UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

IZABELA SALVADOR

Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacau, chocolates,
achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas

PIRACICABA

2011

IZABELA SALVADOR

Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacau, chocolates,
achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas

Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Energia Nuclear na
Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Severino Matias de
Alencar

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Salvador, Izabela

Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacau, chocolates, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas / Izabela Salvador; orientador Severino Matias de Alencar. - - Piracicaba, 2011.

90 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Antioxidantes 2. Compostos fenólicos 3. Cromatografia gasosa
4. Cromatografia líquida de alta eficiência 5. Metabólitos secundários I. Título

CDU 577.127:(633.914.5+66.094.3-097.8)

Dedico,
aos meus pais, Alder e Rosângela,
por terem me ensinado o valor dos estudos e sempre me apoiarem,
apesar de todas as dificuldades;
às minhas irmãs Natália e Gabriela,
e aos meus sobrinhos, Rafaela e Miguel.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, pela orientação, confiança, atenção, generosidade e, principalmente, pela oportunidade concedida.

Ao CENA/USP, pela oportunidade de realização do Mestrado. Agradeço a todos os funcionários e professores, em especial à Profa. Dra. Siu Mui Tsai.

À minha família pelo apoio e incentivo, especialmente à Gabriela, por ter me acompanhado ao longo de todos esses anos em Piracicaba.

Às amigas do laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da Esalq/USP: Adna, Ana Paula, Ivani, Keityane, Juliana, Luciana Mourão, Luciana Ferracini, Lucimara, Maria Augusta, Priscilla, Tatiane e Rosângela, pelos bons momentos e conhecimentos que compartilhamos. À Adna e Ivani, muito obrigada pela persistência, disponibilidade e boa vontade!

À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), pelo fornecimento de amostras.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“O saber se aprende com os mestres.
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida”
(Cora Coralina)

RESUMO

SALVADOR, I. **Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacau, chocolates, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

O estilbeno resveratrol é um composto fenólico potencialmente benéfico à saúde, principalmente devido a sua atividade cardioprotetora. Apesar de abundante em uvas e vinhos tintos, o resveratrol encontra-se ausente na maioria das frutas e vegetais que compõe a dieta humana. Recentemente, este estilbeno foi detectado em cacau e chocolates da Europa e Estados Unidos, configurando-os como sua segunda maior fonte comestível. A escassez de estudos acerca da ocorrência de resveratrol em alimentos consumidos pela população brasileira torna evidente a importância da investigação por fontes que o contenham. Este estudo teve como objetivos avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante de extratos aquosos e alcoólicos de cacau e derivados produzidos no Brasil, além do teor de resveratrol. Foram analisados 14 produtos que incluíram “*nibs*” de cacau, chocolates 70% e 56% de cacau, chocolates meio amargos, ao leite, brancos, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas, de marcas populares do mercado brasileiro. Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A identificação do resveratrol nas amostras foi confirmada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e a quantificação foi feita pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os extratos aquosos apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos totais (mg AG.g^{-1}), na seguinte ordem: “*nibs*” de cacau (21,54) > chocolate 70% (10,45) > chocolate 56% (9,51) > chocolates meio amargos (8,15) > achocolatados em pó (5,91) > chocolates ao leite (3,77) > chocolates brancos (1,22) > bebidas lácteas achocolatadas (0,96). A mesma sequência foi encontrada para a atividade antioxidante obtida pelos métodos indiretos, exceto para chocolates brancos, que exibiram os menores potenciais. Os extratos aquosos apresentaram a maior atividade antioxidante, variando de 86,53 a 1,55% pelo método DPPH; 141,27 a 3,2 $\mu\text{M trolox.g}^{-1}$ pelo método ABTS e 354,42 a 2,27 $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ pelo método FRAP. Por meio da auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, os extratos aquosos e alcoólicos mostraram valores similares para atividade antioxidante, a qual foi maior que 70% para “*nibs*” de cacau e chocolates 70% e 56%. O estilbeno resveratrol foi identificado em todas as amostras analisadas por CG-EM, entretanto em virtude da presença de teores abaixo do limite de quantificação, não foi possível a sua quantificação na maioria das amostras pela técnica de CLAE. Chocolates meio amargos exibiram os maiores teores de resveratrol, os quais foram superiores aos relatados para os mesmos produtos europeus e americanos. Apesar do cacau brasileiro não estar entre os de melhor qualidade, os resultados obtidos mostram seu elevado potencial antioxidante e de seus derivados, contribuindo para a ingestão de antioxidantes pela população brasileira, dentre os quais o estilbeno resveratrol.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Resveratrol. Atividade antioxidante. Cacau. Chocolate. CG-EM. CLAE.

ABSTRACT

SALVADOR, I. **Antioxidant activity and resveratrol level in cocoa, chocolates, chocolate powders and chocolate milk beverages**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

The stilbene resveratrol is a phenolic compound potentially beneficial to human healthy, mainly due it cardioprotector properties. Despite it abundance in grapes and wines, this stilbene lacks in most fruits and vegetables that compose human diet. Recently, resveratrol was detected in cocoa and chocolates commercialized in Europe and United States, making these products the second edible source of resveratrol. The lack of studies about resveratrol occurrence in Brazilian diet makes evident the need for investigation of the stilbene sources. This study aimed at analyzing the amount of total phenolic compounds, the antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of cocoa and cocoa products from Brazil, and the resveratrol level. A total of 14 products were analyzed, including cocoa *nibs*, chocolates 70% and 56% cocoa, dark, milk and white chocolates, chocolate milk beverages and chocolate powders, of popular Brazilian trademarks. The total phenolic compounds were quantified by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was determined using the DPPH, ABTS, FRAP and β -carotene bleaching assays. Identification of resveratrol in the samples was confirmed by gas chromatography/mass spectrometry method (GC-MS) and quantification was obtained by high performance liquid chromatography (HPLC). Aqueous extracts showed a higher phenolic content (mg GAE.g^{-1}), following the sequence: cocoa *nibs* (21,54) > chocolate 70% (10,45), chocolate 56% (9,51), dark chocolates (8,15) > chocolate powders (5,91) > milk chocolates (3,77) > white chocolates (1,22) > chocolate milk beverages (0,96). The same sequence was detected for the antioxidant activity obtained by indirect methods, except for white chocolates, which exhibited the lowest antioxidant activity. Aqueous extracts showed a higher antioxidant activity, ranging from 86,53 to 1,55% in the DPPH assay; 141,27 to 3,2 $\mu\text{M trolox.g}^{-1}$ in the ABTS assay and 354,42 to 2,27 $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ in the FRAP assay. By the β -carotene bleaching method, methanolic and aqueous extracts showed similar antioxidant activities, which were higher than 70% for cocoa and chocolates 70% and 56% cocoa. Resveratrol was identified in all the samples analyzed by GC-MS, but its presence below the limit of quantification doesn't allow its determination in all samples by HPLC. Dark chocolates exhibited the highest resveratrol levels, which were higher than those related for the same European and American products. Although Brazilian cocoa isn't recognized for its quality, the results obtained show it high antioxidant activity and of its derivatives, contributing for antioxidants intake by Brazilian population, among them the stilbene resveratrol.

Keywords: Phenolic compounds. Resveratrol. Antioxidant activity. Cocoa. Chocolate. GC-MS. HPLC.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 <i>Theobroma cacao</i>	12
2.2 Produtos derivados de cacau	14
2.3 Compostos fenólicos	16
2.4 Compostos fenólicos do cacau	18
2.5 Resveratrol	19
2.6 Antioxidantes	21
2.7 Métodos de medida da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	25
2.7.1 Métodos indiretos de medida da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	25
2.7.1.1 DPPH	26
2.7.1.2 ABTS	27
2.7.1.3 FRAP	29
2.7.2 Métodos diretos de medida da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	30
2.7.2.1 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico	30
2.8 Métodos químicos e instrumentais utilizados para análises de compostos fenólicos	31
2.9 Validação	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Coleta de material	35
3.2 Preparo dos extratos brutos (EB)	36
3.3 Análises físico-químicas	36
3.3.1 Espectrofotometria da região ultravioleta-visível (UV-Vis)	36
3.3.2 Compostos fenólicos totais	36
3.4 Avaliação da atividade antioxidante	37
3.4.1 Atividade sequestrante do radical DPPH	37
3.4.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS ^{•+}	38
3.4.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)	39
3.4.4 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico	39
3.5 Identificação do resveratrol por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM)	40
3.5.1 Obtenção do extrato rico em estilbenos (EE)	40

3.5.2 Derivatização – formação dos derivados do trimetilsilil (TMS)	40
3.5.3 Condições analíticas do sistema de cromatografia	41
3.6 Quantificação do teor de resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)	41
3.6.1 Obtenção do extrato rico em estilbenos (EE)	41
3.6.2 Condições analíticas do sistema de cromatografia	42
3.6.3 Validação.....	42
3.7 Análise estatística	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Análises físico-químicas.....	44
4.1.1 Espectrofotometria da região ultravioleta-visível (UV-Vis).....	44
4.1.2 Compostos fenólicos totais.....	46
4.2 Avaliação da atividade antioxidante	49
4.2.1 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	49
4.2.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS ^{•+}	57
4.2.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).....	58
4.2.4 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	60
4.2.5 Correlação entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante	64
4.3 Identificação e quantificação de resveratrol	65
4.3.1 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM).....	65
4.3.2 Quantificação de resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)	68
5. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

Radicais livres são responsáveis pelo estresse oxidativo, o qual leva ao desenvolvimento de doenças humanas degenerativas, como as cardiovasculares, neurológicas e câncer, por meio de múltiplos mecanismos. Recentemente, alimentos *in natura* e antioxidantes derivados, tais como vitaminas e compostos fenólicos, têm recebido atenção especial, por serem conhecidos como agentes protetores contra os danos oxidativos (LEE et al., 2003).

Devido aos seus efeitos antioxidantes, o interesse no estudo dos compostos fenólicos vem aumentando (BRAVO, 1998; SCALBERT et al., 2005). Embora seu papel na saúde ainda não tenha sido totalmente esclarecido, estudos *in vitro* com culturas de células humanas e estudos experimentais com animais, aliados a evidências epidemiológicas, sustentam a hipótese dos compostos fenólicos como agentes benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, diabetes e osteoporose (DUTHIE; GARDNER; KYLE, 2003; SCALBERT et al., 2005; HERRERA et al., 2009).

Um dos compostos fenólicos de destaque em diversos estudos por suas potenciais implicações à saúde é o estilbeno resveratrol. O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina de ocorrência natural, produzida por uma grande variedade de plantas em resposta ao estresse, à injúrias, radiação ultravioleta e infecções fúngicas (LANGCAKE; PRYCE, 1976; LANGCAKE; CORNFORD; PRYCE, 1979; BHAT; KOSMEDER II; PEZZUTO, 2001; AGGARWAL et al., 2004). O consumo regular de vinho tinto, que contém o estilbeno, é amplamente aceito como a explicação para o “Paradoxo Francês”, termo utilizado para descrever a observação de que os franceses apresentam baixo risco de desenvolver doenças cardiovasculares, apesar de sua dieta rica em gorduras saturadas (RENAUD; GUEGUEN, 1998).

Embora abundante em uvas e vinhos tintos, onde sua presença tem sido extensivamente estudada, o resveratrol está praticamente ausente na maioria das frutas e vegetais que compõem a dieta humana (IBERN-GÓMEZ et al., 2000; BHAT; KOSMEDER II; PEZZUTO, 2001), sendo sua ocorrência limitada a uvas, vinhos, amoras, amendoins, pistaches e alguns chás. O resveratrol foi detectado pela primeira vez em cacau e chocolates por Counet, Callemien e Collin (2006) e já foi demonstrado que estes alimentos representam a segunda maior fonte

comestível de *trans*-resveratrol, contribuindo significativamente para a ingestão deste estilbeno pela população americana (HURST et al., 2008).

O cacau, ingrediente essencial na elaboração de chocolates, é uma fonte com grande capacidade antioxidante, maior que a de chás e vinho tinto (ARTS; HOLLMAN; KROMHOUT, 1999; LEE et al., 2003). Apesar de frequentemente visto como um alimento de baixo valor nutricional, estudos recentes tem demonstrado que o chocolate possui propriedades benéficas à saúde, devido à sua elevada quantidade de antioxidantes fenólicos (VINSON et al., 2006).

O alto conteúdo fenólico do cacau e chocolates rende a estes alimentos um interesse particular dos pontos de vista nutricional e farmacológico, tornando crescente o interesse nas atividades biológicas dos compostos fenólicos a eles associados (VISIOLI et al., 2009). Embora as propriedades antioxidantes do cacau e chocolates tenham sido evidenciadas em diversos estudos, estas foram atribuídas principalmente aos flavonóides neles presentes, sendo poucos e recentes os estudos acerca da ocorrência de resveratrol nestes alimentos.

As poucas fontes comestíveis e o potencial terapêutico do estilbeno resveratrol, associados à crescente demanda da população por alimentos funcionais, tornam evidente a importância da investigação por alimentos que contenham este composto fenólico. Por ser um alimento muito apreciado e consumido em todo o país e devido aos recentes relatos da ocorrência de resveratrol em cacau e chocolates nos Estados Unidos e Europa, estes se constituem em potenciais fontes para o estudo da ocorrência de resveratrol e da atividade antioxidante, dentre os alimentos consumidos pela população brasileira.

Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante de cacau e produtos derivados produzidos no Brasil por meio de quatro métodos distintos, bem como identificar e quantificar o estilbeno resveratrol por meio das técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Theobroma cacao*

Theobroma cacao é uma árvore nativa da América do Sul, que se propagou naturalmente para a América Central (BEARDEN et al., 2000). A espécie ocorre em regiões de clima quente e úmido, localizadas ao longo de 20° de latitude norte e sul.

O cacaueiro começa a frutificar por volta dos três anos e produz abundantemente a partir dos oito, mantendo produção satisfatória até os trinta anos. Entretanto, em condições excepcionais, pode produzir até os cinquenta anos, e viver mais de cem. Suas flores, pequenas e avermelhadas, unidas ao tronco, originam as bagas ou frutos, os quais medem de 15 a 30 cm de comprimento. Cada fruto contém entre 20 e 40 sementes envoltas em uma polpa mucilaginosa, e quando maduros, adquirem tonalidade alaranjada, amarela ou roxa, de acordo com a variedade (LAJUS, 1982; ELKON, 2004).

Sensível a extremos climáticos e muito vulnerável a pragas e fungos, o cacaueiro requer calor e umidade. Temperaturas entre 24 e 28°C e, no mínimo, 1500 mm de chuva bem distribuída ao longo do ano representam as condições ideais para seu cultivo (ELKON, 2004).

Membro da ordem Sterculiaceae, ocorre nas variedades *Criollo* e *Forastero*, sendo a variedade *Forastero* dividida em diversas subvariedades. Um terceiro grupo, *Trinitario*, é essencialmente um cruzamento entre as outras duas variedades, e não ocorre naturalmente (MINIFIE, 1989).

