UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

**Desenvolvimento de chocolates ao leite com propriedades
funcionais acrescidos de folhas de *Brassica oleracea*
(couve) e frutos de *Vitis vinífera*(uva)**

Juliana Cajado Souza Carvalho

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

**Desenvolvimento de chocolates ao leite com propriedades
funcionais acrescidos de folhas de *Brassica oleracea*
(couve) e frutos de *Vitis vinífera*(uva)**

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Juliana Cajado Souza Carvalho

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C331d	Carvalho, Juliana Cajado Souza Desenvolvimento de chocolates ao leite com propriedades funcionais acrescidos de folhas de <i>Brassica oleracea</i> (couve) e frutos de <i>Vitis vinifera</i>(uva) / Juliana Cajado Souza Carvalho. -- São Paulo, 2016. 145p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Lannes, Suzana Caetano da Silva 1. Tecnologia de alimentos 2. Chocolate I. T. II. Lannes, Suzana Caetano da Silva, orientador. 664 CDD

Juliana Cajado Souza Carvalho

Desenvolvimento de chocolates ao leite com propriedades funcionais acrescidos de folhas de *Brassica oleracea* (couve) e frutos de *Vitis vinífera*(uva)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“O que nós alcançamos internamente mudará a realidade exterior”

Plutarco

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho é mais uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho, em especial:

À Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes, por sua orientação e dedicação em todas as etapas deste projeto.

As minhas colegas de laboratório: Raquel, Beatriz, Ingryd, Natasha e Poliana, pela parceria durante esses dois anos de trabalho.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, por toda a ajuda diária.

À Profa. Dra. Paulete Romoff e ao Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader, pela colaboração na realização de experimentos e por toda a ajuda e apoio.

Ao técnico Nei Carlos do laboratório de Química da Universidade Presbiteriana Mackenzie e ao doutorando Sandro Oliveira, pela colaboração na realização dos experimentos de antioxidantes.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e o suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho;

A minha família, por todo apoio recebido;

A meus amigos e a todos que estiveram comigo neste período;

CARVALHO, J. C. S. **DESENVOLVIMENTO DE CHOCOLATES AO LEITE COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS ACRESCIDOS DE FOLHAS DE *Brassica oleracea* (couve) E FRUTOS DE *Vitis vinífera* (uva)**, 2016, 137f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

RESUMO

Dietas ricas em vegetais são fontes de antioxidantes, importantes agentes que auxiliam na prevenção do envelhecimento precoce. O cacau, matéria prima base para a produção de chocolates é considerado rica fonte de antioxidante. Entretanto, o chocolate do tipo ao leite, que possui menor quantidade de cacau e, portanto, menor ação antioxidante, é o mais consumido no Brasil. O presente trabalho tem o objetivo de desenvolver formulações de chocolates ao leite com propriedades funcionais. Para tal, foram produzidas três diferentes variações de chocolate: ao leite (controle), ao leite adicionados de folhas de couve e ao leite adicionados de frutos de videira. Os chocolates fabricados foram avaliados por suas características físicas, físico químicas, sensoriais e quanto ao potencial antirradicalar. Como resultado, observou-se que o teor de umidade do chocolate ao leite e a atividade de água não se modificaram com a adição dos produtos liofilizados. Encontrou-se no chocolate com couve, aumento de 9% no teor de fibras e 6% no conteúdo mineral. Foi encontrada diferença nas propriedades físicas do chocolate com uva, como viscosidade Casson ($0,76 \pm 0,04$ Pa.s), dureza ($43,77 \pm 2,05$ N), tensão inicial Casson ($12,9 \pm 3,35$ Pa) e tamanho de partícula ($37,8 \pm 1,13$ μ m). A avaliação sensorial registrou alta aceitabilidade dos produtos e a percepção de diferentes texturas nos chocolates. O perfil do potencial atioxidante sugere que não houve aumento da capacidade antirradicalar com a adição de couve e uva, porém a análise do perfil cromatográfico de fenólicos levanta a hipótese de que alguns compostos foram transferidos para os chocolates com adição de couve e de uva. Conclui-se que foi possível agregar propriedades funcionais no chocolate ao leite.

Palavras-chave: chocolate, couve, uva, antioxidants

CARVALHO, J. C. S. **Development of milk chocolates with functional properties with leaves from *Brassica Oleracea* (kale) and fruits of *Vitis Vinifera* (grape)** 2016. 145f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ABSTRACT

Nowadays, it is known that a diet rich in vegetables is a source of antioxidants which help in the prevention of premature ageing. Studies on cocoa indicate that this raw material, essential in the production of chocolate, is a rich source of antioxidants. However, milk chocolate, which contains less cocoa and less antioxidant activity, is the most consumed type in Brazil. The aim of this study was to develop milk chocolate formulations with antioxidant properties. As such, three kinds of chocolate were produced: with added kale leaves, with added grapes and the control, normal milk chocolate. The chocolates produced were evaluated on their physical characteristics, physical-chemistry and antioxidant potential. It was found that the moisture content and the water activity did not change with the addition of lyophilized materials. The addition of kale increased 9% of fibers content and 6% of mineral content. It was found that the greatest change in physical properties was with added grape, such as viscosity ($0,76\pm0,04$ Pa.s), texture ($43,77\pm2,05$ N), yield value ($12,9\pm3,35$ Pa) and particle size ($37,8\pm1,13$ μ m). The sensorial analysis resulted in high acceptability of the products and in the differences of perception in texture between the three kinds of chocolates. The antioxidant profile suggest that there was no occurrence of increases in antioxidant capacity with the addition of kale and grape, but the chromatography profile of phenolic compounds raises the hypothesis that some phenolic compounds were transferred to the chocolates after the addition. It was found that it is possible to aggregate functional properties of milk chocolate.

Key-words: chocolate, kale, grape, antioxidants

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das camadas da pele	22
Figura 2: Redução tetravalente de O ₂ . Adaptado de Lushchak (2014).	24
Figura 3: Reação de dismutação. Adaptado de Lushchak (2014).	24
Figura 4: A) Reação de Fenton B) Reação de homólise da água. Retirado de Kammeyer; Luiten (2015).	26
Figura 5: Diferenças no valor calórico e teor de polifenóis em diferentes tipos de chocolate (A: amargo, B: ao leite. C: branco) (AFOWAKA, 2010).	29
Figura 6: Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos, (Retirado de RAMALHO; JORGE, 2006).	32
Figura 7: Fórmula geral dos ácidos hidroxibenzóicos (Retirado de RAMALHO, JORGE, 2006).	34
Figura 8: Estrutura química do Resveratrol	36
Figura 9: Métodos utilizados para a extração de compostos fenólicos da couve.	46
Figura 10: Amostras de chocolate utilizadas para análise sensorial	54
Figura 11- Relação entre a velocidade relativa de reações de deteriorização e atividade de água (retirado de NESPOLO, 2015).	58
Figura 12: Estrutura química do reagente DPPH	59
Figura 13: Reação entre o radical DPPH e antioxidante. Retirado de Oliveira (2015)	60
Figura 14: Curva padrão de DPPH.	60
Figura 15: Perfil cinético da reação entre o radical livre DPPH e o extrato de couve liofilizada, sendo A) Extração pelo método de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997) e B) extraído pelo método de Genovese e Lannes (2010)	61

Figura 16: Perfil cinético da reação entre o radical livre DPPH e o extrato de couve in natura, sendo A) Extração pelo método de Laurrari (1997) et al. e B) extraído pelo método de Genovese e Lannes (2010).	62
Figura 17: Reação simplificada de molibdênio com antioxidante.	63
Figura 18: Curva padrão de reação entre Ácido Gálico e o reagente <i>Folin-Ciocalteu</i>	64
Figura 19: Gráfico de probabilidade de massa do material retido versus tamanho da peneira para couve liofilizada em pó.	66
Figura 20: Porcentagem de massa retida em diferentes tamanhos de peneira para extrato de couve liofilizado	67
Figura 21: Demonstração de reação do tartarato de sódio e potássio que, ao formar um sal com Cu^{2+} se reduz a tartarato e Cu_2O (óxido cuproso, de coloração vermelho tijolo). Retirado de Tavares et al (2010).....	69
Figura 22: : Curva cinética da reação entre DPPH e extrato de uva liofilizada em diferentes concentrações	72
Figura 23: Curva cinética da reação entre DPPH e extrato de <i>liquor</i> de cacau em diferentes concentrações	73
Figura 24: Resultado da curva de temperagem do chocolate	76
Figura 25: Curva de resfriamento da manteiga de cacau utilizada nas formulações dos chocolates.....	77
Figura 26: Resultados de viscosidade para chocolate ao leite, chocolate com couve e chocolate com uva	80
Figura 27: Resultados da tensão inicial para o chocolate ao leite, chocolate com couve e chocolate com uva.....	81
Figura 28: Estruturas químicas de açúcares: glicose, frutose e sacarose.	87
Figura 29: Sistema CieLAB para análise de cores.	90

Figura 30: Avaliação da textura pelo período de 3 meses do chocolate ao leite, chocolate ao leite com uva e chocolate ao leite com couve.....	91
Figura 31: Frequência de notas dadas pelos provadores para “sabor” para chocolate ao leite, chocolate com couve e chocolate com uva.	93
Figura 32: Frequência de notas dadas pelos provadores para "Textura" para o chocolate ao leite, chocolate com couve e chocolate com uva.....	94
Figura 33: Frequência de notas dadas pelos provadores para “Aspecto geral” chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.	95
Figura 34: Frequência de notas dadas pelos provadores para “Intenção de compra” para o chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.	96
Figura 35: Espectros de absorção dos extratos de A)Chocolate ao leite B)Chocolate ao leite com couve C) Chocolate ao leite com uva D) DPPH.....	97
Figura 36: A) Curva cinética do padrão Trolox em 30 minutos e B)Curva padrão da variação de absorbância versus concentração de trolox	98
Figura 37: Perfil cinético e curva padrão da reação entre DPPH e o extrato de chocolate ao leite	99
Figura 38: Perfil cinético e curva padrão da reação entre DPPH e o extrato de chocolate ao leite com couve.....	99
Figura 39: Perfil cinético e curva padrão da reação entre DPPH e extrato de chocolate com uva	100
Figura 40: Espectro de absorção de ABTS	100
Figura 41: Perfil cinético e curva padrão da reação entre ABTS e trolox.....	101
Figura 42: Perfil cinético e curva padrão da reação entre ABTS e extrato de chocolate ao leite	102
Figura 43: Perfil cinético e curva padrão da reação entre ABTS e extrato de chocolate ao leite com adição de couve	102

Figura 44: Perfil cinético e curva padrão da reação entre ABTS e extrato de chocolate ao leite com adição de uva	103
Figura 45: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 260 nm, sendo: Cor verde: Couve, Cor laranja: Chocolate ao leite com couve e cor azul: Chocolate ao leite	109
Figura 46 Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 280 nm, sendo: Cor verde: Couve, Cor laranja: Chocolate ao leite com couve e cor azul: Chocolate ao leite	109
Figura 47: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 320 nm, sendo: Cor verde: Couve, Cor laranja: Chocolate ao leite com couve e cor azul: Chocolate ao leite	110
Figura 48: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 350 nm, sendo: Cor verde: Couve, Cor laranja: Chocolate ao leite com couve e cor azul: Chocolate ao leite	110
Figura 49: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 260 nm, sendo: Cor roxa: uva liofilizada, Cor vermelha: Chocolate ao leite com uva e cor azul: Chocolate ao leite	112
Figura 50: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 280 nm, sendo: Cor roxa: uva liofilizada, Cor vermelha: Chocolate ao leite com uva e cor azul: Chocolate ao leite	112
Figura 51: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 320 nm, sendo: Cor roxa: uva liofilizada, Cor vermelha: Chocolate ao leite com uva e cor azul: Chocolate ao leite	113
Figura 52: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 350 nm, sendo: Cor roxa: uva liofilizada, Cor vermelha: Chocolate ao leite com uva e cor azul: Chocolate ao leite	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Materiais utilizados no presente trabalho	40
Tabela 2: Ingredientes utilizados nas formulações de chocolate, sendo a fórmula 1 a controle, a fórmula 2 o chocolate ao leite com adição de couve e a fórmula 3 o chocolate ao leite com adição de uva.	43
Tabela 3: Peneiras utilizadas para a análise de granulometria	44
Tabela 4: Gradiente utilizado no perfil cromatográfico por CLAE	50
Tabela 5: Capacidade antirradicalar de extratos de couve liofilizada e in natura, extraídos por diferentes métodos.	64
Tabela 6: Valores encontrados de Coeficiente de Variação e Abertura Média para método gráfico e algébrico	67
Tabela 7: Determinação de açúcares redutores, não redutores e totais da uva liofilizada e <i>in natura</i>	69
Tabela 8: Quantificação de polifenóis de uva liofilizada por diferentes solventes extratores.	70
Tabela 9: Quantificação de polifenóis e da atividade antirradicalar frente ao radical DPPH para o <i>liquor</i> de cacau.	74
Tabela 10: Quantificação de gordura e de proteína para os leites em pó desnatado e integral utilizados nas formulações de chocolate.	75
Tabela 11: Tamanho de partícula para cada formulação de chocolate.	78
Tabela 12: Tabela de informação nutricional do chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.	83
Tabela 13: Tabela nutricional de chocolates ao leite de 3 marcas nacionais de chocolates finos e uma publicação de Afowaka (2010).	83
Tabela 14: Quantificação de açúcares totais, redutores e não redutores de chocolate eo leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.	87

Tabela 15: Atividade de água dos chocolates	88
Tabela 16: Colorimetria de chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.	89
Tabela 17: Avaliação antirradicalar para os chocolates ao leite, com couve e com uva	103
Tabela 18: Tempos de retenção e áreas dos picos que se repetem os chocolates ao leite com couve (CC), a couve liofilizada e o chocolate ao leite (CL)	111
Tabela 19: Tempos de retenção e áreas dos picos que se repetem os chocolates com uva (CU), a uva liofilizada e o chocolate ao leite (CL)	114
Tabela 20: Compostos fenólicos e seus valores de comprimento de onda onde apresentam maior absorção. Retirado de Zhang et al 2013.....	115

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

<i>ABICAB</i>	<i>Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados</i>
<i>ABTS</i>	<i>2,2'-azino-bis(3-etilbenzothiazolina-6-ácido sulfônico)</i>
<i>AM</i>	<i>Abertura da malha</i>
<i>CLAE</i>	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>
<i>CV</i>	<i>Coeficiente de variação</i>
<i>DPPH</i>	<i>2,2-difenil-1-picrilhidrazil</i>
<i>IC50</i>	<i>Concentração em que se reduz a metade do efeito máximo</i>
<i>ERO</i>	<i>Espécies Reativas de Oxigênio</i>
<i>FDA</i>	<i>Food Dietary Intake</i>
<i>IEA</i>	<i>Instituto de Economia Agrícola</i>
<i>g</i>	<i>Grama</i>
<i>GAE</i>	<i>Gallic Acid Equivalent</i>
<i>LDL</i>	<i>Lipoproteína de baixa densidade</i>
<i>mg</i>	<i>Miligrama</i>
<i>mL</i>	<i>Mililitros</i>
<i>N</i>	<i>Newton</i>
<i>Pa.s</i>	<i>Pascal por segundo</i>
<i>Pa</i>	<i>Pascal</i>
<i>PGPR</i>	<i>Polyglycerol Polyricinoleate</i>
<i>POS</i>	<i>Combinação de Ácido Palmítico-Oleico-Esteárico</i>
<i>POP</i>	<i>Combinação de Ácido Palmítico-Oleico-Palmitico</i>
<i>RDA</i>	<i>Reference Dietary Allowance</i>
<i>RDC</i>	<i>Resolução da Diretoria Colegiada</i>
<i>SOS</i>	<i>Combinação de Ácido Esteárico-Oleico-Esteárico</i>

<i>TAG</i>	<i>Triacilgliceróis</i>
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1. Envelhecimento cutâneo	22
2.2. Cacau e Chocolate	27
2.3. Brassica oleracea (couve)	31
2.4. Vitis vinifera (Uva)	36
3. OBJETIVOS	39
3.1. Geral	39
3.2. Específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Materiais	40
4.2. Liofilização da couve e da uva	41
4.3. Produção do chocolate	42
4.4. Granulometria	44
4.5. Análise de gordura e proteína do leite em pó	45
4.6. Determinação da capacidade antirradicalar	45
4.6.1. Extração de compostos fenólicos	45
4.6.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) para avaliação do potencial antirradicalar de couve, uva e liquor de cacau	47
4.6.3. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) para os chocolates	47
4.6.4. Método de determinação de polifenóis	48
4.6.5. Atividade antirradicalar frente ao radical ABTS	49

4.6.6. Perfil cromatográfico de compostos fenólicos através de CLAE	49
4.7. Determinação do tamanho de partículas máximo dos chocolates	50
4.8. Análises físico-químicas	51
4.8.1. Determinação de umidade	51
4.8.2. Determinação de conteúdo mineral	51
4.8.3. Determinação de lipídeos	51
4.8.4. Determinação de proteínas	52
4.8.5. Determinação do teor de açúcares redutores, não redutores e totais	52
4.8.6. Determinação de fibras totais, solúveis e insolúveis.	52
4.9. Análise de Tempo de Prateleira através de determinação de textura	52
4.10. Determinação da reologia	53
4.11. Determinação de atividade de água	53
4.12. Avaliação da Colorimetria	53
4.13. Avaliação sensorial	53
4.14. Forma de análise de resultados	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Caracterização das propriedades da couve	57
5.1.1. Liofilização	57
5.1.2. Perfil antioxidante	59
5.1.3. Análise granulométrica	66
5.2. Caracterização das propriedades da uva	68
5.2.1. Liofilização da uva, atividade de água e determinação de açúcares redutores, não redutores e totais	68
5.2.2. Determinação do perfil antioxidante da uva	70
5.3. Determinação de propriedades físico-químicas do liquor de cacau	73

5.3.1. Perfil antirradicalar do liquor de cacau	73
5.3.2. Análise de lipídeos no Liquor de cacau	74
5.4. Análise de proteína e gordura dos leites em pó	75
5.5. Determinação de propriedades de chocolates	75
5.5.1. Curva de temperagem do chocolate e curva de resfriamento da manteiga de cacau	75
5.5.2. Determinação do tamanho de partícula	78
5.5.3. Análise Reológica	79
5.5.4. Análise físico-química dos chocolates	82
5.5.5. Atividade de água	88
5.5.6. Colorimetria	89
5.5.7. Estabilidade dos chocolates	90
5.5.8. Avaliação sensorial	92
5.5.9. Determinação do perfil antioxidante dos chocolates	96
5.5.10. Perfil cromatográfico de compostos fenólicos por CLAE-DAD	109
6. CONCLUSÃO	117
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	118
REFERÊNCIAS	119
ANEXO A- PARECER COSUBSTANCIADO DO CEP	132
ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	135
ANEXO C - FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL	138
ANEXO D – NORMAS E DIRETRIZES	139
ANEXO E – FICHA DO ALUNO	140
ANEXO F – CURRICULO LATTES	142

1.INTRODUÇÃO

Na safra 2014/2015 a colheita bruta de cacau 4.230 mil toneladas do fruto (INTERNATIONAL COCOA CONFECTIONARY ORGANIZATION-ICCO, 2016). Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB) (2015), 731 mil toneladas de chocolate foram produzidos no ano de 2014.

