos adulterados. A aplicação espectroscopia no infravermelho associada à análise multivariada mostrou-se uma ferramenta eficaz na identificação do teor de sólidos de cacau em chocolates.

**Palavras-chave:** Autenticidade, quimiometria, *Theobroma cacao*.



## 1. Introdução

O chocolate, dependendo da sua variedade, pode ser definido como uma suspensão de partículas sólidas do açúcar, do cacau e do leite em pó, dispersos em uma fase contínua de gordura (AFOAKWA, 2016). Apresenta características sensoriais únicas como apresentar-se sólido em temperatura ambiente e fundir na boca durante a degustação (LUCCAS et al., 2014). O chocolate é capaz de evocar uma série de estímulos ativadores dos centros de prazer do cérebro humano gerando bem-estar imediato. Esse produto também é uma importante fonte de compostos bioativos, o que satisfaz a crescente preocupação atual de parte dos consumidores por benefícios à saúde, e o tornaram um produto apreciado mundialmente e consumido em todos os segmentos sociais por pessoas de diferentes faixas etárias.

Existe uma ampla variedade de chocolates disponíveis para consumo que são obtidos através de diferentes proporções dos ingredientes e distintos processamentos. O resultado são produtos capazes de agradar diferentes paladares contendo tanto um maior conteúdo de sólidos de cacau quanto uma maior proporção de açúcar. O mercado consumidor apresenta tendências direcionadas à valorização do cacau em razão das suas conhecidas propriedades sensoriais e bioativas. Tal afirmativa é sustentada pelo surgimento e crescimento dos movimentos *bean to bar* e *tree to bar* que tem valorizado a produção artesanal de chocolates com menor adição de ingredientes diferentes aos oriundos do cacau e que objetivam ressaltar a diversidade de estilos e sabores empregados ao chocolate a partir do cacau utilizado (ENGESETH e PANGAN, 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

As características fitoquímicas, tecnológicas e sensoriais advindas do cacau tornam os chocolates alvo de adulterações, uma vez que a comercialização de um produto com menor concentração de sólidos de cacau em sua formulação, mas com informações de venda de um maior teor, traz recompensas financeiras ilícitas (SUN et al., 2008; EFRAIM et al., 2011; BATISTA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). A verificação da autenticidade e a detecção de adulterações são questões cada vez mais importantes para a indústria de alimentos. Para isso, técnicas estão sendo estudadas com o intuito de identificar as discrepâncias existentes entre as informações contidas nos rótulos dos produtos e sua real formulação (QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2018).

Aplicações de técnicas analíticas com o objetivo de identificar o conteúdo de sólidos de cacau em chocolates são escassas. Entre as técnicas existentes a espectrometria de massas mostrou-se eficiente para prever o conteúdo de sólidos de cacau utilizando como marcadores químicos (+)-catequina e (-)-epicatequina (OLIVEIRA et al., 2018). No entanto, atualmente existe uma demanda por metodologias alternativas confiáveis e rápidas que sejam

capazes de abordar essa questão. O uso de técnicas espectroscópicas que apresentam resultados de fácil obtenção e que dispensam a utilização de reagentes químicos, como a espectroscopia no infravermelho (IR), poderia ser uma excelente alternativa.

Na espectroscopia no infravermelho a vibração de grupos funcionais que fazem parte da estrutura dos constituintes químicos dão origem a espectros característicos. O potencial desta técnica nas regiões do IR próximo (NIR) e médio (MIR), associado a técnicas estatísticas multivariadas que auxiliam na extração e interpretação de conjuntos de dados extensos e complexos, tem sido exploradas para discriminar a qualidade, identificar origem, fraude, quantificar compostos de interesse e avaliar a capacidade antioxidante em cacau e seus produtos derivados (MAN et al., 2005; FILHO, 2009; CAMBRAI et al., 2010, TEYE et al., 2014; KRÄHMER et al., 2015; BATISTA et al., 2016; HU et al., 2016; QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2018; QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2019).

Assim, objetivou-se utilizar a espectroscopia NIR e MIR associada à análises multivariadas para determinar a concentração de sólidos de cacau em chocolates e verificar possíveis adulterações em amostras comerciais.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Produção dos chocolates

Foram processadas cinco formulações de chocolate com diferentes concentrações de sólidos de cacau: 30%, 45%, 60%, 75% e 90% a fim de obter uma faixa de representação para amostras comerciais. As porcentagens de lecitina de soja, leite em pó e manteiga de cacau permaneceram fixas, enquanto os teores de açúcar e nibs de cacau variaram de acordo com a formulação (Tabela 1). Foram produzidas 4 repetições de cada formulação, perfazendo um total de 20 unidades experimentais.

**Tabela 1-** Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos chocolates.

Formulações	Ingredientes				
	Nibs	Manteiga de cacau	Leite em pó	Açúcar	Lecitina
<b>30%</b>	22%	8%	7%	62,6%	0,4%
<b>45%</b>	37%	8%	7%	47,6%	0,4%
<b>60%</b>	52%	8%	7%	32,6%	0,4%
<b>75%</b>	67%	8%	7%	17,6%	0,4%
<b>90%</b>	82%	8%	7%	2,6%	0,4%

O nibs de cacau adquirido (cacau Forasteiro variedade Parasinho, Floresta Azul, BA, Brasil), foi produzido a partir da amêndoa do cacau, que após atingir um índice de

fermentação de 87% foi submetida a secagem até umidade de 7% e posterior torra em dois estágios: 100°C por 1h e 50 min; e 120°C por 20 min até atingir uma umidade final de 2%, conforme informações do fabricante.

O nibs de cacau, o açúcar refinado (União, Araquari, SC, Brasil) e o leite em pó integral (Nestlé, Ituiutaba, MG, Brasil) foram transferidos para um equipamento de multifunções Melanger (Spectra 11, Coimbatone, Índia). Neste equipamento foram realizadas as operações de mistura dos ingredientes, refino e conchagem, onde a massa de cada formulação permaneceu por 24 horas. Após 4 horas de refino, metade da manteiga de cacau (Barry Callebaut, Ilhéus, BA, Brasil) foi acrescentada nas formulações e o restante após 10 horas. A lecitina de soja (Tradal Brazil Comp. Imp. e Exp. Ltda, São Paulo, Brasil) foi adicionada aproximadamente 2 horas antes da finalização da conchagem.

A massa conchada foi conduzida para o processo de temperagem, em temperadeira mini chocomachine (Finamac, São Paulo, Brasil), onde permaneceu por 1h e 30 min em constante agitação, até o resfriamento a 29°C, para finalização da temperagem do chocolate. Posteriormente, foi realizado o reaquecimento da massa a temperaturas próximas de 31°C - 33°C para que os cristais instáveis formados fossem fundidos. Essa massa obtida da tempera foi transferida para formas de policarbonato para moldagem dos chocolates e colocadas à temperatura de 8°C por 12 horas. Após resfriados, os chocolates foram embalados e armazenados sob temperatura de 18°C.

## **2.2 Obtenção das amostras comerciais**

Foram adquiridas 110 amostras de chocolate de diferentes marcas em estabelecimentos comerciais. A concentração de cacau informada no rótulo dessas amostras variou de 30% a 88%. Destas 110 amostras, 83 foram produzidas no Brasil, 15 na Suíça, 3 na Alemanha, 2 na Holanda, 2 na Polônia, 1 em Portugal, 1 nos Estados Unidos, 1 nos Emirados Árabes Unidos, 1 na Itália e 1 na Bélgica. Para facilitar a interpretação dos resultados, as amostras foram divididas em grupos, das 110, 19 apresentavam uma variação de sólidos de cacau de 30% a 44%, 20 de 45% a 59%, 48 de 60% a 74% e 23 de 75% a 88%.

## **2.3 Aquisições dos espectros**

### **2.3.1 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)**

Os espectros das amostras de chocolate produzidas e comerciais foram coletados em espectrômetro NIR (SpectraStar 2500XL, Unity Scientific, Brookfield, CT, EUA) equipado com uma lâmpada de halogênio de tungstênio como fonte de luz, um detector de arseneto de índio-gálio (InGaAs). Os sinais foram gerados no modo de refletância (%R) e transformados em absorbância usando  $\log 1/R$ . As amostras foram inseridas no copo de amostras e digitalizadas no intervalo de 1100 a 2500 nm em intervalos de 1 nm. Cada ponto é a pontuação média de 64 varreduras com 1400 pontos. Durante a análise, a temperatura foi mantida em torno de 18°C no ambiente. O software Unity InfoStar V3.11.3 foi usado para configuração, controle e aquisição de dados do espectrômetro. Três medidas foram adquiridas para cada chocolate, a média destes espectros foi usada para a realização das análises estatísticas.

### **2.3.2 Espectroscopia no infravermelho médio (MIR)**

Os espectros foram obtidos em equipamento de infravermelho médio, FTIR-ATR (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), equipado com célula de refletância total atenuada (ATR). Antes de cada coleta foi realizada uma leitura do espectro de fundo (background). Em seguida 0,5 g das amostras foram colocadas individualmente sobre o compartimento do acessório onde incidem os raios na faixa do infravermelho (cristal de diamante), sendo obtidos os espectros no modo de absorbância. Durante a análise, a temperatura foi mantida em torno de 18°C no ambiente. Todas as repetições de cada amostra foram avaliadas na região espectral com número de onda de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$ . Três medidas foram adquiridas para cada chocolate e a média destes espectros foi usada para a realização das análises estatísticas.

## **2.4 Análises estatísticas**

### **2.4.1 Pré-processamentos dos dados espectroscópicos**

Os dados espectroscópicos obtidos no NIR e FTIR-ATR foram primeiramente pré-processados para corrigir qualquer possível falta de homogeneidade ótica devido ao tamanho das partículas. Para esta correção, utilizou-se a variação normal padrão (*standart normal variate* – SNV) onde cada espectro é corrigido individualmente de acordo com o resultado do

desvio padrão individual (FILHO et al., 2009). Os dados foram pré-processados usando o programa *Chemostat* (HELFER et al., 2015).