Os frutos da variedade *Criollo* são alongados, sua superfície externa é enrugada e apresenta cinco sulcos longitudinais profundos e outros cinco menos pronunciados. As sementes encontram-se relativamente soltas na polpa e são redondas, brancas ou róseas, de sabor adocicado e fermentação rápida. A variedade é encontrada principalmente na Venezuela, América Central, México, Java, Ceilão e Samoa, e representa apenas 1% da produção mundial. Seu aroma é considerado suave e de excelente qualidade (LAJUS, 1982; LOPES, 2000; MATTIETO, 2001).

Já a variedade *Forastero* apresenta frutos arredondados, com casca dura e superfície quase lisa. As sementes encontram-se aderidas firmemente à polpa e são achatadas. Os cotilédones possuem células pigmentas, e apresentam coloração

violeta. Robusta e produtiva, a variedade é encontrada em todos os países produtores de cacau. Apresenta sabor mais ácido e característica adstringente (LAJUS, 1982). Os híbridos dessa variedade representam atualmente 80% da produção mundial (HERMÈ, 2006).

A variedade *Trinitario* conserva característica das outras duas variedades: a maior resistência a pragas da variedade *Forastero* e o sabor suave da variedade *Criollo*. Os países produtores são essencialmente os que cultivam a variedade *Criollo*. Atualmente representam 19% da produção mundial e podem oferecer um cacau de aroma notável (EFRAIM, 2004).

O mercado mundial classifica o cacau comercializado em duas categorias básicas: o do tipo *Bulk* (cacau Regular ou Ordinário) e o do tipo Fino ou *Flavor* (cacau Aromático e/ou Fino). Geneticamente, consideram-se as variedades do cacau tipo *Criollo* ou *Trinitario* como espécies botânicas que produzem cacau do tipo Fino ou *Flavor* e o da espécie botânica do tipo *Forastero* como o que produz o cacau do tipo *Bulk* (PEREIRA, 2009).

Atualmente, o cacau tem importância econômica no contexto internacional por ser um *commodity* de participação relevante no comércio mundial de produtos agrícolas (EFRAIM, 2004). É produzido na América Latina (Belize, México, Equador, Peru, Costa Rica e Brasil), oeste da África (Costa do Marfim, Camarões, Gana, Nigéria e São Tomé) e na Indonésia (FRANZEN; MULDER, 2007).

O Brasil atingiu o apogeu na produção de cacau na década de 80, entretanto, a partir da década de 90, houve grande queda na produção nacional, explicada, em parte, pela introdução do patógeno causador da vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Crinipellis perniciosa*) na Bahia, em 1989 (PEREIRA et al., 1990). A África Ocidental detém cerca de 68% da produção mundial; entretanto a produção na América vem aumentando, especialmente no Brasil, devido às condições climáticas favoráveis e aos extensivos programas desenvolvidos para selecionar árvores resistentes às doenças fúngicas, as quais se constituem no maior impedimento à produção no país (GUYTON, 2003; EFRAIM, 2004; DONOVAN, 2006).

O cacaueiro, embora mais exigente quanto às condições de clima e solo, restitui à terra grande parte daquilo que dela retira, mantém o equilíbrio ecológico e se constitui num cultivo perene e renovável. Este caráter de lavoura eminentemente estável confere ao cacau não apenas importância econômica, como também uma significativa importância ambiental (CEPLAC, 2010).

2.2 Produtos derivados de cacau

Com as sementes do cacau torradas e moídas, tanto os maias quanto os aztecas preparavam uma bebida chamada “xoxocoalt”, “cacahualt” ou “chocolatl”, a qual era reservada para os que ocupavam as mais altas classes sociais. O nome escolhido pelo botânico Linnaeus como gênero da árvore, *Theobroma*, é traduzido como “comida dos deuses”, uma vez que os nativos acreditavam ser a árvore de origem divina (LUPIEN, 1999; DILLINGER et al., 2000).

Atualmente, o cacau é consumido predominantemente na forma de chocolate, que representa aproximadamente 90% do mercado do cacau. Os demais 10% são usados na produção de bebidas e cosméticos (DONOVAN, 2006).

As matérias primas para a produção do chocolate são extraídas dos cotilédones, comercialmente chamados *nibs*. Na colheita, o cacau é aberto e suas sementes são separadas, fermentadas e secas. Antes da fermentação, apresentam coloração violácea e aspecto compacto; após a fermentação e secagem, apresentam coloração marrom, sulcos e são friáveis (EFRAIM, 2004; ELKON, 2004).

Uma vez fermentado e seco, o *nib* do cacau é torrado e moído, resultando no *liquor* (ou pasta ou massa) do cacau, o qual se constitui na base do chocolate (ANDRÉS-LACUEVA et al., 2008; EFRAIM et al., 2010) (Figura 1). O chocolate é obtido a partir da mistura de *liquor* de cacau e outros derivados, como o cacau em pó e/ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% (g/100g) de sólidos totais de cacau. Já o chocolate branco é obtido a partir da mistura da manteiga de cacau com os demais ingredientes, contendo, no mínimo, 20% (g/100g) de sólidos totais de manteiga de cacau. A composição precisa do chocolate varia em todo o mundo devido à diferença de gostos e legislação, que se preocupa com as porcentagens de cacau e sólidos do leite adicionais e quantidade e tipos de gorduras vegetais permitidas (RICHTER; LANNES, 2007).

O alto conteúdo de açúcar dos chocolates representa um obstáculo real para seu consumo, o que, juntamente com o aumento da demanda por alimentos funcionais, tem levado pesquisadores e produtores a otimizarem seu tradicional processo de fabricação, a fim de reduzir a quantidade de açúcar e preservar os compostos benéficos (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2007; VISIOLI et al., 2009).

Figura 1 – Fluxograma geral do processamento das sementes de cacau até a obtenção dos *liquors* (EFRAIM et al., 2010)

Mundialmente, o consumo de cacau e produtos derivados aumentou cerca de 2 milhões de toneladas por ano, de 1960 a 2004 (INTERNATIONAL COCOA ASSOCIATION, 2004). No Brasil, registrou-se um incremento anual de 10% no consumo de chocolates por pessoa desde 1993 (DONOVAN, 2006). Entretanto, o paladar brasileiro sempre foi mais acostumado a um produto adocicado, com alto teor de leite, açúcar e gorduras hidrogenadas. Na infância e mesmo entre os adultos, a preferência brasileira é pelo chocolate ao leite, o qual contém em média apenas 25 a 30% de cacau (HERMÈ, 2006). Entretanto, esta predileção vem aos poucos mudando, e é crescente o número de consumidores de chocolates com altas concentrações de cacau (acima de 60%), mais ricos em compostos fenólicos e reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e consequentes benefícios à saúde (VINSON; PROCH; ZUBIK, 1999).

2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, caracterizados como compostos aromáticos que possuem hidroxilas como substituintes. Constituem um dos grupos de substâncias mais numerosas e amplamente distribuídas no reino vegetal, conseqüentemente integrando a dieta humana. São essenciais à fisiologia das plantas, estando envolvidos na lignificação, pigmentação, polinização, crescimento e reprodução destes organismos, além de provê-los com mecanismos de resistência a patógenos e predadores (BRAVO, 1998; HASLAM, 1998).

Bioquimicamente, originam-se de duas vias principais, a do chiquimato e a do acetato, ambas derivadas do metabolismo da glicose. Variam de simples estruturas moleculares, tais como ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados, como os taninos (BRAVO, 1998). Dependendo da estrutura básica de sua cadeia carbônica principal, os compostos fenólicos podem ser divididos em diferentes classes, sendo os flavonóides e os ácidos fenólicos os mais abundantes em nossa dieta (HARBORNE, 1989; SCALBERT et al., 2005) (Tabela 1). O grupo simples dos flavonóides, considerado o mais importante, pode ser dividido em 13 classes com mais de 5000 compostos descritos (BRAVO, 1998).

Tabela 1 - Principais classes de compostos fenólicos (BRAVO, 1998)

Classe	Esqueleto carbônico	Estrutura básica
Fenólicos simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos fenólicos	C ₆ – C ₁	
Acetofenonas	C ₆ – C ₂	
Ácidos fenilacéticos	C ₆ – C ₂	

(continua)

Tabela 1 - Principais classes de compostos fenólicos (BRAVO, 1998)

(conclusão)		
Classe	Esqueleto carbônico	Estrutura básica
Ácidos hidroxicinâmicos	$C_6 - C_3$	
Fenilpropanonas	$C_6 - C_3$	
Coumarinas, isocoumarinas	$C_6 - C_3$	
Cromonos	$C_6 - C_3$	
Naftoquinonas	$C_6 - C_4$	
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$	
Estilbenos	$C_6 - C_2 - C_6$	
Antraquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$	
Flavonóides	$C_6 - C_3 - C_6$	
Lignanas, neolignanas	$(C_6 - C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$	

Os compostos fenólicos são os compostos antioxidantes presentes em maior abundância na dieta humana, e estão presentes em vegetais, cereais, frutas, legumes e bebidas como vinhos, chás e cerveja. São parcialmente responsáveis pela qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (BRAVO, 1998; SCALBERT et al., 2005).

Até a década de 90, muitos estudos se focaram nos danos causados por alguns compostos fenólicos devido a habilidade de se ligarem a macromoléculas,

tais como enzimas digestivas, proteínas e carboidratos, reduzindo a digestibilidade alimentar. Entretanto, o interesse nestes compostos vem aumentando devido aos efeitos antioxidantes a eles associados e aos potenciais benefícios à saúde humana (BRAVO, 1998).

A atividade antioxidante desses compostos envolve tanto a inibição da formação de radicais livres quanto à eliminação destes por meio da doação dos átomos de hidrogênio das hidroxilas ligadas ao anel aromático (NAMIKI, 1990). Assim, os compostos fenólicos podem proteger os constituintes celulares dos danos oxidativos, e consequentemente, limitarem o risco de ocorrência de diversas doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo (SCALBERT et al., 2005).

2.4 Compostos fenólicos do cacau

O apelo do chocolate é universal, mas o prazer de consumi-lo é contraposto pelo seu alto conteúdo de açúcares e gorduras (VINSON; PROCH; ZUBIK, 1999). Entretanto, por ser fonte de diversos compostos fenólicos, o cacau tem perdido o *status* de *junk-food* e vem sendo cada vez mais reconhecido por seus benefícios à saúde (LAMUELA-RAVENTOS et al., 2005; VINSON et al., 2006). Evidências do uso de cacau e chocolates para fins medicinais são encontradas ainda entre os aztecas, e diversos tratados médicos europeus dos séculos XVII ao XX relatam suas propriedades medicinais (DILLINGER et al., 2000).

Os compostos fenólicos do cacau são armazenados nos cotilédones das sementes (ANDRÉS-LACUEVA et al., 2008). A quantidade total de compostos fenólicos solúveis presentes em farinha desengordurada de sementes frescas de cacau representa de 15 a 20% de seu conteúdo. Em sementes fermentadas, esse valor cai para 5% (KEALEY et al., 1998; BRITO, 2000).

Os principais compostos fenólicos encontrados em cacau são da classe dos flavanóis, incluindo catequina, epicatequina e procianidinas (Figura 2). O cacau em pó natural pode conter até 2% destes compostos (MILLER et al., 2006), o que o coloca como o alimento mais rico em flavanóis, contribuindo significativamente em sua ingestão (LEE et al., 2003).

Figura 2 - Principais compostos fenólicos encontrados em cacau (WOLLGAST, 2004)

Dentre outros compostos já relatados em cacau estão ácidos hidroxibenzóicos (gálico, sirínico, protocatequínico, vanilínico), ácidos hidroxicinâmicos e análogos (caféico, ferúlico, cumárico, clovamida), flavonóis (quercitina), flavonas (luteolina, apigenina) e flavononas (naringenina) (BORCHERS et al., 2000; JERKOVIC et al., 2010). Em 2006, foi relatada pela primeira vez a ocorrência do estilbeno resveratrol por Counet, Callemien e Collin.

Assim como ocorre com qualquer outro alimento derivado de planta, o conteúdo fenólico dos produtos derivados do cacau é dependente da variedade cultivada, origem, práticas agrícolas e processamento (WOLLGAST; ANKLAM, 2000; NIEMENAK et al., 2006).

2.5 Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina de ocorrência natural produzida por uma grande variedade de plantas em resposta ao estresse, à injúrias, radiação ultravioleta e infecções fúngicas (LANGCAKE; PRYCE, 1976; LANGCAKE; CORNFORD; PRYCE, 1979; BHAT; KOSMEDER II; PEZZUTO, 2001;

AGGARWAL et al., 2004). O resveratrol foi inicialmente identificado em 1940, quando isolado das raízes de *Veratrum grandiflorum*, e posteriormente, foi também encontrado nas raízes de *Polygonum cuspidatum*, planta utilizada nas medicinas tradicionais chinesa e japonesa (TAKAOKA, 1940; NONOMURA; KANAGAWA; MAKIMOTO, 1963).

Membro da família dos estilbenos, amplamente relatados por seus benefícios à saúde, o resveratrol pode ser encontrado nas configurações *cis* ou *trans*, sendo o isômero *trans* predominante e o de maior foco de estudos (BURNS et al., 2002; KING; BOMSER; MIN, 2006) (Figura 3). Este estilbeno também pode ser encontrado em sua forma glicosilada (BURNS et al., 2002). Formado a partir da condensação de três moléculas de malonil CoA com uma molécula de 4-coumaroil CoA, sua estrutura consiste de dois anéis fenólicos ligados por uma dupla ponte de estireno (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997; AGGARWAL et al., 2004).

Figura 3 - Estrutura das configurações do estilbeno resveratrol (BURNS et al., 2002)

Uvas e vinhos tintos são as fontes mais abundantes e estudadas de resveratrol, entretanto, este composto fenólico já foi encontrado em mais de 70 espécies de plantas distribuídas em 31 gêneros e 12 famílias, todas da divisão Spermatophyta e muitas delas não comestíveis (JANG et al., 1997). Sua ocorrência foi relatada pela primeira vez em cacau e chocolates em 2006 por Counet, Callemien e Collin, e já foi demonstrado que estes alimentos representam a segunda maior

fonte comestível de *trans*-resveratrol, constituindo-se em uma fonte significativa deste estilbeno na dieta americana (HURST et al., 2008).

Inicialmente caracterizado como uma fitoalexina, o resveratrol atraiu pouco interesse até 1992, quando foi questionada sua participação nos efeitos benéficos do vinho tinto ao coração (SIEMANN; CREASY, 1992). Os primeiros indícios das propriedades cardioprotetoras do vinho tinto foram provenientes de estudos epidemiológicos. O fenômeno conhecido como “Paradoxo francês” foi inicialmente descrito por Renaud e Gueguen (1998) e posteriormente, confirmado por estudos experimentais que demonstraram a ação direta do resveratrol na proteção cardíaca em cobaias (RAY et al., 1999).

Atualmente, além da proteção cardiovascular, são reconhecidas diversas outras propriedades biológicas associadas ao resveratrol, tais como atividade anticarcinogênica, antiinflamatória, estrogênica, antioxidante, além de atuar na inibição da apoptose e na coagulação sanguínea (SHAKIBAEI; HARIKUMAR; AGGARWAL, 2009).