Segundo o documento “*Brasil Food Trends 2020*” a tendência para o mercado de alimentos no Brasil é o desenvolvimento de formulações com o conceito de “saudabilidade”, ou seja, produtos com menor valor calórico, reduzido valor de açúcar, com menor teor de gorduras trans, e que possuam atribuições funcionais. Sabe-se que os consumidores vêm buscando produtos que contribuam para uma dieta mais saudável, com maior conteúdo mineral e de nutrientes e valor reduzido de gorduras e colesterol (MADI; COSTA; REGO, 2010).

Lannes et al. (2002), por exemplo, formularam chocolate utilizando o cupuaçu. Seus estudos permitiram concluir que a substituição do cacau pelo cupuaçu foi eficaz, gerando um produto com alta qualidade e custo reduzido, se comparado ao similar. Komes et al. (2013) adicionaram frutas secas às formulações de chocolate, a fim de obter um chocolate com maior capacidade antirradicalar. Segundo a análise sensorial realizada pelos autores, os chocolates contendo *Cranberries* foram bem aceitos e foi possível observar maior potencial antirradicalar nos chocolates com adição de frutas. Amaral (2013) realizou a produção de recheios de bombons com adição de murici, uma fruta de alto valor nutricional e obteve produtos com maior elevados teores de proteínas e minerais.

A busca pela inovação no mercado de chocolates também levou pesquisadores a realizar patentes de seus produtos. Crowley & Naimeddine (2011) desenvolveram um chocolate com adição de um *blend* da manteiga de cacau com adição de frutas liofilizadas em pó. Vajda et al. (1989) elaboraram um *spread* de chocolate com a adição de pós de frutas concentradas.

Sabe-se que há uma grande quantidade de pesquisas a respeito dos benefícios dos antioxidantes para evitar ou reduzir os efeitos de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, Alzheimer, catarata, diabetes, envelhecimento entre outras (Cai et al., 2004; apud MORAIS et al., 2009). Os polifenóis, por exemplo, são antioxidantes que possuem estruturas químicas promissoras para prevenção do envelhecimento cutâneo (MEENA; MEENA; TRÉTON, 2014).

Os antioxidantes podem ser encontrados em diversos tipos de vegetais- como frutas e hortaliças, sendo a couve e a uva dois exemplos de alimentos com essa propriedade.

A couve é um vegetal importante nas dietas tradicionais na região Mediterrânea e é conhecida por sua capacidade de prevenção de doenças e propriedades antimicrobianas. Estudos identificaram nove diferentes ácidos fenólicos em sua composição, sendo estes com alta capacidade antioxidante (AYAZ et al., 2008).

O consumo de uvas vem sendo estudado como efetiva prevenção de doenças degenerativas e o envelhecimento, devido à alta porção de compostos fenólicos em sua composição. A uva é composta principalmente por flavonoides, como o resveratrol, que já foi comprovadamente associado à alta capacidade antirradicalar frente aos radicais livres (XIA et al., 2010).

Diante do acima citado, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de formulação de chocolates acrescidos de folhas de couve (*Brassica oleracea*) e de frutos de uva (*Vitis vinífera*) obtendo-se, assim, produtos com enriquecimento das propriedades funcionais. Por suas propriedades, acredita-se que o seu consumo trará benefícios à saúde.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.Envelhecimento cutâneo

A pele é o órgão que reveste todo o organismo, correspondendo a 5% do peso corporal. Apresenta multifunções, tais como sensorial, proteção contra agentes externos, termorregulação, excreção e produção de metabólitos, além de representar a aparência e perfil característico dos indivíduos (CORRÊA, 2012).

A pele é dividida em três principais camadas- a epiderme a derme e a hipoderme, conforme demonstra a **Figura 1** (KHAVKIN e DAVID, 2011).

Figura 1: Representação das camadas da pele

A epiderme é formada por aproximadamente 95% de queratinócitos, os quais estão sempre se renovando, constituindo desde a membrana basal até a superfície

da pele e, assim, gerando diversas camadas distintas: camada basal, espinhosa, granulosa e córnea (KHAVKIN e DAVID, 2011).

Com o passar do tempo, a derme sofre um processo natural de envelhecimento, que varia de acordo com os fatores genéticos de cada pessoa. Os sinais clínicos de surgimento deste processo se dão com o aparecimento de linhas de expressão, rugas e manchas (LONGO; CASARI; BERETTI, 2013). Estima-se que a exposição à radiação ultravioleta seja responsável por 80% da aceleração do envelhecimento cutâneo precoce, porém, o cansaço físico e psicológico, a exposição à poluição, o consumo de álcool e a dieta não balanceada são fatores importantes que contribuem neste processo (POLJSAK; DAHMANE, 2012).

A pele, por possuir função protetora, é o órgão que está mais exposto a agentes químicos, físicos e microbiológicos e, portanto, possui maior tendência de acumular radicais livres (Hashizume, 2004 *apud* Kammeyer ; Luiten, 2015).

Radical livre é toda espécie, seja ela orgânica ou inorgânica, que possui elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Esta configuração torna os compostos muito instáveis, com baixa meia-vida e, deste modo, com reatividade muito alta (Lushchak, 2014). A formação dos radicais livres pode ocorrer no citoplasma, em membranas e principalmente na mitocôndria (Labat-Robert; Robert, 2014).

Os radicais livres mais comuns encontrados na pele são as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que podem ser radicalares- como radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radicais peroxila e alcóxila ($\text{RO}_2^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$)- ou não radicalares como oxigênio singlete (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), como NO e espécies reativas de enxofre (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Na membrana mitocondrial ocorrem naturalmente as reações de redução completa do O_2 , como demonstra a **Figura 2**. As reações envolvem a transferência de quatro elétrons para a formulação de H_2O , no entanto sabe-se que as reações intermediárias podem vir a formar EROs pela redução incompleta do oxigênio durante o transporte de elétrons (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Figura 2: Redução tetravalente de O_2 . Adaptado de Lushchak (2014).

O ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), formado a partir da primeira reação de redução do oxigênio é, dentre todas as outras ERO, a menos reativa e, portanto, sua capacidade de causar danos a células ainda não é comprovada. Contudo, em meio ácido, este radical sofre a reação de dismutação (**Equação 1**), formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie de meia vida longa que pode reagir com alguns metais, produzindo novas espécies oxidativas (Lushchak, 2014).

Figura 3: Reação de dismutação. Adaptado de Lushchak (2014).

Mesmo assim, o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) possui um papel importante na função vital de algumas células, pois é por meio dele que se formam os radicais $\text{OH}^\bullet$, além de ser essencial para o seu organismo de defesa (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).

O radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) é, entre os já citados, o que possui menor tempo de meia vida; isto significa que ele possui uma instabilidade eletrônica muito maior que os outros. Deste modo, é capaz de capturar mais elétrons de outras moléculas e, portanto, causar danos maiores e mais rapidamente que os outros. Além disso, possui a capacidade de reagir com aminoácidos, ácido desoxirribonucleico, ácidos

ribonucléicos e ácidos orgânicos, bem como inativar diversas proteínas por meio da oxidação do grupo sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) (Prior, 2015)

O ataque a aminoácidos atinge principalmente a cisteína, histidina, triptofano, metionina, fenilalanina, podendo gerar clivagem de ligações, fazendo com que ocorra a perda da atividade enzimática, dificuldade no transporte ativo através de membranas celulares, citólise e até a morte celular. Todos os aminoácidos podem perder o hidrogênio de sua cadeia ligado ao carboxilato e ao grupo amino. Essa abstração faz com que ocorra um ataque do radical hidroxílico à cadeia carboxilato do aminoácido, causando a perda de gás carbônico e formando um carbono radicalar (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).

O radical hidroxila pode ainda reagir com lipídeos; ao atacar essas cadeias, o grupo metilênicoalílico fica suscetível a outros ataques, tornando-se um radical livre. Esse carbono radicalar formado pode facilmente gerar o radical lipídeo-peroxila, atacando a proteína das membranas e gerando danos as células (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).

Este tipo de radical pode ser formado por intermédio de dois tipos de reação. A primeira (**Figura 4A**) é determinada por exposição à radiação ionizante que, em frequente contato com as células da pele, pode levar a formação de câncer em seres humanos. A segunda (**Figura 4B**) ocorre devido à presença de metais de transição no organismos (como Fe^{2+} e Cu^+), que reagem com o peróxido de hidrogênio pela reação de Fenton (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).

Figura 4: A) Reação de Fenton B) Reação de homólise da água. Retirado de Kammeyer; Luiten (2015).

O radical hidroperoxíla ($\text{HO}_2^\cdot$) é a forma protonada do radical superóxido e, segundo Kammeyer e Luiten (2015) é mais reativo e tem maior poder de destruição das células.

A pele possui seu próprio sistema antioxidante que busca reduzir os danos causados por esses radicais livres. A superóxido desmutase, por exemplo, é capaz de converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, evitando a ação deste como radical livre. A catalase e a glutathione peroxidase são também antioxidantes em destaque, pois são capazes de realizar a decomposição do H_2O_2 e, assim, formar água e oxigênio. Apesar disso, as fontes exógenas de radicais livres vêm acelerando o processo de envelhecimento e, assim, torna-se necessária a utilização de fontes exógenas de antioxidantes para combater esses radicais (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Oliveira et al. (2009), por exemplo, estabeleceram uma relação entre o consumo excessivo de produtos como gorduras *trans*, fumo, álcool, açúcar, entre outros, com problemas envolvendo estresse oxidativo. Observam, também, que quanto maior o consumo de frutas e verduras, menor a probabilidade de desenvolvimento de doenças.

Estudos recentes relacionam os hábitos alimentares inadequados ao aumento de ocorrência de doenças crônicas (FARIA; SANTOS; VIANNA, 2006). Por sua vez, Guaratini, Medeiros e Colepicolo (2007) relatam que o envelhecimento cutâneo pode ser catalisado pela presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos tecidos cutâneos, levando a mutações das estruturas normais da pele. Devido a isto, sugere-se a aplicação tanto oral como tópica de antioxidantes como estratégia para a proteção e cuidado da pele.

Qualquer alteração nas funções normais das células da pele resulta em uma série de mudanças, que irão impactar no envelhecimento cutâneo. São elas: a perda de função tensora e retrátil, o aumento da fragilidade, a diminuição nos sistemas de resposta de cicatrização, perda de firmeza, modificação na pigmentação, redução do colágeno e fibras, redução na quantidade de células de Langerhans (Kammeyer; Luiten, 2015).

Antioxidantes importantes adquiridos na dieta agem como inibidores da peroxidação lipídica na pele. Algumas substâncias têm se mostrado importantes para essa suplementação, como α -tocoferol, ácido ascórbico, Vitamina E, Carotenóides (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

2.2.Cacau e Chocolate

Teobroma cacao é uma espécie vegetal originária da América do Sul que cresce principalmente entre os trópicos de Câncer e Capricórnio. As principais espécies são *Criollo*, *Forastero*, *Trinitário* e *Nacional*, sendo a mais comum no Brasil a *Forastero*. Seu fruto, o cacau, é largamente utilizado pelo mundo, principalmente na produção de chocolates (AFOAKWA, 2010).

O cacau é amplamente estudado, sendo que registros demonstram o uso deste fruto desde 1400 d.c. Os astecas e maias o utilizavam para a produção de *chocolatl*, uma bebida muito conhecida na época que tinha em sua fórmula água, cacau e temperos. Em 1520, esta bebida foi exportada para a Espanha, onde passou a ser adoçada com mel (AFOAKWA, 2010).

Em 1536, foi realizado o primeiro registro do uso de cacau e chocolate para fins terapêuticos pelo professor da Faculdade de Santa Cruz, M. de La Cruz. Seu estudo contemplava a confirmação destes produtos para tratamento de constipação, problemas dentários entre outras doenças (LIPPI, 2009).

Atualmente, diversos estudos sobre o cacau relacionam sua alta capacidade antirradicalar com sua grande concentração de compostos fenólicos. Oliveira (2011), por exemplo, identificou a capacidade antirradicalar (método DPPH), a composição de fenólicos (método de *Folin-Ciocalteu*) e flavonoides (método colorimétrico) de cacau cultivado na Bahia, sendo amostras não fermentadas, fermentadas, *nibs* e *liquor* de cacau. Neste estudo encontrou-se uma alta taxa de compostos fenólicos ($301,43 \pm 0,55 \text{ mg.g}^{-1}$) e flavonoides ($214,03 \pm 0,65 \text{ mg.g}^{-1}$) em maior concentração nos *nibs* de cultivo orgânico; quantidade se mostrou alta para fenólicos ($284,63 \pm 3,22 \text{ mg.g}^{-1}$; $233,32 \pm 0,33 \text{ mg.g}^{-1}$; $195,95 \pm 0,55 \text{ mg.g}^{-1}$) e flavonoides ($197,85 \pm 0,33 \text{ mg.g}^{-1}$; $173,63 \pm 0,43 \text{ mg.g}^{-1}$; $128,79 \pm 0,95 \text{ mg.g}^{-1}$) em cacau fermentado e não fermentado de cultivo orgânico e *liquor*, respectivamente. A capacidade antirradicalar, determinada pelo método DPPH, demonstrou um alto potencial dessas amostras de neutralizar radicais livres. Calculadas em IC_{50} , ou seja, a capacidade de diminuir em 50% a concentração inicial do DPPH, as amostras de *nibs* se confirmaram como as com maior capacidade antirradicalar ($4,22 \pm 0,64 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{m.v}^{-1}$), ficando à frente das não fermentadas ($6,43 \pm 1,33 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{m.v}^{-1}$), das fermentadas ($7,06 \pm 0,85 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{m.v}^{-1}$) e do *liquor* de cacau ($7,67 \pm 1,05 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{m.v}^{-1}$). O estudo também revelou valores para cultivo convencional para todas as amostras, e provou que o tipo de cultivo pode gerar diferenças de formação de fenólicos e flavonoides no cacau.

Um trabalho realizado por Delonga e Mazor (2009) investigou os componentes químicos, por CLAE, do *liquor* de cacaos originários de seis diferentes países: Equador, Gana, Madagascar, México, São Tomé e Príncipe e Venezuela. Através deste estudo foi identificada a presença de flavan-3-ol, (-)-epicatequina, (+)-catequina e derivados do ácido cafeíco em todas as amostras. No entanto, não foi identificada a (-)-galocatequina nas amostras de Gana e da Venezuela, bem como a (-)-epigallocatequina não foi identificada em amostras do México e da Venezuela. Em termos quantitativos, foram encontradas maiores quantidades de compostos fenólicos nas amostras de *liquor* de Madagascar, sendo a sequência decrescente a

seguinte: Madagascar>México> Equador> Venezuela > São Tomé> Gana. Esses resultados comprovam não só a presença de fenólicos no cacau, como também a influência das variedades de cacau, condições de cultivo e fermentação na formação de maiores ou menores quantidades de compostos fenólicos.

Um dos mais vendidos produtos originários do cacau é o chocolate. Segundo a RDC no. 264, de 22 de setembro de 2005, emitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o chocolate é definido como:

“o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (ou pasta ou *liquor*) de cacau, cacau em pó e ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados.”

Dependendo de sua quantidade de cacau, leite e manteiga de cacau, o chocolate pode ser distribuído em três categorias primárias: amargo, ao leite e branco que, por diferenças em sua composição, apresentam diferentes valores calóricos e quantidade de flavonoides, como demonstra a **Figura 5** (AFOAKWA, 2010).

Figura 5: Diferenças no valor calórico e teor de polifenóis em diferentes tipos de chocolate (A: amargo, B: ao leite. C: branco) (AFOAKWA, 2010).

Uma formulação de chocolate é basicamente formada por manteiga de cacau, *liquor* de cacau, açúcar, emulsificante (geralmente lecitina de soja ou PGPR-

poliglicerol poliricenolato, ou uma combinação de ambos) e leite em pó (GARTI; WIDLAK, 2012).