#### **2.4.2 Análise de componentes principais (ACP)**

A análise de componentes principais (ACP) foi usada para identificar as inter-relações entre as amostras e os possíveis agrupamentos, selecionar os dados experimentais adequados para a construção do modelo e identificar e eliminar os valores extremos. O número de componentes principais foi escolhido pela avaliação da variância cumulativa, onde foram escolhidos os primeiros componentes principais (PC's), acumulando um percentual de variância maior que 70%. A Análise foi realizada no software Statistical Analysis System (SAS), versão University Edition, utilizando os procedimentos PROC PRINCOMP e PROC CORR. Utilizou-se como variáveis para ACP os valores de números de onda onde ocorriam as máximas absorvências dos picos formados nos espectros das amostras. Os gráficos de dispersão dos coeficientes de correlação entre as variáveis e CP's foram realizados no programa OriginPro, versão 8.0, no espaço bidimensional.

#### **2.4.3 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)**

A regressão por mínimos quadrados parciais utiliza a informação contida na matriz de dados X (espectro completo) e a matriz resposta Y (concentração de sólidos de cacau) para obtenção das novas variáveis, que são denominadas variáveis latentes, componentes ou fatores. Os dados obtidos com NIR e FTIR-ATR foram utilizados para construir o modelo de regressão. O número de variáveis latentes nos modelos foi selecionado de acordo com o método proposto no software. O teste T2 foi usado para determinar se dois valores de PRESS eram significativamente diferentes. Se não houve diferença significativa foram escolhidos mais modelos parcimoniosos e apenas comparados aqueles com menos fatores que o modelo mínimo do PRESS. Utilizou-se como variáveis os valores de absorvência do espectro completo.

O desempenho dos modelos PLS obtidos foram avaliados de acordo com a raiz quadrada do erro médio (RMSE), o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), a relação de desempenho para desvio (RPD) e razão de erro de intervalo (RER) (LIMA et al., 2020). A Análise foi realizada no software Statistical Analysis System (SAS), versão University Edition.

Após a escolha do número de variáveis latentes, os modelos gerados foram utilizados para verificar a autenticidade de amostras comerciais de chocolate.

### 3 Resultados e discussão

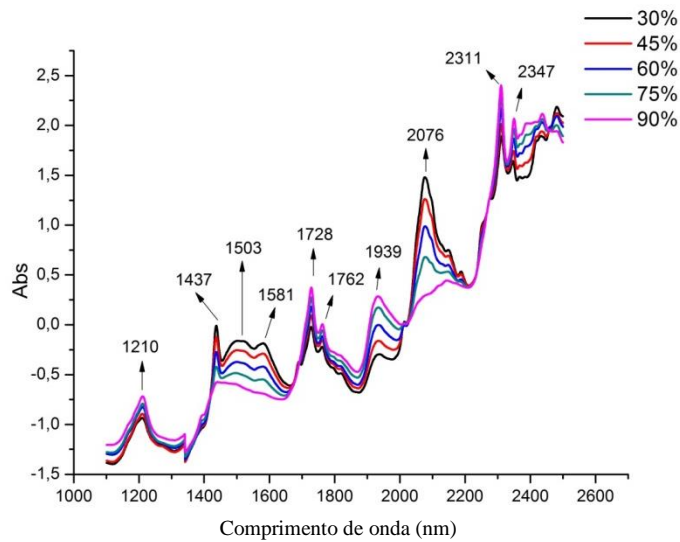
#### 3.1 Características dos espectros obtidos no NIR e MIR

Os espectros pré-processados obtidos no NIR e MIR com as absorvâncias médias dos chocolates contendo diferentes concentrações de sólidos de cacau estão apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Os espectros obtidos com NIR evidenciaram 10 bandas principais de absorção que estão associadas a grupos funcionais que variaram de intensidade de acordo com a concentração de cacau das amostras. Estes grupos funcionais são comumente associados a macromoléculas o que permite a interpretação do espectro em termos de composição. Nota-se que no NIR, com o aumento dos sólidos de cacau (Figura 1), os espectros apresentaram um padrão similar, diferindo apenas no aumento da intensidade das absorvâncias nas regiões 1210nm, 1728nm, 1762nm, 2311nm e 2347nm (vibrações C-H e C-H<sub>2</sub>) cujos grupos funcionais estão associados a lipídeos e em 1939nm (vibrações O-H) associados à água e proteínas. Ocorreu ainda a redução da intensidade das bandas localizadas em 1437nm, 1503nm, 1581nm, 2076nm (vibrações C-H e O-H) relacionadas a carboidratos em razão do aumento dos sólidos de cacau e redução do açúcar nas formulações (DAVIES et al., 1991; FILHO, 2009; LÓPEZ et al., 2017; QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2019).

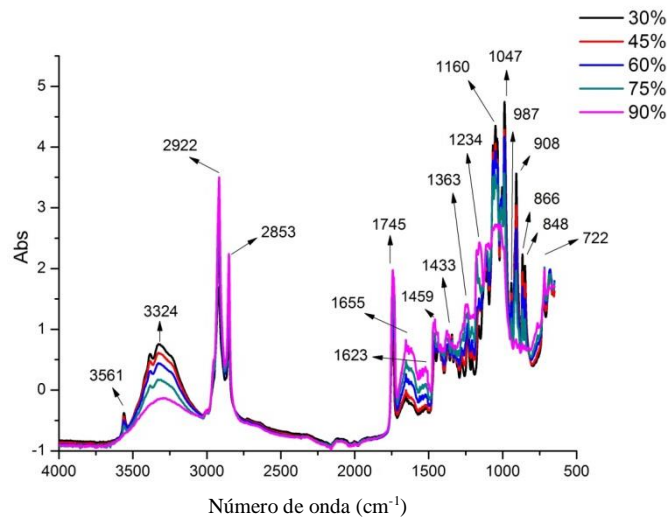
Os espectros obtidos com o FTIR-ATR evidenciaram 18 bandas principais de absorção referentes aos modos vibracionais de diferentes grupos funcionais presentes nas amostras de chocolate. O aumento dos sólidos de cacau resultou em um aumento na intensidade das absorvâncias nas regiões 2922cm<sup>-1</sup>, 2853cm<sup>-1</sup>, 1745cm<sup>-1</sup>, 1459cm<sup>-1</sup>, 1433cm<sup>-1</sup>, 1363cm<sup>-1</sup>, 1160cm<sup>-1</sup> e 722cm<sup>-1</sup> (vibrações C-H e C=O) associadas a lipídeos e compostos fenólicos, e 1655 cm<sup>-1</sup>, 1523cm<sup>-1</sup>, 908cm<sup>-1</sup> (vibrações N-H e C=C) relacionados a proteínas, e na redução da intensidade das bandas relacionados a grupos funcionais associados a carboidratos em 3561cm<sup>-1</sup>, 3324cm<sup>-1</sup>, 1234cm<sup>-1</sup>, 1047cm<sup>-1</sup>, 987cm<sup>-1</sup>, 866cm<sup>-1</sup>, 848cm<sup>-1</sup> (vibrações O-H/C-O/C-C/C-O-C) (COATES, 2006; BATISTA et al., 2016; HU et al., 2016).

**Figura 1** - Espectro dos chocolates produzidos obtidos por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR).

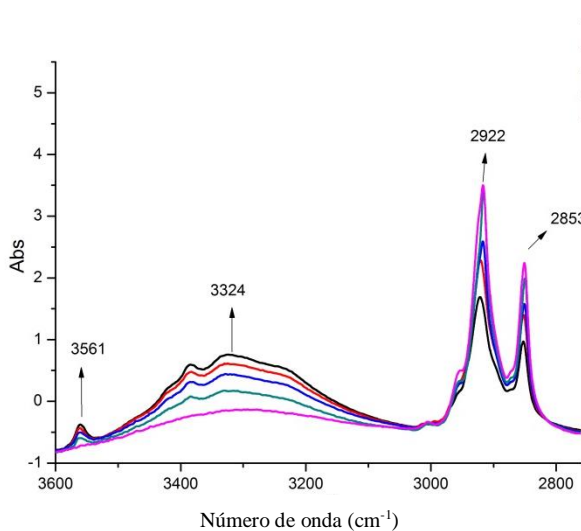


**Figura 2** - Espectro dos chocolates produzidos obtidos por Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR) - (a) espectro completo; (b) Ampliação da região 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$ ; (c) Ampliação da região 1800-500  $\text{cm}^{-1}$ .

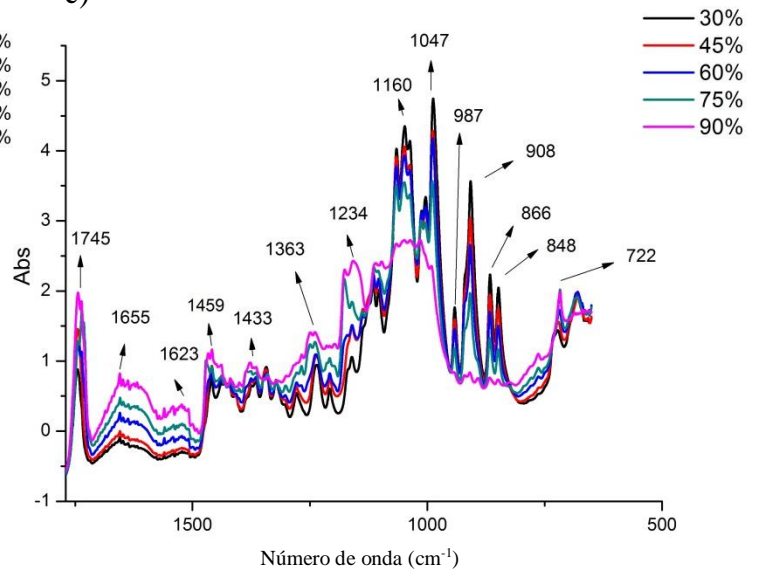
a)



b)



c)



### 3.2 Análise de componentes principais (ACP)

Os dois primeiros componentes principais explicaram 90,18% da variância total dos dados obtidos com NIR para as diferentes concentrações de sólidos de cacau, sendo 87,93% para CP1 e 2,25% para CP2. Para os dados referentes ao FTIR-ATR, CP1 representou 89,31% enquanto CP2 explicou 2,96%, totalizando 92,27% da variância dos dados.