A atividade quimiopreventiva do resveratrol foi relatada em 1997 por Jang et al., que demonstraram que a administração deste composto fenólico inibe o aparecimento e o crescimento de tumores em uma grande variedade de tipos cancerígenos em roedores, por inibição da ciclooxigenase 1 (COX 1). O resveratrol mostrou-se ativo na inibição da vascularização de tumores (KIMURA; OKUDA 2001; TSENG et al., 2004) e na indução da apoptose, atuando como um agente antiproliferativo (CHEN et al., 2004; MARTIN et al., 2004).

Pequenas doses de resveratrol promovem ainda efeitos semelhantes ao da restrição calórica (dietas com 20 a 30% menos calorias que uma dieta normal), as quais retardam o envelhecimento, aumentam a resistência ao estresse e desaceleram o declínio funcional do organismo (BARGER et al., 2008).

2.6 Antioxidantes

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que contem um ou mais elétrons não pareados

(HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O elétron livre favorece a recepção de outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reativos.

As espécies reativas são produtos do metabolismo celular e desempenham um papel dual, como espécies tanto benéficas quanto prejudiciais aos sistemas biológicos (VALKO et al., 2006; 2007). Os efeitos benéficos ocorrem em concentrações baixas ou moderadas de radicais livres e envolvem funções fisiológicas, tais como a defesa contra agentes infecciosos e participação nos sistemas de sinalização celular. Já os efeitos danosos decorrem da superprodução de ERO/ERN (VALKO et al., 2007).

Radicais livres englobam uma grande variedade de espécies químicas, incluindo ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila ($HO^{\cdot}$) e peroxila ($ROO^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio e óxido nítrico ($NO^{\cdot}$). EROs podem tanto ser geradas exogenamente (luz ultravioleta, radiação ionizante) quanto produzidas no meio intracelular (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Estima-se que a maioria da produção intracelular seja derivada das mitocôndrias. A produção de radicais superóxidos nas mitocôndrias ocorre primariamente em dois pontos da cadeia de transporte de elétrons: complexo I (NADH desidrogenase) e complexo III (ubiquinona – citocromo c redutase). Em condições metabólicas normais, o complexo III é o principal responsável pela geração de radicais livres (TURRENS, 1997).

Espécies reativas podem culminar em distúrbios metabólicos e celulares, tais como quebra da fita de DNA, lesão do mecanismo de transporte iônico de membrana ou outras proteínas específicas e peroxidação de lipídeos (PORTO, 2001). Isso leva as células a uma grande variedade de respostas à exposição aos radicais livres, incluindo proliferação, senescência, necrose, apoptose ou prevenção da divisão celular (TANG et al., 2004). Assim, os radicais livres encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas e câncer, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992).

A fim de manter a integridade celular contra esses danos, os organismos possuem uma série de mecanismos de defesa, que incluem: i) mecanismos preventivos, ii) mecanismos reparadores, iii) defesas fisiológicas e iv) defesas antioxidantes (CADENAS, 1997).

O termo antioxidante foi definido por Halliwell e Gutteridge (1995) como “qualquer substância que, presente em baixa concentração quando comparada a do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Entretanto, os próprios autores reconheceram que esta definição estava incompleta, por não incluir antioxidantes envolvidos com mecanismos preventivos e reparadores. A definição do termo antioxidante foi então aprofundada para “qualquer substância que atrasa, previne ou repara os danos oxidativos a uma molécula” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Em organismos saudáveis, a produção de espécies reativas é contraposta pelo sistema de defesa antioxidante, embora o balanço não seja perfeito, o que leva a geração de algum dano oxidativo (HALLIWELL, 2007). O sistema enzimático de defesa antioxidante inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). O organismo também utiliza antioxidantes provenientes da dieta (não enzimáticos) como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenóides, compostos fenólicos, dentre outros (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO et al., 2007). Além destes antioxidantes naturais, existem os sintéticos, como o BHA (butilhidroxianisol), o BHT (butilhidroxitolueno), o TBHQ (terc-butilhidroquinona) e o PG (propil galato) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Além de atuar na proteção do organismo contra os danos causados pelas espécies reativas e doenças degenerativas, antioxidantes são aplicados na indústria para a conservação de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade (FAURÉ et al., 1984). BHA, BHT e TBHQ são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos, com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos (RAMALHO; JORGE, 2006). Entretanto, há forte tendência de substituição de antioxidantes sintéticos por naturais, uma vez que há possibilidade dos sintéticos apresentarem algum efeito tóxico, sendo seu uso restrito em países da comunidade europeia (POKORNÝ, 1991; NAKATANI, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

Antioxidantes podem agir diminuindo a concentração de oxigênio, interceptando o oxigênio singlete, evitando a fase de iniciação da oxidação pelo sequestro de radicais hidroxil, quelando íons metálicos e decompondo produtos primários a compostos que não são radicais (SHAHIDI, 1996). Dependendo do

mecanismo de ação, são classificados em primários ou secundários. Os secundários ou preventivos são ainda subdivididos em sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Antioxidantes primários promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC; JAVANOVIC, 1994; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002):

$R^{\bullet} + AH \rightarrow RH + A^{\bullet}$, onde: $R^{\bullet}$ representa um radical livre; AH um antioxidante com um átomo de H ativo e $A^{\bullet}$ um radical inerte (FRANKEL, 1980).

Os antioxidantes principais e mais conhecidos deste grupo são os compostos fenólicos sintéticos butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e tocoferóis, que são naturais (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Já os antioxidantes secundários retardam a taxa de oxidação por meio de diversos mecanismos, mas não convertem radicais livres em produtos mais estáveis (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada. Exemplos de sinergistas incluem ácido cítrico, ascórbico e tartárico (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, por meio de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autooxidação. Ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados são os melhores exemplos deste grupo (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica, por transferirem elétrons durante os estados de oxidação (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a

ação de complexação. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glicose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Já os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (RAMALHO; JORGE, 2006).

2.7 Métodos de medida da atividade antioxidante *in vitro*

Pesquisas sobre antioxidantes aumentaram consideravelmente nos últimos anos, assim como o número de métodos propostos para medir a atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Entretanto, muitos antioxidantes naturais são multifuncionais e sua atividade em alimentos heterogêneos não pode ser avaliada por um único método (FRANKEL; MEYER, 2000).

Na determinação da atividade antioxidante são utilizadas duas abordagens: a direta e a indireta. Quando métodos indiretos são aplicados, estuda-se a habilidade do antioxidante em capturar radicais livres, o que não necessariamente corresponde a real degradação oxidativa, embora em alguns casos a doação de átomos de hidrogênio (ou elétrons) correlacione-se com a atividade antioxidante. Já os métodos diretos baseiam-se no estudo do efeito que um alimento contendo antioxidantes é capaz de induzir na degradação oxidativa de um sistema em análise (ROGINSKI; LISSI, 2005). Recomenda-se que estudos sobre atividade antioxidante utilizem a combinação entre métodos diretos e indiretos (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

2.7.1 Métodos indiretos de medida da atividade antioxidante *in vitro*

Estes métodos relacionam-se com a geração de diferentes radicais, sendo o combate às EROs atingido por dois mecanismos principais: transferência de elétrons ou transferência do átomo de hidrogênio (RE et al., 1999).

Reações envolvendo doação do átomo de hidrogênio ($X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$) independem do solvente ou pH do meio e se caracterizam como reações rápidas. Já reações envolvendo transferência de elétrons detectam a habilidade de um

antioxidante em transferir um elétron para reduzir um composto, como metais, carbonilas ou radicais ($X^{\bullet} + AH \rightarrow X^{-} + AH^{\bullet+}$). Este mecanismo envolve desprotonação e ionização do grupo reativo funcional, assim, essas reações são dependentes do pH do meio e são mais lentas. Ambos os mecanismos ocorrem quase sempre em conjunto, com o balanço entre eles determinado pela estrutura e pH dos antioxidantes envolvidos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Os métodos mais comumente utilizados envolvem compostos cromogênicos que simulam as espécies reativas de oxigênio (ERO). A presença do antioxidante leva ao desaparecimento dos radicais cromogênicos (OLDONI, 2007). Dentre estes métodos estão a capacidade sequestrante do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), a capacidade antioxidante equivalente ao trolox, por meio do uso do radical ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)) como oxidante, e o método de redução do ferro (FRAP), todos utilizados neste trabalho e abordados na sequência.

2.7.1.1 DPPH

O radical orgânico DPPH tem sido amplamente utilizado em estudos para a determinação da atividade antioxidante em alimentos (YAMAGUCHI et al., 1998), constituindo um método simples e rápido, que não requer reagentes caros ou equipamentos sofisticados (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; KOLEVA et al., 2002). Recentemente, aproximadamente 90% dos estudos sobre atividade antioxidante utilizaram este método, em conjunto a outros (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

O DPPH $^{\bullet}$ é um radical orgânico nitrogenado, livre e estável, comercialmente disponível. O método baseia-se na redução de soluções alcoólicas do radical DPPH $^{\bullet}$ na presença de um antioxidante doador de elétron ou hidrogênio, formando um composto estável (Figura 4). A capacidade antioxidante é proporcional ao desaparecimento do radical DPPH $^{\bullet}$ nas amostras analisadas. No decorrer da reação, a coloração violeta do meio passa a amarela, e a capacidade antioxidante é facilmente avaliada pelo monitoramento do decréscimo da absorbância a 517nm (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Apesar das vantagens, este método também apresenta limitações, como o uso de quantidades significativas de reagentes, padrões e amostras; número limitado de análises simultâneas e impossibilidade de avaliação da atividade de

antioxidantes hidrofílicos, uma vez que o radical é dissolvido em solventes orgânicos (principalmente alcoóis) e não em meio aquoso (ARNAO, 2000; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Figura 4 - Reação entre DPPH[•] e um antioxidante para formar DPPH reduzido (MOON; SHIBAMOTO, 2009)

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalente do padrão utilizado ou como EC₅₀, o qual expressa a quantidade de antioxidante ou amostra necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50% (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

2.7.1.2 ABTS

Enquanto o DPPH[•] é um radical livre adquirido diretamente sem preparação, a geração do radical catiônico ABTS^{•+}, por reações enzimáticas ou químicas, constitui-se na base do método que mede a capacidade antioxidante equivalente ao trolox. Uma vantagem em relação ao DPPH[•] é que o radical ABTS^{•+} pode ser solubilizado tanto em meios orgânicos quanto aquosos, o que permite a avaliação da atividade de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (ARNAO, 2000). Assim, este método tem sido amplamente utilizado para a avaliação da atividade antioxidante em alimentos e bebidas (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

O método originalmente proposto recebeu críticas e foi modificado, uma vez que a geração do radical catiônico ABTS^{•+} baseava-se na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio, em uma reação que sofria interferência pela presença de antioxidantes, os quais contribuíam para a redução do radical formado (RE et al., 1999).

Na técnica modificada para a geração do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, a produção direta do cromóforo azul-esverdeado dá-se por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio (Figura 5). O radical apresenta absorção máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. O radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, perdendo sua coloração azul esverdeada, em intensidade e escala de tempo dependentes da atividade antioxidante, da concentração e da duração da reação (RE et al., 1999).

Figura 5 - Geração do radical catiônico $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pela sua oxidação com persulfato de potássio (MOON; SHIBAMOTO, 2009)

A atividade antioxidante é determinada medindo-se a redução do radical por meio da porcentagem de inibição da absorbância a 734nm (BIGLARI; ALKARKHI; AZHAR, 2008). A absorbância da reação entre o radical e o antioxidante é comparada ao do padrão Trolox, e os resultados são expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (RE et al., 1999).

2.7.1.3 FRAP

O método de redução do ferro foi originalmente desenvolvido por Benzie e Strain (1996) para medir o poder de redução no plasma, mas a abordagem foi posteriormente adaptada para uso em antioxidantes de vegetais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Quando um complexo Fe^{3+} - TPTZ é reduzido a Fe^{2+} por um antioxidante em condições ácidas, desenvolve-se uma intensa coloração púrpura com absorção máxima a 593nm (MOON; SHIBAMOTO, 2009) (Figura 6). Assim, a capacidade antioxidante pode ser avaliada pelo monitoramento da formação do complexo Fe^{2+} - TPTZ espectrofotometricamente.

Figura 6 - Redução do complexo Fe^{3+} - TPTZ a Fe^{2+} - TPTZ por meio de um antioxidante (RUFINO et al., 2006)

Uma das limitações do método é que o sistema deve ser aquoso (MOON; SHIBAMOTO, 2009). Outra desvantagem é que o método não pode detectar compostos que agem por meio da doação de átomos de hidrogênio, particularmente tióis, como a glutathiona, e proteínas, o que pode levar a subestimação da capacidade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Entretanto, essa característica pode ser vantajosa, uma vez que a glutathiona é encontrada em altas concentrações em alimentos, porém é degradada no intestino, sendo pouco absorvida pelos humanos (STAHL et al., 2002). Apesar das limitações, constitui-se em um método rápido, simples e que não requer reagentes caros e equipamentos sofisticados (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

2.7.2 Métodos diretos de medida da atividade antioxidante *in vitro*

A princípio, os métodos diretos são mais adequados para a avaliação da atividade antioxidante, porém, os métodos indiretos são frequentemente mais utilizados. Métodos diretos requerem maior tempo de análise, o que muitas vezes os torna inadequados para análises de rotina (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Entretanto, a fim de tornar as determinações mais precisas e confiáveis, recomenda-se que dados obtidos por meio de métodos indiretos sejam correlacionados com os obtidos por meio de métodos diretos (ROGINSKY; LISSI, 2005). A auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico é um dos métodos diretos mais utilizados.

2.7.2.1 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Este método fundamenta-se em medidas espectrofotométricas (470nm) da descoloração do β -caroteno (oxidação) induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A oxidação lipídica é retardada ou prevenida na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio que sequestram radicais livres. Lipídeos, como o ácido linoleico, formam o radical peroxila na presença de ERO e O_2 ; o radical peroxila reage então com o β -caroteno, formando um radical estável, o que leva à redução da quantidade de β -caroteno do meio. Entretanto, se um antioxidante estiver presente no meio, reagirá competitivamente com os radicais peroxila. Assim, a capacidade antioxidante é facilmente monitorada pelo descoloramento do sistema (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Por ser o sistema uma emulsão, este método sofre a interferência do chamado “paradoxo polar”: enquanto antioxidantes lipofílicos exibem maior atividade em sistemas óleo e água, os hidrofílicos apresentam melhor atividade em sistemas lipídicos. No óleo, os antioxidantes hidrofílicos são orientados para a interface óleo-ar, promovendo melhor proteção quando comparados aos lipofílicos, que ficam solubilizados no óleo. Já em emulsões, os antioxidantes lipofílicos é que são direcionados na interface óleo-ar (KIOKIAS; VARZAKAS; OREOPOULOU; 2008) (Figura 7).