O leite em pó é utilizado no chocolate para agregar sabor e valor nutricional ao produto. O chocolate ao leite é um dos mais consumidos no Brasil (ABICAB, 2014). O leite é geralmente composto por caseína e proteínas do soro, que atuam como surfactantes no chocolate, modificando sua viscosidade e textura. O leite ainda é conhecido por sua propriedade em reduzir o efeito de *fat bloom*, devido as características de sua gordura (AFOWAKA; PATERSON; FOWLER, 2007)

O emulsificante mais comum utilizado na indústria de chocolates é a lecitina de soja. Por possuir uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica essa substância tem afinidade tanto com a gordura quanto com a água, unindo, portanto, as duas fases e, assim, garantindo estabilidade dos produtos. Além disso, a lecitina pode proporcionar plasticidade, suavidade e antiaderência ao produto, além de contribuir para o aroma (AFOWAKA, 2010). É conhecido também que a lecitina possui a propriedade de reduzir o *fat bloom*, processo no qual há a migração da gordura para a superfície (BECKETT, 2009)

A manteiga de cacau é a principal gordura utilizada como fase contínua nos chocolates, servindo como seu principal dispersante (LANNES; GIOIELLI, 1998). A manteiga de cacau é formada por diferentes ácidos graxos, sendo sua composição distinta para cada região geográfica (LIPP et al., 2000). Os mais importantes compostos encontrados na manteiga de cacau são os triacilgliceróis *Cis*-mono-insaturados (TAG) já que estes são os principais responsáveis pela percepção do sabor (PESCHAR et al, 2004).

Os TAGs correspondem de 40 a 50 % da composição da manteiga de cacau, sendo que entre estes três compostos são mais abundantes: 2-oleil-1-palmitoil-3-estearilglicerol (POS), com 35%, 1,3-diesteroil-2-oleilglicerol (SOS), com 23% e 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerol (POP), com 15% (SCHENK; PESCHAR, 2004).

O sabor, a textura e o derretimento na boca são influenciados pela estrutura cristalina que é formada durante a temperagem do chocolate (PESCHAR et al., 2004). Os TAGs, sob diferentes pontos de fusão, podem possuir polimorfos distintos, como demonstrado no **Quadro 1** (RAY et al., 2011). A diferença entre algumas destas estruturas é perceptível tanto visualmente no chocolate quanto no paladar.

A forma V é a mais desejada, por suas características de ser estável em temperatura ambiente, se tornar líquida na temperatura da boca e possuir propriedades mecânicas excelentes. A forma V pode ser facilmente convertida para a forma VI, com o passar do tempo de armazenamento, esta, por sua vez, é menos estável. A forma VI é a responsável pelo *fat bloom* em chocolates e deve ser evitada (BRICKNELL;HARTAL, 1998 *apud* JAMES;SMITH, 2009). Já a forma I é muito instável e se transforma facilmente na forma II, que por sua vez tem a tendência de se passar para a forma III e IV (AFOAKWA,2010).

O *fat bloom* é o defeito mais comum que pode ocorrer no chocolate. Este fenômeno ocorre quando há a migração da gordura para a superfície do chocolate, deixando-o com uma película branca e alterando sabor, brilho e textura. Indesejável nos chocolates, existem diversas maneiras para evitar o *fat bloom*, sendo que a mais conhecida é a utilização de leite em pó que reduz a formação da forma V (LONCHAMPT; HARTEL, 2004).

Quadro 1: Polimorfos da manteiga de cacau, suas nomenclaturas segundo diferentes autores e seus respectivos pontos de fusão (Retirado de Garti; Widlak, 2012).

Willie e Lutton (1996)	Larsson (1966)	Van malssen et al (1999)	Ponto de fusão (°C)
I	β'_3	γ	17,3
II	α -2	α	23,3
III	β'_{2-2}	β'	25,5
IV	β'_{1-2}		27,5
V	β'_{2-3}	β -V	33,8
VI	β'_{1-3}	β -IV	36,4

2.3.Brassica oleracea (couve)

A couve, ou couve manteiga, é um alimento largamente consumido no Brasil. Somente no estado de São Paulo, no ano de 2015, a plantação foi de 120,0 hectares (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRICOLA, 2016).

Esta hortaliça é cultivada em qualquer época do ano e é conhecida principalmente por suas propriedades funcionais e altos valores de vitaminas, minerais e fibras (STEINDAL et al, 2015).

Ayaz et al. (2007) realizaram um estudo de identificação e quantificação dos compostos fenólicos na couve. Foram encontrados nove diferentes tipos de ácidos fenólicos: gálico, protocatecuico, p-hidroxibenzóico, vanílico, salicílico, p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico.

Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos fenólicos formados por uma cadeia de nove carbonos, como demonstra a **Figura 6**. Essa classe está presente em muitos vegetais e frutos e são conhecidos por sua bioatividade e poder antirradicalar (Razzaghi-Asl et al, 2013).

Ácido cinâmico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido o-cumárico: $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido m-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = H$; $R_2 = OH$

Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = OH$

Ácido caféico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = R_3 = OH$

Ácido ferúlico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$

Ácido sinápico: $R_1 = H$; $R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH$

Figura 6: Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos, (Retirado de RAMALHO; JORGE, 2006).

O ácido ferúlico é o composto mais abundante na couve (169 ng/g livres e 170 ng/g PS - Peso seco - como ésteres). Possui, em sua estrutura química, um anel aromático com um grupo hidroxílico, um grupo metoxílico e uma cadeia lateral com três átomos de carbono, como uma função de ácido carboxílico (GRAFF, 1992) e por isso é caracterizado como um possível sequestrador de radicais livres.

Foi encontrado que este ácido possui $81,42 \pm 0,51\%$ (3 mg/L) de capacidade antirradicalar contra o radical DPPH. Além disso, possui comprovadamente atividade

contra os radicais- peróxido de hidrogênio, superóxido, hidroxila e dióxido de nitrogênio (SEVGI; TEPE; SARIKURKCU, 2015).

O ácido cafeico é também um dos mais abundantes fenólicos presentes na couve (2040 ng/g FW em glicosídeos e 2640 ng/g FW em ésteres). Sua estrutura química é formada por um anel benzênico ligado a um grupo metoxihidroxila e um grupo hidroxila (RAMALHO; JORGE, 2006).

Sevgi et al. (2015) determinaram a capacidade antirradicalar deste composto por meio de métodos *in vivo* sob diferentes concentrações. Como resultado, o ácido cafeico se mostrou capaz de seqüestrar $83,35 \pm 0,57$ % de radicais livre DPPH na concentração de 0,3 mg/mL. Esse estudo também revelou a efetividade deste componente na eliminação de radicais como ânion superóxido, um alto poder redutor e alto poder de quelar metais.

O ácido p-cumárico (59,3 ng/g e 59,1 ng/g em ésteres) é um derivado do ácido cinâmico muito utilizado nas indústrias químicas, de alimentos, farmacêutica e cosmética. É conhecido principalmente por suas características redutoras de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e antimicrobianas (KILIÇ, YESILOGHU, 2013).

Foi encontrado que o ácido p-cumárico tem a capacidade de inibir 71,2% da peroxidação lipídica de uma emulsão de ácido linoleico (45 µg/mL), além de efetividade contra eliminação de radicais DPPH, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e a capacidade de reduzir íons férricos e ferrosos (Fe^{3+} e Fe^{2+}) (KILIÇ; YESILOGHU, 2013).

O ácido sinápico (18,7 ng/g FW e 15,5 ng/g FW em ésteres) é um derivado de ácido cinâmico. Estudos revelaram que esta substância é capaz de inibir 33,2% o radical DPPH, sob a concentração de 20 µM (KIKUZAKI et al., 2002).

Facilmente encontrados na natureza, os ácidos hidroxibenzoicos são compostos fenólicos que possuem 7 átomos de carbono, como demonstra a **Figura 7** (SOARES, 2002). Geralmente, apresentam-se como ésteres de ácidos orgânicos ou glicosídeos. Na área alimentícia esses compostos podem influenciar na estabilidade, cor, sabor, valor nutricional e bioatividade (CHEN;HO, 1997).

Ácido salicílico: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

Ácido gentísico: $R_1 = R_4 = \text{OH}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$

Ácido *p*-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$

Ácido protocatequínico: $R_1 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{OH}$

Ácido vanílico: $R_1 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$

Ácido gálico: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$

Ácido siríngico: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$

Figura 7: Fórmula geral dos ácidos hidroxibenzoicos (Retirado de RAMALHO, JORGE, 2006).

O ácido gálico (4,6 ng/g FW e 5,1 ng/g FW em ésteres) é um polifenol encontrado em muitas espécies vegetais. Muito utilizado na indústria alimentícia e cosmética, esse composto é conhecido por evitar a peroxidação lipídica e deterioração dos produtos (YEN; DUH; TSAI, 2002).

A capacidade antirradicalar deste ácido é comprovada por Zhang et al. (2015). Seus experimentos revelaram que o ácido gálico possui um IC_{50} de $36,3 \pm 2,0 \mu\text{mol/L}$ para neutralizar o radical livre DPPH, $66,2 \pm 1,6\%$ de oxidação antilipídica.

O ácido protocatequínico (17,8 ng/g e 22 ng/g FW em ésteres) foi avaliado por Sevgi et al. (2015) segundo sua capacidade antirradicalar, pelo método do DPPH e por sua capacidade de quelar metais. Os resultados revelaram uma capacidade de $65,37 \pm 0,05\%$ (0,3 mg/mL) de seqüestrar o radical DPPH e $26,17 \pm 0,86\%$ de efeito como quelante.

O ácido salicílico (4,6 ng/g FW e 5,1 ng/g FW em ésteres) demonstrou baixos resultados em capacidade antirradicalar (0,11%) pelo método de DPPH e nenhum resultado para peroxidação lipídica e eliminação do peróxido de hidrogênio (SROKA; CISOWKI, 2003).

A couve possui também valores nutricionais interessantes para o consumo, como demonstra o **Quadro 2**.

Quadro 2: Valores nutricionais da couve em 100 g e porcentagem de dose diária recomendada (de acordo com tabela de RDA da FDA) (Adaptado de USDA *NationalNutrientDatabase for Standard Reference*, 2014 e FDA, 2013).

Nutriente	Unidade	Valor por 100g	Porcentagem da RDA
Água	g	84,04	-
Energia	kcal	49	-
Proteína	g	4,28	8,56
Total lipídeos	g	0,93	-
Carboidratos	g	8,75	2,92
Fibras	g	3,6	14,4
Açúcares	g	2,26	-
Minerais			
Cálcio	mg	150	15
Ferro	mg	1,45	8,16
Magnésio	mg	47	0,368
Fósforo	mg	92	9,2
Potássio	mg	491	14,03
Sódio	mg	38	1,58
Zinco	mg	0,38	5,4
Vitaminas			
Vitamina C	mg	120	200
Tiamina	mg	0,11	7,33
Riboflavina	mg	0,13	7,6
Niacina	mg	1	5
Vitamina B6	mg	0,271	13,55
Ácido Fólico	µg	141	32,25
Vitamina B12	µg	0	-
Vitamina A, RE	µg	500	83,33
Vitamina E	mg	1,54	15,4
Vitamina D (D2+D3)	µg	0	-
Vitamina K	µg	704,8	880
Lipídios			
Ácidos graxos saturados	g	0,091	0,455
Ácidos graxos insaturados	g	0,052	-
Ácidos graxos poli-insaturados	g	0,338	-
Colesterol	mg	0	-

2.4. *Vitis vinifera* (Uva)

A uva é largamente produzida no estado de São Paulo como, por exemplo, em Campinas, onde foram plantados em 2015 mais de 22 milhões de pés (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2016)

A uva pode ser dividida basicamente em três espécies- a *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia*, sendo diferenciadas principalmente pelo local de cultivo. Cada uma destas espécies possui composições diferentes e, portanto, distintas quantidades de flavonoides (XIA, 2010).

Liang et al. (2011) realizaram um estudo dos perfis de polifenóis em frutos maduros de *Vitis vinifera*. Neste estudo se identificou 36 compostos fenólicos, sendo 16 antocianinas, dois ácidos hidroxibenzóicos, seis ácidos hidroxicinâmicos, seis flavonóis e seis flavonoides. As antocianinas são compostos presentes em vegetais responsáveis pela coloração. Quanto mais escura é a uva, maior é a quantidade de antocianinas desta. As principais antocianinas presentes na uva são cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina e malvidina, sendo que esta última e seus derivados representam 68% das antocianinas totais. Os principais flavonoides identificados nos estudos de Liang (2011) foram procianidina B1, B2, catequina e derivados, sendo a procianidina a mais abundante, apresentando 64% da quantidade total de flavonoides. Quanto aos ácidos hidroxibenzóicos e cinâmicos tem-se como mais abundantes o ácido gálico e o ácido vanilínico, sendo este último o mais abundante, representando 70% dos ácidos hidroxibenzóicos.

O principal componente estudado na uva, no entanto, é o resveratrol. Esse composto é um polifenol encontrado na semente de uva, sua estrutura é demonstrada na **Figura 8**.

Figura 8: Estrutura química do Resveratrol

Gulçin (2010) realizou um estudo das propriedades antioxidantes do resveratrol. Esse estudo revelou que esse componente tem a capacidade de inibir 89,1% da peroxidação lipídica do ácido linoleico a 30 µg/mL. Além disso, se mostrou eficaz quanto à capacidade antirradicalar frente ao DPPH, radical superóxido e peróxido de hidrogênio. Também se mostrou eficiente no poder redutor e atividades quelantes do Fe^{2+} .

A capacidade antirradicalar frente ao radical DPPH foi determinada por Vlachogianni et al. (2015). Segundo este estudo, o resveratrol possui IC_{50} de $85 \pm 2,7$ µM de capacidade de sequestrar radicais DPPH, o que comprova o alto poder antirradicalar deste componente.

Estudos a respeito dos efeitos benéficos à saúde têm sido relatados, incluindo efeitos anti-câncer, antiviral, neuroprotetor, anti-envelhecimento, anti-inflamatório. Sugere-se que estes efeitos benéficos para os ensaios *in vitro* demonstram o potencial deste composto.

Além de componentes antioxidantes, a uva possui valores nutricionais interessantes, como demonstrado na **Quadro 3**.

Quadro 3: Valores nutricionais da uva em 100 ge porcentagem de dose diária recomendada (de acordo com tabela de RDA da FDA) (Adaptado de USDA *NationalNutrientDatabase for Standard Reference*, 2014 e FDA, 2013).

Nutriente	Unidade	Valor por 100g	Porcentagem da RDA
Água	g	81,3	-
Energia	Kcal	67	-
Proteína	g	0,63	1,26
Total lipídeos	g	0,35	-
Carboidratos	g	17,15	5,72
Fibras	g	0,9	2,6
Açúcares	g	16,25	-
Minerais			
Cálcio	mg	14	1,4
Ferro	mg	0,29	1,61
Magnésio	mg	5	1,25
Fósforo	mg	10	1
Potássio	mg	191	5,46
Sódio	mg	2	83,3
Zinco	mg	0,04	0,27
Vitaminas			
Vitamina C	mg	4	6,67
Tiamina	mg	0,092	6,13
Riboflavina	mg	0,057	3,35
Niacina	mg	0,3	1,5
Vitamina B6	mg	0,11	5,5
Ácido Fólico	µg	4	1
Vitamina B12	µg	0	-
Vitamina A, RE	µg	100	2
Vitamina E	mg	0,19	0,63
Vitamina D (D2+D3)	µg	0	-
Vitamina K	µg	14,6	18,25
Lipídios			
Ácidos graxos saturados	g	0,114	0,17
Ácidos graxos insaturados	g	0,014	-
Ácidos graxos poli-insaturados	g	0,102	-
Colesterol	mg	0	-

3.OBJETIVOS

3.1.Geral

Desenvolver chocolates com adição de propriedades funcionais com a adição de folhas de *Brassica oleraceae* e frutos de *Vitis vinífera*.

3.2.Específicos

1. Formular chocolates ao leite sem e com adição de couve ou uva;
2. Determinar as propriedades físico-químicas dos chocolates formulados;
3. Avaliar a estrutura dos produtos formulados por meio de análises reológica e de textura;
4. Avaliar a capacidade antirradicalar das formulações;
5. Realizar testes sensoriais que comprovem a aceitação dos produtos pelos consumidores, bem como intenção de compra.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Tabela 1: Materiais utilizados no presente trabalho

Matéria Prima	Fornecedor	País
<i>Liquor</i> de cacau	Cargill	Brasil
Manteiga de cacau	Cargill	Brasil
Leite em pó integral	Italac	Brasil
Leite em pó desnatado	Molico	Brasil
Vanilina	Mix	Brasil
Reagentes	Fornecedor	País
Metanol	Synth	Brasil
Acetona	Vetec	Brasil
Reagente DPPH	Merck	Brasil
Reagente <i>Folin-ciocauteau</i>	Merck	Brasil
Reagente ABTS	Merck	Brasil
Ácido clorídrico	Synth	Brasil
Ácido sulfúrico	Synth	Brasil
Kit de enzimas para análise de fibras	Megazyme	EUA
Éter de petróleo	Synth	Brasil
Acetona grau HPLC	Tedia	Brasil
Ácido fórmico grau HPLC	Sigma	Brasil

Os equipamentos utilizados durante o trabalho foram:

- Liofilizador (Edwards do Brasil, Brasil)
- Equipamento universal tipo moinho de bolas WA-FA20 (Mazzetti, Itália)
- Temperímetro Multitherm TC (Buhler, Suíça).
- Agitador de peneiras (*Produtest, Brasil*)
- Espectrofotômetro (*Spectrum Meter, Brasil*)
- Espectrofotômetro UV visível *Varian Cary 50 bio* (*Agilent Technology, EUA*)
- CLAE-DAD (Modelo 1200 *Infinity, Agilent Technology, EUA*)
- Reômetro (Rheotest 3.1)

4.2. Liofilização da couve e da uva

As amostras de couve manteiga (*Brassica oleraceae*) e uva – variedade Summer Royal (*Vitis vinifera*) (aproximadamente 2 kg de cada) foram adquiridas em um mercado em São Paulo, no bairro Butantã. Para início do tratamento das frutas e folhas utilizou-se Hidrosteril®, bactericida utilizado para higienização de verduras e vegetais, cuja ação é comprovada pela ANVISA. Tanto as folhas quanto as frutas foram deixadas imersas nesta solução (20 gotas a cada 1 L, instrução da embalagem do produto) por 15 minutos.

