

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**ALISSON ADAUTO SANT' ANA RODRIGUES**

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DA  
TEOBROMINA E CAFEÍNA EM AMOSTRAS DE CHOCOLATES COM DISTINTAS  
PORCENTAGENS DE CACAU POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA**

**LONDRINA**

**2022**

**ALISSON ADAUTO SANT' ANA RODRIGUES**

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DA  
TEOBROMINA E CAFEÍNA EM AMOSTRAS DE CHOCOLATES COM DISTINTAS  
PORCENTAGENS DE CACAU POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

**Application Of Different Methodologies for The Extraction of Theobromine and  
Caffeine in Samples of Chocolates with Different Percentages of Cocoa by  
Liquid Chromatography**

Trabalho de Conclusão de Curso de  
graduação apresentado como requisito para  
obtenção do título de Licenciado em Química  
da Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná (UTFPR), Câmpus Londrina.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vanessa Kienen  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Amélia Elena  
Terrile

**LONDRINA**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento do trabalho, mesmo para fins comerciais, sem a possibilidade de alterá-lo, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**ALISSON ADAUTO SANT' ANA RODRIGUES**

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DA  
TEOBROMINA E CAFEÍNA EM AMOSTRAS DE CHOCOLATES COM DISTINTAS  
PORCENTAGENS DE CACAU POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso de  
graduação apresentado como requisito para  
obtenção do título de Licenciado em Química  
da Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná (UTFPR), Câmpus Londrina.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vanessa Kienen  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Amélia Elena  
Terrile

Data de aprovação: 28/junho/2022

---

Vanessa Kienen  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Amélia Elena Terrile  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Fábio Vandresen  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Julliana Izabelle Simionato  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**LONDRINA**

**2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado força e sabedoria nessa árdua jornada acadêmica.

Aos meus pais que me incentivaram desde muito cedo a cursar um ensino superior, e se mantiveram ao meu lado em todos os momentos me amparando, independente das dificuldades.

As professoras Dra. Vanessa Kienen e Dra. Amélia Terrile por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa e ter contribuído de forma construtiva durante toda a minha graduação.

Também quero agradecer à Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela elevada qualidade do ensino oferecido.

## RESUMO

O chocolate é um produto feito com base na amêndoa fermentada e torrada do cacau, é um dos alimentos mais consumidos no mundo. Existe uma grande variedade de chocolates, dentre eles temos: chocolate ao leite, amargo, em pó, achocolatado, etc. Como esses produtos são de fácil acesso para o consumidor, acabam sendo o principal alimento fornecedor de teobromina. Do mesmo modo a cafeína é encontrada de forma natural na amêndoa do cacau, e conseqüentemente em chocolates. Esse trabalho visa determinar concentrações dos alcaloides 3,7-dimetilxantina e 1,3,7-trimetilxantina, usualmente conhecidas como teobromina e cafeína respectivamente, pelo Método de Extração 1 com ácido clorídrico e reagentes clarificantes e pelo Método de Extração 2 com hidróxido de sódio e diclorometano em amostras de produtos feitos com base na amêndoa fermentada e torrada do cacau por Cromatografia Líquida com detector de arranjo de diodos. Diante disso, foram analisadas amostras de barras de chocolate com distintas porcentagens de cacau, sendo elas: 34%, 55%, 65%, 70% e 85%. As determinações analíticas pelo método cromatográfico apresentaram concentrações de teobromina de 57,34; 156,99; 184,21; 255,47; 323,37 mg g<sup>-1</sup> respectivamente as porcentagens e concentrações de cafeína de 9,58; 38,43; 54,54; 69,55; 89,89 mg g<sup>-1</sup> na devida ordem. Com esses resultados, pode-se verificar que à medida que a porcentagem de cacau aumenta, as concentrações de teobromina e cafeína aumentam de forma considerável nas amostras de chocolate.

Palavras-chave: 3,7-dimetilxantina. 1,3,7-trimetilxantina. Alcaloides. Chocolate. Cromatografia Líquida.

## ABSTRACT

Chocolate is a product made from fermented and roasted cocoa beans, it is one of the most consumed foods in the world. There is a wide variety of chocolates, among them we have: milk chocolate, bitter, powder, chocolate, etc. As these products are easily accessible to the consumer, they end up being the main food supplier of theobromine. Likewise, caffeine is found naturally in cocoa beans, and consequently in chocolates. This work aims to determine concentrations of 3,7-dimethylxanthine and 1,3,7-trimethylxanthine alkaloids, commonly known as theobromine and caffeine respectively, by Extraction Method 1 with hydrochloric acid and clarifying reagents and by Extraction Method 2 with sodium hydroxide and dichloromethane in samples of products made from fermented and roasted cocoa beans by Liquid Chromatography with diode array detector. Therefore, samples of chocolate bars with different percentages of cocoa were analyzed, namely: 34%, 55%, 65%, 70% and 85%. Analytical determinations by the chromatographic method showed theobromine concentrations of 57.34; 156.99; 184.21; 255.47; 323.37 mg g<sup>-1</sup> respectively the percentages and concentrations of caffeine of 9.58; 38.43; 54.54; 69.55; 89.89 mg g<sup>-1</sup> in the proper order. With these results, it can be seen that as the percentage of cocoa increases, the concentrations of theobromine and caffeine increase considerably in the chocolate samples.

Keywords: 3,7-dimethylxanthine. 1,3,7-trimethylxanthine. Alkaloids. Chocolate. Liquid Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das xantinas .....	14
Figura 2 - Molécula de Teobromina .....	14
Figura 3 - Molécula da Cafeína.....	16
Figura 4 - Componentes típicos de um equipamento para CL.....	22
Figura 5 - Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000.....	27
Figura 6 - Curva de calibração da teobromina nas concentrações 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg L <sup>-1</sup> .....	33
Figura 7 - Cromatograma 30 mg L <sup>-1</sup> dos padrões de teobromina e cafeína. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> , injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) .....	34
Figura 8 - Cromatograma da amostra 34%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> , injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm).....	35
Figura 9 - Cromatograma da amostra 85%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> , injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) Fonte: Autoria própria (2022).....	36
Figura 10 - Cromatograma da amostra 34%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> , injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) .....	37
Figura 11 - Cromatograma da amostra 85%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> , injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) .....	37
Figura 12 - Curva de calibração da cafeína nas concentrações 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg L <sup>-1</sup> .....	38
Figura 13 - Cromatograma 30 mg L <sup>-1</sup> dos padrões de teobromina e cafeína. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> , injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) .....	39
Figura 14 - Cromatograma da amostra 34%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min <sup>-1</sup> , injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) .....	41

<b>Figura 15 - Cromatograma da amostra 85%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 16 - Cromatograma da amostra 34%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 17 - Cromatograma da amostra 85%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm) .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 18 - a) Gráfico dos escores para as amostras; b) Gráfico dos escores dos parâmetros analisados .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 19 - Gráfico da relação linear teobromina:cafeína.....</b>	<b>45</b>



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da Teobromina .....	14
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da Cafeína.....	16
Tabela 3 - Classificação dos métodos cromatográficos em coluna .....	21
Tabela 4 - Dados para construção da curva de calibração da Teobromina .....	32
Tabela 5 - Relação da área do pico com as concentrações de Teobromina.....	35
Tabela 6 - Dados para construção da curva de calibração da Cafeína .....	38
Tabela 7 - Relação da área do pico com as concentrações de Cafeína .....	40
Tabela 8 - Relação da área do pico com as concentrações .....	40
Tabela 9 - Concentrações obtidas de Teobromina (TB) e Cafeína (CF) pelos Métodos 1 e 2.....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Cacau.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Teobromina .....</b>	<b>14</b>
3.2.1	Farmacocinética Teobromina .....	15
3.2.2	Efeitos da Teobromina .....	15
<b>3.3</b>	<b>Cafeína .....</b>	<b>16</b>
3.3.1	Farmacocinética Cafeína.....	17
3.3.2	Efeitos da Cafeína .....	17
<b>3.4</b>	<b>Teobromina e cafeína em chocolate.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5</b>	<b>Métodos de determinação de teobromina e cafeína .....</b>	<b>18</b>
3.5.1	Cromatografia.....	20
3.5.2	Cromatografia Líquida .....	21
3.5.3	Detectores .....	23
<b>3.6</b>	<b>Quimiometria .....</b>	<b>24</b>
3.6.1	Análise das Componentes Principais .....	24
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Materiais .....</b>	<b>26</b>
5.1.1	Amostras .....	26
5.1.2	Reagentes .....	26
5.1.3	Vidrarias .....	26
5.1.4	Materiais Utilizados .....	26
5.1.5	Equipamentos.....	26
<b>5.2</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>27</b>
5.2.1	Preparo das amostras .....	27
5.2.2	Curva de calibração.....	28
5.2.3	Método 1 .....	28

5.2.4	Método 2 .....	28
5.2.5	Método 3 .....	29
5.2.6	Método 4 .....	29
5.2.7	Determinação de Teobromina e Cafeína – Análise Cromatográfica.....	30
<b>5.3</b>	<b>Análise estatística dos resultados .....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>6.1</b>	<b>Determinação do teor de teobromina e cafeína.....</b>	<b>31</b>
<b>6.2</b>	<b>Curva de calibração .....</b>	<b>31</b>
<b>6.3</b>	<b>ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>32</b>
6.3.1	Teobromina .....	32
6.3.2	Cafeína.....	37
<b>6.4</b>	<b>Análise dos dados usando ACP.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Tendo como base no fruto cacau, que é um popular e importante ingrediente para a produção de diversos alimentos, o chocolate tem sido considerado um estimulante devido à presença de teobromina (TB), cafeína (CF) e teofilina (TF) (PURA NAIK, 2001).

A cafeína é uma das substâncias mais consumidas no mundo, sua composição está presente em alguns produtos naturais, como o café, mate e cacau. Sendo considerado um estimulante natural, a cafeína atua diretamente no sistema nervoso central produzindo no organismo um aumento do estado de alerta e reduz a sensação de fadiga, além de ser um estimulante diurético (CAROLINA et al, 2015).

A teobromina é o principal composto presente no cacau. Tendo ação semelhante a cafeína, porém de modo mais suave, é um estimulante do sistema nervoso central. Além disso, a teobromina atua no organismo humano como relaxante do tecido muscular, possui ação diurética e vasodilatadora que contribui no fluxo do sangue nas veias (SMIT, 2011).

Visando a quantificação de teobromina e cafeína presentes em produtos feitos com base na amêndoa fermentada e torrada do cacau, diversos métodos como gravimetria, espectrofotometria, eletroforese capilar, titulometria, infravermelho e cromatografia são utilizados para a determinação destas metilxantinas (PURA NAIK, 2001).

Dentre os métodos de análise, a cromatografia é um dos métodos mais utilizados atualmente. O método físico-químico consiste na separação de componentes presentes em uma amostra, tendo como objetivo a identificação e purificação desses componentes. Esta técnica apresenta duas fases, a estacionária e a móvel. Uma vez que esse método apresenta, alta eficiência, sensibilidade, especificidade e rapidez de análise, a cromatografia líquida contribui de forma favorável para as análises qualitativas e quantitativas (CIENFUEGOS, 2000).

Neste presente trabalho foi utilizada a cromatografia líquida com detecção por DAD como técnica de separação e identificação das metilxantinas, levando em consideração sua eficiência e aplicabilidade para análises qualitativas e quantitativas.

## 2 JUSTIFICATIVA

O cacau é um fruto rico em biomoléculas como os alcaloides que são compostos orgânicos encontrados em produtos naturais que podem produzir efeitos fisiológicos no organismo humano. Dependendo da dose utilizada, tais efeitos podem ser tóxicos ou terapêuticos. (HENRIQUES et al., 2007).

Existe uma grande variedade de produtos que tem como base a amêndoa fermentada e torrada do cacau, dentre eles temos: chocolate ao leite, amargo, branco, em pó, achocolatado, entre outros. No chocolate, a quantidade de teobromina e cafeína depende da pureza do produto, ou seja, do seu teor de cacau (OLIVEIRA, 2013).

Os estudos com teobromina se fazem crescente na comunidade científica pelas descobertas associadas aos seus efeitos psicoativos e benéficos para a saúde humana. Um dos efeitos mais causados pela teobromina é a sensação revitalizante e revigorante, além de ser usada como diurético, vasodilatador e cardioestimulante. A cafeína apresenta efeitos neuroprotetores, ação vasoconstritora nos vasos do cérebro e tem propriedade de estimular a vigilância, a reatividade e a atenção (PERES, 2018). Desse modo, o chocolate com maior teor de cacau e conseqüentemente maior quantidade de teobromina e cafeína pode fazer parte de uma dieta rica, variada e equilibrada (OLIVEIRA, 2013)

Em razão ao consumo desses produtos à base de cacau, este trabalho busca uma metodologia de extração de teobromina e cafeína em amostras de chocolate com distintas porcentagens de cacau quantificando por Cromatografia Líquida com detecção por DAD.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Cacau

Advindo da família das *Malvaceae*, o cacauzeiro passou por diversas classificações sendo designado em 1737 com o nome de *Theobroma fructus*, passando a ser conhecido em 1753 como *T. cacao*, esse sendo mantido até o presente momento. A expressão Theobroma provém do grego antigo theo (deus) e broma (comida), resultando em comida dos deuses (BATISTA, 2008).