O elevado percentual de explicação permite atestar a qualidade da aproximação da transformação do conjunto original das variáveis, as absorvâncias associadas aos modos vibracionais em NIR e FTIR-ATR em componentes principais. Além disso, observa-se que um dos objetivos da ACP foi alcançado com êxito pela redução de 10 e 18 variáveis originais para NIR e MIR, respectivamente, para apenas duas variáveis, CP1 e CP2, com menor perda de informação possível. A partir desses resultados é possível avaliar o agrupamento das amostras de chocolate mediante exames visuais em dispersões gráficas no espaço bidimensional (Figura 3), o que não é possível a partir das variáveis originais sem que perda significativa das informações ocorresse.

O CP1 foi o componente que melhor representou a distribuição dos dados, ou seja, o responsável pela separação das amostras com relação ao conteúdo de sólidos de cacau. Tanto para dados do NIR quanto para o FTIR-ATR, CP1 correlacionou-se de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) com todas as bandas utilizadas como variáveis. Isso demonstra que os componentes químicos que vibram nessas bandas (Figuras 1 e 2) variaram a ponto de promover a separação das amostras.

A CP2 para o NIR correlacionou-se de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) com os comprimentos de onda 1210nm, 1728nm, 1762nm e 1939nm, relacionados a lipídeos e água. Para FTIR-ATR a correlação significativa ( $p < 0,05$ ) desse componente principal se deu com os números de onda  $3324\text{cm}^{-1}$ ,  $2922\text{cm}^{-1}$ ,  $2853\text{cm}^{-1}$ ,  $1745\text{cm}^{-1}$ ,  $1459\text{cm}^{-1}$ , sendo estes comumente associados a carboidratos e lipídeos. Esse componente não foi suficiente para promover a separação das amostras, indicando que os grupos funcionais que vibram nessas bandas não variaram o suficiente para promover a distinção das amostras.

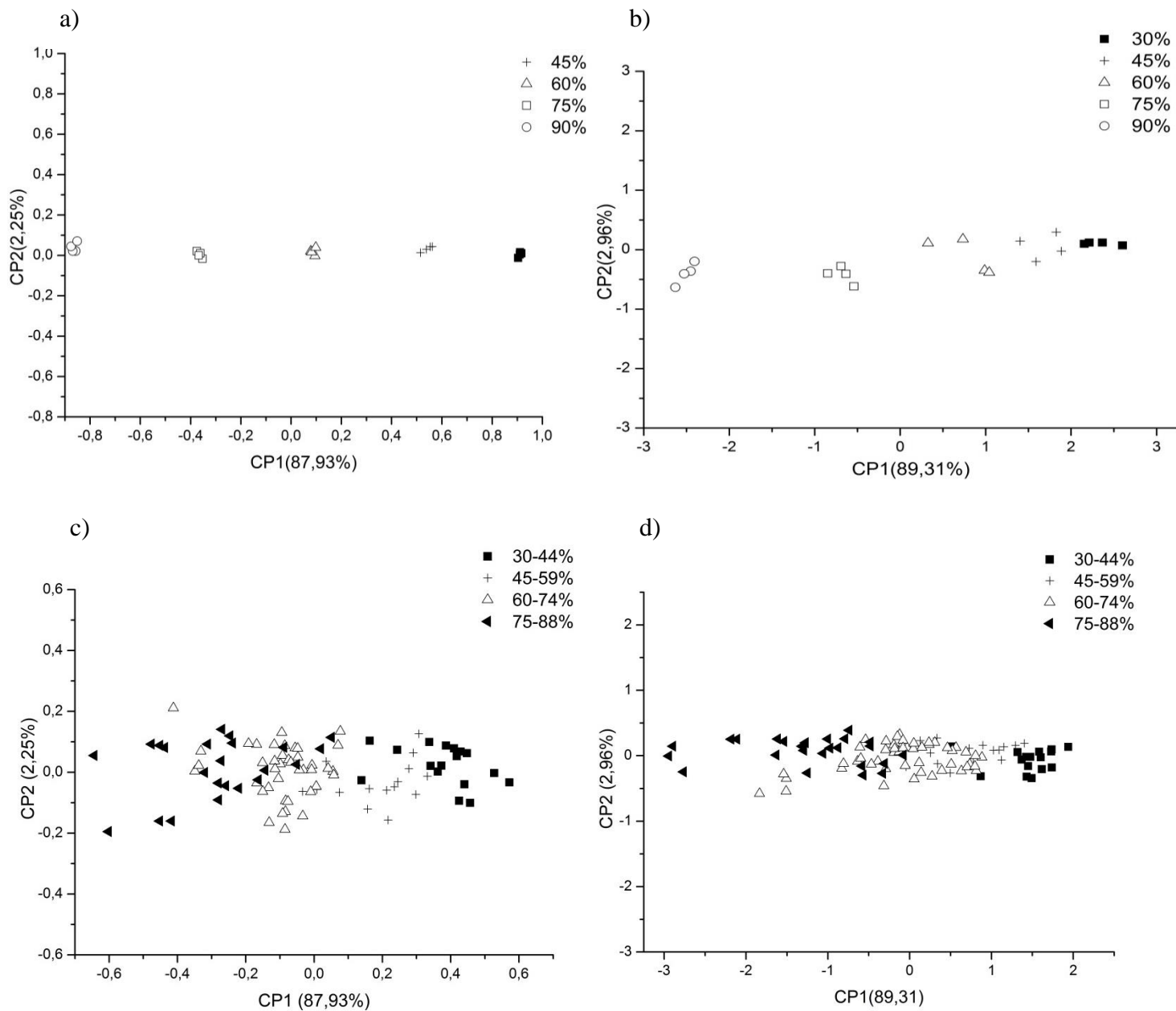
As Figuras 3a e 3b apresentaram a dispersão das amostras de chocolate produzidas usando os espectros do NIR e do FTIR-ATR. É possível verificar que a ACP conseguiu promover a formação de grupos relativos à concentração de sólidos de cacau em sua composição tanto para o NIR quanto para o FTIR-ATR. As Figuras 3c e 3d correspondem à dispersão das amostras comerciais de chocolates com diferentes porcentagens de sólidos de cacau, estas apresentaram um padrão de agrupamento menos homogêneo com relação aos sólidos de cacau do que o observado nas Figuras 3a e 3b referentes às amostras produzidas.



No entanto, o comportamento com relação a CP1 é o mesmo, amostras de chocolate com maior teor de sólidos de cacau continuam a apresentar menores escores em CP1 e amostras com menor teor de sólidos de cacau maior escores em CP1.

A menor homogeneidade nas amostras comerciais deriva possivelmente da diversidade de composição oriunda das formulações (presença ou não de leite, baunilha, dentre outros), da origem e variedade do cacau utilizado e das variações no beneficiamento do cacau e nos processos de produção do chocolate (tipo de equipamento, tempo, dentre outros). Além disso, nas amostras comerciais os valores de sólidos de cacau coletados foram os declarados no rótulo sem que a idoneidade das informações fornecidas pelo fornecedor fossem averiguadas, dessa forma, a menor homogeneidade dos grupos formados também pode ser atribuído a valores de sólidos de cacau declarados erroneamente nos rótulos das amostras de chocolate comerciais indicando a possibilidade de adulteração.

**Figura 3** – Gráfico de dispersão das amostras de chocolate para a ACP (a) NIR para chocolates produzidos (b) MIR para chocolates produzidos (c) NIR para chocolates comerciais (d) MIR para chocolates comerciais.