Depois de higienizadas, a couve e a uva passaram por uma remoção do excesso de água, utilizando-se uma centrífuga secadora de hortaliças (*Utility*, Brasil).

Das couves secas retirou-se o talo, restando somente as folhas, que posteriormente foram picadas com faca e armazenadas em frascos de vidro com tampa. Cada amostra passou em diferentes dias pelo processo de liofilização. Foi efetuada pesagem antes e após a liofilização em todas as amostras.

Das uvas retirou-se o caule, restando somente as frutas. Estas foram processadas em liquidificador e armazenadas em placas de Petri (80x15mm). As uvas passaram pelo processo de liofilização, pesando-se todas as amostras antes e após a liofilização.

O congelamento foi realizado logo em seguida em ultrafreezer (Tectalmaq, Brasil) a -88°C. A liofilização foi realizada em um equipamento Modelo: OS 3728 (*Edwards do Brasil*, Brasil) em temperatura de 50°C e pressão de 10^{-3} mbar.

Após o processo de liofilização, a couve foi triturada em um termomixer *Vorwerk* (Brasil). O pó resultante foi armazenado em recipiente de vidro com tampa e guardado sob-refrigeração.

A uva, após o processo de liofilização, foi moída com o auxílio de um almofariz de porcelana e armazenada então em recipiente de vidro com tampa. Os recipientes foram armazenados sob refrigeração.

4.3. Produção do chocolate

Os chocolates foram formulados em equipamento tipo universal com moinho de bolas WA-FA20 (Mazzetti, Itália). O tempo de processo foi de 2 horas, seguindo o cronograma abaixo para adição de matérias primas.

Fluxograma 1: Processo utilizado para fabricação do chocolate

Os chocolates com adição de uva foram realizados conforme o Fluxograma 1, porém, ao final do processo, utilizou-se um misturador planetário encamisado, com controle de temperatura e de velocidade (MODELO BP/5/00, ERLI, Brasil) para adicionar-se a uva. O tempo deste processo foi de 30 minutos para cada chocolate e a temperatura utilizada foi de $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a 40 rpm.

As formulações são demonstradas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Ingredientes utilizados nas formulações de chocolate, sendo a fórmula 1 a controle, a fórmula 2 o chocolate ao leite com adição de couve e a fórmula 3 o chocolate ao leite com adição de uva.

Ingredientes	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3
	%	%	%
Açúcar	37	36,5	35,35
Manteiga de cacau	25	24,5	24,5
<i>Liquor</i> de cacau	16	16	16
Leite em pó integral	11	11	11
Leite em pó desnatado	10,2	10,2	10,2
Lecitina de soja	0,5	0,5	0,5
Vanilina	0,3	0,3	0,3
Couve liofilizada	-	1	-
Uva liofilizada	-	--	2,15

A porcentagem de cada matéria prima foi determinada a partir da quantidade de gordura a fim de obter valor aproximado a 35% de gordura no produto final.

A temperagem foi realizada de forma manual. As amostras foram aquecidas até a temperatura de 45 °C e resfriadas sob agitação com espátula, em mesa de pedra, até temperatura de 29°C, sendo rapidamente enformadas e levadas à refrigeração a 9 °C por 30 min, desenformadas, acondicionadas em bandejas de isopor e recobertas em filme PVC.

A curva de resfriamento da manteiga de cacau e a temperagem foram avaliadas em Temperímetro Multitherm TC (Buhler, Suíça).

Os chocolates, após a produção, foram armazenados em câmara climática (NOVA ÉTICA, Brasil) com circulação de ar a 20°C e 60% de umidade por 3 meses.

4.4. Granulometria

Para o ensaio de distribuição granulométrica da couve liofilizada foi utilizado um agitador de peneiras *Produtest (Brasil)*. As peneiras utilizadas são demonstradas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Peneiras utilizadas para a análise de granulometria

Designação ABNT	Abertura da malha (mm)
20	0,85
25	0,71
30	0,59
40	0,42
50	0,297
60	0,25

As peneiras foram colocadas em ordem decrescente de abertura de malha, de cima para baixo.

Foi pesada 5 g de amostra e colocada na primeira peneira do jogo. O equipamento foi ligado por 5 minutos, com amplitude de 1,6 mm de vibração e 3600 vibrações por minuto.

A porcentagem de material retido foi determinada a partir da **Equação 3**.

Equação 3: Determinação do material retido na peneira

$$Mi = \frac{mi}{m0} \times 100$$

Sendo:

Mi= Material retido na peneira i, em %

mi= massa do material retido na peneira i

m0= massa da amostra

4.5. Análise de gordura e proteína do leite em pó

As análises de gordura e proteína para os leites em pó foram realizadas em triplicata pelo analisador de leite eletrônico- Ekomilk, modelo Kam9 8-2^a (CapLab, Brasil). Os leites em pó Integral e desnatado foram dissolvidos em água filtrada conforme recomendado na embalagem (20 g/200 mL).

4.6. Determinação da capacidade antirradicalar

4.6.1. Extração de compostos fenólicos

Foram realizadas duas metodologias diferentes de extração, a fim de verificar a que possui maior efetividade na extração dos compostos fenólicos para a couve.

A primeira extração foi baseada no método descrito por Laurrauri et al. (1997), com modificações. Em um béquer de 100 mL, adicionou-se 1 g de amostra e 40 mL de metanol 50%. Após homogeneização, foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 60 minutos e, então, foi centrifugada a 15.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para o balão volumétrico de 100 mL. Foi adicionado ao resíduo restante 40 mL de acetona 70%, homogeneizado e deixado em repouso em temperatura ambiente por 60 minutos. Novamente se centrifugou a 15.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para o mesmo balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e o menisco foi completado para 100 mL com água destilada e logo após armazenado em frasco âmbar.

A segunda extração foi baseada no trabalho descrito por Genovese e Lannes (2010), onde 0,5 g da amostra foi adicionada a 20 mL de metanol/água na proporção 70:30, utilizando um ultraturrax *Marconi (BRASIL)* por 1 minuto em velocidade 4 e

banho de gelo. Filtrou-se o extrato utilizando-se papel de filtro e o extrato resultante foi armazenado em vidro âmbar.

A **Figura 9** demonstra as duas formas de extração utilizadas.

Figura 9: Métodos utilizados para a extração de compostos fenólicos da couve.

Tendo em vista a obtenção de melhores resultados de aproveitamento na extração descrita por Genovese e Lannes (2010), as amostras de uva (liofilizada e *in natura*), dos chocolates (ao leite, com couve, com uva) e do *liquor* de cacau foram extraídas somente por esse método.

Para determinação do melhor solvente para extração, foram utilizadas, para a uva liofilizada, os seguinte solventes extratores: : acetona, acetona acidificada (sendo acetona 70% com adição de 0,1% de ácido clorídrico), metanol e metanol acidificado (sendo metanol:água:ácido acético na proporção 70:30:5 v/v/v

4.6.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) para avaliação do potencial antirradicalar de couve, uva e liquor de cacau

O método da capacidade sequestradora frente ao DPPH foi realizado com base no trabalho descrito por Sanchez-Moreno (2002), com modificações.

A partir de uma solução estoque de 60 μM de DPPH em álcool metílico, a curva padrão foi construída com diluições de 10, 20, 30, 40 50 e 60 μM em ambiente protegido pela luz. Os resultados obtidos foram tratados no Microsoft Excel.

Para a determinação da capacidade antirradicalar frente ao DPPH utilizou-se sete diferentes diluições das amostras (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 %). Em uma cubeta com caminho ótico de 10 mm, adicionou-se 0,075 mL da amostra e 2,925 mL de DPPH, agitando a solução resultante. Para a solução controle foi utilizada a mistura de 0,1 mL de solução controle (metanol 70%) e 3,9 mL de DPPH. Como branco foi utilizado o álcool metílico.

As medições foram realizadas a 515 nm em um espectrofotômetro *Spectrum Meter (Brasil)*, em triplicata e protegidos da luz. Os resultados de absorbância foram anotados a cada 5 minutos por meia hora. Os dados resultantes foram tratados por Microsoft Excel.

Os resultados dessa análise foram expressos em IC_{50} .

4.6.3. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) para os chocolates

A determinação de atividade antirradicalar dos chocolates frente ao radical DPPH foi realizada no Laboratório de Quimiluminescência do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com o auxílio do Ms. Sandro Oliveira.

Para tal, foi adicionado 150 μL de solução estoque DPPH ($1,65 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol/L}$) e etanol (2,77-2,79 mL) em uma cubeta de quarto com caminho óptico igual a 10mm, sendo a concentração final da solução igual a 80 $\mu\text{mol/L}$. A solução estoque

de Trolox foi adicionada a esta cubeta de modo ao volume final de 3,0 mL, bem como os extratos de chocolate. A reação foi monitorada a 515 nm em espectrofotômetro UV visível *Varian Cary 50 bio* (Agilent Technology, EUA) por 30 minutos (OLIVEIRA et al, 2014) e medida em triplicata.

Os resultados dessas análises foram expressos de duas formas: IC_{50} e %Trolox. É possível determinar a %Trolox plotando-se a variação de absorbância da amostra versus as concentrações utilizadas (curva padrão). O coeficiente angular resultante é comparado com o coeficiente angular do padrão trolox.

4.6.4.Método de determinação de polifenóis

A determinação de polifenóis foi realizada baseada no método de *Folin Ciocauteau* descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), com volume modificado.

A curva padrão foi construída a partir de soluções diluídas de ácido gálico nas concentrações de 50, 100, 150, 250 $\mu\text{g/L}$ a partir de uma solução estoque de 0,5 mg/L.

Para determinação dos compostos fenólicos, 20 μL da amostra foi adicionado a um balão volumétrico com 5 mL. Logo após, acrescentou-se 200 μL do reagente Folin-Ciocauteau e se homogenizou a mistura. Após o tempo de 1 a 8 minutos adicionou-se 750 μL de carbonato de sódio 20% e o volume foi ajustado. Sob abrigo da luz, a solução resultante foi deixada em repouso por 2h.

A leitura, após o período de repouso, foi realizada em espectrofotômetro UV-visível (*Spectrum meter, Brasil*) em 760 nm e repetida em triplicata.

4.6.5. Atividade antirradicalar frente ao radical ABTS

A determinação de atividade antirradicalar pelo radical ABTS foi realizada no Laboratório de Quimiluminescência do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com o auxílio do Ms. Sandro Oliveira.

A solução estoque ABTS foi preparada em base aquosa (192 mg/50 mL) e armazenada em geladeira a 4°C. Para oxidação dessa solução e preparação do radical ABTS•+ utilizou-se uma alíquota de 5 mL com 88 µL de uma solução de persulfato de potássio com concentração igual a $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ que reagiram por 16 horas, protegido da luz. A concentração resultante da oxidação foi medida em Espectrofotômetro UV-Visível a 734 nm.

A reação entre ABTS•+ e as amostras foi realizada em cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm em triplicata. Para tal, foi adicionado 25 µL de solução ABTS•+ estoque e diferentes quantidades de etanol e solução estoque de modo a obter-se a concentração de 2,3,4,5,6% do antirradical, de modo ao volume final ser 3 mL. As concentrações foram testadas e padronizadas a fim de se obter uma curva padrão. A análise foi realizada a 25°C e monitorada em espectrofotômetro UV-visível Varian Cary 50 bio (*Agilent Technology*, EUA) por 30 minutos a 734 nm (OLIVEIRA, 2014). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.6.6. Perfil cromatográfico de compostos fenólicos através de CLAE

O perfil cromatográfico de compostos fenólicos por CLAE foi realizada no laboratório de Química Orgânica da Universidade Presbiteriana Mackenzie com o auxílio do Técnico Nei Carlos.

A metodologia utilizada foi baseada no trabalho de Silva e Queiroz (2015) para compostos fenólicos. Utilizou-se como fase móvel: água acidificada com 2% de ácido acético (eluente A) e ácido acético 0,5%:Acetonitrila, na proporção 50:50 (v/v). O gradiente utilizado encontra-se na **Tabela 4**.

O extrato utilizado foi evaporado em rotaevaporador (BUCHI, EUA) com agitação e temperatura controlada (40°C), redissolvido em metanol na proporção 1 mg/1 mL e então repassado em uma pré-coluna C18.

As análises foram realizadas em duplicata, em CLAE-DAD (detecção de diodo) (Modelo 1200 *Infinity*, *Agilent Technology*, EUA) . O fluxo utilizado foi 1mL/min e o volume de injeção de 40 µL. Os comprimentos de onda avaliados foram 260, 280, 320 e 360 nm.

Tabela 4: *Gradiente utilizado no perfil cromatográfico por CLAE*

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
0-20	90%	10%
20-40	86%	24%
40-60	70%	30%
60-65	45%	55%
65-70	30%	70%
70-75	25%	75%
75-80	0%	100%

4.7. Determinação do tamanho de partículas máximo dos chocolates

A determinação do tamanho de partículas máximo do chocolate foi realizada em Micrômetro digital Digimatic Mitutoyo (Mitutoyo, EUA), Modelo Série 293. Determinação feita com cinco repetições.

4.8. Análises físico-químicas

4.8.1. Determinação de umidade

A umidade foi realizada segundo método descrito pelas normas analíticas AOAC (2000) para teste de umidade de perda de massa em estufa regulada a 105°C em triplicata.

4.8.2. Determinação de conteúdo mineral

O conteúdo mineral foi determinado pelo teste de cinzas de perda de massa em mufla a 550°, em triplicata (AOAC, 2000).

4.8.3. Determinação de lipídeos

Para a hidrólise ácida do chocolate foi utilizado o método descrito por Lannes (1997). Foram pesados 10 g de amostra previamente moída e adicionado a um béquer com a mistura de 200 mL de água destilada com 75 mL de ácido clorídrico 37%. A mistura foi aquecida com bico de Bunsen por 20 minutos em ebulição. Após esse procedimento, a mistura foi filtrada com papel de filtro de 24 cm e submetida a lavagem quantitativa até retirada de todo o ácido. Ao final, levou-se o cartucho resultante a estufa a 75°C por uma noite.

Para a extração da gordura, foi utilizado o método com extrator Soxhlet e éter de petróleo como solvente. As análises foram realizadas em triplicata (AOAC, 2000)

4.8.4. *Determinação de proteínas*

A determinação de proteínas foi realizada em triplicata por método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2000).

4.8.5. *Determinação do teor de açúcares redutores, não redutores e totais*

Para a determinação de açúcares totais, redutores e não redutores foi utilizada a metodologia de Fehling, sendo utilizadas 10g de amostra e as titulações foram realizadas em triplicata (Instituto Adolfo Lutz, 2005).

4.8.6. *Determinação de fibras totais, solúveis e insolúveis.*

A determinação de fibras totais, solúveis e insolúveis foi realizada conforme descrito por AOAC (2000) ensaio enzimo-gravimétrico de fibras, com modificações.

4.9. *Análise de Tempo de Prateleira através de determinação de textura*

Os chocolates, armazenados a 20°C e 60% de umidade em câmara climática com temperatura e umidade controlada, foram avaliados segundo sua textura em um período de 1 dia, 7 dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias.

Os ensaios de fratura foram realizados em equipamento analisador de textura TA-XT2 (*Stable Micro Systems*, Reino Unido), com probe HDP/3PB a 25 °C. Parâmetros: velocidades pré-teste, teste e pós-teste: 2,0 mm/s; distância 10 mm; célula de carga 25 kg; Trigger Force: 0,05 N; força em compressão - *return to start*.

Os dados foram coletados através do programa *Texture Expert Exceed* – versão 2.64 (Stable Micro Systems, Reino Unido).

Todas as análises foram realizadas em triplicata com barrinhas de chocolate temperado de tamanho 9,0 cm x 2,5 cm x 1,3 cm (LANNES, 2008).

4.10. *Determinação da reologia*

A determinação de reologia foi realizada em triplicata em reômetro rotacional Rheotest 3.1 (Alemanha) com banho termostatzado a 40°C e probe H1. Foi utilizada uma rampa com taxa de cisalhamento de 200 s⁻¹ com tempo de 120 s.

4.11. *Determinação de atividade de água*

A atividade de água foi determinada em triplicata em equipamento de atividade de água Novasina modelo LabMaster (Novasina, Suíça), em triplicata.

4.12. *Avaliação da Colorimetria*

A colorimetria foi determinada em ColorQuest® XE Hunter Lab, com ângulo observador de 10°C e iluminador D65, em triplicata (ESTELLER, ZANCANARO JÚNIOR, LANNES, 2006).

4.13. *Avaliação sensorial*

A avaliação sensorial foi realizada através do teste afetivo de aceitação global com escala hedônica estruturada de 9 pontos e escala de intenção de compra de 5

pontos Os atributos avaliados para as barras foram: textura, sabor e impressão global e teste de intenção de compra, sendo feito pelos mesmos provadores O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da FCF/USP (nº Parecer: 13.93.285), conforme ANEXO A. A ficha de avaliação se encontra no ANEXO C.

As amostras foram preparadas segundo as boas práticas de fabricação de produtos alimentícios nos laboratórios de Tecnologia de Alimentos III e Planta Piloto, do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica-FCF/USP.

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica de Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Foram avaliadas 3 amostras de chocolate ao leite, uma controle, uma com couve em pó e uma com uva em pó.

Os produtos foram preparados no máximo 24 horas antes dos testes e mantidos em temperatura de 20 °C, 60% de umidade, até o momento de servir. Os chocolates (aproximadamente 5 g) foram servidos em pratos plásticos contendo as três amostras do produto (Figura 10). Entre uma amostra e outra os avaliadores foram instruídos a ingerir água e biscoito de sabor neutro (água e sal) para diminuir a interferência de sabor entre as amostras.

Figura 10: Amostras de chocolate utilizadas para análise sensorial

Recrutamento dos Consumidores

Foram selecionados provadores não treinados, que se declarassem consumidores de chocolates, sendo que antes da degustação os mesmos foram instruídos a ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II), declarando-se não alérgico aos componentes das formulações, permitindo o uso da informação prestada para seu devido fim, e também possuidores do direito de desistir de participar a qualquer momento do teste.