O *Theobroma cacao* é cultivado em um clima tropical úmido em torno da linha do equador, também sendo conhecido por alguns como cinturão do cacau. Das folhas, fruto e sementes são proveitosos na indústria alimentícia, cosmética e farmacêuticas. No interior do fruto são encontradas de 20 a 40 sementes revestidas por uma polpa branca espessa, que apesar de ser adocicada, a semente é o produto predominante para a comercialização (VERNA, 2013).

O fruto divide-se em casca, polpa e sementes. A semente é composta de casca, dois cotilédones e o gérmen. Possui em média, 2,5 cm de comprimento e apresenta adstringência e sabor amargo. O tecido dos cotilédones é constituído por dois tipos de células: o primeiro apresenta pigmentos compostos de polifenóis (flavonoides, catequinas, antocianinas e proantocianidinas) e metilxantinas (teobrominas e cafeína), o segundo são células de reserva, que contêm amido, gorduras, proteínas e enzimas (BECKETT, 1988; LAJUS, 1982; Braudeau 1970).

Os compostos polifenóis são um amplo grupo de substâncias encontrados abundantemente no reino vegetal, caracterizadas pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado ao anel aromático. Dentre este grupo estão presentes os flavonoides, os quais são encontrados no cacau e quando presentes no organismo humano, exercem efeitos inibidora de infecções agudas e melhora da saúde cardiovascular. Diversas classes de compostos fenólicos evidenciam efeitos benéficos à saúde, relacionados também ao potencial antioxidante que apresentam sobre os radicais livres. Os radicais livres são espécies químicas reativas, que possuem elétrons desemparelhados localizados no átomo de nitrogênio ou de oxigênio. (EFRAIM et al., 2011; WILLIAMSON, 2005; SOTO-VACA et al., 2012).

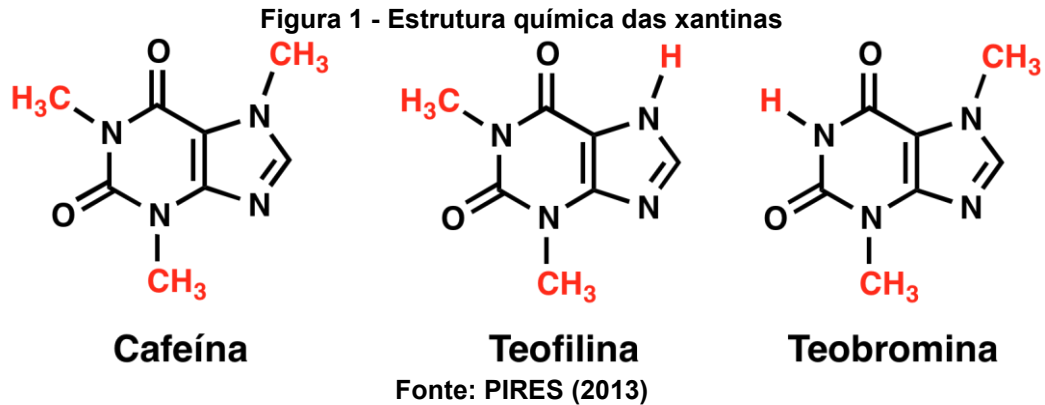
Os primeiros estudos relatam que esse fruto já era utilizado como medicina alimentar nos anos 1200 e 1600 a.C. no continente americano. Com as grandes navegações em que eram transportadas inúmeras mercadorias, o resto do planeta

pode conhecer o fruto. No início seguiam-se as receitas dos astecas, no entanto com a adição de açúcar, canela e baunilha, o sabor da bebida produzida tornou-se doce e agradável, assim se aproximando do que é consumido atualmente. Hoje o chocolate conhecido mundialmente é o principal produto dessa semente (PURA NAIK, 2001).

Para a obtenção de produtos derivados de cacau, o processamento das sementes, são submetidas a várias etapas: fermentação, secagem, torração, moagem das amêndoas inteiras ou dos nibs (fragmentos das amêndoas de cacau) para a obtenção da massa de cacau, moagem fina para obtenção do licor de cacau, e prensagem do licor para a obtenção da manteiga de cacau. Os sólidos de cacau que permanecem são triturados em pequenas partículas, originando-se o cacau em pó. O licor, a manteiga e o cacau em pó são os principais produtos utilizados na fabricação de chocolates e alimentos derivados de cacau. As etapas que correspondem ao processamento do chocolate a partir de licor e manteiga de cacau são, basicamente, mistura, refino, conchagem, temperagem, resfriamento e moldagem. A adstringência e o amargor são atribuídos aos polifenóis juntamente com os alcaloides, além de aminoácidos, peptídeos, pirazinas e dicetopiperazinas, também presentes naturalmente nos produtos derivados (PICKENHAGEN et al., 1975; SERRA BONVEHÍ e VENTURA COLL, 1997; LUNA et al., 2002; MISNAWI et al., 2005).

O cacau é um fruto rico em biomoléculas como os alcaloides que são compostos orgânicos encontrados em produtos naturais que podem produzir efeitos fisiológicos no organismo humano. Dependendo da dose utilizada, tais efeitos podem ser tóxicos ou terapêuticos. São compostos orgânicos de baixo peso molecular, caracterizados pela presença de um ou mais átomos de nitrogênio ao qual lhes conferem o caráter básico. O átomo de nitrogênio presente nos alcaloides é originado dos aminoácidos e o anel heterocíclico formado fornece base para sua classificação química (HENRIQUES et al., 2007).

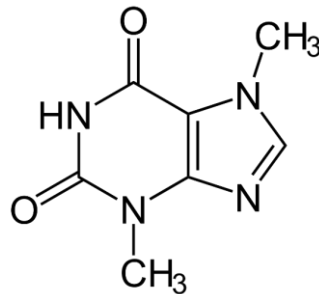
Os alcaloides purínicos ou metilxantinas são comumente representados pela cafeína, teofilina e pela teobromina (Figura 1). Possuem distribuição limitada, suas origens estão relacionadas com as bases purínicas: adenina e guanina, possuem caráter anfótero e são considerados pseudoalcaloides. Dos alcaloides que o cacau possui, a teobromina, a cafeína e a teofilina são encontradas em uma quantidade que depende da variedade do cacau, do processo de colheita e de cura (PERALTAJIMÉNEZ; CAÑIZARES-MACÍAS, 2013; DEWICK, 2009).



### 3.2 Teobromina

A teobromina foi descoberta em 1841 pelo químico russo Alexander Voskresensky, que a isolou das sementes do cacau e a distinguiu da cafeína. Posteriormente a síntese de teobromina foi divulgada pela primeira vez em 1882 por Hermann Emil Fischer, a partir dos estudos das xantinas (MARKITANTOV, 2002).

**Figura 2 - Molécula de Teobromina**



Fonte: PETq (2021)

A teobromina apresenta massa molecular de  $180 \text{ g mol}^{-1}$  e fórmula molecular  $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2$ . É um pó cristalino branco inodoro de degustação amarga (PASCHOAL, 2009).

**Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da Teobromina**

Propriedades físico-químicas	
Massa molecular	$180 \text{ g mol}^{-1}$
Estado físico	Sólido
Ponto de fusão	$357 \text{ }^\circ\text{C}$
Ponto de ebulição	$290 - 295 \text{ }^\circ\text{C}$
pKa	9,9
pH	Solução saturada em água: 5,5 - 7

Fonte: Adaptado de National Center for Biotechnology Information (2022)



A teobromina apresenta-se solúvel em água quando 1g é adicionado a 200 mL, ou em 150 mL de água fervente. 1g se dissolve em cerca de 220 mL de álcool 95%. Sendo também solúvel em hidróxidos de alcalinos e ácidos concentrados e moderadamente solúvel em amônia. Em solventes orgânicos como: benzeno, éter, clorofórmio, tetracloreto de carbono é praticamente insolúvel (IARC, 1991).

### 3.2.1 Farmacocinética Teobromina

A teobromina é metabolizada no fígado pelas enzimas oxidases, estes removem o caráter tóxico da molécula. Uma vez desintoxicada, a molécula de teobromina continua seu caminho através do sangue e percorre por todo o corpo. O processo de digestão/desintoxicação da teobromina é extremamente rápido: estima-se que a molécula comece a agir cinco minutos após sua ingestão. Só terá efeito, por outro lado, uma vez que tenha chegado ao cérebro, através dos vasos sanguíneos que suprem os neurônios. Em adultos saudáveis, a meia vida é de aproximadamente 7 horas (KHADIDJA, 2016).

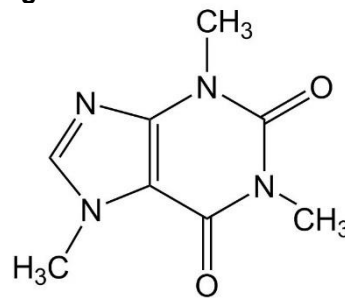
### 3.2.2 Efeitos da Teobromina

A teobromina contida no chocolate tem efeitos positivos no nosso cérebro, esta substância é um estimulante suave que melhora o humor, e desempenha um leve papel de antidepressivo. Na medicina, é usado como estimulante cardíaco e diurético, ou seja, aumenta a secreção urinária e vasodilatadora. Estimula o sistema nervoso e leva a uma inibição da fadiga e também atua como estimulante sexual com efeitos no hipotálamo. Apresenta maior efeito antitússico que a codeína, reduzindo a atividade do nervo vago, bloqueia os receptores de adenosina que se acumulam no cérebro durante o dia e acentua a vontade de dormir. Aumenta a produção de norepinefrina, causa um efeito eufórico e pode aumentar o risco de câncer de próstata. A teobromina pode causar náuseas e anorexia e que a ingestão diária de cacau de 50 – 100 g (0,8 – 1,5 g de teobromina) pelos seres humanos tem sido associada à sudorese, tremor e dor de cabeça severa. O TD<sub>01</sub> (menor dose tóxica testada), por via oral para seres humanos é de 26 mg kg<sup>-1</sup> causando alterações na atividade motora náusea ou vômito (KHADIDJA, 2016; IARC, 1991).

### 3.3 Cafeína

A cafeína foi extraída pela primeira vez do café em 1819 pelo químico alemão Frielieb Ferdinand Rungue que intitulou o composto isolado como *Kaffebase* (a base proveniente do café). Posteriormente em 1821 Pierre Jean Robiquet, Pierre-Joseph Pelletier e Joseph Bienaimé Caventou, químicos franceses, isolaram o composto e o termo *cafféine* surgiu. O químico alemão, Hermann Emil Fischer, entre os anos de 1893 e 1895 contribuiu com história da cafeína devido a descoberta total do processo da síntese do composto e a determinação da sua fórmula estrutural (LE COURTEUR, 2006; MENDES, 2012).

Figura 3 - Molécula da Cafeína



Fonte: PETq (2021)

Com massa molecular de  $194 \text{ g mol}^{-1}$  e quimicamente estruturada como  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ , a cafeína também é conhecida como dioxipurina, teína, guaranina e metilteobromina (MARTÍNEZ LÓPEZ et al, 2014).

De aspecto branco, possui sabor amargo bastante característico, é inodora e moderadamente solúvel em água (KHADIDJA, 2016).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da Cafeína

Propriedades físico-químicas	
Massa molecular	$194 \text{ g mol}^{-1}$
Estado físico	Sólido
Ponto de fusão	$235 - 238 \text{ }^\circ\text{C}$
Ponto de ebulição	$178 \text{ }^\circ\text{C}$
pKa	14
pH	Solução de 1%: 6,9

Fonte: Adaptado de National Center for Biotechnology Information (2022)

Um grama de cafeína dissolve-se em 46 mL de água, em 5,5 mL de água a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  ou 1,5 mL de água fervente. A solubilidade na água é aumentada por benzoatos alcalinos, cinamatos, citratos ou salicilatos. Também é possível a solubilidade de 1 g

em 66 mL de álcool, 22 mL de álcool a 60 °C, 50 mL de acetona, 5,5 mL de clorofórmio que dissocia com diclorometano de polaridade semelhante (O'Neil, 2013).

### 3.3.1 Farmacocinética Cafeína

A meia vida da cafeína varia muito entre as pessoas, dependendo de diversos fatores. Em adultos, a meia-vida de eliminação da cafeína é de 3 a 5 horas e os seus metabólitos são excretados na urina. A cafeína é processada ou metabolizada no fígado pelo sistema enzimático oxidase do citocromo. A eliminação ocorre após metabolismo da cafeína para compostos mais polares, como a paraxantina e a teofilina, que também promovem atividade biológica semelhante à cafeína (KHADIDJA, 2016; TAVARES, 2012).

### 3.3.2 Efeitos da Cafeína

Todos esses efeitos são diferentes para cada indivíduo. A cafeína que tem efeitos neuroprotetores, ação vasoconstritora nos vasos do cérebro, diminui a intensidade e a duração das enxaquecas. A cafeína também tem a propriedade de estimular a vigilância, a reatividade e a atenção, pode ser útil no tratamento de reações alérgicas e melhora a respiração de pessoas com asma leve a moderada. O consumo de cafeína reduz o apetite e combate a prisão de ventre, estimula a secreção de bile pela vesícula biliar, a secreção de suco pancreático, bem como a secreção ácida do estômago. A cafeína exerce ação diurética e melhora o volume miccional (evacuação de urina) sem alterar o pico de fluxo urinário. Alguns efeitos comuns do consumo excessivo de cafeína incluem dores de cabeça, fadiga, ansiedade, alterações de humor, vômitos, náuseas, palpitações, inquietação, tremores musculares e distúrbios do sono. Também existem efeitos negativos graves devido ao consumo excessivo de cafeína. A cafeína aumenta o açúcar no sangue, aumenta a pressão arterial e pode causar arritmias cardíacas. A insônia também é um efeito da cafeína no corpo durante os períodos de sono. Pode apresentar um efeito diurético (tendência a urinar com mais frequência) e em demasia a cafeína pode levar a uma deficiência de cálcio e pode até levar a osteoporose. Uma overdose fatal aguda de cafeína em humanos é de cerca de 10 - 14 gramas (equivalente a 150 – 200 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal). No caso de overdose de cafeína, podem ocorrer convulsões, já que a cafeína é um estimulante do sistema nervoso central (KHADIDJA, 2016).