Assim como a capacidade sequestrante do DPPH, este método também faz uso de quantidades significativas de reagentes, padrões e amostras e apresenta limitações em relação ao número de análises simultâneas. Também apresenta pontos críticos, como o controle de temperatura (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Figura 7 – Distribuição interfacial dos antioxidantes em um sistema contendo óleo (à esquerda) e emulsão óleo em água (à direita) (KIOKIAS; VARZAKAS; OREOPOULOU; 2008; PRADO, 2009)

2.8 Métodos químicos e instrumentais utilizados para análises de compostos fenólicos

Análises de compostos fenólicos totais podem ser realizadas por métodos colorimétricos ou enzimáticos, sendo os colorimétricos mais utilizados na determinação do teor destes compostos em alimentos (PORT'S, 2011). Dentre eles, o mais popular é o que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, método que se baseia em uma reação de óxido-redução na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotungstico-fosfomolibdico do reagente a uma solução azul (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999).

Como ferramenta auxiliar na identificação de compostos fenólicos, é comum o uso da espectrofotometria de absorção na região UV-visível, na qual a identificação dá-se pela comparação dos perfis de espectros de absorção obtidos de padrões isolados (PORT'S, 2011). No entanto, o grande número de substâncias presentes na matriz alimentar pode interferir na análise, o que muitas vezes requer uma separação prévia (HURST; MARTIN; TARKA JUNIOR, 1998).

Assim, faz-se necessário o uso de métodos de separação. Com o desenvolvimento das metodologias instrumentais, surgiu a possibilidade da utilização de métodos que oferecessem maior reprodutibilidade e sensibilidade, e que pudessem ser aplicados em pequenos volumes de amostra (DE MARIA; MOREIRA, 2007), como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A cromatografia em fase reversa é o modo mais popular em CLAE para compostos fenólicos. As colunas mais utilizadas são as colunas C18 e os sistemas de eluição são geralmente binários, com uma solução aquosa ácida, como ácido acético, perclórico, fosfórico, fórmico ou ortofosfórico (solvente A) e um solvente orgânico polar, como metanol ou acetonitrila (solvente B) (FRANCISCO; RESURRECCION, 2009). A CLAE é a técnica melhor estabelecida e aceita no meio científico, nas mais diversas áreas de aplicação, apresentando robustez, repetibilidade e reprodutibilidade, características muito importantes no desenvolvimento de um método analítico com parâmetros de validação adequados (BIZZOTTO, 2010).

2.9 Validação

Técnicas de separação, tais como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), vem se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI et al., 2004). A fim de atestar a eficiência e assegurar a qualidade de suas medições, métodos analíticos passam por uma avaliação denominada validação, a qual é cada vez mais reconhecida e exigida (RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

A NBR ISO 9000 define validação como “a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos”. De acordo com a ANVISA “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

Os parâmetros analíticos normalmente determinados na validação de métodos cromatográficos são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

A seletividade ou especificidade de um método é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa, ou seja, a seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro analito, reagentes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes. Dessa forma, este parâmetro garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (GREEN, 1996; RIBANI et al., 2004). Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$ (curva analítica), só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida, que consiste na faixa de aplicação do método. Quanto ao coeficiente de correlação, r , parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, a ANVISA recomenda um valor igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Como na prática, em validações de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno, calcula-se a estimativa do desvio padrão absoluto. Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um desvio padrão relativo (RSD) de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004).

A exatidão representa o grau de concordância entre resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência, e geralmente é obtida por meio de testes de recuperação (INMETRO, 2003). Como a eficiência do método varia em função da concentração da substância, na maioria dos casos a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação

deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70 e 120% (RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material

Nesse trabalho foram analisados os seguintes produtos: *nibs* de cacau torrados e parcialmente triturados, achocolatados em pó, bebidas lácteas achocolatadas, chocolates nacionais (brancos, ao leite, meio amargos, 56% e 70% cacau) e uma amostra de chocolate ao leite importado, para fins de comparação. Os *nibs* de cacau e os chocolates 56% e 70% cacau foram fornecidos pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC – Ilhéus-BA). As demais amostras foram adquiridas no comércio, sendo analisadas duas marcas de um mesmo produto (exceto chocolate importado), num total de 14 amostras (Tabela 2). As duas marcas de chocolates comerciais escolhidas para análise estão entre as três mais citadas pelos consumidores brasileiros como suas favoritas (BRAGA et al., 2007).

Tabela 2 - Produtos derivados de cacau analisados, total de amostras e origem

Categoria do produto	Amostras	Origem
Cacau (" <i>nibs</i> ")	1	Ceplac (Ilhéus-BA)
Chocolate 70% cacau	1	Ceplac (Ilhéus-BA)
Chocolate 56% cacau	1	Ceplac (Ilhéus-BA)
Chocolate meio amargo	2	Comércio (Piracicaba-SP)
Chocolate ao leite	2	Comércio (Piracicaba-SP)
Chocolate ao leite importado	1	Suíça
Chocolate branco	2	Comércio (Piracicaba-SP)
Achocolatado em pó	2	Comércio (Piracicaba-SP)
Bebida láctea achocolatada	2	Comércio (Piracicaba-SP)

3.2 Preparo dos extratos brutos (EB)

A extração dos compostos fenólicos das amostras foi feita em dois solventes, um aquoso e outro alcoólico, todas em triplicata. As amostras de bebidas lácteas achocolatadas foram previamente congeladas e liofilizadas, enquanto os demais produtos foram triturados e homogeneizados. Todas as amostras foram mantidas a -18°C até o momento da extração.

Os extratos aquosos foram obtidos segundo método descrito por Lee et al. (2003). Inicialmente foram pesados 2,0 g de material liofilizado ou triturado, e adicionados 55 mL de água destilada a 100°C . Na sequência, os extratos foram centrifugados a $12000 \times g$ por 5 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram utilizados para as análises subsequentes.

Para a obtenção dos extratos alcoólicos, foram pesados 2,0 g de material liofilizado ou triturado, e adicionados 20 mL de metanol:água (80:20 v/v). A mistura foi homogeneizada e mantida em banho-ultrassom por 20 minutos. Os extratos foram centrifugados a $12000 \times g$ por 5 minutos e os sobrenadantes foram utilizados para as análises subsequentes.

3.3 Análises físico-químicas

3.3.1 Espectrofotometria da região ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção foram obtidos de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2005), com modificações. Os extratos obtidos de acordo com o item 4.2 foram diluídos nos solventes utilizados para a extração na proporção 1:40. Os espectros de absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de 200 a 500 nm.

3.3.2 Compostos fenólicos totais

A análise de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando ácido gálico como padrão. O reagente Folin-Ciocateau consiste de uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos

fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W.

As amostras foram diluídas adequadamente e uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para tubos de ensaio, adicionando-se em seguida 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10%. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4%. Após a incubação por 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes em ácido gálico (mg AG.g^{-1} amostra em base úmida), calculados por meio do ajuste da curva de calibração do ácido gálico com concentrações que variaram de 5 a 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Anexo A). Todas as análises foram conduzidas em triplicatas.

3.4 Avaliação da atividade antioxidante

3.4.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da capacidade sequestrante determinada pelo método DPPH baseia-se no princípio de que o DPPH (1,1-difenil-1-picrilidrazil), um radical estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, que desaparece à medida que é reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR et al., 2001).

Foram utilizados os padrões BHT (Butil hidroxitolueno) e Trolox ((+/-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2 ácido carboxílico), nas concentrações de 200 e 50 ppm, respectivamente. Foram adicionados 0,5 mL de cada padrão ou extrato diluído a 3,0 mL de etanol 99% e 0,3 mL do radical DPPH em solução de etanol. A mistura permaneceu a temperatura ambiente no escuro por 45 minutos e a absorbância foi então medida a 517 nm. A atividade anti-radical foi determinada na forma de Atividade Antioxidante (AA), pela equação:

$$AA(\%) = 100 - \left(\frac{((Aa - Ab) \times 100)}{Ac} \right)$$

Onde:

Aa = absorbância da amostra

Ab = absorbância do branco

Ac = absorbância do controle negativo

O controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente.

Os resultados da análise de DPPH também foram expressos em termos de EC₅₀, que representa a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. Os valores do EC₅₀ foram calculados por regressão linear dos gráficos, em que o eixo das abscissas representou as diferentes concentrações dos extratos e o eixo das ordenadas a atividade antioxidante (%). A cinética das amostras foi determinada pelo monitoramento a cada 20 minutos, durante 120 minutos, do declínio da absorbância da solução de DPPH a 517 nm.

3.4.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) foi feita conforme a metodologia desenvolvida por Re et al. (1999), com algumas modificações. O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação de 140 mM de persulfato de potássio com 7 mM de ABTS. A mistura foi armazenada no escuro a temperatura ambiente por 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,02$ a 734 nm.

A partir dos extratos brutos obtidos de acordo com o item 4.2, foram preparadas três diluições diferentes. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 µL de cada diluição para tubos de ensaio e adicionou-se 3,0 mL do radical ABTS. O equipamento foi zerado com etanol e após 6 minutos de reação, as absorbâncias foram lidas a 734 nm. Como referência utilizou-se o Trolox, um antioxidante sintético análogo a vitamina E, nas concentrações de 100 a 2000 µM (Anexo B). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µM de Trolox.g⁻¹ amostra em base úmida (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

3.4.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Kukic et al. (2008), com algumas modificações. Esta se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e FeCl_3 (20 mM) em solução aquosa na proporção 10:1:1, v/v/v. Uma alíquota de 100 μL de extrato foi adicionado a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP, a 593 nm. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso 100-2000 μM (Anexo C), e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ amostra em base úmida.

3.4.4 Autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e do ácido linoleico foi realizada de acordo com o método de Emmons, Peterson e Paul (1999), com algumas modificações. Foram pesados 10 mg de β -caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio/beta-caroteno e adicionados 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com fluxo de gás nitrogênio e o resíduo obtido foi redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 minutos. Alíquotas de 3 mL da emulsão beta-caroteno/ácido linoleico foram misturadas com 50 μL dos extratos, e incubadas em banho-maria a 50°C. A oxidação da emulsão foi monitorada em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas. Para a amostra controle foi utilizado solvente no lugar dos extratos brutos. Foram utilizados padrões de BHT e Trolox em concentrações de 200 e 50 ppm, respectivamente. A atividade antioxidante (AA) foi expressa como percentual de inibição relativa comparada ao controle depois de 120 minutos usando a equação:

$$AA(\%) = \frac{(DR_c - DR_s)}{DR_c} \times 100$$

Onde:

DR_c = taxa de degradação do controle (= ln(a/b)/120)

DR_s = taxa de degradação na presença do padrão ou extrato (= ln(a/b)/120)

“a” e “b” são as absorbâncias no tempo inicial (0 min) e no tempo final (120 min), respectivamente.

3.5 Identificação do resveratrol por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM)

3.5.1 Obtenção do extrato rico em estilbenos (EE)

Para a obtenção do extrato rico em estilbenos, foram pesados 60 mg de cada amostra, aos quais foi adicionado 1,25 mL de acetato de etila. Em seguida, as amostras foram submetidas a banho-maria a 70°C por 30 min e após, centrifugadas a 12000 x *g* por 4 min (RAGAB et al., 2006). Todo o sobrenadante foi coletado, filtrado e imediatamente derivatizado.

3.5.2 Derivatização – formação dos derivados do trimetilsilil (TMS)

Os extratos ricos em estilbenos filtrados foram transferidos para *vials* previamente secos em estufa à temperatura de 120°C por aproximadamente 10 horas. O solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e em seguida foram adicionados 100 µL de reagente derivatizante (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida), sendo a mistura homogeneizada. O *vial* devidamente fechado foi colocado em estufa a 60°C por 10 min, para a completa reação de derivatização das amostras. Após, o reagente derivatizante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e os produtos da derivatização (derivados do trimetilsilil -TMS) foram rediluídos em 600 µL de hexano. As amostras silanizadas foram homogeneizadas e utilizadas para a injeção em um cromatógrafo gasoso com espectrometria de massas (CG-EM). O mesmo procedimento foi utilizado para o padrão resveratrol (1 µg.mL⁻¹).

O processo de derivatização foi realizado em condições anidras devido à alta sensibilidade dos derivados TMS quando em contato com a umidade (ZUO; WANG; ZHAN, 2002).

3.5.3 Condições analíticas do sistema de cromatografia

As análises por CG-EM de estilbenos (EE) foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC 2010, acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu modelo QP 2010 Plus. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). A programação de temperatura foi de 80°C (1 min), atingindo 250°C, com um incremento de 20°C/min, permanecendo nesta temperatura por 1 min, 250°C a 300°C a taxa de 6°C/min durante 5 min, somando 40 minutos de análise. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280°C e o volume de injeção foi de 0,2 μ L no modo “*splitless*”. A interface foi mantida a temperatura de 280°C. O detector de massas operou no modo “sim” m/z 444, característico para o resveratrol, sendo este identificado por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) do padrão autêntico silanizado e eluído nas mesmas condições.

3.6 Quantificação do teor de resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

3.6.1 Obtenção do extrato rico em estilbenos (EE)

Para a análise por CLAE-FR, a obtenção do extrato rico em estilbenos sofreu algumas modificações, sendo obtido da seguinte forma: foi pesado 1 g de cada amostra, ao qual foi adicionado 10 mL de acetato de etila. Em seguida, as amostras foram extraídas em banho-maria a 70°C por 30 min e após, centrifugadas a 12000 x g por 4 min. Todo o sobrenadante foi coletado, filtrado e evaporado sob fluxo de nitrogênio. A seguir, adicionou-se 1 mL de metanol e as amostras foram então novamente filtradas e injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

3.6.2 Condições analíticas do sistema de cromatografia

As análises por CLAE em fase reversa do EB e EE foram feitas de acordo com o método descrito por Counet, Callemien e Collin (2006). Trinta microlitros de cada extrato foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 320 nm e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μ m. A fase móvel utilizada foi água/acetonitrila/ácido fórmico (98,9/1/0,1, v/v/v) (solvente A) e acetonitrila (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 5% do solvente B até 45% de B em 23 minutos, 100% de B em 7 minutos, permanecendo nesta condição isocrática por mais 10 minutos, voltando a 5% do solvente B em 5 minutos, totalizando 45 minutos de corrida. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30°C e os cromatogramas foram processados utilizando o software Class-VP®.

3.6.3 Validação

O método foi validado nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação.

Para o teste de seletividade foram construídas duas curvas analíticas, sendo uma em matriz (bebida láctea achocolatada B) contaminada com o padrão resveratrol em concentrações conhecidas (0,01, 0,02 e 0,04 μ g.mL⁻¹) e a outra contendo apenas o padrão de resveratrol, nas mesmas concentrações. Em seguida, os coeficientes angulares das duas curvas analíticas foram comparados.

A linearidade foi testada na faixa de 0,02 μ g.mL⁻¹ a 0,08 μ g.mL⁻¹ (n=4 pontos), sendo a curva analítica construída pela injeção em triplicata de soluções padrões de resveratrol. A precisão foi determinada em relação aos níveis de repetitividade, por meio da quantificação de resveratrol na mesma amostra por 3 vezes consecutivas, sob as mesmas condições e em um mesmo dia de análise, sendo então feita a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) destas medidas.