Critérios de inclusão

Os consumidores que foram convidados para os testes apresentavam os seguintes pré-requisitos:

- Ser maior de idade (acima de 18 anos);
- De ambos sexos;
- Não apresentar alergia aos componentes das formulações;
- Foram adotados cuidados especiais para evitar que indivíduos subordinados ou diretamente ligados ao pesquisador não se sentissem obrigados a participar do estudo.

Critérios de exclusão

Foram excluídos da seleção indivíduos que:

- Estivessem em dieta especial.
- Estivessem em tratamento médico.
- Desistissem da participação após o início da análise.

Casuística

Para os testes foram recrutadas 90 pessoas, alunos e funcionários da Universidade de São Paulo.

4.14. *Forma de análise de resultados*

Os resultados foram analisados pelos testes ANOVA e posteriormente de Tukey, em 5% de significância, com o software Statistica *version 11* (StaSoft, EUA) e com o programa Microsoft Excel (Microsoft, EUA).

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.Caracterização das propriedades da couve

5.1.1.Liofilização

A couve foi analisada pela diferença de massas antes e após a liofilização, a fim de verificar a quantidade de água extraída e determinar a equivalência entre os pesos da couve antes e depois deste processo. Os resultados revelaram a % de produto liofilizado ($9,89 \pm 0,369$ %) e a porcentagem de água retirada do produto liofilizado ($90,11 \pm 0,369$ %).

Estes resultados demonstraram que a quantidade de água retirada da couve pelo processo de liofilização foi de $90,107 \pm 0,369$ % e a o peso da couve liofilizada correspondeu a $9,8932 \pm 0,369$ % do peso inicial. Estes dados estão de acordo com o trabalho realizado por Furlani et al. (1978) que determinou a quantidade de água em diversas frutas e hortaliças. Segundo estes autores, a couve manteiga apresentou aproximadamente 89% de água em sua composição.

Esses resultados foram necessários para a conversão da quantidade de couve liofilizada que foi adicionada posteriormente ao chocolate.

A desidratação é uma técnica comum utilizada em alimentos, pois esta pode aumentar a vida útil do produto, principalmente no caso de frutas e vegetais. A redução do teor de água nesses alimentos leva a uma menor atividade microbológica, o que desacelera o processo de deterioração desses produtos (FELLOWS, 2000).

A atividade de água (a_w) é um parâmetro que mede a razão entre a pressão de vapor da água (P_w) no alimento e a pressão de vapor da água pura na temperatura do alimento (P_w^0) (TOLEDO, 2007), dada pela expressão:

$$A_w = \frac{P_w}{P_w^0}$$

A baixa atividade de água está relacionada com a diminuição da velocidade relativa de reações de deterioração por bactérias, auto oxidação, reações enzimáticas, entre outros, conforme demonstra a **Figura 11** (NESPOLO et al., 2015).

Figura 11- Relação entre a velocidade relativa de reações de deteriorização e atividade de água (retirado de NESPOLO, 2015).

O valor encontrado para atividade de água da couve em pó foi $0,531 \pm 0,014$, no momento de sua utilização para produção do chocolate. Este valor, segundo a **Figura 11**, está relacionado com baixas velocidades de reações enzimáticas e nenhuma atividade para reações com bactérias, leveduras e mofos, tornando, assim, o produto liofilizado estável, mesmo após um ano de sua produção. Este resultado tem grande importância, pois demonstra que a adição de couve liofilizada no chocolate provavelmente não irá afetar sua vida de prateleira.

5.1.2. Perfil antioxidante

5.1.2.1. Ensaio da atividade antioxidante frente ao radical DPPH

O ensaio com o DPPH é baseado na perda da intensidade da cor da solução púrpura do radical estável DPPH•, após a reação com um composto antirradicalar (AOH). O DPPH é um radical livre, pois apresenta um elétron não emparelhado, com absorção na região de 520 nm (MOLYNEUX, 2003). A estrutura química do DPPH é demonstrada na **Figura 12**.

Figura 12: Estrutura química do reagente DPPH

Ao se misturar com uma substância capaz de doar um hidrogênio, o DPPH reage (**Figura 13**) e vai para sua forma reduzida, fazendo com que perca a sua cor púrpura característica e se torne uma solução de cor castanha (MOLYNEUX, 2003).

Figura 13: Reação entre o radical DPPH e antioxidante. Retirado de Oliveira (2015)

Para a couve liofilizada e couve *in natura* foram realizados dois métodos de extração diferentes a fim de verificar suas efetividades e padronizar para futuros ensaios.

A curva padrão do DPPH está demonstrada na **Figura 14**.

Figura 14: Curva padrão de DPPH

Para realizar o estudo do DPPH, cada extrato foi diluído em diferentes concentrações: 5,10, 20,30, 40 50 e 60%. Utiliza-se diferentes concentrações

para se ter um intervalo de absorbância de modo que seja possível verificar a cinética da reação.

O resultado da cinética da reação entre DPPH e couve liofilizada extraída pelos dois métodos está representado na **Figura 15**.

Figura 15: Perfil cinético da reação entre o radical livre DPPH e o extrato de couve liofilizada, sendo A) Extração pelo método de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997) e B) extraído pelo método de Genovese e Lannes (2010)

As curvas cinéticas obtidas pela reação entre radical livre DPPH e a couve liofilizada demonstram um comportamento semelhante em ambos os extratos. A partir dos primeiros cinco minutos é possível observar uma queda mais acentuada na absorbância, sendo que os minutos seguintes apresentam uma redução branda.

No extrato obtido a partir da metodologia de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto.(1997), pode-se observar que não há diferenciação entre as diluições de 5 e 10 %, enquanto que o extrato obtido a partir da metodologia utilizada por Genovese e Lannes (2010) não houve grande diferença entre os extratos de 50% e 60%,já que ficaram entre a absorbância entre 0,3 e 0,4.

É possível observar a queda mais acentuada no extrato B em todas as concentrações, chegando a valores de até 0,3 de absorbância. Enquanto que o extrato A reduziu somente até aproximadamente 0,7 de absorbância.

A couve *in natura* foi analisada sob as mesmas condições e concentrações. O perfil cinético da reação entre DPPH e os extratos é demonstrado na **Figura 16**.

Figura 16: Perfil cinético da reação entre o radical livre DPPH e o extrato de couve *in natura*, sendo A) Extração pelo método de Larruri (1997) et al. e B) extraído pelo método de Genovese e Lannes (2010).

Conforme se observa na **Figura 16**, assim como para a couve liofilizada, o perfil cinético da couve *in natura* para ambos os extratos demonstrou uma redução mais acentuada na absorbância nos primeiros cinco minutos, sendo quase constante nos minutos subsequentes. É possível observar que no perfil A (extração segundo Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto, 1997) não se tem diferença entre concentrações de 5% e 10% de amostra. Por sua vez, no perfil B (extração segundo Genovese e Lannes, 2010) as concentrações de 40% e de 50% não apresentaram diferença. Em todos os quatro extratos é possível observar que quanto maior a concentração, maior é o decaimento da absorbância.

A partir destes resultados é possível calcular o IC_{50} , ou seja, a concentração necessária para reduzir a absorbância do DPPH pela metade. Sendo assim, quanto

menor for a concentração de IC_{50} , maior potencial antirradicalar este extrato tem. Os resultados da atividade antirradicalar contra o radical DPPH se encontram na **Tabela 5**, juntamente com os resultados de quantificação de polifenóis por método *Folin-ciocauteau*.

5.1.2.2. Ensaio da quantificação de polifenóis

O ensaio de *Folin-Ciocauteau* é baseado na mudança de coloração da solução após reação com antioxidante. O reagente de *Folin-Ciocauteau* é formado por uma mistura de ácidos de molibdênio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), que resulta na cor amarela por estar num estado de oxidação VI, e ácidos de tungstênio (SINGLETON, ORTHOFER, LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

Em contato com os antioxidantes (agentes redutores) tem-se a formação de um complexo Molibdênio-Tungstênio ($PMoW_{11}O_4$)⁴ (**Figura 17**), que possuem coloração azul. Através da diferença de coloração é possível determinar a quantidade de polifenóis em uma amostra (SINGLETON, ORTHOFER, LAMUELA-RAVENTOS, 1999)

Figura 17: Reação simplificada de molibdênio com antioxidante.

Para a construção da curva padrão de ácido gálico, foi realizada a reação do reagente *Folin-Ciocauteau* com diferentes concentrações de ácido gálico (0,50,100,150,250 e 500 mg/L). A **Figura 18** representa a definição desta curva.

Figura 18: Curva padrão de reação entre Ácido Gálico e o reagente *Folin-Ciocalteu*

Os diferentes extratos foram colocados em reação com o reagente *Folin-Ciocalteu*, sendo cada amostra realizada em triplicata.

A partir da curva padrão de ácido gálico, obteve-se a equação da reta que foi utilizada para o cálculo das concentrações de cada extrato. A **Tabela 5** representa tais resultados.

Tabela 5: Capacidade antirradicalar de extratos de couve liofilizada e in natura, extraídos por diferentes métodos.

Amostra	Método	IC ₅₀ (mg/L)	Quantidade de polifenóis totais (g/mg GAE)
Liofilizada	Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997)	118,78	110,33
Liofilizada	Genovese e Lannes (2010)	41	226,16
<i>in natura</i>	Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997)	410,67	32,83
<i>in natura</i>	Genovese e Lannes (2010)	312,9	62,83

*n=3

Tanto para a couve *in natura* quanto para a couve liofilizada foi encontrada maior concentração de compostos fenólicos com aplicação do método usado por Genovese e Lannes (2010). Além disso, as concentrações em IC₅₀ para a atividade

antirradicalar frente ao radical DPPH confirmam essa hipótese, uma vez que foram encontrados menores valores de concentração para estes extratos.

Os resultados obtidos indicam, conforme esperado, maior concentração de compostos bioativos para a couve liofilizada, se comparada aos extratos da couve *in natura*.

Muito utilizada na indústria alimentícia, a liofilização é um processo que visa a desidratação de alimentos como café, vegetais, frutas entre outros. Realizado sob baixas temperaturas e ausência de ar atmosférico, o liofilizador mantém a temperatura e a pressão da água no ponto triplo (0°C e 4,7 mm de Hg), o que faz com que a água, já em estado de congelamento, passe por sublimação- diretamente do estado sólido para o gasoso (GAVA, 1998).

Pelo fato da desidratação total do alimento ocorrer sob baixas temperaturas obtêm-se um produto com baixa atividade microbiológica e, conseqüentemente, alta estabilidade frente a deterioração. Além disso, essa técnica permite a conservação dos componentes presentes no alimento e concentração destes produtos. Mesmo assim, sabe-se que por se tratar de um processamento, ocorrem perdas de alguns compostos voláteis (RATTI, 2001). Foi observada maior capacidade antirradicalar na couve liofilizada pelo fato desta estar mais concentrada que a couve *in natura*.

Analisando os valores obtidos, no entanto, pode ser observado que não há uma proporcionalidade entre a quantidade de polifenóis da couve *in natura* em relação à couve liofilizada, o que sugere que houve perda durante o processamento.

Kaulmann et al. (2014) realizaram um estudo de compostos antioxidantes em diversas variações de *Brassica oleracea in natura*. Após o teste de *Folin-Ciocalteu* foi encontrada uma concentração de 60,2±4,49 mg GAE (ácido gálico equivalente)/ 100g de couve.

Este resultado se assemelha aos valores encontrados no presente trabalho para a couve *in natura*, extraída pelo método usado por Genovese e Lannes (2010) (62,83 mg GAE/100g couve). A semelhança nos resultados reforça a tese de que há maior efetividade nesse método frente ao método de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997).

5.1.3. Análise granulométrica

A distribuição granulométrica das matérias primas em pó a serem utilizadas no chocolate são de extrema importância, pois afetam diretamente o tamanho de partícula dos produtos finais.

A partir da análise granulométrica, plotou-se um gráfico da porcentagem de material retido versus abertura da peneira. A **Figura 19** demonstra esses resultados.

Figura 19: Gráfico de probabilidade de massa do material retido versus tamanho da peneira para couve liofilizada em pó.

A partir do gráfico é possível calcular a Abertura Média (AM) ou o Coeficiente de Variação (CV), com a seguinte equação (Lannes, 2000):

$$CV = \frac{a_{16} - a_{84}}{2AM} * 100$$

É possível, também, realizar o cálculo de AM e CV pelo método algébrico. Os resultados referentes a esses parâmetros, tanto pelo método gráfico quanto pelo método algébrico, estão representados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Valores encontrados de Coeficiente de Variação e Abertura Média para método gráfico e algébrico

	CV	AM
Método gráfico	48%	0,550
Método algébrico	36,85%	0,502

A **Figura 20** demonstra a porcentagem de massa retida em cada peneira utilizada. A partir dela é possível concluir que a maior quantidade de partículas se encontra na faixa de 0,59 a 0,25 mm.

Figura 20: Porcentagem de massa retida em diferentes tamanhos de peneira para extrato de couve liofilizado

5.2. Caracterização das propriedades da uva

5.2.1. Liofilização da uva, atividade de água e determinação de açúcares redutores, não redutores e totais

As massas de uva antes e após a liofilização foram registradas e, a partir destes resultados, foi possível determinar a média de material liofilizado ($21,14 \pm 1,35\%$) e a média de água retirada ($78,86 \pm 1,35\%$) nesse processo de liofilização.

A determinação da atividade de água da uva liofilizada foi realizada em triplicata imediatamente após a liofilização, sendo o resultado obtido igual a $a_w = 0,303 \pm 0,085$. Este valor de atividade de água é considerado bom para evitar a deterioração do produto, porém pode aumentar de acordo com o tempo. Sabe-se que produtos com a_w abaixo de 0,7 têm menor exposição a riscos microbiológicos, sendo que a faixa de valores de a_w de 0,3 para abaixo indica que o produto está preservado também de qualquer outra reação de deterioração (TOLEDO, 2007).

A tendência para frutas liofilizadas, no entanto, é de haver aumento no valor de atividade de água com o passar do tempo. Isso ocorre, devido à alta quantidade de açúcar presente nas frutas, como sacarose, glicose e frutose, que, em estado amorfo, tendem a se ligar por ligação de hidrogênio com a água. Esse fato faz com que essas frutas liofilizadas, com elevados teores de açúcar, sejam altamente higroscópicas, sendo assim há maior instabilidade do produto liofilizado, uma vez que este tende a sofrer hidratação e aumentar a sua atividade de água e umidade. Sua manipulação, portanto, deve ser realizada com muito cuidado de modo a não interferir na atividade de água e não gerar o efeito *caking* - tendência deste tipo de produto de aglomerar (SERNA-COCK; VARGAS-MUNOZ; APONTE, 2015; OLIVEIRA, 2013).

A quantidade de açúcares nas uvas *in natura* e liofilizada foram determinadas pelo método de Fehling. Este método, também conhecido como Lane-Eynon, se baseia na reação entre os sais cúpricos e aldoses ou cetoses que sob alta temperatura e meio alcalino formam como produto o precipitado cuproso, conforme demonstrado na **Figura 21**, que possui coloração avermelhada.

Figura 21: Demonstração de reação do tartarato de sódio e potássio que, ao formar um sal com Cu^{2+} se reduz a tartarato e Cu_2O (óxido cuproso, de coloração vermelho tijolo). Retirado de Tavares et al (2010).

A **Tabela 7** demonstra a porcentagem de açúcares redutores, não redutores e totais encontrados.

Tabela 7: Determinação de açúcares redutores, não redutores e totais da uva liofilizada e *in natura*.

	Redutores (%)	Não redutores(%)	Totais(%)
Uva <i>in natura</i>	16,00 ± 0,037	2	18,00±0,02
Uva liofilizada	63,00±0,007	1	64,00±0,018

*n=3, Os valores de açúcares não redutores foram calculados por diferença entre açúcares totais e redutores.

Através desta análise é possível perceber um aumento na quantidade de açúcares totais ao liofilizar a uva, bem como uma redução dos açúcares não redutores e um aumento na porcentagem de açúcares redutores. Essas diferenças podem ser explicadas pela retirada da água nas amostras, o que leva estas a ficarem mais concentradas e, assim, aumentar a quantidade de açúcares de 18% para 64%. Esse resultado confirma a teoria de que a uva liofilizada possui alta concentração de açúcares e, portanto, realmente se torna altamente higroscópica, o que faz com que se diferencie da couve em pó.

O equipamento utilizado para a fabricação dos chocolates possui um moinho de bolas, que reduz o tamanho de partícula do açúcar e outros grânulos presentes na formulação. Esse tipo de moinho possui pequenas bolas que giram com baixa

velocidade e realizam forças de cisalhamento na amostra (FELLOWS, 2000). No caso da couve liofilizada em pó, por exemplo, foi adicionada no equipamento de produção de chocolate com moinho de bolas para se ter um menor tamanho de partícula deste no chocolate e, então, não ser sentido sensorialmente. A uva liofilizada que é, como já dito, caracterizada como um material higroscópico, não poderia ser adicionada em um moinho de bolas, já que muita energia seria aplicada sob este material o que poderia resultar em um efeito *caking*, também o processamento do chocolate não ocorreria de forma correta. Por esta razão, a uva liofilizada triturada foi adicionada após a fabricação do chocolate, em misturador planetário.

5.2.2. Determinação do perfil antioxidante da uva

Para a determinação do melhor solvente para a extração dos compostos fenólicos da uva, foram utilizados: acetona, acetona acidificada (sendo acetona 70% com adição de 0,1% de ácido clorídrico), metanol 70% e metanol acidificado (sendo metanol:água:ácido acético na proporção 70:30:5 v/v/v). Os resultados encontrados estão dispostos na **Tabela 8**.

Tabela 8: Quantificação de polifenóis de uva liofilizada por diferentes solventes extratores.