### 3.4 Teobromina e cafeína em chocolate

Como mencionado, o cacau apresenta alguns alcaloides diferentes. A teobromina se faz presente e em menor proporção, a cafeína. Apesar de a teobromina ser encontrada em outras plantas como guaraná e alguns chás, a principal fonte com relação direta aos humanos são o chocolate, o cacau em pó e seus derivados (LUANA VIEIRA, 2021).

A teobromina pode ser extraída principalmente das sementes do fruto do cacau, e sua quantidade depende da variedade dessa planta, porém em média atinja percentuais entre 1,5 a 3,0%. A cafeína também é encontrada, no entanto em menores quantidades relacionadas à teobromina. A teobromina e a cafeína que são encontrados em produtos feitos com base na amêndoa fermentada e torrada do cacau são os responsáveis pelo amargor desses produtos. Quanto maior o teor de cacau nos chocolates, maior é a quantidade de alcaloides e conseqüentemente maior o amargor (GONZÁLES, 2018).

Peralta-Jiménez et al. 2012, estudaram a quantidade de teobromina e cafeína em diversas amostras, como sementes de cacau, casca de cacau, produtos de chocolate como barras, bebidas de chocolate e cacau em pó de distintas marcas, sendo analisado 1 g de cada amostra. Na semente de cacau por exemplo quantidade de teobromina presente foi superior a  $18 \text{ mg g}^{-1}$  e  $1,37 \text{ mg g}^{-1}$  de cafeína. Pra uma barra de chocolate ao leite foi determinada  $2,10 \text{ mg g}^{-1}$  de teobromina e  $0,47 \text{ mg g}^{-1}$  de cafeína.

### 3.5 Métodos de determinação de teobromina e cafeína

Na literatura científica diversos métodos são utilizados para a determinação de alcaloides. Os principais métodos são: Gravimetria, Espectrofotometria UV-Vis, Eletroforese Capilar, Espectroscopia de Infravermelho, Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

A gravimetria foi o primeiro método utilizado para analisar alcaloides em alimentos. Na busca para a extração, a técnica utilizava água ou metanol como

solvente, posteriormente ocorria a limpeza do filtrado com óxido de magnésio e extração com clorofórmio. Após a evaporação do clorofórmio, a determinação era realizada por gravimetria (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

No método espectrofotométrico o extrato aquoso da matriz é tratado com óxido de magnésio e ferrocianeto de zinco para remoção de trigonelina e outros compostos interferentes. A quantificação da cafeína é conduzida com base na análise da absorvância no comprimento de onda de 272 nm. Este método é mais rápido, simples e preciso que as técnicas gravimétricas, porém os resultados podem ser superestimados pela presença de interferentes (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

A eletroforese capilar é um método preciso e exato, a resolução dos compostos é excelente devido à alta eficiência de separação. A eletrocromatografia capilar micelar, também chamada de cromatografia capilar eletrocínética micelar, é o tipo de eletroforese capilar mais usada para multianálise de metilxantinas. É a técnica geralmente usada para separação de compostos neutros. A cromatografia capilar eletrocínética micelar inclui a adição de um surfactante, como o dodecil-sulfato de sódio, sendo o analito separado pela sua partição entre as micelas e o tampão (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

A técnica de espectroscopia na região do IV tem apresentado resultados muito interessantes quando aplicada nas áreas farmacêutica e de alimentos. Nesse contexto, deve-se destacar o uso dos espectrômetros de IV com transformadas de Fourier (IVTF) e seu emprego na identificação e dosagem de metilxantinas. O método consiste na dissolução dos princípios ativos em clorofórmio, seguida pela filtração das soluções para remoção dos excipientes (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

A cromatografia gasosa é um método que oferecesse maior reprodutibilidade e sensibilidade e pode ser aplicada para análise de xantinas em pequenos volumes de amostra. Sendo a detecção feita por detector de ionização de chama (DIC) e a separação conduzida em coluna, a técnica permite a determinação rápida, e com alta reprodutibilidade de pequenas quantidades (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

A cromatografia líquida foi usada na determinação de cafeína pela primeira vez no início da década de 70. Inicialmente, foi usado cromatografia de troca iônica para separar a cafeína de outros compostos orgânicos em café empregando uma resina de poliestireno sulfonado, tendo como contra-íon o cátion amônio. A maior dificuldade foi a baixa estabilidade mecânica da resina à pressão de trabalho, o que limitou a vazão da fase móvel. Com a introdução da coluna de fase reversa, houve um

grande avanço na análise de compostos de baixa massa molar por cromatografia líquida. Este tipo de coluna de sílica, com octadecilsilano, confere uma baixa polaridade e maior estabilidade mecânica ao suporte. Mais tarde, o desenvolvimento de fases estacionárias, contendo micropartículas, permitiu melhor resolução e um menor tempo de análise, contribuindo para a maior difusão da cromatografia líquida. Deste modo, a cromatografia de fase reversa foi aplicada para análise de cafeína e outras metilxantinas em diferentes matrizes alimentícias (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

A cromatografia líquida também é utilizada para a determinação de teobromina em amostra de cacau e seus derivados. As vantagens da utilização desta técnica são a eficiência, sensibilidade e especificidade quando comparada com outras técnicas. Outra vantagem deste método é a possibilidade de quantificação de mais do que um alcaloide na mesma análise, por exemplo, a cafeína (PURA NAIK, 2001)

### 3.5.1 Cromatografia

A cromatográfica é um método físico-químico que consiste na separação dos componentes de uma mistura entre duas fases. Posteriormente é possível a identificação e determinação de diversas substâncias devido às diferenças na sua estrutura. Existem dois tipos de cromatografia, a planar e a em coluna. Na cromatografia planar, a fase estacionária é suportada sobre uma placa plana ou nos poros de um papel. Desse modo, a fase móvel desloca-se através da fase estacionária por ação da capilaridade ou sob a influência da gravidade. Na cromatografia em coluna, a fase estacionária é mantida em um tubo estreito e a fase móvel, forçada através do tubo sob pressão ou por gravidade. (SKOOG, 2006).

A cromatografia se resume, a passagem dos componentes de uma determinada amostra através de um meio com o qual interagem fisicamente (a fase estacionária), sendo arrastados por um fluido (a fase móvel). As moléculas na amostra por possuírem diferentes afinidades e interações com a determinada fase estacionária utilizada para o estudo conduz à separação de moléculas. Componentes da amostra que exibam interações mais fortes com a fase estacionária irão mover-se mais lentamente através da coluna, do que os componentes com interações mais fracas. Compostos diferentes podem ser separados uns dos outros à medida que se movem através da coluna, com isso, podem ser analisados e determinados quantitativamente e qualitativamente.

Vários métodos cromatográficos foram desenvolvidos, em coluna se dividem em três métodos como apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3 - Classificação dos métodos cromatográficos em coluna**

<b>Classificação Geral</b>	<b>Método Específico</b>	<b>Fase Estacionária</b>	<b>Tipo de Equilíbrio</b>
Cromatografia em fase gasosa	Gás-líquido	Líquido adsorvido ou ligado a uma superfície sólida	Partição entre gás e líquido
	Gás-sólido	Sólido	Adsorção
Cromatografia líquida	Líquido-líquido (fase quimicamente ligada)	Líquido adsorvido ou ligado a uma superfície sólida	Partição entre líquidos imiscíveis
	Líquido-sólido	Sólido	Adsorção
	Troca iônica	Resina de troca iônica	Troca iônica
	Exclusão por tamanho	Líquidos dos interstícios de um sólido polimérico	Partição/exclusão
	Afinidade	Grupo específico ligado a uma superfície sólida	Partição entre um líquido na superfície e líquido da fase móvel
Cromatografia com fluido supercrítico		Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Partição entre fluido supercrítico e espécies líquidas ligadas à superfície

Fonte: Adaptado de SKOOG et al. (2009)

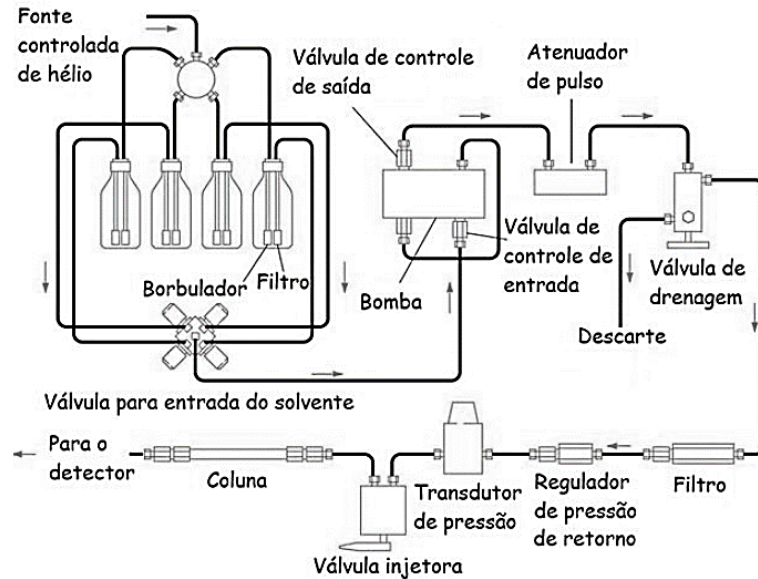
### 3.5.2 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é uma técnica analítica de separação e determinação de espécies em distintos materiais biológicos, inorgânicos e orgânicos. Dentre os métodos analíticos, esse tipo de cromatográfica contribui com exatidão em sua defectibilidade e adaptabilidade para a separação dos compostos. (SKOOG, 2006).

A cromatográfica líquida é uma técnica que envolve a injeção de uma amostra líquida em uma coluna com partículas microporosas (fase estacionaria), onde os componentes da amostra são transportados ao longo dessa coluna por um líquido (fase móvel) movido a força da gravidade. A separação do analito pretendido ocorrerá devido a sua interação de modo físico-químico com as duas fases, sendo que cada componente da mistura irá ter uma interação diferente. Para uma melhor eficiência, tornou-se necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel. Assim, basicamente, um equipamento de cromatografia líquida possui uma válvula de

injeção da amostra, uma bomba, um amostrador automático, um sistema de distribuição do solvente, uma coluna de alta pressão e um detector (FERREIRA, 2013).

**Figura 4 - Componentes típicos de um equipamento para CL**



**Fonte: SKOOG et al (2009)**

Devido ao alto custo financeiro das colunas e sua predisposição a fácil degradação pela ação de partículas sólidas na amostra ou no solvente, é importante que as amostras devam ser centrifugadas e filtradas antes de serem introduzidas no sistema de injeção. (HARRIS, 2013).

A fase estacionária mais comum é constituída por partículas microporosas de sílica, que são permeáveis ao solvente e possuem área superficial de centenas de metros quadrados por grama. A fase móvel abrange diversos solventes que são capazes de eluir um determinado soluto, praticamente independente de sua natureza. Os solventes utilizados para eluição devem ter alto grau de pureza para evitar possíveis degradações das colunas cromatográficas e minimizar o sinal de fundo do detector causado por contaminantes (HARRIS, 2013).

Há dois tipos de fases móveis de acordo com a cadeia alifática ligada à sílica. Caso ao final dessa cadeia alifática houver um grupo polar, tem-se uma cromatografia de fase normal, em que a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. Caso a cadeia alifática seja apolar, tem-se a cromatografia de fase reversa, em que a fase estacionária possui polaridade menor que a fase móvel. Assim, em fase reversa, quanto maior o comprimento da cadeia, maior o fator de retenção. Os adsorventes



mais utilizados na cromatografia de fase normal são a sílica e a alumina. Para a fase reversa são utilizadas substâncias polares quimicamente ligadas, tendo como grupos funcionais cadeias com terminações do tipo ciano, diol, fenil, amino ou apolares. Dentre as fases estacionárias a mais utilizada é a de Octadecilsilano (C18), uma fase estacionária de baixa polaridade, utilizada na fase reversa além dos grupos octil (-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) e fenil (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) (COLLINS et al, 2006).

### 3.5.3 Detectores

Um detector em Cromatografia Líquida é um dispositivo conectado na saída da coluna, em que sua função é analisar a solução que esta eluindo. Desse modo, o detector emite sinais elétricos em forma de picos ao presenciar os componentes de uma amostra. Um detector ideal deve possuir como características: alta sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade, respostas linear e rápida aos analitos, confiabilidade, seletividade e facilidade de manuseio. Os principais detectores utilizados em Cromatografia Líquida são: Ultravioleta-Visível (UV-VIS/DAD), Fluorescência (FL), Índice de Refração (RI), Eletroquímico e Espectrometria de Massas (MS) (ARGENTON, 2010).