### 3.3 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

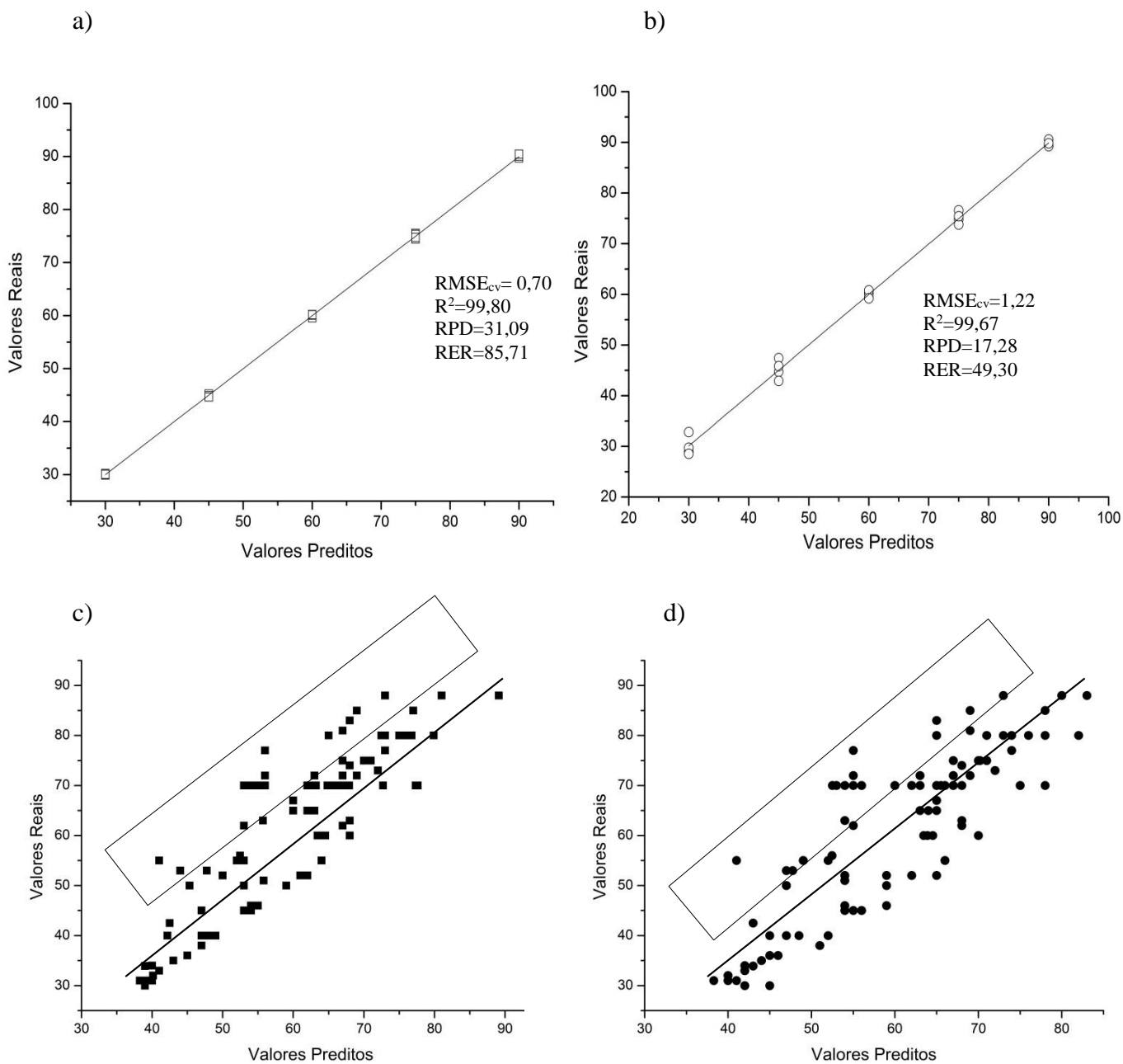
Os modelos PLS foram construídos com 5 e 3 variáveis latentes para os espectros obtidos no NIR e MIR, respectivamente. Sabe-se que quanto menor o número de variáveis latentes, maior a facilidade do modelo em prever os valores com um erro associado baixo e mais simples o modelo se torna. O modelo gerado por PLS para NIR exigiu um maior número de variáveis latentes para um melhor ajuste, entretanto, o modelo PLS gerado, assim como o do FTIR-ATR apresentou valores de RPD, RER e  $R^2$  e  $RMSE_{CV}$  satisfatórios.

Baixos valores de  $RMSE_{CV}$  e  $R^2 > 0,83$  garantem ao modelo uma excelente capacidade de predição e robustez. A relação entre o desempenho e o desvio (RPD) é uma medida da capacidade de um modelo prever um constituinte. Valores entre 2,0-2,5 possibilitam previsões quantitativas aproximadas, enquanto valores entre 2,5-3,0 e acima de 3,0 indicam uma previsão que pode ser considerada boa e excelente, respectivamente (ELFADL et al., 2010; QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2020). Rambo et al. (2016) consideram que valores de  $RER > 8,5$  indicam modelos confiáveis de alta previsibilidade. De acordo com essas classificações, os modelos ajustado por PLS para predição dos sólidos de cacau podem ser considerados excelentes.

As Figuras 4a e 4b apresentam o gráfico de correlação entre o conteúdo real de sólidos de cacau das amostras produzidas e os valores preditos pelo modelo para NIR e FTIR-ATR.

Após a construção dos modelos sua capacidade de generalização foi testada utilizando as amostras comerciais. Os gráficos de correlação entre os valores informados nas embalagens e os teores preditos pelos modelos estão apresentados na Figura 4c para o modelos NIR e 4d para o modelo FTIR-ATR. Em ambos os casos, 94 amostras de chocolate apresentaram teor de sólidos de cacau semelhante ou próximo aos informados no momento da compra ou no rótulo. Os modelos elaborados destacaram 16 amostras (em destaque na Figura 4c e 4d), que representam aproximadamente 14% das amostras coletadas, cujas porcentagens de sólidos de cacau destoaram em mais e 10% do teor informado pelo vendedor. Esses resultados sugerem que as porcentagens de cacau especificados nos rótulos dessas amostras não refletem o real valor presente de sólidos de cacau, indicando a possibilidade de adulteração. Além disso, os resultados indicam que ambos os modelos apresentaram ótima capacidade de predição, e que tanto o NIR quanto o FTIR-ATR podem ser utilizados para estimar o teor de sólidos de cacau em chocolates.

**Figura 4** – Gráfico de correlação para os valores reais e preditos pelo modelo PLS utilizando dados no (a) NIR para as amostras produzidas b) MIR para as amostras produzidas (c) NIR para chocolates comerciais (d) MIR para chocolates comerciais.



#### 4. Conclusão

A ACP foi eficaz na redução da dimensionalidade dos dados e através desta foi possível averiguar o comportamento característico das amostras de chocolate em termos dos sólidos de cacau. As amostras comerciais apresentaram um padrão de comportamento menos homogêneo que pode ser atribuído tanto a variações na composição destas amostras quanto a indicações errôneas do teor de sólidos de cacau. A aplicação da PLS ao conjunto de dados tanto do NIR quanto do FTIR-ATR foram capazes de fornecer modelos com excelente capacidade de predição e de generalização para amostras comerciais, destacando 16 amostras comerciais que possivelmente não apresentam o teor de sólidos de cacau compatível com o teor apresentado no rótulo. Esses resultados indicam que a Espectroscopia no Infravermelho é uma ferramenta adequada para a identificação dos sólidos de cacau ajudando na determinação rápida desse teor no controle de qualidade de chocolates, garantindo ao consumidor a autenticidade do produto adquirido.

#### Referências

- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. 2 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2016.
- BATISTA, N. N.; ANDRADE, D. P.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. **Food Research International**, v. 90, p. 313-319, 2016.
- CAMBRAI, A.; MARCIC, C.; MORVILLE, S.; HOUER, P. S.; BINDLER, F.; MARCHIONI, E. Differentiation of chocolates according to the cocoa's geographical origin using chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1478-1483, 2010.
- COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, v.1, p. 1-23, 2006.
- DAVIES, A. M. C.; FRANKLIN, J. G.; GRANT, A.; GRIFFITHS, N. M.; SHEPHERD, R.; FENWICK, G. R. Prediction of chocolate quality from near-infrared spectroscopic measurements of the raw cocoa beans. **Vibrational spectroscopy**, v. 2, p.161-172, 1991.
- EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 14, p. 181-201, 2011.
- ELFADL, E.; REINBRECHT, C.; CLAUPEIN, W. Development of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibration model for estimation of oil content in a worldwide safflower germplasm collection. **International Journal of Plant Protection**, v. 4, p. 259–270, 2010.
- ENGESETH, N. J.; PANGAN, M. F. A. Current context on chocolate flavor development - a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 21, p. 84-91, 2018.

- FILHO, P.A.C. Rapid determination of sucrose in chocolate mass using near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, p. 206-211, 2009.
- HELPER, G. A.; BOCK, F.; MARDER, L.; FURTADO, J. C.; COSTA, A. B. D.; FERRÃO, M. F. Chemostat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados, **Química Nova**, v.38, p.575-579, 2015.
- HU, Y.; PAN, Z. J.; LIAO, W., Li, J.; GRUGET, P.; KITTS, D. D.; LU, X. Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.202, p.254–261, 2016.
- KRÄHMER, A.; ENGEL, A.; KADOW, D.; ALI, N.; UMAHARAN, P.; KROH, L.; SCHULZ, H. Fast and neat–determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 181, p. 152-159, 2015.
- LÓPEZ, M.G.; GARCÍA-GONZÁLEZ, A.S.; FRANCO-ROBLES, E. Carbohydrate analysis by NIRS-Chemometrics. **Developments in Near-Infrared Spectroscopy**, v. 10, p. 67208, 2017.
- LIMA, A. B. S.; BATISTA, A. S.; JESUS, J. C.; SILVA, J.J.; ARAÚJO, A. C. M.; SANTOS, L. S. Fast quantitative detection of black pepper and cumin adulterations by near-infrared spectroscopy and multivariate modeling, **Food Control**, v.107, p.106802, 2020.
- LUCCAS, V.; BONOMI, É.C.; KIECKBUSCH, T. G. Comparative characterization between milk chocolates formulated with anhydrous milk fat and with milk fat stearin. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, p. 130-138, 2014.
- MAN, Y.B C.; SYAHARIZA, Z.A.; MIRGHANI, M.E.S.; JINAP, S.; BAKAR, J. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 90, p. 815-819, 2005.
- OLIVEIRA, D.N.; CAMARGO, A.C.B.; MELO, C. F.O.R.; CATHARINO, R.R. A fast semi-quantitative screening for cocoa content in chocolates using MALDI-MSI. **Food research international**, v. 103, p. 8-11, 2018.
- QUELAL-VÁSCONEZ, M.A. PÉREZ-ESTEVE, E. ARNAU-BONACHERA, A.; BARAT, J.M.; TALENS, P. Rapid fraud detection of cocoa powder with carob flour using near infrared spectroscopy. **Food control**, v. 92, p. 183-189, 2018.
- QUELAL-VÁSCONEZ, M.A.; LERMA-GARCÍA, M.J.; PÉREZ-ESTEVE, É.; ARNAU-BONACHERA.; A. BARAT.; J. M.; TALENS, P. Fast detection of cocoa shell in cocoa powders by near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Food Control**, v. 99, p.68-72, 2019.
- QUELAL-VÁSCONEZ, M.A.; LERMA-GARCÍA, M.J.; PÉREZ-ESTEVE, E.; ARNAU-BONACHERA, A.; BARAT, J.M.; TALENS, P. Changes in methylxanthines and flavanols during cocoa powder processing and their quantification by near-infrared spectroscopy. **Food Science and Technology**, v. 117, p.1-8, 2020.
- RAMBO, M.K.D.; FERREIRA, M.M.C.; AMORIM, E.P. Multi-product calibration models using NIR spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.151, p.108-114, 2016.