Amostra	Absorbância	Quantidade de polifenóis (mg/g)
Uva liofilizada extraída com acetona acidificada	0,368±0,0138 ^{ab}	109,5
Uva liofilizada extraída com acetona	0,340±0,0350 ^{ab}	86,45
Uva liofilizada extraída com metanol 70%	0,396±0,0212 ^b	132,4
Uva liofilizada extraída com metanol acidificado	0,318±0,0794 ^a	72,21
*n=3		

*As letras diferentes indicam diferença estatística, por Tukey em 5% de significância.

Rockenbach (2008) quantificou os polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de bagaços de uva *Vitis vinifera*, utilizando como solvente etanol e

acetona. Os melhores resultados encontrados neste trabalho foram para acetona 50% e 70%, para antocianinas e polifenóis totais.

Rockenbach (2011) realizou um estudo da quantidade de polifenóis em alguns tipos de uvas *Vitis vinifera* L. e *Vitis Labrusca* L. Neste estudo utilizou-se como solvente para extração o metanol acidificado (sendo metanol: água: ácido acético 70:30:5 v/v/v). O maior valor encontrado foi para a variedade *Cabernet sauvignon*, pertencente à classe *Vitis vinifera* L. (74,75 mg/g GAE). Este valor é próximo ao encontrado no presente trabalho (72,21 mg/g GAE para o mesmo tipo de extrato).

Vizzoto e Pereira (2011) realizaram um estudo de quantificação de compostos fenólicos, por diferentes meios de extração, da amora-preta. Neste estudo utilizou-se extratos com acetona, acetona acidificada, metanol e metanol acidificado, porém não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Existem grandes classes de compostos fenólicos, como as antocianinas, flavonóis, sendo que em cada classe possui grandes quantidades de substâncias diferentes, com estruturas diferentes. Isso faz com que seja difícil se ter uma metodologia capaz de extrair todos os componentes fenólicos de uma amostra. É, portanto, que se estuda o melhor método para a extração, por meio de comparações entre solventes e tipos de metodologias.

O metanol é um solvente de polaridade alta enquanto que a acetona possui polaridade média. A acidificação destes solventes tende a melhorar a eficiência da extração.

Mesmo assim, o método de extração mais eficiente para quantificação de polifenóis continuou sendo o mesmo utilizado por Genovese e Lannes (2010) e no presente trabalho para os extratos de couve. A partir do extrato metanólico 70% obteve-se uma quantidade de 132 mg/g GAE, estatisticamente maior que a dos outros extratos.

A quantidade de polifenóis da uva *in natura* foi realizada a partir do extrato metanólico 70% e foi encontrado o valor de $58,38 \pm 8,22$ mg GAE/g. Assim como a couve, é possível perceber que a liofilização tende a concentrar os compostos

fenólicos e, assim, resultar em maiores valores de concentração. No entanto, o valor encontrado na uva liofilizada não é proporcional ao rendimento, o que provavelmente significa que alguns compostos foram perdidos durante o processo.

A determinação frente ao radical DPPH foi realizada com as concentrações de 5,10,20,30,40,50 e 60 % de extrato. Utilizou-se, para o processo de extração, extrato metanólico 70 %, conforme o método utilizado por Genovese e Lannes (2010). A **Figura 22** representa o perfil cinético da reação entre DPPH e a uva liofilizada.

Figura 22: Curva cinética da reação entre DPPH e extrato de uva liofilizada em diferentes concentrações

Através da cinética da reação é possível perceber que quanto maior a concentração de extrato utilizada tem-se uma redução maior da absorbância em relação à absorbância inicial.

Através da curva cinética é possível calcular o valor de IC_{50} para a amostra, sendo que o valor encontrado para a uva liofilizada foi de 66,45 mg/L. Esse valor representa alta capacidade antirradicalar, concordando com a alta quantidade de polifenóis encontrada.

5.3.Determinação de propriedades físico-químicas do liquor de cacau

5.3.1.Perfil antirradicalar do liquor de cacau

Visto que houve maior eficiência no método de Genovese e Lannes (2009) foi padronizado a utilização desta extração. A análise de polifenóis do *liquor* de cacau, portanto, foi realizada nestas condições e seus resultados demonstrados na **Tabela 9**.

A curva cinética da reação do DPPH com o extrato nas diferentes concentrações é demonstrada na **Figura 23**.

Figura 23: Curva cinética da reação entre DPPH e extrato de *liquor* de cacau em diferentes concentrações

A partir da curva cinética é possível observar uma redução da absorbância ao longo dos 30 minutos em todos os extratos. Além disso, tem-se que a quanto maior a concentração do extrato, maior a redução de absorbância.

Tabela 9: Quantificação de polifenóis e da atividade antirradicalar frente ao radical DPPH para o *liquor* de cacau.

Amostra	Média de absorbância	Concentração (mg/g de ácido gálico)	IC ₅₀ (mg/L)
<i>Liquor</i> de cacau	0,445±0,00971	259,94	2,906

*n=3

Othman et al. (2007) estudaram o perfil antirradicalar amêndoas de cacau de diferentes locais, em meio a extrato etanólico e aquoso. Neste estudo, foi observado um valor de IC₅₀ igual a 1,3 mg/g para extrato etanólico do cacau da Malásia e de Gana e um valor de IC₅₀ de 2,4 mg/g para o cacau da Malásia e 1,7 mg/g para o cacau de Gana.

Belščak et al. (2009) avaliaram o perfil antirradicalar de produtos comerciais da Croácia, derivados do cacau (*liquor* de cacau, cacau em pó, chocolates ao leite, amargo e chocolate em pó). Em relação ao *liquor* de cacau, foram encontrados, em termos de fenólicos totais, de 25 a 35 mg GAE/g. Esses valores se encontram muito inferiores ao encontrado no presente trabalho, porém sabe-se que a quantidade de polifenóis pode variar muito dependendo das condições geográficas de plantação, a variedade do cacau utilizado para a fabricação do *liquor*, bem como o tipo de tratamento (fermentação, secagem, armazenamento) para a produção do *liquor*.

Oliveira et al. (2011) analisaram a quantidade de compostos fenólicos de diferentes tipos de cacau e encontraram um valor de 195,95±0,55 mg GAE/g para *liquor* orgânicos, semelhante a encontrada no presente trabalho.

5.3.2. Análise de lipídeos no *Liquor* de cacau

A análise de lipídeos no *liquor* de cacau foi realizada como informação para o cálculo da formulação do chocolate. Através deste, foi determinada que a quantidade de lipídeos no *liquor* utilizado é de 52 ±0,012 %, sendo compatível com o laudo enviado pela empresa fornecedora, que é de 53,10 %

5.4. Análise de proteína e gordura dos leites em pó

A análise de proteína e gordura dos leites em pó foram realizadas para fins de cálculo do conteúdo de gordura final da formulação do chocolate ao leite. A **Tabela 10** demonstra os resultados obtidos para o leite em pó desnatado e para o leite em pó integral.

Tabela 10: Quantificação de gordura e de proteína para os leites em pó desnatado e integral utilizados nas formulações de chocolate.

	Leite em pó desnatado	Leite em pó integral
Gordura (g/100g)	0	2,12±0,001
Proteína (g/100g)	2,67±0,11	2,01±0,023
	n=3	

5.5.Determinação de propriedades de chocolates

5.5.1.Curva de temperagem do chocolate e curva de resfriamento da manteiga de cacau

A temperagem foi avaliada por curva de temperagem para verificação da produção de cristais adequados para a manteiga de cacau. A curva de temperagem se encontra na **Figura 24**.

Figura 24: Resultado da curva de temperagem do chocolate

A curva de temperagem é de grande importância para a verificação da qualidade da massa do chocolate e eficiência da temperadeira e/ou do processo de temperagem. Chocolates bem temperados devem conter de 3 a 8 % de cristais de manteiga de cacau, o desenvolvimento desses cristais, ao longo do tempo de resfriamento, pode ser medido através deste tipo de curva (MINIFIE, 1989).

A curva de temperagem indica a quantidade de calor liberada ao se solidificar o chocolate. Durante o processamento, geram-se dois pontos de inflexão, como destacado na Figura 24, sendo que cada um deles indica uma parte da formação de cristais. O primeiro ponto refere-se a relação temperatura/tempo em que se inicia a nucleação dos cristais e a segunda o ponto no qual a nucleação realmente ocorre. A inclinação gerada a partir desses dois pontos é, portanto, avaliada e deve permanecer o mais reta possível, de modo a não haver uma inclinação negativa (o que significaria um chocolate *sobre-temperado*), ou uma inclinação positiva (o que significaria um chocolate *sub-temperado*). Um chocolate over-tempered é aquele que possui cristais a mais formados durante a temperagem, o que, portanto, gera menor quantidade de cristais durante o teste e, conseqüentemente, há menor quantidade de energia sendo liberada. Já no caso do chocolate *under-tempered*

tem-se uma quantidade muito inferior de cristais quando temperada, gerando, portanto, uma grande liberação de calor durante o resfriamento e como consequência uma inflexão maior na curva (AFOWAKA,2010; MINIFIE,1989; COHEN; LUCCA; JACKIX, 2004).

A curva gerada no presente trabalho apresenta uma linearidade adequada, podendo-se afirmar que a massa de chocolate possui boa propriedade de temperagem, sendo que foi obtido um *slope* de 0,18 °C/min em tempo de 2,4 minutos e temperatura igual a 23,5°C. O “*temper index*” (TI), parâmetro utilizado pelo fabricante do equipamento (Buhler) para avaliar a boa performance da temperagem, resultou no valor de 4,3, considerado adequado,

A manteiga de cacau também foi avaliada, em duplicata, por sua curva de resfriamento, o resultado encontra-se na **Figura 25**.

Figura 25: Curva de resfriamento da manteiga de cacau utilizada nas formulações dos chocolates

A curva de resfriamento da manteiga de cacau demonstra suas características de derretimento e a taxa de cristalização desta gordura, apresentando a adequação desta gordura para utilização em chocolates.

Lannes (1997) estudou a curva de resfriamento de Jensen de diferentes tipos de gorduras utilizadas em chocolate tipo cobertura. Em seu trabalho, a autora

demonstrou uma típica curva de resfriamento da manteiga de cacau e esta se assemelha a encontrada no presente trabalho (taxa de resfriamento de 2,0 °C/min, cristalização à 20,5 °C por um tempo de 7,8 minutos).

O fabricante do equipamento (Buhler) também utiliza de um índice para avaliação da curva de resfriamento, conhecido como *Cocoa Butter Index* (CBI). Segundo o fabricante, o CBI encontrado para a manteiga analisada ($3,3 \pm 0,01$) é considerado adequado para produção de chocolates.

5.5.2.Determinação do tamanho de partícula

A determinação do tamanho de partícula é importante para o controle de qualidade dos chocolates, pois pode influenciar tanto a reologia do produto como também a sensação na boca. Chocolates com tamanho de partícula maior que 30 µm são percebidos na boca, pois possuem textura arenosa, além de viscosidade não adequada. Já tamanhos de partícula próximos a 20 µm possuem uma textura mais macia e massa mais cremosa (AFOWAKA, 2010).

Os resultados da determinação do tamanho de partícula para cada chocolate estão na **Tabela 11**.

Tabela 11: Tamanho de partícula para cada formulação de chocolate.

	Tamanho de partícula (µm)
Chocolate ao leite	$25,8 \pm 0,47^a$
Chocolate com couve	$27,7 \pm 0,95^b$
Chocolate com uva	$37,8 \pm 1,13^c$

n:10 (n:2 processamento, n:5 análise)

As letras diferentes indicam diferença estatística, por Tukey em 5% de significância.

Conforme a análise estatística realizada tem-se que a adição tanto de uva liofilizada quanto de couve liofilizada altera significativamente ($p < 0,05$) o tamanho de partícula do chocolate.

Como dito anteriormente, o tamanho de partícula desejável para chocolates está entre 20 a 30 μm , como é o caso tanto do chocolate ao leite (25,8 μm) quanto para o chocolate com adição de couve (27,7 μm), o que sugere que ambos os chocolates não terão uma percepção sensorial diferente quanto ao tamanho das partículas. A diferença entre esses dois tamanhos pode ser explicada pela adição da couve que, conforme avaliado anteriormente, era um pó com tamanho de partícula médio de aproximadamente $5 \times 10^4 \mu\text{m}$. Durante o processo de fabricação de chocolate, tem-se a etapa de refino que, no caso do equipamento utilizado, ocorre pelo moinho de bolas, o que provavelmente ajudou a reduzir o tamanho de partícula consideravelmente, mas ainda assim não o suficiente para não haver diferença entre as amostras.

Ao contrário da couve, a uva só foi adicionada após o término da fabricação da massa de chocolate, em agitador planetário e, portanto, não passou pelo processo de refino, conforme foi explicado no item “5.2.1. Liofilização da uva”. Essa diferença no processo certamente refletiu no tamanho de partícula do chocolate com adição de uva, que sugere que estas partículas serão sentidas sensorialmente.

5.5.3. Análise Reológica

O chocolate é uma suspensão onde partículas de açúcar, cacau e leite encontram-se dispersas na manteiga de cacau, sendo assim, ele se comporta como um fluido não-newtoniano, o que significa que a sua tensão de cisalhamento não é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento. Os chocolates têm como característica apresentar o “yeld stress”, (força mínima necessária para se iniciar o fluxo) e uma viscosidade plástica (energia necessária para que continue a fluir) (LANNES, 1997; AFOWAKA, 2010). O modelo de Casson é, atualmente, considerado o que melhor se adapta ao comportamento dos chocolates e é adotado

pela OICC (*Internacional Office of Cocoa*). A equação que expressa esse modelo se encontra na **Equação 1**.

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_{CA}} + \sqrt{\eta_{CA}} + \sqrt{\gamma}$$

Equação 1: Representação da equação de Casson, assumindo que: τ , a tensão de cisalhamento, τ_{CA} , a tensão inicial de Casson ou tensão residual de Casson; η_{CA} , viscosidade de Casson ou viscosidade plástica e γ , a taxa de cisalhamento.

Os parâmetros reológicos, como a viscosidade e a tensão inicial de Casson, são de extrema importância durante a produção de chocolate, já que podem atestar a qualidade dos produtos. Esses foram avaliados no presente trabalho para todos os chocolates e os resultados se encontram nas **Figuras 26 e 27**.

Figura 26: Resultados de viscosidade para chocolate ao leite, chocolate com couve e chocolate com uva

A partir dos resultados apresentados na Figura 26 pode-se perceber que a viscosidade do chocolate se modifica com a adição de couve e uva. Segundo Beckett (2009) a distribuição do tamanho de partícula influencia diretamente a viscosidade do produto, sendo que quanto maior for o tamanho de partícula menor

será sua viscosidade. Isso ocorre pois ao se reduzir o tamanho, tem-se mais ligações entre essas partículas e, conseqüentemente, maior fricção entre elas, aumentando, assim, a viscosidade. Os resultados apresentados atestam esse fenômeno, já que o tamanho de partícula do chocolate ao leite é o menor (26 μm) e apresenta maior viscosidade, enquanto que o chocolate com adição de uva tem maior tamanho de partícula (37,8 μm) e apresenta a menor viscosidade.

Beckett (2009) afirma que os valores normais para chocolate, no caso da viscosidade, vão de 1 a 20 Pa.s. As viscosidades encontradas para o chocolate ao leite ($1,6 \pm 0,018$ Pa.s), chocolate com adição de couve ($1,13 \pm 0,04$ Pa.s) e chocolate com adição de uva estão dentro dessa faixa ($0,76 \pm 0,04$ Pa.s).

Em todas as formulações do presente trabalho foram encontradas altas quantidades de gordura (36,26 g/100 g no chocolate ao leite, 35,06 g/100 g no chocolate com couve e 35,50 g/100 g no chocolate com uva), o que justifica, então, a baixa viscosidade de Casson. Isso ocorre porque quanto maior a quantidade de gordura mais espaços vazios são preenchidos na estrutura do chocolate, o que leva a uma maior facilidade no fluxo e, portanto, menor viscosidade (AFOWAKA,2010).

Figura 27: Resultados da tensão inicial para o chocolate ao leite, chocolate com couve e chocolate com uva

A tensão inicial foi avaliada para todos os chocolates, sendo que o chocolate com uva apresentou menor valor (7,6 Pa) em comparação ao chocolate ao leite e o chocolate com adição de couve, que apresentaram pouca diferença entre si.

Diversos autores já relataram a relação entre a distribuição de tamanho de partícula com a tensão inicial de Casson. Sabe-se que a tensão inicial está relacionada com a superfície de contato das partículas. Quando se tem um menor tamanho de partículas estas conseguem interagir mais entre si, levando a uma área superficial maior e, sendo assim, mais facilmente o líquido flui (AFOWAKA,2010; BECKETT,2009; KONAR,2014). O presente trabalho também confirma essa relação, já que o chocolate com maior tamanho de partícula obteve menor tensão inicial.

Konar et al. (2014) avaliaram chocolates ao leite com a adição de Inulina e encontraram tensão inicial entre 3,35 a 18,16 Pa e viscosidade entre 1,72 e 3,96 Pa.s sendo que essas diferenças de valores foram justificadas pela distribuição do tamanho de partícula. Karnjanolarn e McCarthy (2006) avaliaram chocolates ao leite com diferentes quantidades de lecitina de soja e PGPR e encontraram, para 0,5% de lecitina, 1,49 Pa.s de viscosidade e 4,73 Pa para tensão inicial. Sendo assim, é possível afirmar que os valores encontrados para viscosidade e tensão inicial dos chocolates avaliados no presente trabalho se encontram próximos aos encontrados na literatura. Além disso, pode-se atestar que a adição de frutas e folhas liofilizadas tende a alterar as propriedades reológicas do chocolate.

5.5.4. Análise físico-química dos chocolates

A análise físico-química foi realizada para o chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva e seus resultados estão dispostos na **Tabela 12.**

Tabela 12: Tabela de informação nutricional do chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.