O detector mais utilizado atualmente em Cromatografia Líquida é o de absorção na região ultravioleta e visível, além de ter um menor custo para sua aquisição, a maioria dos solutos absorve radiação ultravioleta (HARRIS, 2013).

O detector de absorção no UV-Vis possui um arranjo de fotodiodos que fornecem espectros do eluente da coluna em determinados intervalos de tempo. O detector de absorção possui duplo feixe, em que um dos feixes passa por uma célula do eluente e o outro entre a célula de referência, apenas em uma única corrida cromatográfica. Dessa maneira, origina-se um gráfico de absorbância em função do tempo (SKOOG et al, 2009).

O Detector de Arranjo de Diodos (DAD) é um dos detectores de fótons que constitui a base dos instrumentos multicanais para absorção UV-Vis (SKOOG et al, 2009).

O DAD é constituído por uma fonte de emissão de luz, que é direcionada através de um sistema de lentes sobre a amostra. A luz que passa através da amostra reflete sobre um diodo do arranjo. Este diodo, ao ser irradiado, produz uma corrente elétrica que é transformada em absorbância nos diferentes comprimentos de onda, resultando no espectro de absorção da substância. Assim, com um ou dois arranjos

de diodos colocados ao longo do plano focal de um monocromador, todos os comprimentos de onda podem ser monitorados simultaneamente, tornando possível a espectroscopia de alta velocidade (SCOTT, 2003).

### 3.6 Quimiometria

Uma ferramenta matemática e estatística, que em combinação com diversos métodos químicos permite a análise de um amplo número de variáveis em uma única amostra, a Quimiometria busca planejar ou selecionar condições de medidas e experimentos a fim de extrair o máximo de informação de dados químicos. Com a finalidade de reduzir os números de variáveis geradas pelas técnicas analíticas, os métodos de análise multivariada são amplamente utilizados (MARIANO, 2021).

#### 3.6.1 Análise das Componentes Principais

A análise de componentes principais (ACP) é um método não supervisionado que permite analisar se existem semelhanças ou diferenças entre várias amostras. Desta maneira, é possível classificá-las e agrupá-las através de determinadas características. Aplicada a variáveis discretas ou contínuas, a ACP reduz o número de variáveis, transformando-as em combinações lineares que resultam em cada componente principal (CP). A contribuição de cada variável é representada pelos pesos ou *loadings*. Aos objetos, são fornecidos valores chamados escores gerados pela combinação linear. A ACP visa maximizar a variância de cada combinação linear CP1, CP2 e assim por diante (TERRILE, 2016).

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Determinar o teor de teobromina e cafeína em barras de chocolate comercial com distintas porcentagens de cacau utilizando a Cromatografia Líquida com detecção por arranjo de fotodiodo.

### **4.2 Objetivos específicos**

Aplicar diferentes metodologias para verificar qual a mais adequada para a extração da teobromina e cafeína nas amostras feitas com base na amêndoa fermentada e torrada do cacau;

Determinar quantitativamente o teor de teobromina e cafeína em barras de chocolate com distintas porcentagens de cacau utilizando a Cromatografia Líquida;

Classificar as amostras analisadas pelo seu teor de teobromina e cafeína, usando análise quimiométrica.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Materiais

#### 5.1.1 Amostras

Para as análises foram utilizadas as amostras de barras de chocolates com distintas porcentagens de cacau, adquiridas no comércio da cidade de Londrina (PR).

#### 5.1.2 Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados: água destilada, água ultra pura (Milli-Q), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) grau HPLC, padrão de teobromina 98% Sigma e cafeína 98% Sigma, éter de petróleo, óxido de magnésio ( $\text{MgO}$ ), acetato de etila ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ), acetato de zinco di-hidratado ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), ferrocianeto de potássio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ).

#### 5.1.3 Vidrarias

Para as análises foram utilizadas as vidrarias: béqueres 250, 100, 50 e 25 mL, pipetas volumétricas 1, 5, 10 mL, proveta 50 e 100 mL, bastão de vidro, funil de separação de 125 e 250 mL e balão volumétrico com capacidade de 5, 10, 25, 50, 100 e 250 mL.

#### 5.1.4 Materiais Utilizados

Foram utilizados alguns materiais, tais como: pera, papel filtro descartável, espátula, filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  (acetato de celulose), pipeta automática com ponteira capacidade de 100-1000  $\mu\text{L}$ , pipetas Pasteur, filtro de seringa de 13 mm com partículas de  $0,45 \mu\text{m}$  (acetato de celulose), coluna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de  $5 \mu\text{m}$ ), cartucho de extração em fase sólida (SPE) e vials para análise cromatográfica.

#### 5.1.5 Equipamentos

Os equipamentos utilizados: balança analítica, ultrassom, Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000 – Thermo Scientific.

Para a obtenção dos cromatogramas, foi utilizada uma Estação de Trabalho Cromatográfica Ultimate 3000 da Thermo Scientific, com programa de gerenciamento Chromeleon contendo: bomba de pistão recíprocante com quatro vias; injetor automático com alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$  e coluna cromatográfica C18 (150mm x 4,6 mm com partículas de 5  $\mu\text{m}$ ). O equipamento cromatográfico pertence à UTFPR Câmpus Londrina sob vigência do Departamento de Química (DAQUI).

**Figura 5 - Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000**



**Fonte: Thermo Fischer Scientific (2022)**

## **5.2 Métodos**

### **5.2.1 Preparo das amostras**

Determinações analíticas foram executadas em cinco tabletes de chocolate de distintas porcentagens (34%, 55%, 65%, 70% e 85%). Primeiramente as amostras de chocolate comercial contendo 5 g foram trituradas individualmente e para realização dos métodos apenas 1 g da amostra foi utilizado. Para as amostras de chocolates de um único fornecedor, ocorreram testes com quatro métodos de extração em amostras com percentual de 34 e 85% cacau. Posteriormente foram feitas análises

cromatográficas, a fim de verificar qual seria o mais eficiente para a extração da teobromina e cafeína nas amostras analisadas.

### 5.2.2 Curva de calibração

Para a determinação de teobromina e cafeína, utilizando a Cromatografia Líquida foram construídas curvas de calibração a partir da solução padrão destas espécies. Para o tratamento analítico cromatográfico foi construída a curva padrão com as áreas dos picos nas ordenadas e as concentrações nas abscissas, tanto para a teobromina, quanto para a cafeína.

Uma solução estoque de 500 mg L<sup>-1</sup> de teobromina e cafeína foi preparada com 40% de metanol. A partir dessa solução foram realizados os cálculos e a preparação da solução padrão em um balão de 10 mL nas concentrações de: 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>.

### 5.2.3 Método 1

Aproximadamente 1,0 g da amostra foi pesada no interior de um béquer de 100 mL, seguido da adição de 2 mL de HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 25 mL de água. Posteriormente a solução foi transferida para banho-maria por 15 min. Após o resfriamento natural, foi adicionado 1 mL do reagente clareador 1 e 1 mL do reagente clareador 2. A solução ficou em repouso por cerca de 30 min e filtrada em papel filtro faixa azul. Os primeiros 5 mL foram passados por filtro de seringa para análise por HPLC. A taxa de filtração depende da quantidade de sólidos precipitados presentes. As soluções podem ser estáveis por pelo menos 24 horas.

Reagente clarificante 1: Foram dissolvidos cerca de 5,0 g de acetato de zinco di-hidratado em água contendo 0,75 mL de ácido acético, posteriormente a mistura foi completada a 25 mL com água.

Reagente clarificante 2: Aproximadamente 3,0 g de hexacianoferrato de potássio (II) tri-hidratado foi dissolvido em água completando 25 mL com água (RICHARDS, 2012).

### 5.2.4 Método 2

Cerca de 1,0 g da amostra foi pesada em balança analítica. Em seguida, a amostra foi diluída em 10,0 mL de hidróxido de sódio 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 30 mL

diclorometano, posteriormente a solução foi transferida para funis de separação e agitada lentamente por 10 minutos. Em seguida, a fração orgânica foi transferida para um béquer. O procedimento de extração repetiu-se com mais duas porções de 10 mL de diclorometano. Posteriormente, filtrou-se a amostra em filtros de membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e injetados no cromatógrafo. A identificação dos analitos foram realizados comparando-se os tempos de retenção dos padrões de cada composto com os tempos de retenção dos analitos nas amostras (NASCIMENTO, 2016).

#### 5.2.5 Método 3

Aproximadamente 1,0 g de amostra e 6,0 g de óxido de magnésio serão pesados e transferidos para um erlenmeyer de 300 mL (no qual será anotado o peso inicial do conjunto: erlenmeyer + amostra + óxido de magnésio). Posteriormente será adicionado 100 mL de água destilada e em seguida a mistura será fervida por 15 minutos. Ao resfriar, a mistura irá ser pesada novamente repondo a água perdida por evaporação até que se atinge 100 g acima do peso inicial. Desse modo, haverá a centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos, filtração do sobrenadante em membrana filtrante de 0,45  $\mu\text{m}$  e a injeção no cromatógrafo líquido (ALVES et al, 2002).

#### 5.2.6 Método 4

Para extrair metilxantinas de matrizes sólidas, a técnica apresenta a eluição seletiva dos compostos desejados. Desse modo, as amostras serão obtidas dissolvendo 1,0 g de chocolate triturado ou cacau em pó em 20 mL de água Milli-Q. Posteriormente as amostras irão ser inseridas em tubos selados e aquecidas em banho-maria a 80 °C por 15 min. Os extratos das amostras serão obtidos por meio de condicionamento sequencial do tubo de extração em fase sólida (SPE), adição da amostra, lavagem e algumas eluições.

Os passos são descritos como:

1. Condicionar o tubo de extração de fase sólida com ativação de 1 mL de metanol e equilíbrio 1 mL de água Milli-Q, em sistema a vácuo.
2. Inserção da amostra: 0,5 mL de amostra;
3. Lavagem 1 mL de água Milli-Q;
4. Eleição os compostos de interesse: 2 vezes com 2,5 mL de metanol em frascos separados;

5. Evaporação: Os 2 frascos serão concentrados até à secura sob nitrogênio a 40 °C e cada resíduo será dissolvido em 1000 µL de água Milli-Q e em seguida, será separado em 5 alíquotas de 200 µL, posteriormente irá ser injetados no Cromatógrafo Líquido para as análises (MENGUY, 2009).

#### 5.2.7 Determinação de Teobromina e Cafeína – Análise Cromatográfica

Para análise cromatográfica foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 com comprimento (150 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho da partícula). E fase móvel isocrática composta por água-metanol (65:35) (v/v), com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e com detecção de 272 nm para a teobromina e cafeína, com temperatura do forno da coluna de 25 °C e o volume de injeção de 20 µL da solução padrão e das amostras analisadas (MARIANO, 2018).

### 5.3 Análise estatística dos resultados

Os valores obtidos para teobromina e cafeína foram relacionados com as diferentes amostras contendo cacau, utilizando análise exploratória não supervisionada, mais especificamente Análise das Componentes Principais (ACP), o que permitiu observar se há agrupamento entre as amostras de acordo com o teor de cada metilxantinas analisada (variáveis). Para tal fim foi utilizado o programa Statistica 7.



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Determinação do teor de teobromina e cafeína

Dos métodos de extração citados, seguido de variações e ajustes para tentar otimiza-los, apenas dois apresentaram eficiência e foram utilizados para a separação dos alcaloides estudados neste trabalho. O primeiro método denominado de Método 1, foi o de Richards (2012), que ocorrendo otimizações apresentou um melhor resultado de extração para a teobromina. Enquanto o segundo método designado de Método 2, foi otimizado de Nascimento (2016), em que expressou um resultado mais positivo para a cafeína.

Para as análises cromatográficas foi verificado o perfil de separação da teobromina e da cafeína utilizando padrão de concentração conhecida e as concentrações experimentalmente encontradas nas amostras foram averiguadas se estavam de acordo com a curva de calibração analítica. Após a otimização do método foi necessário ajustar a vazão para  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , assim, as amostras foram injetadas no cromatógrafo.

### 6.2 Curva de calibração

Para as determinações por CL foram preparados padrões de teobromina e cafeína nas concentrações de 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

Uma curva de calibração corresponde a um método utilizado na química analítica para determinar a concentração de um analito estabelecendo uma relação entre a resposta instrumental (área/ altura da banda cromatográfica). A curva deve ser construída a partir da análise de no mínimo 6 concentrações do analito, os chamados padrões de calibração (CASSIANO et al, 2009).

Por meio de um *software* (Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS), construiu-se as curvas de calibração da concentração dos padrões ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em relação à área do pico ( $\text{mAU.min}$ ) detectada pelo equipamento.