SUN, D-W. **Modern Techniques for Food Authentication**. 2 ed. Canada: Academic Press, 2008.

TEYE, E.; HUANG, X-Y.; LEI, W.; DAI, HUANG. Feasibility study on the use of Fourier transform near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate and quantify adulteration in cocoa beans. **Food research international**, v. 55, p. 288-293, 2014.

# **Capítulo IV**

---

## **Artigo 2**

---



**PREDIÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DE CACAU EM CHOCOLATES  
UTILIZANDO COMPOSTOS BIOATIVOS E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE  
ASSOCIADOS À ANÁLISE MULTIVARIADA**

Ingrid Alves Santos<sup>a</sup>, Acsa Santos Batista<sup>a</sup>, Daniele Gomes Conceição<sup>a</sup>, Leandro Soares Santos<sup>a</sup>, Sibelli Passini Barbosa Ferrão<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil

**Resumo**

Objetivou-se determinar o teor de sólidos de cacau em chocolates utilizando o teor de compostos bioativos e sua capacidade antioxidante aliados à estatística multivariada. Para controle, foram produzidas 5 formulações com diferentes concentrações de sólidos de cacau (30%, 45%, 60%, 75% e 90%) e adquiridas 105 amostras comerciais com variadas concentrações de sólidos de cacau (30-88%). Os chocolates foram avaliados em relação aos compostos fenólicos totais, metilxantinas (teobromina e cafeína), fenólicos ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e capacidade antioxidante. Verificou-se que para todas as determinações realizadas as amostras produzidas apresentaram comportamento linear crescente. Os resultados foram submetidos às técnicas multivariadas de Análise de Componentes Principais (ACP) e Regressão Linear Múltipla (RLM). A ACP das 5 formulações produzidas formaram grupos distintos com relação às concentrações de cacau, e para os chocolates comerciais observou-se um padrão de comportamento semelhante às amostras produzidas. Para RLM a equação de regressão foi capaz de prever o conteúdo de sólidos de cacau dos chocolates comerciais e destacou 10% das amostras como possíveis produtos adulterados. Assim, a associação da análise multivariada aos compostos bioativos quantificados e à capacidade antioxidante das amostras mostrou-se uma estratégia eficaz para a identificação do teor de sólidos de cacau em chocolates.

**Palavras-chave:** Autenticidade, CLAE, compostos fenólicos, *Theobroma cacao*.

## 1. Introdução

O chocolate é definido como a mistura homogênea de um ou mais dos seguintes componentes: nibs de cacau, massa de cacau, torta de cacau, cacau em pó, com ou sem adição de manteiga de cacau e ingredientes opcionais permitidos e/ou agentes aromatizantes (*Codex Alimentarius*, 1981).

Entre os principais componentes dos chocolates estão cacau, açúcares, gorduras e leite que, utilizados em variadas proporções e em distintos processamentos, dão origem a produtos que vão dos mais amargos aos mais doces. Os primeiros se distinguem pela maior porcentagem de cacau e, portanto, maior quantidade de compostos fenólicos, substâncias bioativas consideradas importantes na prevenção de várias doenças. Já os muito doces têm menor conteúdo de cacau e são mais ricos em açúcares e gorduras (OLIVEIRA et al., 2018).

As substâncias bioativas presentes no cacau são transferidas ao chocolate em concentrações variáveis, dependendo da porcentagem de cacau. As metilxantinas (como teobromina e cafeína) e importantes grupos de polifenóis (epicatequina, catequinas, antocianinas e proantocianidinas), responsáveis pela sensação adstringente e gosto amargo das amêndoas de cacau e por consequência do chocolate (EFRAIM et al., 2011; BATISTA et al., 2016), são exemplos dessas substâncias. Os compostos fenólicos têm sido largamente estudados em razão dos efeitos benéficos que propiciam à saúde, como uma potente capacidade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres, além disso, esses compostos ocasionam uma série de implicações protetoras sobre o sistema cardiovascular e também atuam na prevenção da deterioração da função cognitiva com o envelhecimento (HU et al., 2016).

As moléculas provenientes do cacau podem ser utilizadas como marcadores químicos e por meio do monitoramento dessas com o auxílio de ferramentas estatísticas é possível estabelecer uma correlação para determinar o teor de sólidos de cacau presente em chocolates. O desenvolvimento de métodos para análise de matérias-primas e produtos acabados tem sido extensamente pesquisado visando o monitoramento do processo produtivo a fim de garantir a qualidade dos produtos fornecidos ao consumidor (OLIVEIRA et al., 2018).

A determinação da autenticidade dos chocolates é uma questão importante para a indústria de alimentos que visa o controle dos teores de cacau em seus produtos inclusive para atender às exigências dos mercados internacionais e para os consumidores lesados através da falsa rotulagem de chocolates com menores teores de cacau comercializados por valores mais elevados (ACIERNO et al., 2016).

Objetivou-se com este estudo avaliar teor de compostos fenólicos totais, metilxantinas, fenólicos ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e capacidade antioxidante em chocolates aliados à estatística multivariada para classificar com segurança amostras de chocolate com diferentes concentrações de sólidos de cacau e verificar a autenticidade de chocolates comerciais.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Produção dos chocolates

Foram processadas cinco formulações de chocolate com diferentes concentrações de sólidos de cacau: 30%, 45%, 60%, 75% e 90% a fim de obter uma faixa de representação para amostras comerciais. As porcentagens de lecitina de soja, leite em pó e manteiga de cacau permaneceram fixas, enquanto os teores de açúcar e nibs de cacau variaram de acordo com a formulação (Tabela 1). Foram produzidas 4 repetições de cada formulação, perfazendo um total de 20 unidades experimentais.

**Tabela 1-** Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos chocolates.

Formulações	Ingredientes				
	Nibs	Manteiga de cacau	Leite em pó	Açúcar	Lecitina
<b>30%</b>	22%	8%	7%	62,6%	0,4%
<b>45%</b>	37%	8%	7%	47,6%	0,4%
<b>60%</b>	52%	8%	7%	32,6%	0,4%
<b>75%</b>	67%	8%	7%	17,6%	0,4%
<b>90%</b>	82%	8%	7%	2,6%	0,4%

O nibs de cacau (cacau Forasteiro variedade Parasinho, Floresta Azul, BA, Brasil) foi produzido a partir da amêndoa do cacau que após atingir um índice de fermentação de 87% foi submetida a secagem até umidade de 7% e posterior torra em dois estágios: 100°C por 1h e 50 min; e 120°C por aproximadamente 20 min até atingir uma umidade final de 2%.

O nibs de cacau, o açúcar refinado (União, Araquari, SC, Brasil) e o leite em pó integral (Nestlé, Ituiutaba, MG, Brasil) foram transferidos para um equipamento de multifunções Melanger (Spectra 11, Coimbatone, Índia), onde foram realizadas as operações de mistura dos ingredientes, refino e conchagem, onde a massa de cada formulação permaneceu por 24 horas. Após 4 horas de refino, metade da manteiga de cacau (Barry Callebaut, Ilhéus, BA, Brasil) foi acrescentada nas formulações e o restante após 10 horas. A lecitina de soja (Tradal Brazil Comp. Imp. e Exp. Ltda, São Paulo, Brasil) foi adicionada aproximadamente 2 horas antes da finalização da conchagem.

A massa conchada foi conduzida para o processo de temperagem, em temperadeira mini chocomachine (Finamac, São Paulo, Brasil), onde permaneceu por 1h e 30 min em constante agitação, até o resfriamento a 29°C, para finalização da temperagem do chocolate. Posteriormente, foi realizado o reaquecimento da massa à temperatura de 31°C-33°C para que os cristais instáveis formados fossem fundidos. Essa massa obtida da têmpera foi transferida para formas de policarbonato para moldagem dos chocolates e mantidas à temperatura de 8°C por 12 horas. Após resfriados, os chocolates foram embalados e armazenados sob temperatura de 18°C.

## **2.2 Obtenção das amostras comerciais**

Para verificação do teor de sólidos de cacau em amostras comerciais foram adquiridas 105 amostras de chocolate de diferentes marcas em estabelecimentos comerciais situados no Brasil nos estados da Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina, em Portugal e nos Emirados Árabes Unidos. A concentração de cacau informada no rótulo dessas amostras variou de 30% a 88%. Destas 105 amostras, 78 foram produzidas no Brasil, 15 na Suíça, 3 na Alemanha, 2 na Holanda, 2 na Polônia, 1 em Portugal, 1 nos Estados Unidos, 1 nos Emirados Árabes Unidos, 1 na Itália e 1 na Bélgica. Para facilitar a interpretação dos resultados, as amostras foram divididas em grupos, das 105, 17 apresentavam uma variação de sólidos de cacau de 30% a 44%, 18 de 45% a 59%, 48 de 60% a 74% e 22 de 75% a 88%.

## **2.3 Determinação de Constituintes Fenólicos Totais (CFT)**

Os CFT dos chocolates foram determinados de acordo com a ISO 14502-1 (2005), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A extração dos compostos fenólicos foi feita em solvente aquoso, adaptado de Lee et al. (2003). Foram pesadas 2 g de chocolate e adicionados 10 mL de água destilada a 40°C para diluição das amostras. Uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e em seguida repassadas para tubos de ensaio, adicionando-se 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10%. A mistura permaneceu em repouso por 8 minutos e após este período foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4%. Após a incubação por 2 horas à temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800, Japão) a 773 nm. Uma curva de calibração ( $Y = 10,487x + 0,06$ ), na faixa de 0,01–0,09 mg de ácido gálico.mL<sup>-1</sup> foi utilizada para quantificação e mostrou boa linearidade ( $R^2 = 0,99$ ). Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG.100g<sup>-1</sup> de amostra).