A exatidão foi obtida por meio de testes de recuperação, os quais foram realizados comparando-se os resultados obtidos da análise de amostras isentas de resveratrol com os resultados obtidos da análise de soluções contendo concentrações conhecidas do padrão (0,02, 0,04 e 0,06 μ g.mL⁻¹).

O limite de detecção foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Onde: s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e S é o coeficiente angular da curva analítica. O limite de quantificação foi calculado por meio da equação:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

3.7 Análise estatística

O delineamento experimental para todos os ensaios foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo programa SAS para a determinação da análise de variância. A separação entre as médias foi realizada usando-se o teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises físico-químicas

4.1.1 Espectrofotometria da região ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção na região do UV-visível dos extratos brutos aquosos e alcoólicos das amostras estão ilustrados nas Figuras 8, 9 e 10, os quais evidenciam a ocorrência de compostos fenólicos nos extratos, uma vez que a faixa de comprimento de onda (λ) entre 220 a 350 nm corresponde à região do ultravioleta visível em que estes compostos absorvem luz (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1971). Os espectros obtidos para todas as amostras, em ambos os extratos, também demonstram a similaridade para a mesma classe de compostos, uma vez que a absorção máxima dos espectros foi pouco variável, compreendendo a faixa de 271 a 276 nm.

Para fins de comparação, todos os extratos foram diluídos na mesma proporção (1:40). Assim, os picos com absorções máximas, na faixa de comprimento de onda de 271 a 276 nm, sugerem uma maior concentração de compostos fenólicos no cacau (Figura 8), seguido pelos chocolates 70% e 56% cacau (Figuras 8 e 9). Já os chocolates brancos foram os que apresentaram as menores intensidades de absorção no comprimento de onda característico para os compostos fenólicos. É possível também observar que os extratos aquosos apresentaram as maiores absorções na região característica para os compostos fenólicos, indicando o alto poder de extração que a água possui para os produtos avaliados.

Figura 8 - Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos aquosos e alcoólicos das amostras

Figura 9 - Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos aquosos e alcoólicos das amostras

Figura 10 - Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos aquosos e alcoólicos das amostras

4.1.2 Compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico nos extratos brutos aquosos e alcoólicos estão apresentados na Tabela 3, sendo os valores expressos em base úmida.

Em relação aos extratos brutos aquosos, *nibs* de cacau foi a amostra que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais ($21,54 \pm 1,64 \text{ mg AG.g}^{-1}$), seguido dos chocolates 70% e 56% cacau ($10,45 \pm 0,41$ e $9,51 \pm 0,38 \text{ mg AG.g}^{-1}$ amostra, respectivamente), confirmando as evidências encontradas nos espectros de absorção na região do UV-visível.

Em ordem decrescente, os maiores valores para compostos fenólicos totais foram: cacau > chocolate 70% cacau > chocolate 56% cacau > chocolates meio amargos > achocolatados em pó > chocolates ao leite > chocolates brancos > bebidas lácteas achocolatadas.

Tabela 3 - Compostos fenólicos totais (mg AG.g⁻¹ material úmido) em amostras obtidas em solvente aquoso e alcoólico (média $\pm$ desvio padrão da triplicata da extração)

Amostra	Marca	Solvente	
		Água	Metanol (80%)
Cacau	-	21,54 $\pm$ 1,64 ^{a*}	12,73 $\pm$ 0,90 ^a
Chocolate 70%	-	10,45 $\pm$ 0,41 ^b	7,56 $\pm$ 0,62 ^b
Chocolate 56%	-	9,51 $\pm$ 0,38 ^{b,c}	7,30 $\pm$ 0,85 ^b
Chocolate meio amargo	A	8,15 $\pm$ 0,47 ^{c,d}	8,09 $\pm$ 0,22 ^b
	B	7,66 $\pm$ 0,60 ^d	8,31 $\pm$ 0,08 ^b
	A	3,77 $\pm$ 0,22 ^{f,g}	2,05 $\pm$ 0,02 ^{d,e}
Chocolate ao leite	B	3,08 $\pm$ 0,11 ^g	3,80 $\pm$ 0,04 ^c
	importado	3,49 $\pm$ 0,07 ^g	1,41 $\pm$ 0,14 ^{e,f}
Chocolate branco	A	1,22 $\pm$ 0,01 ^h	0,34 $\pm$ 0,02 ^h
	B	1,16 $\pm$ 0,04 ^h	0,22 $\pm$ 0,01 ^h
Achocolatado em pó	A	5,91 $\pm$ 0,21 ^e	3,58 $\pm$ 0,18 ^c
	B	4,12 $\pm$ 0,17 ^{f,g}	3,23 $\pm$ 0,11 ^c
Bebida láctea	A	0,55 $\pm$ 0,01 ⁱ	0,61 $\pm$ 0,03 ^{f,g}
achocolatada	B	0,96 $\pm$ 0,01 ⁱ	0,55 $\pm$ 0,01 ^g

*Letras iguais nas colunas representam diferenças não significativas entre as amostras, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em relação aos extratos brutos alcoólicos, os chocolates meio amargos não diferiram dos chocolates 70% e 56% cacau. Diferentemente dos extratos aquosos, os chocolates brancos foram os que apresentaram menores teores de compostos fenólicos. Com exceção dos extratos alcoólicos do chocolate meio amargo B, chocolate ao leite B e bebida láctea achocolatada A, todos os outros extratos aquosos apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos totais. Portanto, fica demonstrado que a extração aquosa foi mais eficaz na extração de compostos fenólicos para a maioria das amostras, confirmando as evidências observadas pelos espectros de absorção na região do UV-visível.

A grande discrepância entre a quantidade de compostos fenólicos totais obtida para cacau e chocolates pode ser explicada pelos últimos conterem não apenas cacau processado, mas também ingredientes livres ou pobres em compostos fenólicos, como açúcares, leite em pó e manteiga de cacau. Além disso, o menor conteúdo de compostos fenólicos observado em chocolates é consequência

do seu próprio processo de fabricação, o qual leva à degradação do cacau (WOLLGAST; ANKLAM 2000; ANDRÉS-LACUEVA et al., 2008).

O conteúdo de compostos fenólicos e, conseqüentemente, a capacidade antioxidante, são afetados pelo método de extração utilizado (LEE et al., 2003). Waterhouse et al. (1996) encontraram 20 mg AG.g⁻¹ cacau; 8,4 mg AG.g⁻¹ chocolate amargo e 5 mg AG.g⁻¹ chocolate ao leite, utilizando metanol 95% como solvente. Analisando diversos produtos do mercado norte americano, Miller et al. (2006) encontraram valores mais elevados para compostos fenólicos totais em cacau (45,3 ±1,16 a 60,2 ±4,54 mg AG.g⁻¹) e chocolate amargo (11,73 ±0,35 a 14,88 ±0,37 mg AG.g⁻¹), enquanto os valores obtidos para chocolate ao leite foram próximos aos obtidos por este trabalho (3,25 ±0,1 a 5,38 ±0,12 mg AG.g⁻¹). Já Lee et al. (2003) relataram 24 mg AG.g⁻¹ de cacau na extração com metanol 80%.

Os resultados quantitativos obtidos por meio do método Folin-Ciocalteu devem ser interpretados cuidadosamente e devem ser entendidos como “estimativa” de compostos fenólicos totais no lugar de “conteúdo” de compostos fenólicos totais, particularmente quando são comparados resultados provenientes de diferentes matrizes ou de estudos realizados em diferentes laboratórios (ROHR, 1999). Isso porque, neste método, a cor atingida na reação depende do potencial de redução do padrão de referência utilizado, assim como dos compostos fenólicos e outros compostos interferentes da matriz do cacau, tais como aminas aromáticas, carboidratos e produtos da reação de Maillard, formados durante o processo de industrialização do chocolate.

Entretanto, apesar das limitações, quando comparado a outros métodos para a estimativa de compostos fenólicos totais (Vanilina-HCl e Azul da Prússia), o método Folin-Ciocalteu é o que apresenta a melhor repetibilidade e linearidade, representado, portanto uma ferramenta quantitativa valorosa quando interpretada adequadamente (WOLLGAST, 2004).

Apesar do teor de compostos fenólicos totais ser frequentemente usado para explicar a atividade antioxidante, deve-se ressaltar que seu significado é diferente de capacidade e/ou atividade antioxidante, a qual para ser avaliada necessita da extração de compostos fenólicos de efetiva atividade (OLDONI, 2007; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

4.2 Avaliação da atividade antioxidante

4.2.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

A atividade antioxidante dos extratos brutos aquosos e alcoólicos e dos padrões de referência, avaliada pelo método DPPH, está mostrada na tabela 4. A fim de possibilitar a comparação dos resultados, todos os extratos, tanto os aquosos quanto os alcoólicos, foram diluídos à mesma concentração ($0,36 \text{ g.mL}^{-1}$), a qual permitiu a reação em todas as amostras, sem que ocorresse subestimação dos resultados.

Tabela 4 – Valor da atividade antioxidante, em porcentagem, das amostras obtidas em solvente aquoso e alcoólico (média $\pm$ desvio padrão da triplicata da extração), pelo método do sequestro do radical livre DPPH

Amostra	Marca	Solvente	
		Água	Metanol (80%)
Cacau	-	$86,53 \pm 1,56^a$	$43,39 \pm 8,03^a$
Chocolate 70%	-	$62,28 \pm 3,00^b$	$41,20 \pm 2,92^a$
Chocolate 56%	-	$54,58 \pm 1,40^c$	$43,94 \pm 7,51^a$
Chocolate meio amargo	A	$39,94 \pm 1,17^d$	$41,55 \pm 2,75^a$
	B	$49,52 \pm 6,30^c$	$43,74 \pm 1,37^a$
	A	$17,51 \pm 2,99^e$	$11,83 \pm 1,96^b$
Chocolate ao leite	B	$18,88 \pm 0,75^e$	$12,74 \pm 0,23^b$
	importado	$21,16 \pm 0,25^e$	$12,89 \pm 2,07^b$
Chocolate branco	A	n.d.	n.d.
	B	n.d.	n.d.
Achocolatado em pó	A	$33,31 \pm 0,74^d$	$12,70 \pm 0,17^b$
	B	$23,67 \pm 0,71^e$	$13,58 \pm 2,62^b$
Bebida láctea	A	$1,55 \pm 0,20^f$	$1,07 \pm 0,19^c$
achocolatada	B	$3,60 \pm 0,24^f$	$1,58 \pm 0,48^c$
Padrões		Etanol	
BHT (200 ppm)		$34,29 \pm 1,02$	
Trolox (50 ppm)		$87,65 \pm 2,35$	

*Letras iguais nas colunas representam diferenças não significativas entre as amostras, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade
n.d.: não determinado

Todos os extratos aquosos apresentaram maiores porcentagens de atividade antioxidante que os alcoólicos, exceto o chocolate meio amargo A. Em relação aos extratos aquosos, *nibs* de cacau foi a amostra com a maior atividade ($86,53 \pm 1,56\%$), seguida dos chocolates 70% ($62,28 \pm 3,00\%$) e 56% ($54,58 \pm 1,40\%$). A atividade antioxidante do chocolate meio amargo A, embora tenha diferido da do chocolate meio amargo B, foi significativamente maior que a dos chocolates ao leite.

O achocolatado em pó B apresentou atividade igual a dos chocolates ao leite, enquanto o achocolatado em pó A mostrou atividade mais elevada, estatisticamente igual a do chocolate meio amargo A. Excluindo-se as amostras de chocolates brancos, para as quais não foi detectada atividade antioxidante, os valores obtidos para as bebidas lácteas achocolatas foram os menores dentre os produtos derivados do cacau. A queda na atividade antioxidante observada nos chocolates ao leite e bebidas lácteas achocolatadas deve-se ao processo de fabricação do chocolate, no qual a própria adição de leite reduz a atividade antioxidante em aproximadamente 30% (TABERNERO; SERRANO; SAURA-CALIXTO, 2006).

Observando os extratos alcoólicos, pode-se constatar uma considerável redução na atividade antioxidante em relação aos aquosos. A amostra de *nibs* de cacau apresentou atividade de apenas 43,39%, sendo estatisticamente igual dos chocolates 70% cacau, 56% cacau e meio amargos. Assim como observado para o teor de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante dos extratos aquosos e alcoólicos dos chocolates meio amargos foi semelhante. Chocolates ao leite e achocolatados em pó não diferiram entre si, mas diferiram do *nibs* de cacau, chocolates 70% e 56% cacau e meio amargos, bem como das bebidas lácteas achocolatas.

Apesar de se constituir em um método fácil e rápido para a avaliação da atividade antioxidante, o uso do radical DPPH requer algumas precauções na interpretação dos dados, pois a interação do radical com o antioxidante depende de sua conformação estrutural; enquanto alguns antioxidantes reagem rapidamente, outras reações são mais complexas (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995). Assim, o estudo do comportamento cinético da reação é uma ferramenta que pode auxiliar na interpretação dos dados. Os comportamentos cinéticos dos extratos estão ilustrados nas Figuras 11 a 14.

Figura 11 - Cinética de redução do radical livre DPPH dos extratos brutos aquosos

Figura 12 - Cinética de redução do radical livre DPPH dos extratos brutos aquosos

Figura 13 - Cinética de redução do radical livre DPPH dos extratos brutos alcoólicos

Figura 14 - Cinética de redução do radical livre DPPH dos extratos brutos alcoólicos

Analisando-se o comportamento cinético das reações, é possível observar que os extratos alcoólicos dos chocolates meio amargos tiveram suas reações estabilizadas por volta de 40 minutos, o que explica os valores de atividade antioxidante mais próximos aos dos extratos aquosos. O mesmo comportamento cinético foi observado com o extrato alcoólico do achocolatado em pó A e da bebida láctea achocolatada B. Já os demais extratos apresentaram estabilização mais tardia. Portanto, foi adotado o tempo de 120 minutos para o cálculo dos valores de EC_{50} , os quais foram expressos em $mg.mL^{-1}$ (Tabela 5).

Tabela 5 - Valor do EC_{50} ($mg.mL^{-1}$) dos extratos brutos aquosos e alcoólicos

Amostra	Marca	Solvente	
		Água	Metanol (80%)
Cacau	-	0,54	0,81
Chocolate 70%	-	1,15	1,37
Chocolate 56%	-	1,23	1,32
Chocolate meio amargo	A	1,64	1,32
	B	1,75	1,18
	A	5,73	5,79
Chocolate ao leite	B	5,46	5,11
	importado	4,91	7,64
Chocolate branco	A	n.d.	n.d.
	B	n.d.	n.d.
Achocolatado em pó	A	2,60	3,10
	B	3,22	5,32
Bebida láctea	A	8,25	12,41
achocolatada	B	3,75	6,32

n.d.: não determinado

As menores concentrações dos extratos para reduzir em 50% o radical DPPH foram obtidas para os extratos aquoso e alcoólico do *nibs* de cacau ($0,54 mg.mL^{-1}$ e $0,81 mg.mL^{-1}$, respectivamente). Isto indica uma forte atividade antioxidante, uma vez que é necessária uma menor concentração de amostra para reduzir o radical DPPH em relação às demais. Esses resultados diferem dos obtidos por Othman et al. (2007), que encontraram valores de EC_{50} entre $1,3 \pm 0,01$ e $1,5 \pm 0,1 mg.mL^{-1}$ em extratos etanólicos e $1,7 \pm 0,01$ e $2,9 mg.mL^{-1}$ em extratos aquosos de amostras

de sementes de cacau provenientes de diferentes países produtores. As diferenças em relação aos valores obtidos por este trabalho podem ser devidas ao método de extração empregado, às variedades de cacau utilizadas e ao processo de fabricação dos produtos analisados.