## 6.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

### 6.3.1 Teobromina

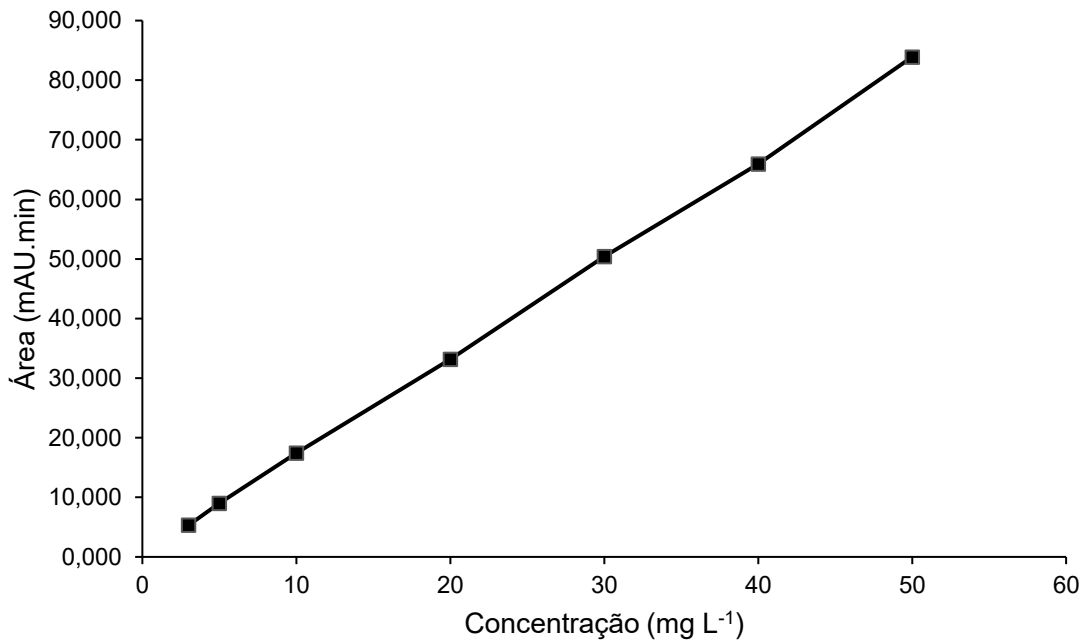
Para a teobromina, a curva de calibração (Figura 6) apresenta os valores das áreas dos picos em função das concentrações de teobromina evidenciadas na Tabela 4.

**Tabela 4 - Dados para construção da curva de calibração da Teobromina**

<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área (mAU.min)</b>
3,0	5,321
5,0	8,992
10,0	17,424
20,0	33,144
30,0	50,433
40,0	65,961
50,0	83,903
<b>Limite de Detecção</b>	<b>Limite de Quantificação</b>
0,06 mAU	0,2 mAU
0,03 mg L <sup>-1</sup>	0,3 mg L <sup>-1</sup>

**Fonte: Autoria própria (2022)**

**Figura 6 - Curva de calibração da teobromina nas concentrações 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>**

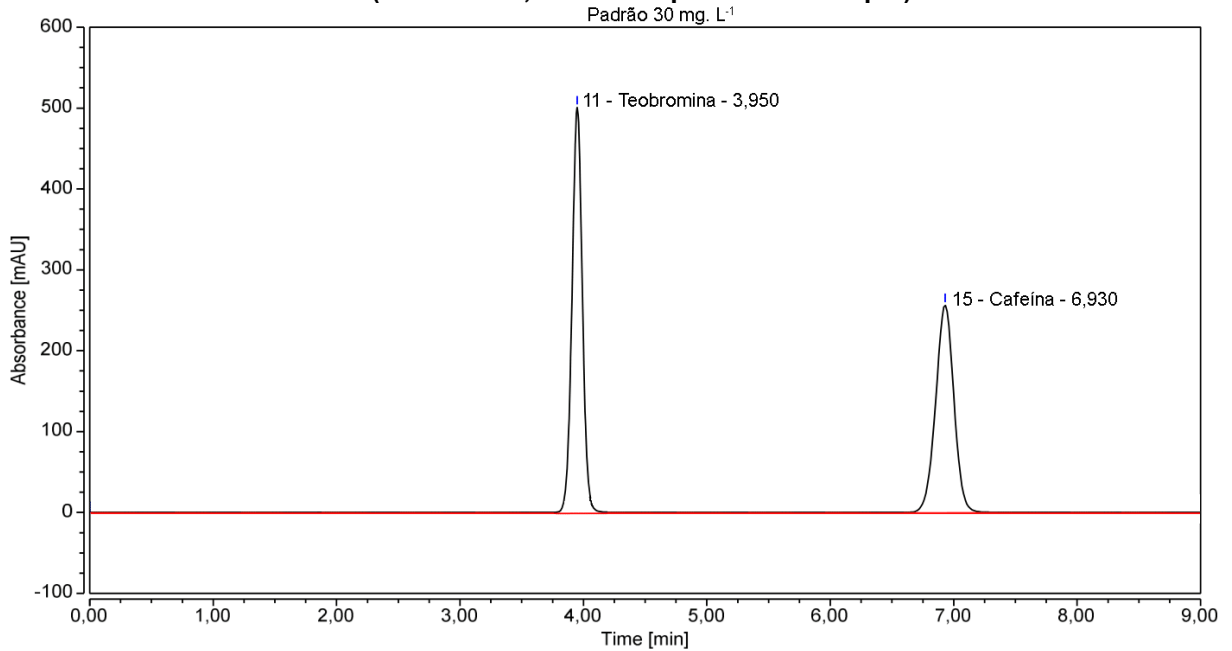


**Fonte: Autoria própria (2022)**

Comprovando os ajustes da equação da reta das análises realizadas, o valor para  $R^2$  é de 0,9997. Por meio da equação da reta (eq. 1), determinou-se as concentrações reais das amostras analisadas.

A Figura 7 representa um cromatograma de um dos pontos de concentração da curva de calibração.

**Figura 7 - Cromatograma 30 mg L<sup>-1</sup> dos padrões de teobromina e cafeína. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

O cromatograma indica o sinal obtido em relação a concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de teobromina com tempo de retenção de 3,950 minutos e para a cafeína, tempo de retenção em 6,930 minutos. O *software* (Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS)) vinculado ao cromatógrafo apresentou as áreas dos picos e as concentrações das amostras analisadas em mg L<sup>-1</sup>. As concentrações foram calculadas de acordo com a equação da reta obtida através da curva de calibração:

$$y = 1,6563x + 0,4973 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que X representa a concentração real das amostras, sendo identificadas na Tabela 5 de acordo com o Método de Extração 1.

**Tabela 5 - Relação da área do pico com as concentrações de Teobromina**

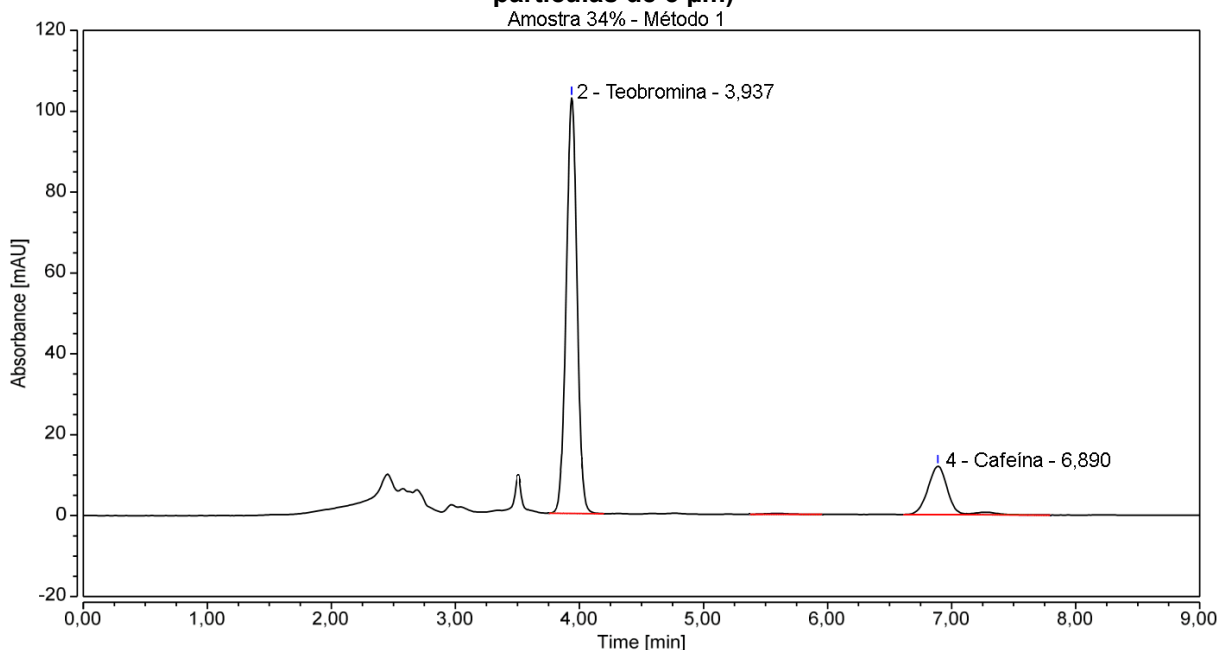
Amostra	Área do pico (mAU.min)	Concentração real (mg g <sup>-1</sup> )
34%	10,32	57,34
55%	26,82	156,99
65%	31,33	184,21
70%	43,13	255,47
85%	54,38	323,37

Fonte: Autoria própria (2022)

Mediante aos resultados observados na Tabela 5, à medida que a porcentagem de cacau aumenta, as concentrações de teobromina aumentam de forma considerável nas amostras. No entanto, na proporção de 55 para 65 a quantidade tenderia para um valor mais diferenciado, ou seja, mais superior, tendo em conta a diferença de 10% do teor de cacau entre as amostras. Enquanto a amostra de 65 para 70, com relação a porcentagem diferencial de 5%, o valor da concentração não aumenta de forma expressiva. Apesar disso, é demonstrado que realmente tende a aumentar a quantidade de teobromina de acordo com a porcentagem do chocolate.

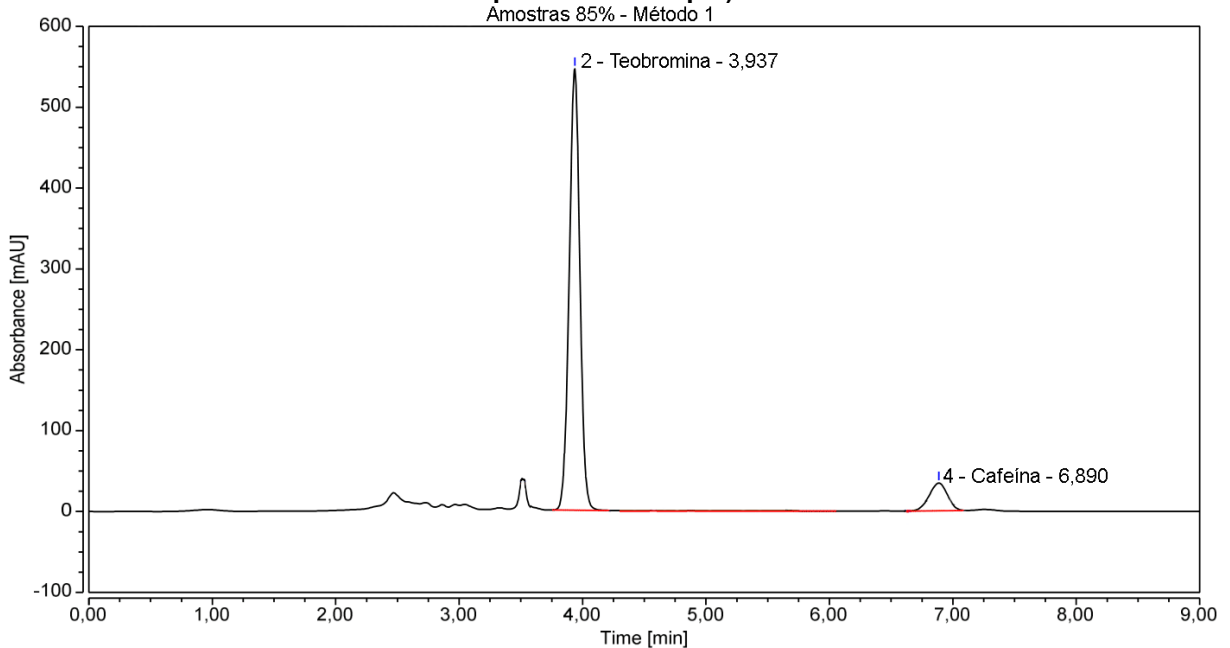
As Figuras 8 e 9 representam as amostras de tabletes de chocolate com 34% e 85% de cacau respectivamente.