## **2.4 Determinação da capacidade antioxidante - Método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

A capacidade antioxidante dos chocolates foi avaliada utilizando-se o método adaptado de Brand-Williams (1995). Nesse ensaio, 100 µL da amostra diluída em água destilada (1g:125mL) foram adicionados a 3,9 mL da solução radical DPPH (0,06 mM) e armazenados no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). A capacidade de eliminação de radicais livres foi então avaliada medindo a absorvância a 515 nm em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800, Japão). Uma curva de calibração ( $Y = 230,43x + 9$ ), na faixa de 0,02–0,4 mg Trolox.mL<sup>-1</sup>, foi utilizada para quantificação da atividade antioxidante e mostrou boa linearidade ( $R^2 = 0,98$ ). Os resultados foram expressos como mg Trolox.mL<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em triplicata.

## **2.5 Quantificação de Teobromina, Cafeína, Epicatequina e Catequina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Foram pesadas aproximadamente 0,02 g de cada amostra de chocolate, adicionados 5 mL de solução extratora (85% H<sub>2</sub>O, acidificado com 0,3% de ácido acético, e 15% Metanol) em tubos de ensaio e mantidos sob agitação por 15 minutos em banho ultrassônico (Sanders medical, SoniClean 6, Brasil). Na sequência, os tubos foram colocados em banho termostático (Tecnal, Te-2005, Brasil) a 60°C por 10 minutos e centrifugados (SP Labor, Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a 3000 g por 15 minutos para separação. O extrato foi filtrado com filtros (Syringe Filter, PVDF030N022I, Taiwan) estéreis de 0,22 µm.

Os alcaloides xantínicos (cafeína e teobromina) e compostos fenólicos majoritários do cacau ((+)-catequina e (-)-epicatequina) foram quantificados por meio do sistema HPLC-SHIMADZU DGU-20A5R composto por uma coluna Shim-pack PREP-ODS(H)KIT, 250x4,6 mm, comprimento de onda 280 nm, fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µm. A corrida foi realizada no modo gradiente, com as seguintes fases móveis: A (Metanol) e B (H<sub>2</sub>O ultrapura com 0,3% de ácido acético) com um tempo total de corrida de 28 minutos (RISNER, 2008).

## **2.6 Planejamento experimental**

O delineamento experimental utilizado para obtenção e análise dos dados de compostos fenólicos totais, metilxantinas, fenólicos ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e capacidade antioxidante dos chocolates foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em quatro repetições com cinco tratamentos (30%, 45%, 60%, 75% e 90% de sólidos de cacau). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os resultados das medidas realizadas nas amostras produzidas foram submetidas à análise de regressão em função dos tratamentos à 5% de significância com o objetivo de conhecer o comportamento das determinações em função do teor de sólidos totais. Os modelos matemáticos foram escolhidos de acordo com os efeitos significativos do modelo proposto ( $p \leq 0,05$ ), falta de ajustamento não significativa ( $p > 0,05$ ) e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) em relação ao  $SQ_{TRAT}$ . Para a determinação da contribuição dos compostos bioativos determinados com a capacidade antioxidante das amostras estudadas, foi realizada a análise de correlação.

Os resultados das quantificações das amostras produzidas e comerciais foram submetidos às análises multivariadas com o auxílio do software Statistical Analysis System (SAS), versão University Edition.

## **2.7 Análises Multivariadas**

### **2.7.1 Análise de componentes principais (ACP)**

A análise de componentes principais (ACP) foi usada para identificar as inter-relações entre as amostras e os possíveis agrupamentos, selecionar os dados experimentais adequados para a construção do modelo e identificar e eliminar os valores extremos. O número de componentes principais foi escolhido pela avaliação da variância cumulativa, onde foram escolhidos os primeiros CP's, acumulando um percentual de variância maior que 70%. A análise foi realizada utilizando os procedimentos PROC PRINCOMP e PROC CORR. Os gráficos de dispersão dos coeficientes de correlação entre as variáveis e CP foram realizados no programa OriginPro, versão 8.0, no espaço bidimensional.

### **2.7.2 Regressão linear múltipla (RLM)**

O teor de sólidos de cacau foi correlacionado com as informações da CLAE, dos CFT e da capacidade antioxidante pelo método de RLM. Para calibração do modelo foi utilizado o método de validação cruzada (cross validate).

O modelo RLM foi testado de acordo com a Equação 1.

$$y = \beta_0 + \beta_1 \times x_1 + \dots + \beta_n \times x_n + \varepsilon \quad \text{Equação 1}$$

Onde:  $y$  = resposta ou variável dependente;  $\beta_0$  = constante (intercepto);  $x_1 \dots x_n$  = variáveis explicativas ou independentes;  $\beta_1 \dots \beta_n$  = parâmetros do modelo (coeficientes de regressão);  $\varepsilon$  = erros do modelo.

Três métodos de otimização foram testados: *Backward*, *Forward* e *Stepwise*. O desempenho dos modelos obtidos foi avaliado de acordo com a raiz quadrada do erro médio (RMSE), a relação de desempenho para desvio (RPD) e razão de erro de intervalo (RER) (LIMA et al., 2020).

Após a escolha do método, o modelo construído com as amostras produzidas foi utilizado para determinar o teor de sólidos de cacau em amostras comerciais.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Teor de compostos fenólicos totais, metilxantinas, fenólicos e capacidade antioxidante das amostras produzidas

As equações de regressão ajustadas para o teor de compostos fenólicos totais, fenólicos ((+)-catequina e (-)-epicatequina), metilxantinas (teobromina e cafeína) e capacidade antioxidante das cinco formulações de chocolate estudadas estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Compostos fenólicos totais, metilxantinas, fenólicos e capacidade antioxidante dos chocolates produzidos (valores mínimos, valores máximos, equações de regressão ajustadas e coeficientes de determinação ( $R^2$ )).

Variáveis	Mínimos-Máximos	Equação estimada	$R^2$
Compostos fenólicos totais (mg.g <sup>-1</sup> )	3,75-24,43	$\hat{Y} = 0,3406x - 6,6233$	0,97
Capacidade antioxidante (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,06-0,16	$\hat{Y} = 0,0014x + 0,0323$	0,83
Teobromina (mg.g <sup>-1</sup> )	5,12-15,71	$\hat{Y} = 0,1919x - 0,9964$	0,95
Cafeína (mg.g <sup>-1</sup> )	3,29-9,36	$\hat{Y} = 0,1081x + 0,0404$	0,85
Epicatequina (mg.g <sup>-1</sup> )	0,24-0,74	$\hat{Y} = 0,0089x - 0,0563$	0,84
Catequina (mg.g <sup>-1</sup> )	0,18-0,47	$\hat{Y} = 0,0052x + 0,0492$	0,70

Os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante apresentaram um efeito linear crescente, justificado pelo aumento dos sólidos de cacau nas formulações.

Os teores de polifenóis presentes nos chocolates produzidos variaram entre 3,75 mg.g<sup>-1</sup> EAG e 24,43 mg.g<sup>-1</sup> EAG. Segundo Oracz et al. (2019) o cacau é uma fonte valiosa de

substâncias bioativas constituindo-se como uma das fontes naturais mais ricas em compostos fenólicos (principalmente epicatequina, catequina e procianidinas). Os fenólicos do cacau podem variar de acordo com a origem geográfica, a variedade da planta, o clima, o tipo de solo, a região de plantio, fatores agrônômicos e ambientais. As diferentes etapas da transformação do cacau em chocolate também podem influenciar no teor de polifenóis dos produtos finais, fatores de processo.

Os polifenóis do cacau são os responsáveis pela capacidade antioxidante dos chocolates, e para as amostras produzidas a capacidade antioxidante variou entre 0,06 mg Tolox.mL<sup>-1</sup> e 0,16 mg Tolox.mL<sup>-1</sup>. Os fenólicos atuam como sequestradores de radicais livres e quelantes de metais, apresentando ação tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo. Além disso, o cacau pode ser uma fonte de poliaminas, que também contribuem para a atividade antioxidante do cacau (ZANCHETT et al., 2016; ORACZ et al., 2019).

Os resultados da CLAE para fenólicos e metilxantinas também apresentaram um crescimento linear com o aumento dos sólidos de cacau. As metilxantinas teobromina e cafeína variaram entre 5,12-15,71 mg.g<sup>-1</sup> e 3,29-9,36 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente. O chocolate possui elevadas concentrações de metilxantinas, principalmente teobromina e em menores concentrações, a cafeína, que além de possuir leve ação antioxidante, funcionam também como estimulante do sistema nervoso central e como relaxadores musculares, tendo ampla aplicação no tratamento de doenças do trato respiratório (MITCHELL et al., 2011; FRANCO et al., 2013). Estes resultados são compatíveis aos obtidos por Tan et al. (2019) que ao determinarem o teor de metilxantinas em chocolates amargos observaram que quanto maior o teor de cacau, mais teobromina e cafeína o produto irá conter.

Os compostos fenólicos (+)-catequina e (-)-epicatequina apresentaram teores que variaram entre 0,18-0,47 mg.g<sup>-1</sup> e 0,24-0,74 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente. A epicatequina mostrou-se predominante, com valores de concentração superiores aos da catequina. Segundo Rusconi e Conti (2010) a epicatequina é o principal flavan-3-ol encontrado no cacau e no chocolate. Deve-se levar em consideração, porém, que a concentração destes constituintes individuais no chocolate também são dependentes de diversos fatores, como: variedade genética dos frutos, procedimentos pós colheita e as etapas de processamento do chocolate.