Para fins de melhor comparação dos produtos avaliados, a figura 15 mostra um comparativo entre a atividade antioxidante e a concentração de amostra para reduzir em 50% o radical DPPH. Conforme ilustrado, fica evidente uma relação inversa entre a porcentagem de atividade antioxidante e valo de EC_{50} .

Figura 15 – Atividade antioxidante das amostras (%) pelo método do sequestro do radical livre DPPH e concentração necessária das amostras para reduzir em 50% o radical DPPH (EC_{50})

4.2.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS**

A Tabela 6 mostra os valores obtidos por meio do método ABTS, para os extratos aquosos e alcoólicos das amostras. Os resultados estão expressos como atividade antioxidante equivalente ao Trolox ($\mu\text{m trolox.g}^{-1}$ amostra) em base úmida.

Tabela 6 – Atividade antioxidante equivalente ao trolox em amostras obtidas em solvente aquoso e alcoólico (média $\pm$ desvio padrão da triplicata da extração), pelo método ABTS

Amostra	Marca	Solvente	
		Água	Metanol (80%)
Cacau	-	141,27 $\pm$ 13,11 ^{a*}	100,50 $\pm$ 6,58 ^a
Chocolate 70%	-	80,70 $\pm$ 17,58 ^b	68,01 $\pm$ 8,47 ^b
Chocolate 56%	-	72,31 $\pm$ 0,68 ^{b,c}	64,71 $\pm$ 12,71 ^b
Chocolate meio amargo	A	56,28 $\pm$ 1,85 ^c	62,51 $\pm$ 3,93 ^b
	B	57,45 $\pm$ 5,26 ^c	76,27 $\pm$ 3,52 ^b
	A	21,13 $\pm$ 0,95 ^{d,e}	23,13 $\pm$ 0,18 ^c
Chocolate ao leite	B	21,24 $\pm$ 0,30 ^{d,e}	25,15 $\pm$ 1,06 ^c
	importado	23,66 $\pm$ 1,37 ^d	16,75 $\pm$ 1,70 ^{c,d}
Chocolate branco	A	n.d.	n.d.
	B	n.d.	n.d.
Achocolatado em pó	A	33,66 $\pm$ 1,15 ^d	28,04 $\pm$ 0,68 ^c
	B	30,25 $\pm$ 0,68 ^d	25,91 $\pm$ 0,08 ^c
Bebida láctea	A	3,20 $\pm$ 0,26 ^e	1,87 $\pm$ 0,22 ^d
achocolatada	B	4,03 $\pm$ 0,37 ^e	4,43 $\pm$ 0,13 ^d

*Letras iguais nas colunas representam diferenças não significativas entre as amostras, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

n.d.: não determinado

Em relação aos extratos aquosos, em ordem decrescente, as amostras que apresentaram melhor atividade antioxidante pelo método ABTS foram: cacau > chocolate 70% cacau > chocolate 56% cacau > chocolates meio amargos > achocolatados em pó > chocolates ao leite > bebidas lácteas achocolatadas. Não houve diferença estatística significativa entre as atividades antioxidantes dos extratos brutos aquosos dos chocolates meio amargos em relação ao chocolate 56% cacau. A atividade antioxidante para os chocolates ao leite também não diferiu

estatisticamente das encontradas para os achocolatados em pó. Os chocolates brancos não apresentaram atividade antioxidante por meio do método ABTS.

Já em relação aos extratos alcoólicos, o chocolate meio amargo B coloca-se como a amostra com a segunda melhor atividade antioxidante ($76,27 \pm 3,52 \mu\text{m trolox/g}$), enquanto a atividade dos achocolatados em pó encontra-se próxima à dos chocolates ao leite nacionais. Não houve diferença entre as atividades antioxidantes dos chocolates meio amargos e dos 56% e 70% cacau. Os resultados obtidos são consistentes com os encontrados por Tabernero, Serrano e Saura-Calixto (2006), que detectaram $78,8 \pm 2,13 \mu\text{m trolox.g}^{-1}$ em chocolate 52% cacau e $42,72 \pm 1,28 \mu\text{m trolox.g}^{-1}$ em chocolate 34% desengordurados, utilizando metanol 50% como solvente.

Na interpretação dos resultados obtidos pelo ABTS, deve-se considerar que este radical reage com qualquer composto aromático hidroxilado, independentemente de seu real potencial antioxidante, incluindo grupos que não contribuem efetivamente com a atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Entretanto, apesar de se constituir em um método mais abrangente quanto à polaridade dos antioxidantes, os resultados corroboram os observados por meio do método DPPH, o que indica a extração de compostos com efetiva atividade.

4.2.3 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos por meio do método de redução do ferro, para os extratos aquosos e alcoólicos das amostras. Os resultados da atividade antioxidante estão expressos em $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ amostra em base úmida.

Da mesma forma, o extrato aquoso de *nibs* de cacau apresentou a maior atividade antioxidante, seguido dos extratos aquosos de chocolate 70% e 56% cacau. Os chocolates meio amargos também apresentaram alta atividade, entretanto, a do chocolate meio amargo A foi menor e diferiu estatisticamente da atividade do chocolate meio amargo B. Os extratos aquosos dos achocolatados em pó também tiveram maiores valores para atividade antioxidante em relação aos dos chocolates ao leite. As menores atividades foram obtidas para as bebidas lácteas achocolatadas e chocolates brancos.

Tabela 7 - Atividade antioxidante em $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ em amostras obtidas em solvente aquoso e alcoólico (média $\pm$ desvio padrão da triplicata da extração), pelo método de redução do ferro (FRAP)

Amostra	Marca	Solvente	
		Água	Metanol (80%)
Cacau	-	354,43 $\pm$ 7,94 ^{a*}	174,50 $\pm$ 15,36 ^a
Chocolate 70%	-	181,43 $\pm$ 5,54 ^b	122,57 $\pm$ 28,10 ^b
Chocolate 56%	-	166,77 $\pm$ 4,53 ^c	119,95 $\pm$ 7,49 ^b
Chocolate meio amargo	A	119,82 $\pm$ 8,83 ^e	132,63 $\pm$ 1,91 ^b
	B	143,41 $\pm$ 2,51 ^d	146,50 $\pm$ 7,46 ^b
	A	46,11 $\pm$ 1,54 ^h	44,08 $\pm$ 3,86 ^c
Chocolate ao leite	B	47,99 $\pm$ 0,20 ^h	49,00 $\pm$ 0,36 ^c
	importado	43,58 $\pm$ 2,75 ^h	27,93 $\pm$ 3,08 ^{c,d}
Chocolate branco	A	4,35 $\pm$ 0,11 ⁱ	2,89 $\pm$ 0,11 ^d
	B	2,28 $\pm$ 0,32 ⁱ	1,16 $\pm$ 0,20 ^d
Achocolatado em pó	A	86,97 $\pm$ 0,19 ^f	33,40 $\pm$ 1,89 ^c
	B	70,50 $\pm$ 0,87 ^g	37,66 $\pm$ 5,44 ^c
Bebida láctea	A	6,56 ⁱ	4,25 ^d
achocolatada	B	11,13 ⁱ	5,05 ^d

*Letras iguais nas colunas representam diferenças não significativas entre as amostras, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em relação aos extratos brutos alcoólicos, a amostra de *nibs* de cacau apresentou a maior atividade, seguida pelos chocolates meio amargos, juntamente com os 70% e 56% cacau. Achocolatados em pó e chocolates ao leite não diferiram. Esses resultados são consistentes em relação aos observados pelo método ABTS, pois também o potencial de redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (0,7 V) é similar ao do radical ABTS^{+} (0,68 V), e assim, compostos similares reagem em ambos os métodos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Os resultados desse estudo são também semelhantes aos obtidos por Carlsen et al. (2010), que detectaram 2,3 $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ em chocolate branco e 149,8 $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ em chocolate amargo, utilizando metanol como solvente. Os autores encontraram médias de 18 $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ para produtos com conteúdo entre 24 e 30% de cacau, 72 $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ para produtos entre 40 a 65% e 109 $\mu\text{mol Fe}^{++}.\text{g}^{-1}$ para produtos contendo entre 70 a 99% de cacau. Pérez-Jiménez et al. (2008) relataram 149,87 $\mu\text{mol trolox}.\text{g}^{-1}$ de material seco para chocolate amargo e 61,5 $\mu\text{mol trolox}.\text{g}^{-1}$ para chocolate ao leite, também utilizando metanol como solvente.

4.2.4 Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A Tabela 8 apresenta os resultados da atividade antioxidante, em porcentagem, dos extratos aquosos e alcoólicos das amostras avaliadas pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

Diferentemente do observado pelos demais métodos, *nibs* de cacau não foi a amostra com a maior atividade antioxidante, a qual foi obtida pelo extrato aquoso do chocolate 70% cacau ($86,08 \pm 0,89\%$), seguido do extrato aquoso do chocolate 56% cacau ($79,60 \pm 2,26\%$). Apesar destas diferenças, novamente pode-se observar maior atividade antioxidante para os extratos alcoólicos dos chocolates meio amargos em relação aos aquosos.

Em ambos os extratos, a atividade do chocolate 70% cacau foi mais próxima da encontrada para chocolate 56% que para *nibs* de cacau. Em relação aos extratos brutos aquosos, *nibs* de cacau não diferiu da atividade encontrada para chocolate 56% nem da detectada para o chocolate meio amargo B. A atividade encontrada para chocolate ao leite importado foi superior a dos chocolates ao leite nacionais. Achocolatados em pó não diferiram dos chocolates ao leite, mas diferiram dos chocolates brancos. Os menores valores foram obtidos para as bebidas lácteas achocolatas.

A atividade antioxidante encontrada para o extrato alcoólico do chocolate meio amargo A não diferiu da obtida para chocolate 56% nem da encontrada para *nibs* de cacau. Para este extrato, a atividade dos chocolates ao leite nacionais foi maior que a do importado. O achocolatado em pó A não diferiu dos chocolates ao leite, entretanto, para a marca B houve diferença significativa.

Tabela 8 - Atividade antioxidante em porcentagem em amostras obtidas em solvente aquoso e alcoólico (média $\pm$ desvio padrão da triplicata da extração), pelo método da auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Amostra	Marca	Solvente	
		Água	Metanol (80%)
Cacau	-	77,59 $\pm$ 2,34 ^{b,c*}	73,96 $\pm$ 2,47 ^c
Chocolate 70%	-	86,08 $\pm$ 0,89 ^a	83,99 $\pm$ 2,60 ^a
Chocolate 56%	-	79,60 $\pm$ 2,26 ^{a,b}	80,88 $\pm$ 1,67 ^{a,b}
Chocolate meio amargo	A	65,90 $\pm$ 1,20 ^d	75,04 $\pm$ 1,99 ^{b,c}
	B	71,58 $\pm$ 0,82 ^{c,d}	73,54 $\pm$ 1,22 ^c
	A	47,03 $\pm$ 6,19 ^{f,g}	58,79 $\pm$ 3,98 ^d
Chocolate ao leite	B	42,87 $\pm$ 3,64 ^g	60,97 $\pm$ 1,27 ^d
	importado	55,41 $\pm$ 3,95 ^e	51,44 $\pm$ 2,52 ^e
Chocolate branco	A	24,41 $\pm$ 2,11 ^h	11,82 $\pm$ 2,04 ^{g,h}
	B	29,87 $\pm$ 0,54 ^h	13,79 $\pm$ 0,86 ^g
Achocolatado em pó	A	50,88 $\pm$ 2,09 ^{e,f}	57,26 $\pm$ 1,93 ^{d,e}
	B	47,06 $\pm$ 0,54 ^{f,g}	42,56 $\pm$ 3,54 ^f
Bebida láctea	A	5,51 $\pm$ 0,53 ⁱ	3,62 $\pm$ 0,27 ⁱ
achocolatada	B	9,75 $\pm$ 0,22 ⁱ	6,28 $\pm$ 0,74 ^{h,i}
Padrões		Etanol 100%	
BHT (100 ppm)		82,54 $\pm$ 2,16	
Trolox (100 ppm)		80,68 $\pm$ 1,46	

*Letras iguais nas colunas representam diferenças não significativas entre as amostras, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Othman et al. (2007) compararam a atividade antioxidante de sementes de cacau provenientes de diferentes países produtores, e obtiveram valores variando entre 51,4 $\pm$ 3% e 83,69 $\pm$ 1,07% para extratos aquosos e 26,1 $\pm$ 1,8% e 74,1 $\pm$ 2,5% para extratos alcoólicos (etanol), à concentração de 40000ppm. Assim, os resultados são consistentes com os encontrados nesse estudo, cujos valores obtidos para cacau, à concentração de 36000ppm foram 77,59 $\pm$ 2,34% e 73,96 $\pm$ 2,47% para extrato aquoso e alcoólico, respectivamente. Além disso, os valores obtidos neste estudo sugerem que o cacau produzido no Brasil está entre os que apresentam maior atividade antioxidante. De acordo com Sanbongi et al. (1998), as sementes do cacau brasileiro (variedade *Forastero*) possuem maior concentração de compostos fenólicos em comparação com sementes da mesma variedade provenientes de outros países produtores.

A cinética de descoramento do beta-caroteno durante os 120 minutos de análise, apresentada nas Figuras 16 e 17, mostra o comportamento dos extratos quanto à proteção contra a oxidação da emulsão. Pode-se observar que os extratos brutos aquosos e alcoólicos de *nibs* de cacau e chocolates 70% e 56% cacau foram os que mais agiram a favor da proteção da emulsão. O comportamento dos extratos brutos de chocolates ao leite e achocolatados em pó foi semelhante, enquanto o dos extratos de chocolates brancos e bebidas lácteas achocolatadas foram os que menos contribuíram contra a oxidação do sistema, confirmando a fraca atividade antioxidante.

A polaridade dos compostos presentes nos extratos influencia a análise da atividade antioxidante por meio do método de auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, já que o meio apresenta simultaneamente regiões polares e apolares, por ser uma emulsão. Uma vez que os extratos aquoso e alcoólico de *nibs* de cacau apresentaram alta capacidade antioxidante quando submetidos às demais análises de atividade antioxidante em solventes orgânicos, há indícios de que esses extratos contem maior quantidade de moléculas antioxidantes polares. Assim, os extratos que apresentaram maior atividade foram aqueles que possuem compostos capazes de interagir na interface água/lipídio, onde se inicia o processo oxidativo, o que pode não representar a real capacidade antioxidante das amostras.