	Chocolate ao leite	Chocolate com couve	Chocolate com uva
Conteúdo energético (kcal)	564,68	554,68	555,70
Umidade (g/100 g)	1,73±0,48 ^a	2,07±0,29 ^a	2,27±0,25 ^a
Conteúdo mineral (g/100 g)	2,53±0,14 ^a	2,68±0,054 ^b	2,57±0,027 ^a
Proteínas (g/100 g)	8,51±0,36 ^a	8,52±0,37 ^a	8,13±0,46 ^a
Lipídios (g/100g)	36,26±0,39 ^a	35,06±0,38 ^b	35,50±0,87 ^{ab}
Carboidratos (g/100g)	52,70	53,74	53,80
Fibras dietéticas totais (g/100g)	7,89	8,59	8,05
Fibras solúveis (g/100g)	3,18	4,18	3,16
Fibras insolúveis (g/100g)	4,71	4,4	4,88

*n=3

*As letras indicadas referem-se a diferença estatística entre as amostras da mesma linha, pelo teste de Tukey em 5% de diferença significativa

Os resultados da composição nutricionais se assemelham aos publicados por Afowaka (2010) e aos chocolates ao leite de marcas nacionais (Kopenhagen, Cacau show e Brasil Cacau), conforme demonstrado na **Tabela 14**.

Tabela 13: Tabela nutricional de chocolates ao leite de 3 marcas nacionais de chocolates finos e uma publicação de Afowaka (2010)

	Valor energético (Kcal)	Carboidratos (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídeos (g/100g)
Marca "A"	524	56	6,8	32,4
Marca "B"	576	52	7,2	38,4
Marca "C"	550	55	6,5	32,5
AFLOWAKA(2010)	518	57	7	33

É possível afirmar que os chocolates produzidos no presente trabalho possuem maior teor de proteínas (8,51±0,36 g/100 g) em comparação com os apresentados na Tabela 13, assim como a quantidade de lipídeos (35,06±0,38 g/100 g) que, com exceção da Marca "B", também apresentam maior valor em comparação

a tabela. Já em termos de valor energético (564,68 g/100 g) e carboidratos (52,7 g/100 g), os valores encontrados no presente trabalho são semelhantes aos da Tabela 13.

A partir dos resultados demonstrados pode-se dizer que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras dos três chocolates segundo sua quantidade proteínas. Esse fato, portanto, identifica que a adição de couve ou uva, nessas condições, não altera a quantidade final da proteína do produto.

Além disso, é possível notar que a adição de produtos liofilizados foi eficaz em termos de não aumentar o teor de umidade das amostras de chocolate. A umidade é um importante parâmetro para o chocolate, pois altos valores de umidade em chocolate podem estar altamente relacionados com defeitos durante o tempo de prateleira. O *sugar Bloom*, por exemplo, defeito causado pela agregação das partículas de açúcar, forma grumos que são desagradáveis sensorialmente, além de formar películas brancas na superfície do chocolate, modificando seu brilho e aparência (AFOWAKA, 2010).

Chocolates com elevado teor de umidade podem também modificar as suas propriedades de fluxo, sendo que valores acima de 3 % podem levar a um aumento na tensão inicial e na viscosidade do produto (AFOWAKA; PATERSON; FOWLER, 2008). Os três chocolates fabricados apresentaram valores de umidade abaixo de 3% e, portanto, não houve um aumento nesses parâmetros, corroborando, portanto, com os resultados encontrados no item acima, onde se tem baixos valores de tensão inicial e viscosidade.

A quantificação de lipídeos apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras de chocolate ao leite e chocolate acrescido de couve, enquanto a amostra de chocolate acrescida de uva foi igual as outras duas amostras.

O conteúdo mineral também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, sendo que o maior teor foi encontrado no chocolate com adição de couve. Os chocolates com uva e controle não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si no conteúdo mineral. Este resultado era esperado devido ao acréscimo de material sólido/mineral ao produto.

Ayaz et al. (2006) identificaram altas quantidades de macro e micronutrientes nas folhas de couve. Estes encontraram $72,6 \mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) de ferro, $53,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) de manganês, $39,4 \mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) de zinco, $19,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) de cálcio, $13,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) de potássio, entre outros componentes identificados. Os chocolates com adição de couve, portanto, provavelmente possuem um maior valor de conteúdo mineral devido a este fato.

Os nutrientes minerais são essenciais para os seres humanos, pois ajudam em funções vitais das células, como na ativação de enzimas e de secreções hormonais. Além disso, são essenciais para a absorção de vitaminas. O manganês, por exemplo, é de extrema importância para a cicatrização humana, o zinco é um componente importante para a atividade metabólica de enzimas. O ferro, por sua vez, contribui para a produção de hemoglobina e mioglobina. A deficiência de ferro é um dos distúrbios que mais acomete a população mundial, sendo que pode causar fraqueza corporal, fadiga e sérios problemas de saúde (GUPTA e GUPTA, 2014).

Além dos nutrientes minerais, as fibras dietéticas são de extrema importância nutricional, já que são elas que auxiliam no bom funcionamento do sistema gastrointestinal, pois contribuem para o aumento do bolo fecal e na redução do tempo de digestão e, assim, ajudam a prevenir a constipação. Além disso, já foi associado que as fibras dietéticas contribuem para a redução de doenças cardíacas e câncer de colo (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010).

A partir dos resultados é possível concluir que a adição de couve e uva aumentou a quantidade de fibras totais do chocolate, porém não foi possível avaliar se essa diferença é estatisticamente significativa.

Os resultados indicam que houve um aumento no teor de fibras solúveis do chocolate quando adicionado a couve. A couve é considerada uma alta fonte de fibras sendo que, segundo a USDA e RDA, tem-se aproximadamente 14% da fibra diárias recomendadas em 100 g desse vegetal.

No caso da uva, houve um aumento (mesmo que em pequena proporção) de fibras insolúveis, resultando em uma quantidade maior de fibras totais. A uva é estudada por sua característica de possuir alta quantidade de polifenóis combinados a uma grande porcentagem de fibras dietéticas em sua composição. A revisão

publicada por Zhu, Du e Zheng (2015) aborda o trabalho de diversos autores que avaliaram as fibras totais, solúveis e insolúveis. Todas as variedades de uva avaliadas obtiveram altas quantidades de fibras insolúveis e baixas quantidades de fibras solúveis. A quantidade de fibras totais das diferentes espécies variou de 74,5 a 28,0 g/100g, sendo que as fibras insolúveis representaram mais de 80 % da quantidade total.

A quantidade de carboidratos presentes na amostra, conforme a RDC no. 360 de 23 de dezembro de 2003, *“é calculado como a diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, gorduras, fibra alimentar, umidade e cinzas.”*.

Sendo assim, como há diferença entre os valores encontrados para conteúdo mineral e lipídeos, existe também uma diferença entre a quantidade de carboidratos encontrados nas três amostras.

Um dos principais responsáveis pela alta quantidade de carboidratos nos chocolates é o açúcar utilizado na formulação. Os chocolates com couve e uva também foram formulados com diferentes quantidades de açúcar, para o ajuste da formulação, sendo que para o chocolate com couve foi utilizado 36,5%, para o chocolate com uva foi utilizado 35,35% e para o chocolate ao leite foi utilizado 37%. Mesmo que a maior adição de açúcar na formulação foi para o chocolate ao leite, obteve-se valores maiores de carboidratos para o chocolate com couve. Já no chocolate com uva reduziu-se em 1,65% a menos de açúcar em pó e, mesmo assim, e obteve-se um valor semelhante ao de chocolate ao leite.

A quantificação de açúcares totais, redutores e não redutores para os três chocolates foi realizada em triplicata, e seus resultados estão dispostos na **Tabela 14**.

Tabela 14: Quantificação de açúcares totais, redutores e não redutores de chocolate eo leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.

	Chocolate ao leite	Chocolate com couve	Chocolate com uva
Açúcares Totais (g/100g)	21,00±0,016 ^a	17,00±0,0083 ^b	21,00±0,015 ^a
Açúcares redutores (g/100g)	7,4±0,0032 ^a	7,82±0,0029 ^a	7,24±0,0039 ^a
Açúcares Não-redutores (g/100g)	13	9,21	13,45

*n=3

*As letras diferentes indicam diferença estatística, por Tukey em 5% de significância.

Conforme foi observado na Tabela 13, os chocolates com adição de couve tiveram menor valor de açúcares em relação ao chocolate controle ou o chocolate com uva, sendo que isso se deve principalmente a uma menor quantidade de açúcares não-redutores neste chocolate.

Os açúcares redutores são aqueles que possuem em sua estrutura agrupamentos aldose ou cetose que, ao entrar em contato com agentes oxidantes, sofrem oxidação. Os açúcares redutores mais comuns são a frutose (presente principalmente em frutas), a glicose, a maltose e a lactose. A sacarose, por sua vez, é um açúcar não-redutor, porém pode se tornar um açúcar redutor através da ação de enzimas ou por hidrólise ácida. As estruturas da frutose, glicose e sacarose se encontram na **Figura 28** (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010).

Figura 28: Estruturas químicas de açúcares: glicose, frutose e sacarose.

Sendo assim, os resultados indicam que a redução da quantidade de açúcar na formulação, no caso da adição de couve, impacta diretamente na quantidade de açúcares não redutores. Ayaz et al. (2006) quantificaram os açúcares presentes na couve e identificaram frutose, glucose e sucrose como mais abundantes, sendo encontrado um valor de 2011 mg de frutose, / 100 g de couve seca 1056 mg de glucose / 100 g de couve seca e 894 mg de sucrose. / 100 g de couve seca

Comparando-se o chocolate com adição de uva com o chocolate controle, não foi possível observar modificação em suas quantidades de açúcares redutores, não redutores e totais, corroborando com o resultado de que não houve modificação na quantidade de carboidratos dessas duas amostras. Apesar de, como dito anteriormente, as quantidades de açúcar nas duas formulações ser diferente.

5.5.5. Atividade de água

Os resultados obtidos da análise de atividade de água são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15: Atividade de água dos chocolates

	Chocolate ao leite	Chocolate com couve	Chocolate com uva
Atividade de água	0,523±0,0131 ^a	0,506±0,0101 ^a	0,519±0,0321 ^a
*n=3			

**As letras diferentes indicam diferença estatística, por Tukey em 5% de significância.

A atividade de água em chocolates é relativamente baixa, sendo normalmente avaliada com valores de 0,3 a 0,6. Reolon et al. (2012) estudaram a presença de endobactérias em chocolate e, para tal, avaliaram a atividade de água em chocolates comerciais. O estudo revelou um valor de 0,42 em chocolates ao leite.

A atividade de água encontrada está na faixa indicada para que tenha conservação dentro de seu prazo de validade de até 1 ano.

5.5.6. Colorimetria

Os resultados referentes à análise colorimétrica dos chocolates se encontram na **Tabela 16**.

Tabela 16: Colorimetria de chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.

	L*	a*	b*
Chocolate ao leite	30,66± 0,52 ^a	6,02±0,39 ^a	13,64±0,58 ^a
Chocolate com couve	30,20±0,58 ^a	6,13±0,19 ^a	15,09±0,35 ^b
Chocolate com uva	30,80±0,85 ^a	6,53±0,49 ^a	13,65±0,78 ^a

Segundo a CIELAB para análise de cores tem-se que L refere-se a luminosidade, a* espaço da coloração verde para vermelho, b* espaço da coloração de amarelo para azul.

*n=3

*As letras diferentes indicam diferença estatística, por Tukey em 5% de significância.

A partir dos resultados apresentados é possível concluir que não houve diferença nos parâmetros L* e a* após adição de couve e uva nos chocolates. No entanto, existe uma diferença entre o chocolate com couve para o parâmetro b*.

O estudo de cor é um parâmetro importante para os alimentos, já que é o primeiro a ser percebido pelo consumidor, por isso sua determinação é de extrema relevância para o controle de qualidade. A alteração na cor de um produto alimentício pode significar defeitos, principalmente no chocolate, como é o caso do branqueamento de sua superfície devido ao efeito de *bloom* (WU e SUN, 2013)

A determinação de cor é realizada através de valores numéricos, resultantes de três espaços dimensionais, sendo os mais comuns os valores de L*, a* e b*, que são os parâmetros mais próximos do que o olho humano é capaz de distinguir (WU e SUN, 2013). O sistema CIELab padroniza estes espaços de cor, que vão de 0 a 100, O parâmetro L* significa a luminosidade, o parâmetro a* indica da coloração verde para vermelho e b* de amarelo para azul, conforme demonstrado na **Figura 29**.

Figura 29: Sistema CielAB para análise de cores.

Sendo assim, é possível concluir que a adição de couve e uva não modificou significativamente ($p < 0,05$) a luminosidade nem a coloração no parâmetro a^* , indicando que provavelmente esses parâmetros não serão percebidos sensorialmente.

No caso do parâmetro b^* , no entanto, o chocolate com couve apresentou modificação de praticamente 2 pontos na escala em comparação com os outros dois chocolates, tendendo para o azul, porém, por ser uma pequena diferença, provavelmente também não será percebida sensorialmente.

5.5.7. Estabilidade dos chocolates

O chocolates foram avaliados segundo sua textura por um período de tempo de 3 meses, sendo medidos nos tempos de 1 dia, 15 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias após a temperagem. Durante os 3 meses, os chocolates permaneceram com suas

características visuais estáveis, como brilho e cor. A avaliação de textura dos três chocolates é apresentada na **Figura 30**.

Figura 30: Avaliação da textura pelo período de 3 meses do chocolate ao leite, chocolate ao leite com uva e chocolate ao leite com couve.

Nas 24 horas após a produção dos chocolates, tem-se um valor de força de compressão maior para o chocolate com uva ($43,76 \pm 2,90\text{N}$) se comparado com o chocolate ao leite ($32,28 \pm 1,84\text{N}$) e o chocolate com couve ($35,92 \pm 4,38\text{N}$). Esse fato provavelmente se dá ao maior tamanho de partícula desta amostra ($37,8\mu\text{m}$), como mostrado anteriormente, sendo, portanto, mais força necessária para quebrar o chocolate. A dureza e o tamanho de partícula tendem a ser proporcional, o que explica este resultado (AFOWAKA,2010). Essa tendência de maior força para o chocolate com uva se repetiu durante todo o período observado.

Com o passar do tempo, o chocolate ao leite aumentou a sua dureza, já que a força necessária para a quebra foi aumentando. Os resultados para 1 dia, 1 semana, 15 dias não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Já no segundo mês houve um aumento significativo ($38,44 \pm 2,42\text{ N}$), que permaneceu igual estatisticamente no terceiro mês ($39,45 \pm 1,89\text{ N}$). Sendo assim, o aumento da força de compressão do chocolate ao leite subiu 18,17 % do seu valor inicial ao longo dos três meses. Essa

diferença, no entanto, é pequena e provavelmente não pode ser sentida sensorialmente.

No caso do chocolate com couve, a força permaneceu estável durante o período de 3 meses, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados encontrados.

O chocolate com uva, por sua vez, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no período de 1 dia, 1 semana e 15 dias. Houve um aumento significativo no segundo mês ($48,00 \pm 2,99$ N) que se manteve significativamente ($p < 0,05$) estável no terceiro mês.

Os resultados revelam que no chocolate ao leite e com uva ocorre mudança na dureza dos chocolates com o passar do tempo de prateleira. Essas mudanças, no entanto, provavelmente não deverão ser percebidas sensorialmente, uma vez que se resumem a praticamente uma diferença de 20N entre as forças encontradas, o que provavelmente é difícil de ser reconhecido.

5.5.8. Avaliação sensorial

Durante a análise sensorial foram avaliados os parâmetros 'sabor', "Textura", 'Aspecto geral' e 'Intenção de compra' para todos os chocolates.

A frequência de notas para sabor se encontra na **Figura 31**.

Figura 31: Frequência de notas dadas pelos provadores para “sabor” para chocolate ao leite, chocolate com couve e chocolate com uva.

A partir da análise dos resultados quanto ao sabor, é possível afirmar que a maioria dos provadores ficou entre “gostei ligeiramente” (nota 6) à “gostei muitíssimo” (nota 9), representando 91,6% dos provadores no caso do chocolate com couve, 92,6% no caso do chocolate ao leite e 93,7 % no caso do chocolate com adição de uva, sendo que para este último 25,3% dos provadores atribuíram nota 9. A nota mais atribuída foi a nota “8” (gostei muito), sendo que 33,7% atribuiu esta nota para o chocolate ao leite, 33,7 % para o chocolate com couve e 29,5 % para o chocolate com uva. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$). entre a média das notas, indicando que os três chocolates foram bem aceitos.

A avaliação de “textura” está apresentada na **Figura 32**.

Figura 32: Frequência de notas dadas pelos provadores para "Textura" para o chocolate ao leite, chocolate com couve e chocolate com uva.

A textura do chocolate com couve obteve maior porcentagem de notas acima de 6, representando 64,2% do total, ficando na frente do chocolate ao leite (61,1%) e do chocolate com uva (47,4%), havendo uma distribuição maior das notas, porém as médias não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. O maior coeficiente de variação entre os provadores ocorreu nas notas de textura do chocolate com uva, sendo que muitos apontaram terem gostado da "textura crocante" desta amostra e outros indicaram que "a amostra havia pedaços maiores ruins de mastigar". Essa diferença de sensações pode ser explicada pelo tamanho da partícula da uva liofilizada adicionada ao chocolate que, como apontado anteriormente, foi relativamente maior e foi facilmente percebido pelos provadores.

Os provadores, em sua maioria, (92%) responderam que havia diferença entre as amostras. Entre diversas respostas, as mais frequentes foram: a diferença de sabor entre os três chocolates e a diferença de textura da amostra de chocolate com uva em relação aos demais.

Os resultados quanto ao aspecto geral das amostras estão indicados na **Figura 33**.

Figura 33: Frequência de notas dadas pelos provadores para “Aspecto geral” chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.