A relação dos bioativos determinados para todos os chocolates com a capacidade antioxidante foi avaliada através análise de correlação, os resultados estão apresentados na Tabelas 3.



**Tabela 3** - Correlação das variáveis: compostos fenólicos totais, teobromina, cafeína, epicatequina e catequina com a capacidade antioxidante para os chocolates comerciais e produzidos.

Variáveis	Correlação
Compostos fenólicos totais	0,55*
Teobromina	0,10 <sup>ns</sup>
Cafeína	0,11 <sup>ns</sup>
Epicatequina	0,14 <sup>ns</sup>
Catequina	0,10 <sup>ns</sup>

\*=F significativo ao nível de 5%; ns= F não significativo ao nível de 5%.

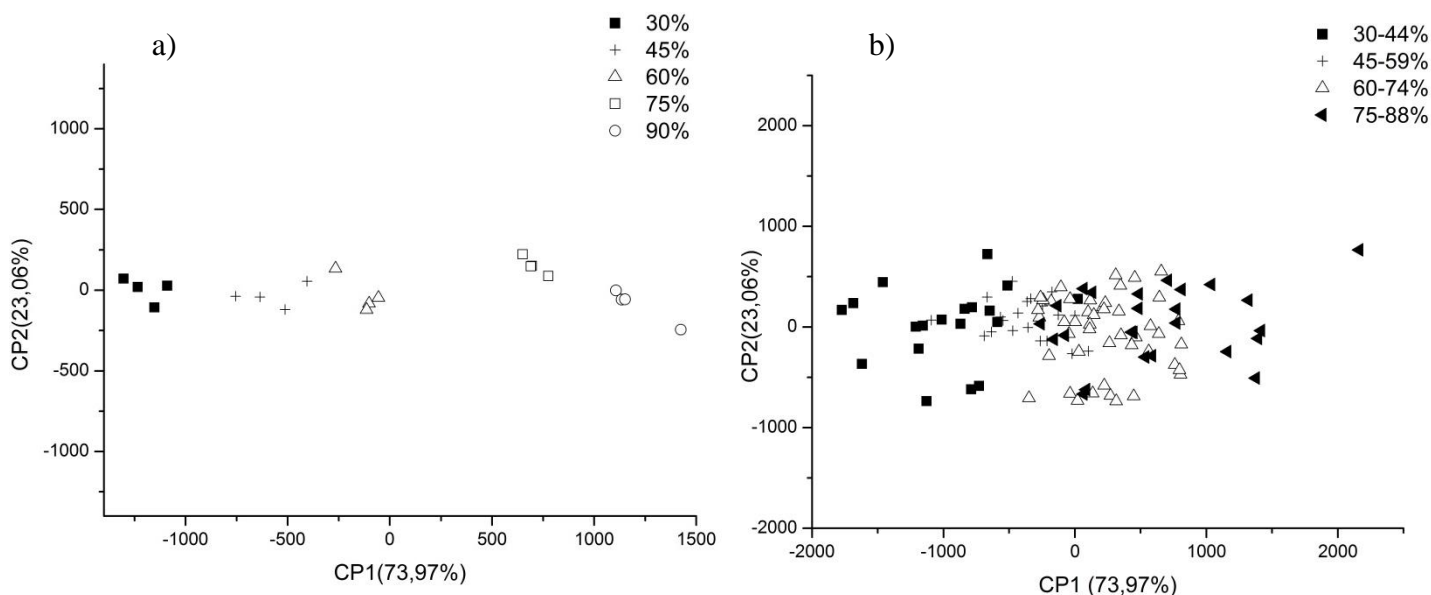
A capacidade antioxidante das amostras estudadas apresentou correlação significativa moderada (entre 0,5 e 0,7) com os compostos fenólicos totais. A capacidade de inibir a formação de radicais livres não depende apenas da quantidade de fenólicos, mas também dos tipos de compostos, posição de hidroxilas e anéis aromáticos. Portanto, pode não haver correlação forte (maior que 0,9) entre o conteúdo de fenólicos totais e a ação antioxidante de uma amostra (HUANG et al. 2005).

As metilxantinas (teobromina e cafeína) assim como os fenólicos individuais ((+)-catequina e (-)-epicatequina) estudados não apresentaram correlação significativa com a capacidade antioxidante para o conjunto de amostras estudado. Estes resultados indicam que para além das catequinas e metilxantinas, outras moléculas capazes de sequestrar radicais livres encontram-se presentes nos chocolates. Além disso, a ação antioxidante pode estar associada a interações químicas (sinergismo, antagonismo e efeitos adicionais) entre vários compostos fenólicos presentes no chocolate, como em qualquer matriz alimentícia (ZIELINSKI et al., 2019).

### 3.2 Análise de componentes principais (ACP)

Os dois primeiros componentes principais explicaram 97,07% da variância total dos dados obtidos com as determinações de fenólicos totais, CLAE ((+)-catequina, (-)-epicatequina, teobromina e cafeína) e capacidade antioxidante. Esse elevado percentual de explicação constata a qualidade da aproximação em relação à transformação do conjunto de dados originais para as variáveis componentes principais.

**Figura 1** – Gráfico de dispersão das amostras de chocolate para a ACP dos (a) chocolates produzidos (b) chocolates comerciais.



Com isso, por meio da ACP foi possível reduzir com menor perda de informação possível de 6 variáveis originais para apenas 2, os CP's, permitindo o agrupamento das amostras de chocolate por meio da dispersão gráfica no espaço bidimensional, o que não é possível a partir das variáveis originais sem a perda significativa de informações.

O CP1 foi responsável pela separação das amostras com relação à concentração de sólidos de cacau, tanto para as amostras produzidas (Figura 1a) quanto para as comerciais (Figura 1b). Observou-se que à medida com que CP1 apresentou maiores escores, maiores foram os teores de sólidos de cacau das amostras (Figura 1). Esse componente correlacionou-se positivamente e de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) com os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante, indicando que quanto maior o escore de CP1, maior o teor de fenólicos totais e a ação antioxidante das amostras.

O CP2 correlacionou-se positivamente ( $p < 0,05$ ) com os teores de catequina, epicatequina, teobromina e cafeína, demonstrando que essas determinações não variaram o suficiente para promover a distinção das amostras.

Os resultados demonstraram que embora os compostos fenólicos totais possam variar de acordo com diversos fatores, estes, aliados à sua capacidade antioxidante constituíram-se como uma medida global do teor de sólidos de cacau presente nas amostras de chocolates produzidas e comerciais. Já as metilxantinas e fenólicos ((+)-catequina e (-)-epicatequina) determinadas pela CLAE não apresentaram um padrão de variação entre as amostras que fosse suficiente para indicar o teor de sólidos de cacau. É importante destacar que existe uma

gama extensa de compostos fenólicos presentes nos produtos derivados do cacau que não se restringem apenas as catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) determinados pela CLAE.

As amostras comerciais apresentaram uma dispersão menos homogênea que está relacionada, possivelmente, a diferenças existentes nas formulações (presença ou não de frutas, nozes, leite, baunilha, dentre outros ingredientes), na variedade do cacau utilizado e das variações no beneficiamento do cacau e nos processos de produção do chocolate (tipo de equipamento, tempo de processamento, dentre outras variáveis). Além disso, nas amostras comerciais os valores de sólidos de cacau utilizados para a ACP foram os declarados no rótulo sem que as informações contidas pelo produtor fossem averiguadas. Portanto, essa menor homogeneidade dos grupos formados também pode ser atribuída a valores de sólidos de cacau declarados erroneamente nos rótulos dos chocolates comerciais indicando a possibilidade de adulteração.

### 3.3 Regressão linear múltipla (RLM)

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de ajustes dos modelos preditivos para o teor de sólidos de cacau. Três métodos de otimização foram testados: *Backward*, *Forward* e *Stepwise*.

**Tabela 4** - Ajuste dos modelos preditivos de RLM para o teor de sólidos de cacau.

Método	Número de variáveis	RMSE	RPD	RER
Backward	2	3,08	7,07	19,50
Forward	3	2,93	7,44	20,51
Stepwise	2	2,94	7,38	20,40

Na técnica *Backward*, todos os preditores são incluídos de uma só vez na equação de regressão gerada e são retirados um por um, em ordem de maiores valores de probabilidade ( $p > 0,05$ ), até que os melhores preditores sejam identificados, ou seja, aqueles que apresentavam significância ( $p < 0,05$ ), além de baixa inflação da variância. Em *Forward*, a equação inicia com apenas um preditor e cada novo preditor que apresenta significância ( $p < 0,05$ ) é adicionado individualmente na equação até que todos os preditores adicionados sejam capazes de explicar o fenômeno em estudo. A técnica *Stepwise* é caracterizada por incluir preditores em blocos até que o melhor modelo gerado se ajuste aos dados (TABACHNICK e FIDELL, 2006). Observou-se um bom ajuste de modelos de predição sendo os modelos *Forward* e *Stepwise* os responsáveis pelos melhores parâmetros entre os modelos, com menores valores de RMSE e maiores valores de RPD e RER.

A relação entre o desempenho e o desvio (RPD) é uma medida da capacidade de um modelo prever um constituinte. Valores entre 2,0 e 2,5 possibilitam previsões quantitativas aproximadas, enquanto valores entre 2,5 e 3,0 e acima de 3,0 indicam uma previsão que pode ser considerada boa e excelente, respectivamente (QUELAL-VÁSCONEZ et al., 2020). De acordo com essa classificação, o modelo ajustado por RLM por *Forward e Stepwise* para predição dos sólidos de cacau pode ser considerado excelente.