**Figura 8 - Cromatograma da amostra 34%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 9 - Cromatograma da amostra 85%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



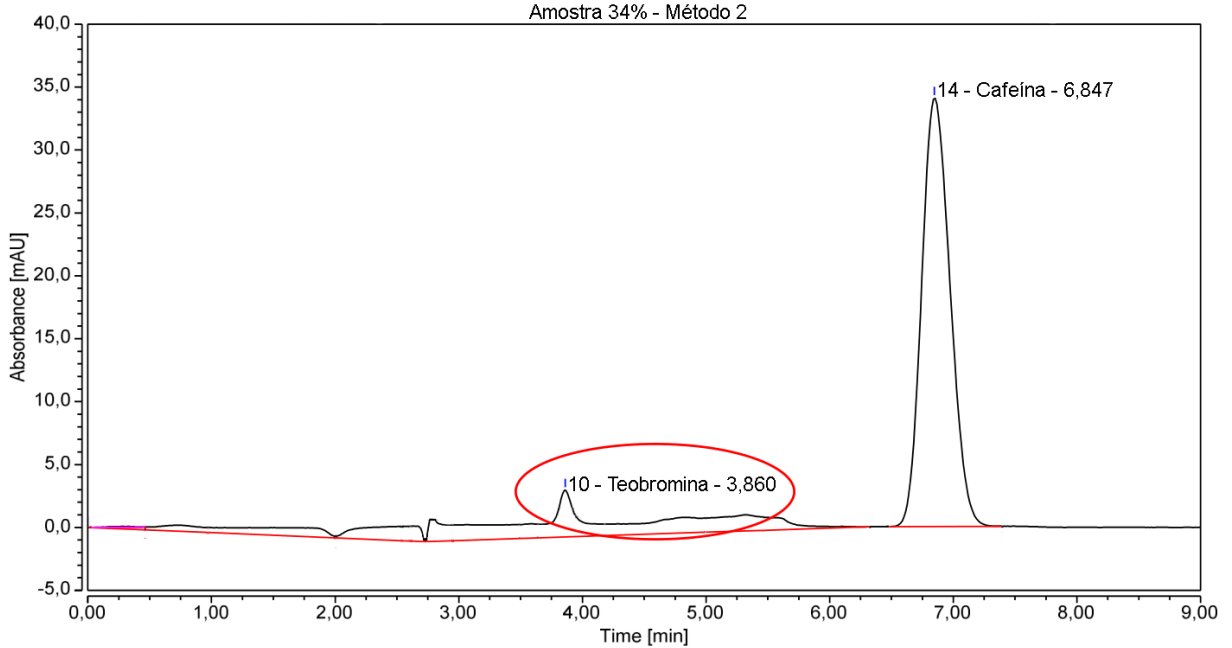
Fonte: Autoria própria (2022)

As amostras de chocolate analisadas apresentaram concentrações maiores do que as concentrações encontradas na literatura. Essa ocorrência pode-se dar devido a diferença das amostras utilizadas ou a eficácia do método de extração aplicado, pois como testado, a utilização de outra metodologia de extração não apresentou quantidades significativas.

Utilizando a metodologia denominada como Método 1, foi possível observar um melhor resultado de extração para teobromina do que para a cafeína e isso foi verificado utilizando o Método 2.

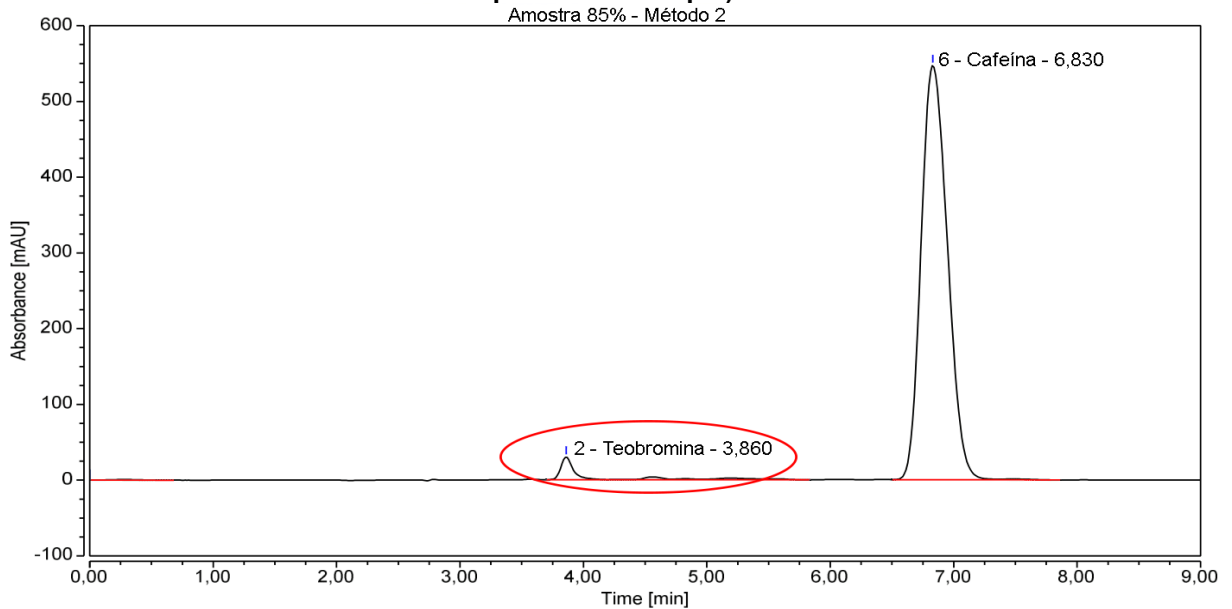
Para o Método 2 de extração, os resultados obtidos de concentração de teobromina não foram significativos em relação ao Método 1. As Figuras 10 e 11 representam as amostras dos tabletes de chocolate analisados com 34% e 85% de cacau respectivamente.

**Figura 10 - Cromatograma da amostra 34%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 11 - Cromatograma da amostra 85%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



Fonte: Autoria própria (2022)

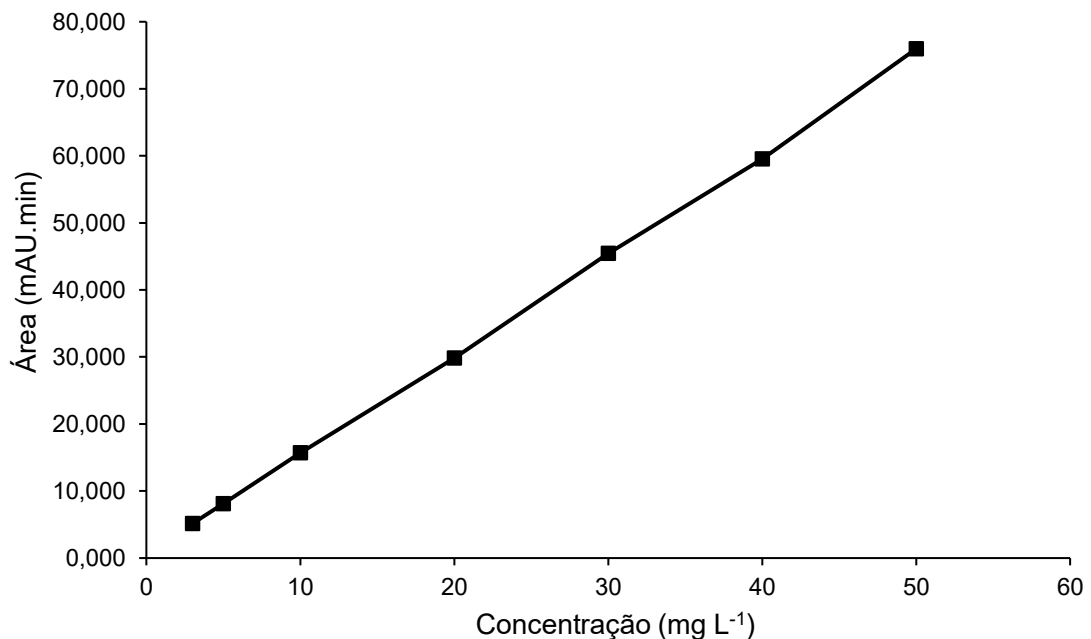
### 6.3.2 Cafeína

A curva de calibração para a cafeína (Figura 12) apresenta os valores das áreas dos picos em função das concentrações de cafeína retratadas na Tabela 6.

**Tabela 6 - Dados para construção da curva de calibração da Cafeína**

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Área (mAU.min)
3,0	5,161
5,0	8,121
10,0	15,682
20,0	29,854
30,0	45,426
40,0	59,513
50,0	75,963
Limite de Detecção	Limite de Quantificação
0,06 mAU	0,2 mAU
0,03 mg L <sup>-1</sup>	0,3 mg L <sup>-1</sup>

Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 12 - Curva de calibração da cafeína nas concentrações 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>**

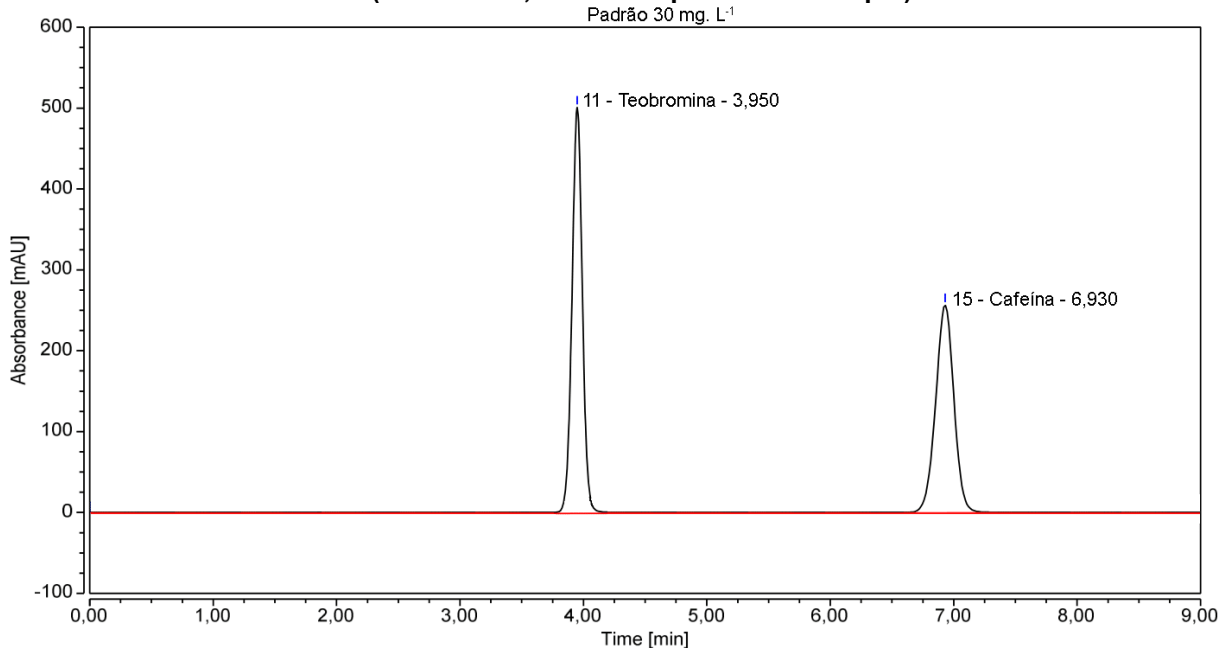
Fonte: Autoria própria (2022)

Os ajustes da equação da reta das análises realizadas são comprovados pelo valor de 0,9997 para  $R^2$ . Por meio da equação da reta (eq. 2), determinou-se as concentrações reais das amostras analisadas.

A Figura 13 representa um cromatograma de um dos pontos de concentração da curva de calibração.



**Figura 13 - Cromatograma 30 mg L<sup>-1</sup> dos padrões de teobromina e cafeína. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



Fonte: Autoria própria (2022)

O cromatograma indica o sinal obtido em relação a concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de cafeína com tempo de retenção de 3,950 minutos e para a cafeína, tempo de retenção em 6,930 minutos. O *software* (Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) vinculado ao cromatógrafo apresentou as áreas dos picos e as concentrações das amostras analisadas em mg L<sup>-1</sup>. De acordo com a equação da reta obtida através da curva de calibração as concentrações foram calculadas:

$$y = 1,4944x + 0,5148 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que X representa a concentração real das amostras para o Método 1, sendo identificadas na Tabela 7.

Para a cafeína, a Tabela 7 apresenta os resultados das concentrações obtidas pela utilização do Método 1.

**Tabela 7 - Relação da área do pico com as concentrações de Cafeína**

<b>Amostra</b>	<b>Área do pico (mAU.min)</b>	<b>Concentração real (mg g<sup>-1</sup>)</b>
34%	1,93	7,79
55%	3,32	17,12
65%	5,43	31,22
70%	5,03	28,53
85%	5,89	34,26

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Para o Método 2 utilizando as mesmas amostras, as concentrações reais foram obtidas através da eq. 2. Sendo identificadas na Tabela 8.