Figura 16 – Cinética de inibição da oxidação de extratos brutos aquosos e alcoólicos pelo método da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico

Figura 17 – Cinética de inibição da oxidação de extratos brutos aquosos e alcoólicos pelo método da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico

4.2.5 Correlação entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

A correlação entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foi muito elevada para os métodos DPPH, ABTS e FRAP, sendo a maior delas obtida para o método ABTS (Tabela 9). Já a correlação entre compostos fenólicos totais e o sistema β -caroteno/ácido linoleico foi moderada.

Estes resultados indicam que os compostos fenólicos são responsáveis pela quase totalidade da atividade antioxidante detectada pelos métodos indiretos. Ainda em relação aos métodos indiretos, os extratos aquosos obtiveram maior correlação

que os alcoólicos, enquanto por meio da autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico a maior correlação foi obtida pelo extrato alcoólico. A análise da correlação evidencia a extração de compostos com efetiva atividade antioxidante.

Tabela 9 - Correlação entre a atividade antioxidante e os teores de compostos fenólicos totais

Correlação		r^2	
		Água	Metanol (80%)
Compostos fenólicos x	DPPH	0,9199	0,8549
	ABTS	0,9836	0,9762
	FRAP	0,9609	0,9489
	B-caroteno/ácido linoleico	0,6128	0,6868

4.3 Identificação e quantificação de resveratrol

4.3.1 Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM)

A identificação de *trans*-resveratrol foi confirmada por meio da comparação do tempo de retenção e fragmentação iônica do padrão *trans*-resveratrol com os das amostras. Como resultado da estrutura estável do *trans*-resveratrol, foi detectado um pico único na análise do padrão, referente ao *trans*-resveratrol derivatizado (m/z 444 uma), com tempo de retenção de 15,75 minutos (Figura 18).

O resveratrol foi identificado em todas as amostras analisadas, que incluíram *nibs* de cacau, chocolates 70% e 56% e o representante de cada produto para o qual se obteve as maiores atividades antioxidantes (Figuras 18 e 19). Apesar da alta precisão e sensibilidade da técnica de CG-EM, há o inconveniente da necessidade de derivatização dos compostos para convertê-los em derivados voláteis, os quais passam totalmente à fase de vapor nas condições de temperatura usadas normalmente na CG (DE MARIA; MOREIRA, 2004). As altas temperaturas atingidas podem ainda levar a isomerização e degradação do analito (PAULO et al., 2011).

Figura 18 – Perfil cromatográfico (modo sim) do padrão resveratrol (1A e 1B), *nibs* de cacau (2) e chocolate 70% (3) e 56% cacau (4). As setas indicam o pico referente ao resveratrol

Figura 19 – Perfil cromatográfico (modo sim) de chocolate meio amargo (5), ao leite (6), branco (7), achocolatado em pó (8) e bebida láctea achocolatada (9). As setas indicam o pico referente ao resveratrol

Apesar de esta técnica não ter possibilitado a quantificação de resveratrol, devido à alta variação encontrada em uma mesma amostra, a confirmação da presença de resveratrol em todas as amostras, incluindo chocolate branco, permitiu

o prosseguimento para a etapa de quantificação com segurança, dada a alta sensibilidade da técnica de CG-EM.

4.3.2 Quantificação de resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

Devido à pequena quantidade de *trans*-resveratrol presente nas amostras analisadas, inicialmente o método analítico passou por uma etapa de otimização. A identificação do estilbeno foi confirmada comparando-se o espectro obtido para o pico em solução padrão e o pico correspondente nas amostras com o mesmo tempo de retenção, sendo algumas amostras fortificadas para a confirmação. Após o pico de *trans*-resveratrol estar devidamente separado dos demais no cromatograma das amostras, foi iniciado o procedimento de validação (Figuras 20 e 21).

Figura 20 – Perfil cromatográfico da amostra de *nibs* de cacau. As setas indicam o pico referente ao resveratrol

Figura 21 – Perfil cromatográfico das amostras de chocolates meio amargos A e B. As setas indicam o pico referente ao resveratrol

O teste de seletividade foi realizado comparando-se os valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas: uma em matriz contaminada com o padrão resveratrol em concentrações conhecidas ($0,01$, $0,02$ e $0,04 \text{ ug.mL}^{-1}$) e a outra contendo apenas o padrão de resveratrol, nas mesmas concentrações. Quando as inclinações das duas curvas são iguais ou muito próximas e a razão entre os dois coeficientes angulares se aproxima de 1, significa que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito, ou seja, não há efeito de matriz e, portanto, o método é seletivo (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos no estudo de seletividade do método. A razão entre os coeficientes angulares das curvas foi igual a 0,98. Assim, o método é capaz de identificar o resveratrol sem interferentes e pode ser dito seletivo. O parâmetro linearidade também se mostrou satisfatório, uma vez que o coeficiente de determinação foi maior que 0,99, seguindo as recomendações da ANVISA (Figura 23).

Figura 22 – Curvas analíticas do padrão *trans*-resveratrol e do padrão *trans*-resveratrol em matriz

Figura 23 – Curva analítica (equação de reta e coeficiente de correlação) de *trans*-resveratrol na faixa de 0,02 a 0,08 ug.mL⁻¹

Os valores obtidos nos testes de recuperação, para avaliação do parâmetro exatidão, podem ser observados na tabela 10. Os resultados obtidos estiveram entre 70 a 120%, com média igual a 107,41%, e demonstram que o método pode ser aplicado satisfatoriamente. Paulo et al. (2011) calcularam 100,44% para a recuperação de *trans*-resveratrol em pesquisa com vinhos portugueses, valor semelhante ao calculado neste estudo.

Tabela 10 – Recuperação de *trans*-resveratrol em três diferentes concentrações

Concentração de resveratrol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Massa injetada (μg)	Massa recuperada (μg)	Recuperação (%)
0,02	0,0004	0,000476	118,98
0,04	0,0008	0,000758	94,74
0,06	0,0012	0,0013	108,52
Média			107,41

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados a partir de três curvas analíticas do padrão resveratrol, contendo quatro pontos (Figura 24), foram iguais a $0,0035 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,0108 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, por meio dos cromatogramas obtidos a partir da injeção de $0,0002 \mu\text{g}$ do padrão (equivalente a concentração de $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$), observou-se que este LQ não permitiria a quantificação segura de resveratrol, dada a variação entre as injeções e a pequena área do pico, levando à conclusão de que nesta concentração pode-se detectar o estilbeno, mas não quantificá-lo. Portanto, adotou-se a concentração de $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ como o LD e não como LQ.

Para a confirmação do valor de LQ, a matriz contaminada com $0,0004 \mu\text{g}$ de resveratrol (equivalente a concentração $0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foi submetida a extração e injetada nas mesmas condições que as demais amostras, também em triplicata. Nesta concentração, obtiveram-se dados reprodutíveis, e, portanto, adotou-se o valor de $0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ como o LQ. Paulo et al. (2011), calcularam um limite de quantificação igual a $0,025 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Gerogiannaki-Christopoulou (2006) calcularam $0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Estas observações evidenciam a importância da confirmação dos valores de LD e LQ obtidos por meio dos cálculos, que podem não coincidir com o observado nas análises, e assim, levar a erros.

Figura 24 – Curvas analíticas (equações de reta e coeficientes de correlação) de *trans*-resveratrol na faixa de 0,02 a 0,08 µg.mL⁻¹, para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A precisão foi avaliada por meio de testes de repetitividade. Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um desvio padrão relativo (RSD) de 1 a 2%, enquanto em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004). Os resultados estão apresentados na Tabela 11, que também apresenta os resultados da quantificação de resveratrol (µg.g⁻¹) nas amostras. É possível observar que todas as amostras quantificadas apresentaram RSD abaixo de 20%, e, portanto, o método pode ser considerado preciso.

Embora o resveratrol tenha sido detectado, não foi possível quantificá-lo nos chocolates 56% e 70% cacau, bem como nos chocolates ao leite nacionais. O estilbeno não foi detectado pela técnica de CLAE nas amostras de chocolate ao leite importado, chocolates brancos, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas.

Tabela 11 – Quantidade de resveratrol ($\mu\text{g.g}^{-1}$) nas amostras e desvio padrão relativo (RSD)

Amostra	Marca	$\mu\text{g resveratrol.g}^{-1}$	RSD (%)
Cacau	-	$1,16 \pm 0,092$	7,99
Chocolate 70%	-	*	-
Chocolate 56%	-	*	-
Chocolate meio amargo	A	$1,25 \pm 0,009$	0,75
	B	$2,25 \pm 0,412$	18,34
	A	*	-
Chocolate ao leite	B	*	-
	importado	n.d.	-
Chocolate branco	A	n.d.	-
	B	n.d.	-
Achocolatado em pó	A	n.d.	-
	B	n.d.	-
Bebida láctea achocolatada	A	n.d.	-
	B	n.d.	-

* detectado, porém abaixo do LQ

n.d.: não detectado

Os dados obtidos revelam concentração mais elevada de resveratrol em chocolates meio amargos que no próprio *nibs* do cacau. Variações entre amostras já foram previamente observadas em uvas e cevada (ROMERO-PEREZ et al., 2001; JERKOVIC; COLLIN, 2007, 2008). É importante salientar que ocorre grande variação na produção de compostos secundários pelas plantas, sendo esta produção relacionada tanto a fatores genéticos quanto ambientais. Assim, genes responsáveis pela biossíntese de compostos secundários, como o resveratrol, podem ser ativados em casos de infecções por microrganismos ou pragas, solo pobre em nutrientes, clima, exposição à radiação UV, dentre diversos outros fatores (HERAS, 1998; JERKOVIC et al., 2010).

Hurst et al. (2008) encontraram $1,85 \pm 0,43 \mu\text{g.g}^{-1}$ para cacau em pó e $0,35 \pm 0,08 \mu\text{g.g}^{-1}$ para chocolates amargos. O uso de diferentes procedimentos de extração (desengorduramento, hidrólise ácida) e fontes de detecção menos seletivas que a espectrometria de massas pode ser responsável por essas diferenças (JERKOVIC et al., 2010). Além desses fatores, por serem os compostos fenólicos degradados no processo de fermentação, amostras menos fermentadas preservam estes compostos em maior concentração (CAMU et al., 2008).

Assim, a fim de preservar o conteúdo de compostos fenólicos em maior quantidade no processo de fermentação, alguns estudos recentes tem se concentrado na inativação da enzima polifenoloxidase, entretanto, estes estudos focam-se principalmente no conteúdo de flavanóis, e não de estilbenos (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2007; SCHINELLA et al., 2010). Tanto a falta de estudos quanto a observação de que marcas diferentes de um mesmo produto apresentam grande variação no teor de resveratrol evidenciam a necessidade de investigar de que forma o processo de fabricação afeta o teor de estilbenos.

Apesar de este método não ter permitido a quantificação do teor de resveratrol na maioria das amostras, tanto os dados relatados na literatura quanto os obtidos neste estudo demonstram que os produtos derivados de cacau produzidos e comercializados no Brasil (chocolates meio amargos) possuem uma quantidade elevada de resveratrol, colocando-os em posição de destaque dentre os alimentos que contem este estilbeno. Apesar de não ter sido possível a quantificar o teor de resveratrol nos chocolates ao leite nacionais, o estilbeno foi detectado em ambas as amostras, o que não ocorreu com o chocolate ao leite importado, confirmando a presença de maior quantidade do estilbeno nos chocolates nacionais.

Embora este estudo não tenha identificado e quantificado o glicosídeo do *trans*-resveratrol, pode-se inferir que sua quantidade nas amostras brasileiras é superior à de *trans*-resveratrol, uma vez que Hurst et al. (2008) detectaram níveis do glicosídeo de 3,2 a 5,2 vezes mais elevados que os de *trans*-resveratrol nas amostras de produtos derivados de cacau analisadas. Considerando-se que em mamíferos o glicosídeo é absorvido como *trans*-resveratrol (HENRY-VITRAC et al., 2006), cacau e produtos derivados contribuem com a ingestão de uma quantidade ainda maior de estilbenos.

De acordo com os dados obtidos por este estudo, considerando-se a ingestão 30g, o consumo de chocolates meio amargos contribui com a ingestão até 67,5 ug de resveratrol. Vitrac et al. (2005) relatam a ingestão de 297µg de resveratrol em uma porção de 150mL de vinho tinto brasileiro. Dessa forma, os resultados obtidos para os chocolates brasileiros os colocam como uma fonte significativa de resveratrol, contribuindo significativamente para a ingestão deste importante polifenol pela população brasileira.

5. CONCLUSÕES

O método de extração térmica com o solvente água foi mais eficaz na extração de compostos fenólicos totais.

Os extratos das amostras que apresentaram valores elevados, intermediários e baixos para atividade antioxidante foram os mesmos para os métodos indiretos (DPPH, ABTS e FRAP), indicando semelhança do mecanismo de reação bem como a contribuição dos mesmos compostos para a atividade antioxidante.

Os resultados obtidos por meio do método da autooxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico diferiram dos obtidos por meio dos métodos indiretos, principalmente em relação à amostra de *nibs* de cacau, evidenciando a presença de moléculas antioxidantes polares neste extrato.

Devido a sua alta sensibilidade, a técnica de CG-EM permitiu a confirmação da ocorrência de resveratrol em todas as amostras analisadas. O emprego de CLAE e a validação do método permitiram a quantificação de resveratrol em apenas três das catorze amostras analisadas, evidenciando a menor sensibilidade deste método em relação à técnica de CG-EM.

A variação da concentração de resveratrol dentre as amostras indica a influência de diversos fatores, desde a procedência da matéria prima até o processo de fabricação e indica a necessidade de estudos para a preservação deste estilbeno ao longo da cadeia produtiva.

A quantidade de resveratrol presente em chocolates meio amargos brasileiros foi superior à relatada para os produtos dos mercados americano e europeu, o que, em conjunto com a elevada atividade antioxidante encontrada, mostram a contribuição destes alimentos para o consumo de antioxidantes e resveratrol pela população brasileira.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, R. S.; SEERAM, N. P.; SHISHODIA, S.; TAKADA, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, Athens, v. 24, p. 2783-2840, 2004.
- ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- ANDRÉS-LACUEVA, C.; MONAGAS, M.; KHAN, N.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; URPI-SARDA, M.; PERMANYER, J.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 3111-3117, 2008.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 11, n.11, p. 419-421, 2000.
- ARTS, I. C.; HOLLMAN, P. C.; KROMHOUT, D. Chocolate as a source of tea flavonoids. **Lancet**, London, v. 354, p. 488, 1999.
- BARGER, J. L.; KAYO, T.; VANN, J. M.; ARIAS, E. B.; WANG, J.; HACKER, T. A.; WANG, Y.; RAEDERSTORFF, D.; MORROW, J. D.; LEEUWENBURGH, C.; ALLISON, D. B.; SAUPE, K. W.; CARTEE, G. D.; WEINDRUCH, R.; PROLLA, T. A. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 6, p. e2264, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BEARDEN, M. M.; PEARSON, D. A.; REIN, D.; CHEVAUX, K. A.; CARPENTER, D. R.; KEEN, C. L.; SCHMITZ, H. Potential cardiovascular health benefits of procyanidins present in chocolate and cocoa. In: PARLIAMENT, T. H.; HO, C.-T.; SCHIEBERLE, P. (Ed.). **Caffeinated beverages** – Health benefits, physiological effects, and chemistry. Washington, DC: ACS, 2000. cap. 19, p. 177-186. (Symposium Series).