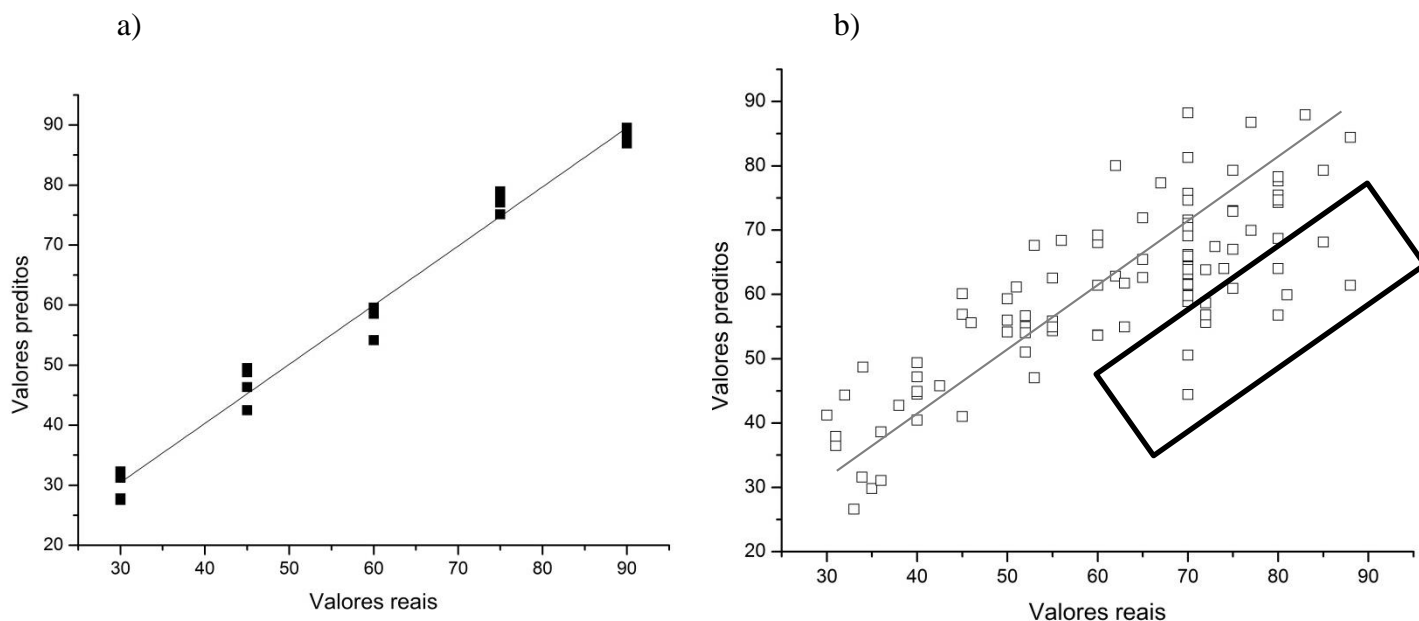
De acordo com Williams e Sobering (1993), valor de RER é obtido calculando a divisão da amplitude de concentração de um analito pelo erro quadrático médio, onde um modelo com valores de intervalo de erros (RER) <3 tem pequena capacidade preditiva, modelos com RER entre 3 e 10 têm utilidade prática moderada, e valores de RER > 10 indicam boa utilidade prática. Rambo et al. (2016) consideram ainda que valores de RER > 8,5 indicam modelos confiáveis de alta previsibilidade. Assim, pelos valores do RER, o modelo predito por RLM tanto para *Forward* quanto para *Stepwise* indica alta previsibilidade.

As variáveis preditoras utilizadas para a construção do modelo *Forward* foram compostos fenólicos totais, cafeína e capacidade antioxidante. Para o modelo *Stepwise* as variáveis preditoras utilizadas para a construção do modelo foram compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante o que indica que apenas estas determinações foram satisfatórias para prever o teor de sólidos de cacau presente nas amostras de chocolate.

Visando a menor utilização de reagentes onerosos e maior facilidade de obtenção dos resultados bem como pela exigência de uma menor quantidade de análises, o modelo *Stepwise* foi escolhido para a predição dos sólidos de cacau em amostras comerciais. O modelo RLM sua capacidade de generalização foi testada utilizando as amostras comerciais. Os gráficos de correlação entre os valores informados nas embalagens e os teores preditos pelos modelos foram gerados (Figura 2).

Um total de 94 amostras de chocolate apresentaram teor de sólidos de cacau semelhante ou próximo aos informados no rótulo. Por outro lado, 11 amostras (em destaque na Figura 2b) apresentaram concentrações de sólidos de cacau que destoaram em mais de 10% do teor informado pelo vendedor. Esses resultados sugerem que as porcentagens de cacau especificados nos rótulos dessas amostras não refletem o real valor presente de sólidos de cacau, indicando a possibilidade de adulteração. Além disso, os resultados indicam que o modelo apresentou ótima capacidade de predição, e que pode ser utilizado para estimar o teor de sólidos de cacau em chocolates.

**Figura 2** – Gráfico de correlação para os valores reais e preditos pelo modelo RLM (a) para chocolates produzidos (b) para chocolates comerciais.



#### 4 Conclusão

A utilização das determinações químicas referentes aos compostos ativos associados à estatística multivariada mostrou-se como uma técnica eficaz para a determinação do teor de sólidos de cacau. A ACP foi eficaz na redução da dimensionalidade dos dados e através desta foi possível analisar o comportamento característico das amostras de chocolate em termos dos sólidos de cacau. O modelo RLM criado a partir das amostras produzidas com diferentes teores de sólidos de cacau apresentou uma excelente capacidade de predição e de generalização para amostras comerciais destacando aproximadamente 10% dos chocolates como possíveis amostras cujo teor de sólidos de cacau fornecido ao consumidor não condiz com o valor real. O modelo desenvolvido pode ser uma ferramenta utilizada para o controle de qualidade de chocolates.

#### Referências

- ACIERNO, V.; YENER, S.; ALEWIJN, M.; BIASIOLI, F.; RUTH, S. Factors contributing to the variation in the volatile composition of chocolate: Botanical and geographical origins of the cocoa beans, and brand-related formulation and processing. **Food Research International**, v. 84, p. 86-95, 2016.
- BATISTA, N. N.; ANDRADE, D. P.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. **Food Research International**, v. 90, p. 313-319, 2016.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CODEX ALIMENTARIUS. Standard for chocolate and chocolate products. CODEX STAN 87 – 1981. Disponível em: <[http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS\\_087e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS_087e.pdf)> Acesso em: 14 de abril de 2020.

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

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

HU, Y.; PAN, Z. J.; LIAO, W., Li, J.; GRUGET, P.; KITTS, D. D.; LU, X. Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.202, p.254–261, 2016.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

ISO, 2005. ISO14502-1: 2005 Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1. Content of total polyphenols in tea-colorimetric method using Folin–Ciocalteu reagent. **International Organization for Standardization**, Geneva, Switzerland.

LIMA, A. B. S.; BATISTA, A. S.; JESUS, J. C.; SILVA, J.J.; ARAÚJO, A. C. M.; SANTOS, L. S. Fast quantitative detection of black pepper and cumin adulterations by near-infrared spectroscopy and multivariate modeling, **Food Control**, v.107, p.106802, 2020.

MITCHELL, E. S.; SLETTENAAR, M.; Vd MEER, N.; TRANSLEER, C.; JANS, L.; QUADT, F.; BERRY, M. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. **Physiology & behavior**, v. 104, p.816-822, 2011.

OLIVEIRA, D.N.; CAMARGO, A.C.B.; MELO, C. F.O.R.; CATHARINO, R.R. A fast semi-quantitative screening for cocoa content in chocolates using MALDI-MSI. **Food research international**, v. 103, p. 8-11, 2018.

ORACZ, J.; NEBESNY, E.; ŻYŻELEWICZ, D. Identification and quantification of free and bound phenolic compounds contained in the high-molecular weight melanoidin fractions derived from two different types of cocoa beans by UHPLC-DAD-ESI-HR-MSn. **Food Research International**, v.115, p.135-149, 2019.

QUELAL-VÁSCONEZ, M.A.; LERMA-GARCÍA, M.J.; PÉREZ-ESTEVE, E.; ARNAU-BONACHERA, A.; BARAT, J.M.; TALENS, P. Changes in methylxanthines and flavanols during cocoa powder processing and their quantification by near-infrared spectroscopy. **Food Science and Technology**, v. 117, p.1-8, 2020.

RAMBO, M.K.D.; FERREIRA, M.M.C.; AMORIM, E.P. Multi-product calibration models using NIR spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.151, p.108-114, 2016.

RISNER, C. H. Simultaneous Determination of Theobromine, (+)-Catechin, Caffeine, and (-)-Epicatechin in Standard Reference Material Baking Chocolate 2384, Cocoa, Cocoa Beans, and Cocoa Butter. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 892-899, 2008.

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

TABACHNICK, B. G.; FIDELL, L. S. **Using Multivariate Statistics**. 5. ed. MA: Inc. Needham Heights, 2006.

TAN, J.; LI, R; JIANG, Z. T; TANG, S. H; WANG, Y. Rapid and non-destructive prediction of methylxanthine and cocoa solid contents in dark chocolate by synchronous front-face fluorescence spectroscopy and PLSR. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.77, p.20-27, 2019.

WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D. C. Comparison of Commercial near Infrared Transmittance and Reflectance Instruments for Analysis of Whole Grains and Seeds. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 1, p. 25–32, 1993.

ZANCHETT, C. S.; MIGNONI, M.C.; BARRO, N. P. R.; ROSA, C. D. Development of white chocolate with yerba mate extract. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, p.1-8, 2016.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I. ; BETA, T. . Evaluation of the Phenolics and in vitro Antioxidant Activity of Different Botanical Herbals Used for Tea Infusions in Brazil. **CURRENT NUTRITION AND FOOD SCIENCE**, v. 15, p. 345-352, 2019.