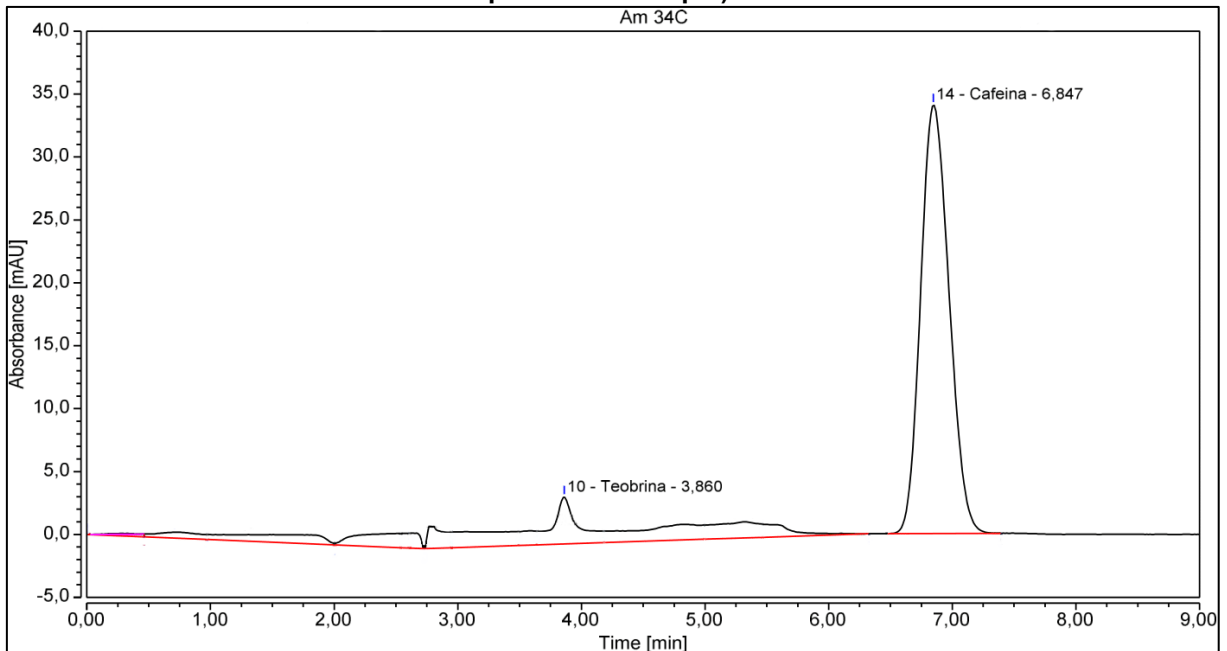
**Tabela 8 - Relação da área do pico com as concentrações**

<b>Amostra</b>	<b>Área do pico (mAU.min)</b>	<b>Concentração real (mg g<sup>-1</sup>)</b>
34%	15,09	9,58
55%	58,20	38,43
65%	82,27	54,54
70%	104,71	69,55
85%	135,11	89,89

**Fonte: Autoria própria (2022)**

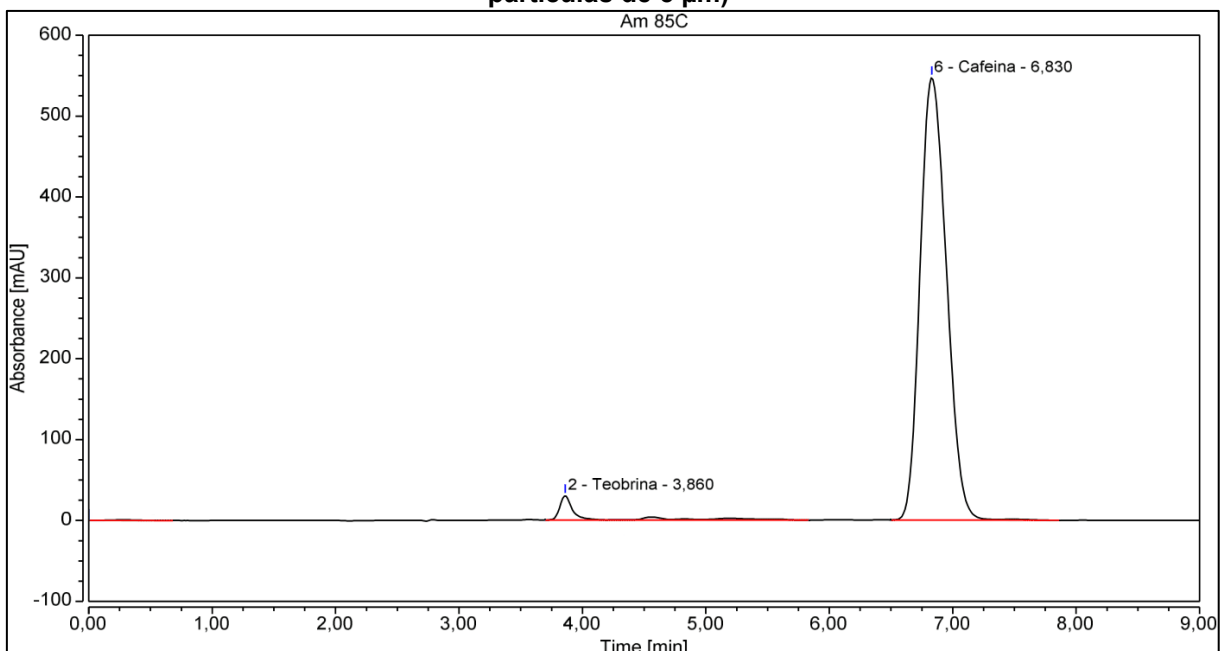
Para o Método de Extração 2, as Figuras 14 e 15 representam as amostras dos tabletes de chocolate analisados com 34% e 85% de cacau respectivamente.

**Figura 14 - Cromatograma da amostra 34%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



Fonte: Autoria própria (2022)

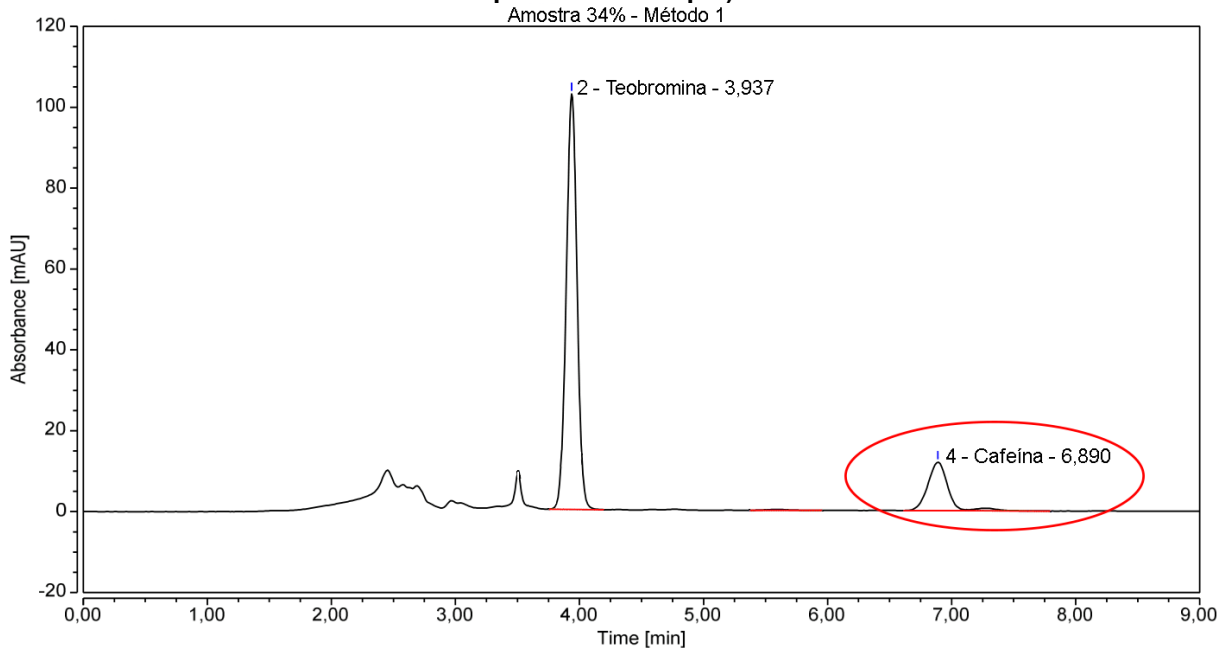
**Figura 15 - Cromatograma da amostra 85%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



Fonte: Autoria própria (2022)

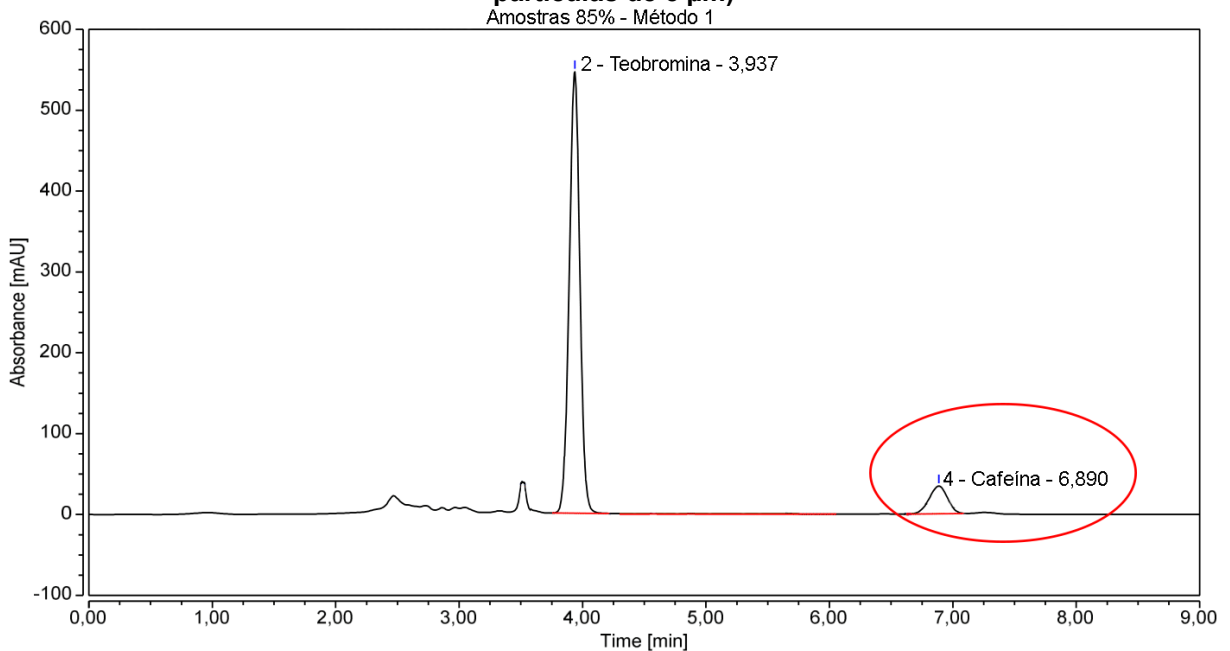
Para o Método de Extração 1, as Figuras 16 e 17 representam as amostras dos tabletes de chocolate analisados com 34% e 85% de cacau respectivamente.

**Figura 16 - Cromatograma da amostra 34%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 17 - Cromatograma da amostra 85%. Condições: Fase móvel água/metanol (65:35), vazão 0,6 mL min<sup>-1</sup>, injeção 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm)**



Fonte: Autoria própria (2022)

As amostras de chocolate analisadas apresentaram concentrações maiores de cafeína do que as concentrações encontradas na literatura. A diferença das amostras podem ser resultantes da desigualdade das concentrações ou a eficiência do método de extração utilizado.

Os métodos propostos foram aplicados as mesmas amostras de barras de chocolate, e os resultados foram comparados. Os resultados das amostras analisadas obtidas pelo Método 1 e 2 são apresentadas na Tabela 9.

Os valores obtidos de teobromina para cada amostra foram maiores pelo Método 1, enquanto os valores alcançados para cafeína foram superiores na aplicação do Método 2.

**Tabela 9 - Concentrações obtidas de Teobromina (TB) e Cafeína (CF) pelos Métodos 1 e 2**

Amostra	Método 1		Método 2	
	Concentração Experimental TB (mg g <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental CF (mg g <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental TB (mg g <sup>-1</sup> )	Concentração Experimental CF (mg g <sup>-1</sup> )
34%	57,34	7,79	0,21	9,58
85%	323,37	34,26	15,32	89,89

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Analisando os resultados obtidos das concentrações e recordando que a mesma amostra foi utilizada para os dois métodos empregados, é possível determinar que o Método 1 é mais eficaz para a extração da teobromina e o Método 2 mais eficiente para a extração da cafeína.

A teobromina e a cafeína são alcaloides de origem natural, contendo, carbono, hidrogênio e nitrogênio. Apesar de serem classificadas na mesma categoria de metilxantinas, ambas apresentam diferenças significativas.

A teobromina por exemplo é praticamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, no entanto, apresenta maior solubilidade em ácidos minerais diluídos. Em meio ácido comprova-se a importância da acidificação para a extração da teobromina, o que está provavelmente relacionado com a descomplexação e com a protonação da metilxantina e conseqüentemente o aumento da solubilidade em água, a qual é incrementada pela elevação da temperatura. A solubilidade da teobromina é bastante baixa em comparação com a cafeína, isso pode ser explicado pela existência de ligações intermoleculares relativamente fortes e a tendência da molécula para formar aglomerados (ZHONG, 2017).

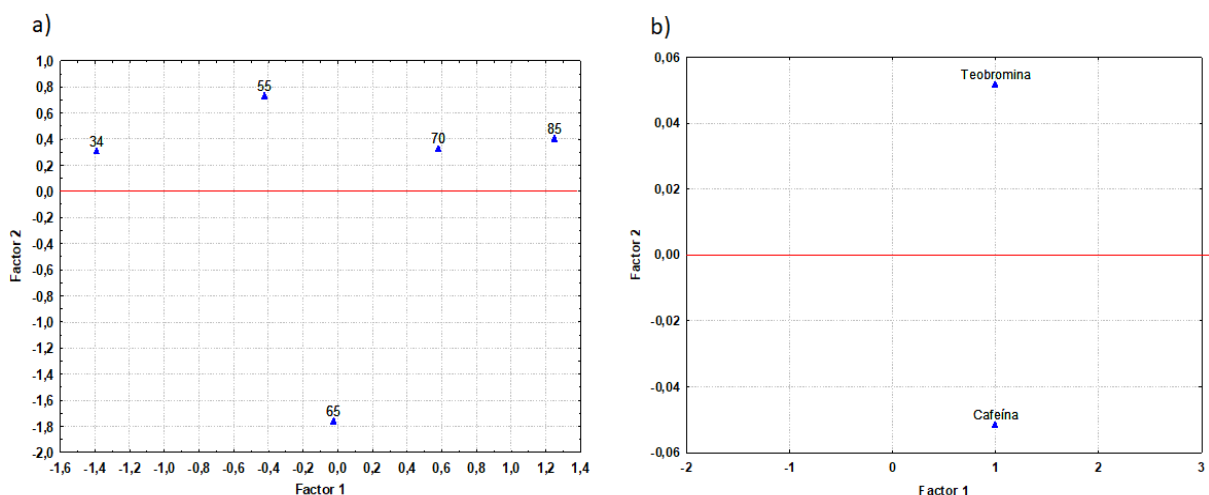
## 6.4 Análise dos dados usando ACP

O agrupamento das amostras de acordo com os valores médios obtidos nas análises realizadas foi verificado através de uma análise exploratória utilizando Análise das Componentes Principais. Desta maneira, foi montada uma matriz no programa Statistica 7, composta por 5 linhas (amostras) e 2 colunas (variáveis: teor de teobromina e cafeína).