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, p. 70–76, 1996.

BHAT, K. P. L.; KOSMEDER II, J. W.; PEZZUTO, J. M. Biological effects of resveratrol. **Antioxidants and Redox Signaling**, Larchmont, v. 3, n. 6, p. 1041-1064, 2001.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A. F. M.; AZHAR, M. E. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, p. 1636-1641, 2008.

BIZZOTTO, C. S. **Metilxantinas por eletroforese capilar: desenvolvimento, otimização e validação de método. Aplicação em café descafeinado e outras bebidas**. 2010. 148 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; HANNUM, S. M.; GERSHWIN, M. E. Cocoa and chocolate: composition, bioavailability and health implications. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 3, n. 2, p. 77–105, 2000.

BRAGA, C.; DAOLIO, R.; OLIVEIRA, M. A.; CASSIANO, C. M. O que motiva e determina a compra e o consumo de chocolate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA COMUNICAÇÃO, 30., 2007, Santos. **Anais...** São Paulo: INTERCOM, 2007. 1 CD-ROM.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaften und Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3337-3340, 2002.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 391–397, 1997.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; ADDO, S. K.; TAKRAMA, J. S.; BERNAERT, H.; DE VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and

polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, p. 2288–2297, 2008.

CARLSEN, M. H.; HALVORSEN, B. L.; HOLTE, K.; BØHN, S. K.; DRAGLAND, S.; SAMPSON, L.; WILLEY, C.; SENOO, H.; UMEZONO, Y.; SANADA, C.; BARIKMO, I.; BERHE, N.; WILLETT, W. C.; PHILLIPS, K. M.; JACOBS, D. R.; BLOMHOFF, R. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. **Nutrition Journal**, London, v. 9, n. 3, 2010. Disponível em: <http://www.nutritionj.com/content/pdf/1475-2891-9-3.pdf>.

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Disponível em: www.ceplac.gov.br. Acesso em: 20 mar. 2010.

CHEN, Y.; TSENG, S. H.; LAI, H. S.; CHEN, W. J. Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. **Surgery**, Saint Louis, v. 136, p. 57–66, 2004.

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

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Analytical methods for chlorogenic acid. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Caféina: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

DILLINGER, T. L.; BARRIGA, P.; ESCÁRCEGA, S.; JIMENEZ, M.; LOWE D. S.; GRIVETTI, L. E. Food of the Gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 8, p. 2057S-2072S, 2000.

DONOVAN, J. **Diversification in international cacao markets**: opportunities and challenges for smallholder cacao enterprises in Central America. A consultancy report prepared for RUTA. Turrialba, Costa Rica: CATIE, 2006. 35 p.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUTHIE, G. G.; GARDNER, P. T.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 62, p. 599-603, 2003.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. 2004. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

ELKON, J. **O livro de receitas com chocolate**. Rio de Janeiro: Editora Record, 2004. 152 p.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4894-4898, 1999.

FAURÉ, M.; LESSI, E.; TORRES, L.; VIDELA, C. A. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. **Phytochemistry**, New York, v. 29, p. 3773-3775, 1984.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, London, v. 408, p. 239-247, 2000.

FRANCISCO, M. L. D. L.; RESURRECCION, A. V. A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 117, p. 356-363, 2009.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 19, p. 1-22, 1980.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 13, p. 1925- 1941, 2000.

FRANZEN, M.; MULDER, M. B. Ecological, economic and social perspectives on cocoa production worldwide. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, n. 13, p. 3835–3849, 2007.

GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; ATHANASOPOULOS, P.; KYRIAKIDIS, N.; GEROGIANNAKI, I. A.; SPANOS, M. *Trans*-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. **Food Control**, Vurrey, v. 17, p. 700–706, 2006.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GUYTON, B. **Commodities** – Cocoa Review. Issues, trends and performance of the chocolate and confectionery industries. Washington, DC: World Cocoa Foundation, 2003. 40 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 18, p. 125-126, 1995.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 35, p. 1147-1150, 2007,

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 2007. 704 p.

HARBORNE, J. B. Methods in plant biochemistry, In: DEY, P. M.; HARBONE, J. B. (Ed.). **Plant phenolics**. London: Academic Press, 1989.

HASLAM, E. **Practical polyphenolics**: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 422 p.

HENRY-VITRAC, C.; DESMOULIÈRE, A.; GIRARD, J.; MERILLON, J. M.; KRISA, S. Transport, deglycosylation and metabolism of *trans*-piceid by small intestinal epithelial cells. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 45, p. 376–382, 2006.

HERMÈ, P. **Larousse do chocolate**. São Paulo: Editora Larousse. 2006. 256 p.

HERAS, D. L.; SLOWING, K.; BENEDÍ, J.; CARRETO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M. J.; GÓMEZ-SERRANILLOS, P.; LISO, P. A.; VILLAR, A. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 61, p. 161-166, 1998.

HERRERA, E.; JIMÉNEZ, R.; ARUOMA, O. I.; HERCBERG, S.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I.; FRAGA, C. Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. **Nutrition Reviews**, New York, v. 67, p. S140-S144, 2009.

HURST, W. J.; MARTIN, R. A.; TARJA JUNIOR, S. M. Analytical methods for quantitation of methylxanthines. In: SPILLER, G. A. (Ed.). **Caffeine**. New York: CRC Press, 1998. cap. 10.

HURST, W. J.; GLINSKI, J. A.; MILLER, K. B.; APGAR, J.; DAVEY, M. H.; STUART, D. A. Survey of the *trans*-resveratrol and *trans*-piceid content of cocoa containing and chocolate products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 8374-8378, 2008.

IBERN-GÓMEZ, M.; ROIG-PÉREZ, S.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; TORRE-BORONAT, M. C. Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 6352–6354, 2000.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Brasília, DF, 2003. (DOQ-CGCRE-008).

INTERNATIONAL COCOA ASSOCIATION. **Annual Report 2003–2004**. Disponível em: <http://www.icco.org/anrep/anrep0304english.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2011.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MONN, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, Washington, DC, v. 275, p. 218–220, 1997.

JERKOVIC, V.; COLLIN, S. Occurrence of resveratrol and piceid in American and European hop cones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 8754–8758, 2007.

JERKOVIC, V.; COLLIN, S. Fate of resveratrol and piceid through different hop processings and storage times. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 584–590, 2008.

JERKOVIC, V.; BROHAN, M.; MONNART, E.; NGUYEN, F.; NIZET, S.; COLLIN, S. Stilbenic profile of cocoa Liquors from different origins determined by RP-HPLC-APCI(+)-MS/MS. Detection of a new resveratrol hexoside. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 7067–7074, 2010.

KEALEY, K. S.; SNYDER, R. M.; ROMACZYK, L. J.; GEYER, H. M.; MEYERS, M. E.; WHITHCARE, E. J.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H. Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same medical uses. **Patent Corporation Treaty (PCT) WO 98/09533**, Mars Incorporated, USA, 1998.

KIMURA, Y.; OKUDA, H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 6, p. 1844–1849, 2001.

KING, R.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of resveratrol. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, p. 65–70, 2006.

KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.; OREOPOULOU, V. *In vitro* activity of vitamins, flavonoids and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 1, p. 78–93, 2008.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cinara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 2, p. 861–868, 2008.

LAJUS, B. **Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau**. 1982. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TORNERO, A. Review: health effects of cocoa flavonoids. **Food Science and Technology International**, London, v. 11, n. 3, p. 159-176, 2005.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 9, p. 77–86, 1976.

LANGCAKE, P.; CORNFORD, C. A.; PRYCE, R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 18, n. 6, p. 1025–1027, 1979.

LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 7292-7295, 2003.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.) em função do processamento**. 2000. 112 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

LUPIEN, J. R. Overview of the Nutritional Benefits of Cocoa and Chocolate. In: KNIGHT, I. (Ed.). **Chocolate and Cocoa: health and nutrition**. Oxford: Blackwell Science, 1999.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MARTIN, A. R.; VILLEGAS, I.; LA CASA, C.; DE LA LASTRA, C. A. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 67, p. 1399–1410, 2004.

MATTIETO, R. A. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 2001. 164 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 127-130, 2001.

MILLER, K. B.; STUART, D. A.; SMITH, N. L.; LEE, C. Y.; MCHALE, N. L.; FLANAGAN, J. A.; OU, B.; HURST, W. J. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4062-4068, 2006.

MINIFIE, B. W. **Chocolate, cocoa, and confectionary**: science and technology. New York: Chapman and Hall, 1989. 904 p.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

NAKATANI, N. Antioxidants from spices and herbs. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants**: chemistry, health effects, and applications. Newfoundland: AOCS Press, 1996. cap. 4, p. 64-75.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

NIEMENAK, N.; ROHSIUS, C.; ELWERS, S.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, p. 612–619, 2006.

NONOMURA, S.; KANAGAWA, H.; MAKIMOTO, A. Chemical constituents of polygonaceous plants. In Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.). **Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, Tokyo, v. 83, p. 988–990, 1963.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzidas por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; GHANI, N. A.; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 1523–1530, 2007.

PAULO, L.; DOMINGUES, F.; QUEIROZ, J. A.; GALLARDO, E. Development and validation of an analytical method for the determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in wine: analysis of its contents in 186 portuguese red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 2157–2168, 2011.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M. de; ALMEIDA, L. C. C. The First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa region in Brazil. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 67, n. 2, p. 188-189, 1990.

PEREIRA, P. R. G. **Relação da qualidade do cacau no mercado atual e no mundo**. Ilhéus, BA: Cepec/Ceplac, 2009. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/semfaz/mercadoatual.htm>>. Acesso em: 20 maio 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Essex, v. 41, n. 3, p. 274–285, 2008.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 2, n. 9, p. 223- 227, 1991.

PORTO, W. G. Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia? **Revista Neurociências**, São Paulo, v. 9, p. 70-76, 2001.

PORT'S, P. S. **Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica brasileira**. 2011. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RAGAB, A. S.; VAN FLEET, J.; JANKOWSKI, B.; PARK, J.; BOBZIN, S. C. Detection and quantitation of resveratrol in tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 7175-7179, 2006.

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

RAY, P. S.; MAULIK, G.; CORDIS, G. A.; BERTELLI, A. A. E.; BERTELLI, A.; DAS, D. K. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 27, p. 160–169, 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, p. 1231–1237, 1999

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. (Ed.). **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 2002.

RENAUD, S.; GUEGUEN, R. The French Paradox and wine drinking. **Novartis Foundation Symposium**, New York, v. 216, p. 208–217, 1998.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RICHTER, M.; LANNES S. C. S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 3, 2007.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, p. 235–254, 2005.

ROHR, G. E. **Analytical Investigation on and Isolation of Procyanidins from Crateagus Leaves and Flowers**. 1999. Thesis (Ph.D.) - Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Zürich, Switzerland, 1999.

ROMERO-PÉREZ, A. I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; de la TORRE-BORONAT, M. C. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 210–215, 2001.

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

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 45, p. 287–306, 2005.

SCHINELLA, G.; MOSCA, S.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; PASAMAR, M. A.; MUGUERZA, B.; RAMÓN, D.; RÍOS, J. L. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 1614-1623, 2010.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, healthy effects, and applications**. Newfoundland: AOCS press, 1996. cap. 1, p. 1-11.

SHAKIBAEI, M.; HARIKUMAR, K. B.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol addiction: To die or not to die. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 53, p. 115-128, 2009.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, p. 49-52, 1992.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C. T.; OSAWA, T.; HUANG, T. M.; ROSEN, R. T. **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington, DC: ACS, 1994. chap. 2, p. 20-32. (Symposium Series).

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzimology**, Orlando, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come and gone? **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 30, p. 91-113, 1997.

STAHL W.; van den BERG, H.; ARTHUR, J.; BAST, A.; DAINY, J.; FAULKS, R. M.; GAERTNER, C.; HEANEN, G.; HOLLMAN, P.; HOLST, B.; KELLY, F. J.; POLIDORI, M. C.; RICE-EVANS, C.; SOUTON, S.; van VLIET, T.; VINA-RIBES, J.; WILLIAMSON, G.; ASTLEY, S. B. Bioavailability and metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 23, p. 39-100, 2002.

TABERNERO, M.; SERRANO, J.; SAURA-CALIXTO, F. The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, p. 28–32, 2006.

TAKAOKA, M. J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). **Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University**, Hokkaido, v. 3, p. 1–16, 1940.

TANG, S. Y.; WHITEMAN, M.; PENG, Z. F.; JENNER, A.; YONG, E. L.; HALLIWELL, B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, p. 1575–1587, 2004.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; MARÍN, A.; MUGUERZA, B.; GIL-IZQUIERDO, A.; CERDA, B.; ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J.; IBARRA, A.; PASAMAR, M. A.; RAMÓN, D.; ESPIN, J. C. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 3926–3935, 2007.

TSENG, S. H.; LIN, S. M.; CHEN, J. C.; SU, Y. H.; HUANG, H. Y.; CHEN, C. K.; LIN, P. Y.; CHEN, Y. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 10, p. 2190–2202, 2004.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**, New York, v. 17, p. 3–8, 1997.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v. 39, p. 44–84, 2007.

VINSON, J. A.; PROCH, J.; ZUBIK, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4821–4824, 1999.

VINSON, J. A.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA, P.; SHUTA, D.; SAMMAN, N.; AGBOR, G. A. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 8071–8076, 2006.

VISIOLI, F. F.; BERNAERT, H.; CORTI, R.; FERRI, C.; HEPTINSTALL, S.; MOLINARI, E.; POLI, A.; SERAFINI, M.; SMIT, H. J.; VINSON, J. A.; VIOLI, F.; PAOLETTI, R. Chocolate, Lifestyle, and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 49, p. 299–312, 2009.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J.; MERILLON, J.; TEISSEDE, P. Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astrigen, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 5664–5669, 2005.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods using DPPH. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, p. 1201–1204, 1998.

WATERHOUSE, A. L.; SHIRLEY, J. R.; DONOVAN, J. L. Antioxidants in chocolate. **Lancet**, London, v. 348, p. 834, 1996.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Review in polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, Essex, v. 33, p. 423–447, 2000.

WOLLGAST, J. **The contents and effects of polyphenols in chocolate: Qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health**. 2004. 349 p. Thesis (Doctor) - Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics, and Environmental Management, Gießen, 2004.

ZUO, Y.; WANG, C.; ZHAN, J. Separation, characterization, and quantification of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3789–3794, 2002.

ANEXOS

ANEXO A

Figura 25 - Curva de calibração do ácido gálico para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais

ANEXO B

Figura 26 - Curva de calibração do Trolox para o cálculo da atividade antioxidante pelo método $\text{ABTS}^{+\bullet}$

ANEXO C

Figura 27 - Curva de calibração com sulfato ferroso para o cálculo da atividade antioxidante pelo método FRAP