Devido a que apenas duas variáveis estavam sendo analisadas, obtiveram duas componentes principais que explicaram 99,74% e 0,26% da variância total contida nos dados. Portanto, a discriminação das amostras foi encontrada na projeção de CP1 x CP2. A Figura 18 a) e b) mostram os escores das amostras e dos parâmetros analisados (teobromina e cafeína), respectivamente.

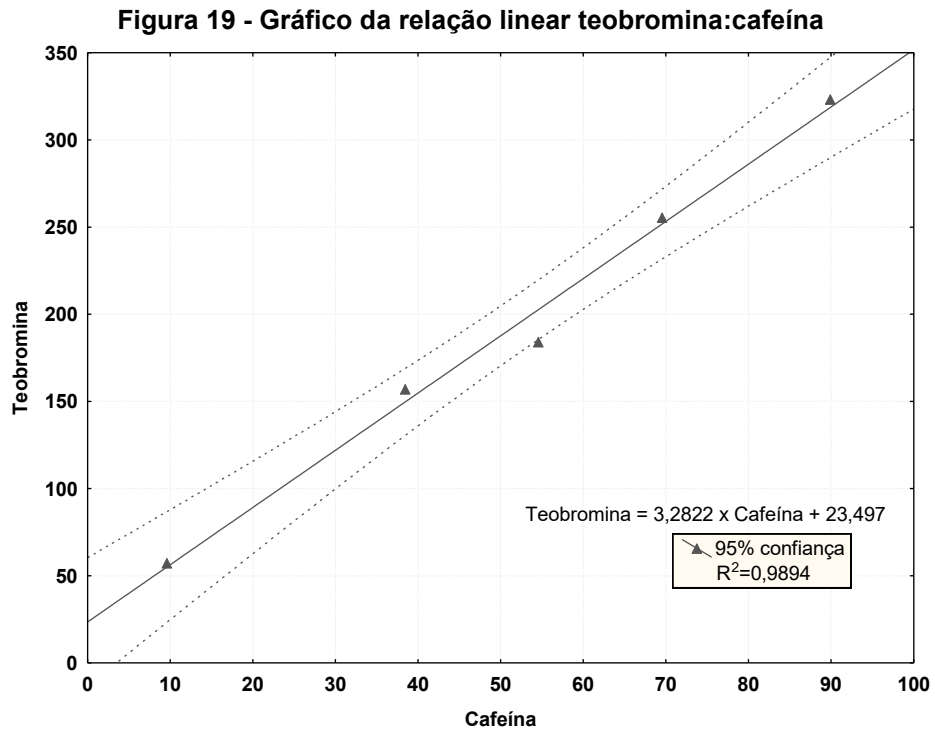
Os escores positivos da CP2 (Figura 18a) agrupam as amostras de chocolate com 34, 55, 70 e 85% de cacau, indicando que estas amostras apresentam um teor mais elevado de teobromina, composto que se encontra nos escores positivos da CP2, como se observa na Figura 18b. Já a amostra com 65% de cacau se agrupou nos escores negativos da CP2 (Figura 18a), apresentando maior teor de cafeína em relação às outras amostras (Figura 18b).

**Figura 18 - a) Gráfico dos escores para as amostras; b) Gráfico dos escores dos parâmetros analisados**



Fonte: Autoria própria (2022)

Os teores de cafeína e teobromina estão altamente correlacionados, a nível de 95% de confiança. A Figura 19 mostra o gráfico da relação linear destes dois parâmetros e a equação da reta, que estabelece esta relação com  $R^2 = 0,9894$ .



Fonte: Autoria própria (2022)

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho foi verificado que apesar das semelhanças entre as metilxantinas, teobromina e cafeína, estas apresentaram um perfil diferenciado com relação aos métodos de extração.

Os métodos foram determinados com o comparativo entre outros também encontrados na literatura, realizados as extrações das mesmas amostras e determinados analiticamente pelo método cromatográfico. Para a escolha do melhor método, foi levando em consideração os resultados com maior área do pico, menos ruídos, uma boa separação e simetria para os picos. O método empregando, a CL mostrou-se adequado para a determinação dos alcaloides – teobromina e cafeína, sendo: preciso, linear em uma ampla faixa dinâmica, seletivo, com limites de detecção e quantificação compatíveis com os teores das amostras analisadas. Assim, os Métodos 1 e 2 apresentaram melhores resultados de extração para a teobromina e cafeína respectivamente.

Dessa forma, as amostras de barras de chocolate analisadas com distintas porcentagens de cacau, foram: 34%, 55%, 65%, 70% e 85%. E as determinações analíticas pelo método cromatográfico apresentaram concentrações de teobromina de 57,34; 156,99; 184,21; 255,47; 323,37 mg g<sup>-1</sup> respectivamente as porcentagens e concentrações de cafeína de 9,58; 38,43; 54,54; 69,55; 89,89 mg g<sup>-1</sup> na devida ordem. Assim, à medida que a porcentagem de cacau aumenta, as concentrações de teobromina e cafeína aumentam de forma considerável nas amostras.

A ACP mostrou que as amostras com 34, 55, 70 e 85% de cacau apresentaram maior teor de teobromina enquanto a amostra com 65 % de cacau se caracterizou por um maior teor de cafeína. As duas metilxantinas se apresentaram correlacionadas ao nível de 95% de confiança, mantendo uma relação linear entre os seus teores.



## 8 REFERÊNCIAS

ALVES, A. B. BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Campinas, São Paulo. v 38, n 2, p. 237-243, 2002.

ARGENTON, A. Conceitos fundamentais de Cromatografia a liquido de Alto Desempenho (HPLC). **Conselho Regional de Química – IV Região (SP)**. São José do Rio Preto, São Paulo. 2010.

BATISTA, A. S. P. A. **CHOCOLATE: SUA HISTÓRIA E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS**. Monografia (Especialização em Gastronomia e Saúde) - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília, 2008.

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

BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**; trad. de Mariano González Alonso. 1 ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 423 p.

BRAUDEAU, J. El cacao: técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona. Ed. Blume, 1970. 297p.

CAROLINA, A. MONTEIRO, B. DORIGATTI, D. FANTINI, J. COMUNE, O, A. BEIRA, J. DA SILVA, M. **Extração e quantificação de Cafeína em alimentos utilizando a técnica de Cromatografia em Camada Delgada**. Amparo, São Paulo, 2015. Disponível em: <[https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/06/4cromatografia\\_de\\_camada\\_delgada.pdf](https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/06/4cromatografia_de_camada_delgada.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2021.

CASSIANO, Neila Maria et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas. Unicamp, 2006.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. CAFEÍNA: REVISÃO SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISE. **Química Nova**. v 30, n 1, p. 99-105, 2007.

DEWICK, P. M.; Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach. 3ª edição: Editora Wiley, 2009.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de semente de cacau para produção de chocolate**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

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

GONZÁLES, C. M. F. **EFEITO DA ADIÇÃO DE TEOBROMINA SOBRE AS PROPRIEDADES DO CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO**, 2018. Tese – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro. LTC, 2013.

IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Geneva: World Health Organization. **International Agency for Research on Cancer**. 1972-PRESENT. (Multivolume work). p. V51 432 (1991).

Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. (2001). **Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations**. National Academic Press.

KHADIDJA, BENALI.; RADHIA, FIZIR. **Etude comparative de l'activité biologique de la caféine et de la théobromine**, 2016. Mémoire du Projet de Fin d'Etudes Pour l'obtention du diplôme Master En Génie des procédés - Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, Argélia, 2016.

LAJUS, B. Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau. São Paulo, 1982. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1982.

Le Couteur, P. Burreson, J. **Os botões de Napoleão: as 17 moléculas que mudaram a história**. Tradução: Maria Luiza X. de A. Borges. Rio de Janeiro: Zahar, 2006. 343p.

LUNA, F.; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 50, n. 12, p. 3527-3532, 2002. PMID:12033823. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0116597>.

MARIANO, R. S. **Desenvolvimento De Metodologia Analítica De Impressão Digital Espectroscópica Para Análise De Metabólitos Em Grãos Verdes E Torrados De Coffea arabica E Coffea canephora**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, 2021.

MARIANO, R. S. **Determinação De Cafeína Em Bebidas Estimulantes Por Cromatografia Líquida E Espectrofotometria UV-Vis**. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciado em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, Paraná, 2018.

MARKITANTOV, B. IGOR. **Eficiência e Qualidade da Produção de Chocolate**. São Petersburgo: Agência de impressão RDK, 2002. 89P.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, S. et al. Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. **Food Research International**, v. 63, p. 446–455, 2014.

MENGUY, L. PRIM, D. SINCLAIR, A. C. MARC, IMAN. The Determination of Methylxanthines in Chocolate and Cocoa by Different Separation Techniques: HPLC, Instrumental TLC, and MECC. **Journal of Chemical Education**. Versailles, França. v 86, n 11, p. 1307-1310. 2009.

MISNAWI; JINAP, S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 85, n. 6, p. 917-924, 2005. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1954>.

MONTEIRO, Mariana C; TRUGO, Luis C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.

NASCIMENTO, M. M. **Estratégias Analíticas Para Determinação De Metilxantinas E Flavonoides Em Amostras De Chocolates Artesanais Com Diferentes Teores de Cacau**. Dissertação (Pós-Graduação em Química). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, Bahia, 2016.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>. Acesso em: 4 de jul. 2022.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 5429, Theobromine**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theobromine>. Acesso em: 4 de jul. 2022.

OLIVEIRA, D. F. M. **Velho alimento, novos benefícios**. Dissertação (Mestrado Integrado Em Medicina). Faculdade De Medicina Da Universidade De Coimbra. Coimbra, Portugal, 2013.

O'Neil, M.J. (ed.). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013., p. 289.

PASCHOAL, V.; KALLUF, L. Fome de bom humor. In: MARANGONI, S. **Revista Nutrir**, 2 ed., n. 2, p. 32-35, 2009.

PAVIA, L. D. *Coffee, Tea, or Cocoa*. Western Washington State College Eellingham. v 50, n 11, 1973.

PERALTA-JIMÉNEZ, L.; CAÑIZARES-MACÍAS, M. P. Ultrasound-Assisted Method for Extraction of Theobromine and Caffeine from Cacao Seeds and Chocolate Products. **Food Bioprocess Technol**. Mexico – DF, 2012.

PICKENHAGEN, W.; DIETRICH, P.; KEIL, B.; POLONSKY, J.; NOUAILLE, F.; LEDERER, E. Identification of the bitter principle from cocoa. *Helvetica Chimica Acta*, Basel, v. 58, n. 4, p. 1078-1086, 1975. PMID:1158737. <http://dx.doi.org/10.1002/hlca.19750580411>.

PIRES, Elísabet. **Chocolate sí, pero sin pesarse**. Disponível em: <<https://isqch.wordpress.com/2013/12/16/chocolate-si-pero-sin-pasarse/>>. Acesso em: 26 de jun. de 2022.

PURA NAIK, J. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3579–3583, 2001.

RICHARDS, A. WAILES, B. Estimation of Fat-Free Cocoa Solids in Chocolate and Cocoa Products – Global Survey of Typical Concentrations of Theobromine and Caffeine Determined by HPLC. **Journal of the Association of Public Analysts**. v 40, p. 1-12, 2012.

SCOTT, R. P. W. *Liquid Chromatography*. Chrom-Ed Book Series-library4science, LLC, 2003.

SERRA-BONVEHÍ, J.; VENTURA COLL, F. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chemistry*, v. 60, n. 3, p. 365-370, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00353-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00353-6).

SKOOG, Douglas. A.; WEST, Donald. M.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SMIT, H. J. **Theobromine and the pharmacology of cocoa** *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2011.

SOTO-VACA, A.; GUTIERREZ, A.; LOSSO, J. N.; XU, Z.; FINLEY, J. W. Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 6658-6677, 2012.

TAVARES, C. KIMIKO, R. Cafeína para o Tratamento de Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. V. 62, n 3, p. 387-401, 2012.

TERRILE, A. E. **Impressão Digital Espectroscópica Em Grãos Crus De Coffea Arabica, Cultivado Em Dois Tipos De Arranjo E Duas Densidades De Plantio**. Tese (Doutora em Química Analítica). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, 2016.

VERNA, R. The history and science of chocolate. **Malaysian J Pathol**. v 35, n 2, p. 111-121, 2013.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda**. v. 81, p. 243S-255S, 2005.

ZHONG, Jialun et al. Measurement and correlation of solubility of theobromine, theophylline, and caffeine in water and organic solvents at various temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 62, n. 9, p. 2570-2577, 2017.