Em termos de aspecto geral, os provadores aceitaram bem as amostras, sendo que 90,5% deu uma nota entre 6 e 9 para o chocolate com couve e 91,6% do chocolate ao leite e 88,4% para o chocolate com uva. A nota mais colocada novamente foi nota a “8” (Gostei muito), sendo que 33,7 % atribuíram essa nota para o chocolate ao leite, 31,6% para o chocolate ao leite com couve e 28,4% para o chocolate ao leite com uva. Mesmo assim, as notas médias não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), ou seja, todas as amostras obtiveram a mesma aceitação frente aos provadores.

As notas de “intenção de compra” se encontram na **Figura 34**.

Figura 34: Frequência de notas dadas pelos provadores para “Intenção de compra” para o chocolate ao leite, chocolate ao leite com couve e chocolate ao leite com uva.

A partir da análise das notas dadas para a “intenção de compra” é possível afirmar que a maioria dos provadores “Certamente compraria” ou “Provavelmente compraria” representando um total de 61,1% para o chocolate com couve, 66,6% para o chocolate ao leite e 64,2% do chocolate com uva. Apesar da diferença entre porcentagens, a avaliação estatística da média das notas indicou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias apresentadas.

Os resultados indicam uma alta aceitação dos chocolates, bem como intenção de compra. As diferenças sensoriais percebidas durante o teste não mudaram estatisticamente a aprovação dos provadores.

5.5.9. Determinação do perfil antioxidante dos chocolates

Primeiramente foi verificado o espectro de absorção dos três extratos obtidos a partir dos chocolates, a fim de verificar se estes, por possuírem coloração característica, absorviam mesma região do espectro que o radical DPPH (515nm) , o

que poderia interferir nos resultados obtidos. Os espectros dos três tipos de chocolate estão dispostos na **Figura 35**.

Figura 35: Espectros de absorção dos extratos de A)Chocolate ao leite B)Chocolate ao leite com couve C) Chocolate ao leite com uva D) DPPH.

A partir dos espectros de absorção é possível afirmar que os extratos de chocolate não absorvem energia no comprimento de onda de 515nm, que é o utilizado para a análise de DPPH. É possível observar no espectro do DPPH que este absorve mais energia a 515nm e, por isso, justifica a escolha do comprimento de onda para esta análise.

Segundo Oliveira (2011), o trolox é uma substância análoga a vitamina E sendo sua principal característica ser um antirradicalar. Ensaios já realizados revelam a eficiência do trolox frente ao radical DPPH, por isso é considerado que a porcentagem de trolox representa proporcionalmente a atividade antirradicalar. A capacidade antirradicalar do padrão trolox foi testada em triplicata e a curva cinética está representada na **Figura 36**.

Figura 36: A) Curva cinética do padrão Trolox em 30 minutos e B) Curva padrão da variação de absorbância versus concentração de trolox

A curva cinética do padrão Trolox indica que o aumento da concentração reflete em maior redução da absorbância, principalmente nos primeiros 5 minutos. O restante da reação permanece com a absorbância constante, o que revela que a reação entre o radical DPPH e o padrão trolox ocorre principalmente nos primeiros 5 minutos.

As amostras de extratos de chocolate ao leite, chocolate ao leite com adição couve e chocolate ao leite com adição de uva foram testadas frente ao radical DPPH, suas respectivas curvas cinética e curvas padrão estão representadas nas **Figuras 37, 38 e 39**.

O perfil cinético das três amostras apresenta um padrão de comportamento: os extratos de menor concentração têm menor queda em relação à absorbância do DPPH sem adição de antioxidantes. Já os extratos com maior concentração apresentam maior diferença entre a absorbância final e o DPPH sem adição, sendo que quanto maior a concentração maior é esta diferença.

A diminuição da absorbância, em todos os extratos de todas as amostras, tem seu decaimento ocorrendo durante todo o tempo de análise (30 minutos), diferente do observado no padrão trolox, indicando que a reação entre o radical DPPH e todos os extratos de chocolate ocorrem por mais tempo.

A partir dessa variação de absorbância é possível traçar a curva padrão para cada uma destas amostras, sendo que quanto maior a inclinação da reta, maior é a capacidade antirradicalar da amostra.

As curvas padrão das três amostras de chocolate revelam uma grande semelhança entre os perfis desses chocolates. O coeficiente angular (α) de cada uma das retas é comparado com o coeficiente angular médio do Trolox ($\alpha=0,021$), obtido através da análise em triplicata deste padrão. Os resultados estão representados na **Tabela 17**, juntamente com os resultados de outras avaliações do perfil antirradicalar das amostras.

Figura 37: Perfil cinético e curva padrão da reação entre DPPH e o extrato de chocolate ao leite

Figura 38: Perfil cinético e curva padrão da reação entre DPPH e o extrato de chocolate ao leite com couve

Figura 39: Perfil cinético e curva padrão da reação entre DPPH e extrato de chocolate com uva

Foi realizada também a quantificação da atividade antirradicalar frente ao radical DPPH por IC₅₀, sendo que o resultado se encontra na Tabela 17.

A análise frente ao ABTS foi realizada em triplicata para todas as amostras de chocolate. Primeiramente, obteve-se o espectro de absorção do padrão ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), conforme **Figura 40**.

Figura 40: Espectro de absorção de ABTS

O espectro de absorção do padrão ABTS $\cdot^+$ revela que a maior absorção deste composto ocorre na região entre 700 e 750nm, portanto justifica-se a utilização de 734nm para o comprimento de onda.

O padrão Trolox também é indicado como padrão da capacidade antirradicalar frente ao radical ABTS $\cdot^+$ e, portanto, a reação entre eles foi realizada. O perfil cinético e a curva padrão desta reação é apresentada na **Figura 41**.

Figura 41: Perfil cinético e curva padrão da reação entre ABTS e trolox

O perfil cinético desta reação entre ABTS $\cdot^+$ e trolox mostra que conforme o aumento da concentração tem-se uma redução no valor de absorbância. Além disso, é possível notar que durante os 30 minutos de análise cada amostra se mostrou com um valor de absorbância estável, revelando que a reação ocorre no início do processo e não se modifica ao passar do tempo.

As amostras de chocolates foram testadas frente ao radical ABTS $\cdot^+$, sendo utilizadas as concentrações de extrato de 2, 3, 4, 5, 6%. As **Figuras de 42 a 44** apresentam os resultados obtidos tanto para o perfil cinético quanto para a curva padrão de cada chocolate. Estas sugerem um perfil de cinética muito parecido para todos os extratos de chocolate. Tem-se uma redução de absorbância durante todo o tempo de análise (30 minutos), sendo mais acentuada nos primeiros cinco minutos, o que sugere que a reação ocorra durante todo este período. Mesmo assim, o

padrão observado na amostra padrão se repete: quanto maior a concentração, menor é a absorbância encontrada.

O $\text{ABTS}^{\bullet+}$ possui uma coloração verde-escura e ao reagir com o antirradical modifica sua coloração para verde-claro, e conforme a reação for ocorrendo tem-se a diminuição do valor de absorbância devido a esta diferença de coloração.

Figura 42: Perfil cinético e curva padrão da reação entre ABTS e extrato de chocolate ao leite

Figura 43: Perfil cinético e curva padrão da reação entre ABTS e extrato de chocolate ao leite com adição de couve

Figura 44: Perfil cinético e curva padrão da reação entre ABTS e extrato de chocolate ao leite com adição de uva

. A curva padrão do ácido gálico demonstrou uma equação da reta igual a $y = 0,0012x + 0,2366$.

A quantificação dos polifenóis, bem como a porcentagem de trolox frente ao radical DPPH e a porcentagem de trolox frente ao radical $ABTS^{\bullet+}$ estão apresentadas na **Tabela 17**.

Tabela 17: Avaliação antirradicalar para os chocolates ao leite, com couve e com uva

Amostra	g/mg GAE	IC ₅₀ (DPPH) (mg/L)	%Trolox (DPPH)	% Trolox (ABTS)
Chocolate ao leite	74,22±4,10 ^a	6,82±0,14 ^a	278,75±3,98 ^a	443,97±4,12 ^a
Chocolate com couve	74,29±3,93 ^a	6,3±0,56 ^a	250,93±7,29 ^{ab}	442,28±18,20 ^a
Chocolate com uva	147,285±14,17 ^b	6,92±0,48 ^a	240,47±11,51 ^b	373,80±1,36 ^a

*n=3

*As letras diferentes indicam diferença estatística, por Tukey em 5% de significância.

A partir da avaliação da capacidade antirradicalar dos chocolates frente ao radical ABTS pode-se dizer que não foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, sendo assim, todos os chocolates apresentaram a

mesma capacidade frente a este radical, ou seja, não houve aumento com a adição de couve e uva nos chocolates.

Os valores encontrados para esse tipo de produto são altos, visto que podem ser comparados com alimentos conhecidos por sua alta capacidade antirradicalar como- mirtilos (476,6 mg Equivalente de Vitamina C (VCE) /100 g), ameixas pretas (372 mg VCE/100g) (FLOEGEL,2011) e goiaba (496 mg Trolox/100 g) (REDDY, 2010).

Já frente ao radical DPPH em porcentagem de Trolox, a atividade antirradicalar das amostras de chocolate revelaram resultados nos quais o chocolate ao leite é estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do chocolate ao leite com uva, mas o chocolate ao leite com couve não apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) com nenhuma das duas amostras. Esse fato indica que a capacidade antirradicalar frente ao radical DPPH não aumentou com a adição de couve e apresentou menor capacidade com a adição de uva.

Os resultados frente ao radical DPPH avaliados por IC_{50} demonstraram não haver diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Na literatura, não existe um consenso em como expressar os resultados de testes antirradicalares. Oliveira et al., (2014) sugerem a utilização de porcentagem de Trolox por facilitar a interpretação dos resultados, já que é diretamente proporcional à atividade antirradicalar.

Os valores encontrados para a capacidade antirradicalar frente ao radical DPPH também são comparáveis a frutas e vegetais conhecidos por serem potenciais antirradicalares, como manga (211mg Trolox/100 g) (REDDY et al, 2010), ameixa preta (287 mg VCE/100 g) e vinho (196,4 mg Trolox/100 g), (FLOEGEL et al, 2011).

O radical DPPH tende a interagir com compostos antirradicalares mais reativos, enquanto que o radical ABTS reage com os compostos de reatividade intermediária (Oliveira, 2014). Esse fato pode explicar a diferença de valores encontrada para os chocolates por estes dois métodos e pode-se inferir que existe maior quantidade de compostos de reatividade intermediária em todos os chocolates.

Diversos autores já discutiram a correlação destas duas metodologias. Floegel et al. (2011) realizaram um estudo com 50 diferentes tipos de alimentos (frutas, vegetais e bebidas) e analisaram a correlação entre os resultados obtidos para a capacidade antirradicalar frente ao radical DPPH e frente ao radical ABTS. Foi encontrada uma alta correlação ($R=0,953$), comparando-se os resultados das frutas e das bebidas. Por outro lado, encontrou-se menor correlação para os resultados de vegetais ($R=0,896$). Dudonne et al. (2011) publicaram um estudo comparativo entre 30 diferentes extratos de plantas, assim como o artigo anterior foi encontrada uma alta correlação ($R=0,903$) entre os resultados de ABTS e DPPH.

A análise estatística da quantificação de polifenóis demonstrou que não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os resultados de chocolate com couve e chocolate ao leite, porém houve uma diferença entre estes em comparação ao chocolate ao leite com uva. Houve um aumento da quantidade de polifenóis em 50,44% do chocolate com uva em relação ao chocolate controle.

A quantidade de polifenóis encontrada no controle e chocolate com couve pode ser comparável à quantidade de polifenóis presentes, por exemplo, em laranjas (70 mg GAE/g) (REDDY, 2010).

Conforme citado anteriormente, a couve e a uva foram adicionadas de diferentes formas no chocolate. A couve foi adicionada durante o processo de refino dos chocolates, na máquina de moinho de bolas, enquanto que a uva foi adicionada após o processo de fabricação, em um misturador planetário, o que pode ter afetado diretamente na quantidade de polifenóis adicionada.

Siebert, Troukhanova e Lynn (1996) estudaram a interação entre proteínas e polifenóis. Sabe-se que os polifenóis têm, em sua estrutura, duas extremidades que podem se ligar as proteínas- o anel benzênico, que possivelmente podem interagir com a parte apolar das cadeias de proteínas e os grupos hidroxílicos que formam facilmente ligação de hidrogênio com a amina ou com a carbonila da proteína. Supõe-se que essas ligações formam uma rede de proteínas-polifenóis a qual pode interferir em suas biodisponibilidade. Arts et al. (2002) avaliaram a modificação do resultado de capacidade antirradicalar total de chá preto com e sem caseína. Foi identificado que a adição de proteínas no chá afeta a capacidade antirradicalar do mesmo, não atingindo a capacidade máxima de atividade antirradicalar.

Niseteo et al. (2012) realizaram um estudo da capacidade antirradicalar de diferentes tipos de bebidas a base de café com e sem a adição de leite e quantificaram os compostos polifenólicos por método de *Folin-ciocauteau*. Naquele trabalho, também foi encontrada diferença na capacidade antirradicalar dos cafés com adição de leite, de valor reduzido em comparação aos sem leite e a interação polifenóis-proteínas também foi discutida. No entanto, a quantidade de polifenóis dos *cappuccinos* com adição de leite foi maior do que o controle. O autor atribuiu essa diferença nos resultados de quantidade de polifenóis e da capacidade antirradicalar devido à baixa precisão analítica e a baixa seletividade do reagente de *Folin-ciocauteau*, que pode interagir com outros compostos redutores como açúcares e aminoácidos e gerar, assim, resultados diferentes. Os resultados encontrados para o chocolate com uva apresentam a mesma tendência- menor capacidade antirradicalar e maior quantidade de polifenóis.

Jakobek (2015) publicou uma revisão sobre a interação dos polifenóis com outros componentes alimentares como proteínas, lipídeos e carboidratos. Segundo o autor, a partir de sua revisão bibliográfica, é possível concluir que essas interações podem significar alterações na biodisponibilidade e bioacessibilidade desses compostos pelo organismo. A interação entre lipídeos e polifenóis, por exemplo, pode causar uma mudança na absorção de lipídeos no corpo e reduzir a peroxidação lipídica. Além disso, as proteínas e polifenóis interagem entre si e podem alterar tanto a atividade das proteínas quanto a biodisponibilidade dos polifenóis.

Os estudos citados acima demonstram uma forte interação entre os componentes dos alimentos (proteínas, lipídeos, carboidratos) com os compostos fenólicos. Sugere-se que esta interação pode vir a afetar a disponibilidade dos compostos fenólicos e, portanto, alterar a sua capacidade antirradicalar. Jakobek (2015) cita, também, que quanto maior a quantidade de grupos hidroxila e quanto maior o peso molecular, maior é a tendência das moléculas de polifenóis a se ligar a proteínas. Os compostos encontrados na couve e na uva apresentam esses dois fatores, o que sugere que estas interações possam ter ocorrido e, conseqüentemente, interferindo na capacidade antirradicalar dos chocolates formulados.

No entanto, não foram utilizadas as metodologias de ORAC e FRAP, que também são conhecidas para capacidade antirradicalar. Sabe-se que a análise da atividade antirradicalar por ORAC apresenta grande vantagem em relação ao radical ABTS e ao radical DPPH, pois é baseada nos radicais peroxila, que são mais correlacionados com a oxidação *in vivo* das ERO (SCHAICH; ZIE, 2015). O FRAP baseia-se na redução do complexo férrico pela ação de doação de elétrons por antioxidantes e possui boa correlação com o ABTS (Duddone et al.; 2009).

A adição de frutas secas em chocolates já foi estudada por diversos grupos de pesquisa, com o objetivo de enriquecer essas formulações.

Belščak-Cvitanovi et al. (2012) elaboraram diversas formulações de chocolate com adição de folhas de *Rubus ideaus L.* (*raspberry*) com o objetivo de adicionar compostos fenólicos. Para tal estudo, realizaram formulações de chocolate ao leite e chocolate amargo, sendo um teor de cacau de 30 e 72%, respectivamente. As folhas sofreram um processo de extração em água quente, sendo adicionadas em duas formas diferentes ao chocolate: um extrato liofilizado e um extrato obtido por evaporação. Não foi possível observar diferença na quantidade de compostos polifenólicos totais com adição de extrato liofilizado, assim como sua capacidade antirradicalar frente ao radical FRAP. Além disso, foi identificado que o chocolate amargo possui capacidade antirradicalar e quantidade de polifenóis muito superiores se comparado aos chocolates ao leite avaliados, pois, segundo o autor, produtos com grande quantidade de açúcar e leite em pó formam uma rede de interação forte entre proteínas e catequinas e isto podem afetar diretamente na análise de antirradicalares.

Komes et al. (2013) estudaram a adição de 5 diferentes tipo de frutas secas(ameixa, mamão, damasco, uvas passa e *cranberry*) em formulações de chocolate. Este estudo revelou também uma maior capacidade antirradicalar e quantidade de polifenóis para chocolates amargos, em comparação com chocolates ao leite. Apesar da adição de *cranberry* e uva passa terem sido efetivas em termos de aumentar a capacidade antirradicalar e o teor de polifenóis, os autores demonstram que o maior responsável pelos altos valores é o cacau, que possui grande quantidade de compostos fenólicos em sua composição.

A grande influência do *liquor* de cacau na quantidade de polifenóis e na capacidade antirradicalar está de acordo com o encontrado para todos os chocolates formulados no presente trabalho. Conforme demonstrado anteriormente, o *liquor* de cacau utilizado, quando comparado com frutas conhecidas por essa propriedade, possui uma alta capacidade antirradicalar ($IC_{50}=2,9$ mg/g) e alta quantidade de polifenóis (259,94 mg GAE/ g), que reflete nos altos valores encontrados.

Sim et al. (2016) estudaram a adição de pó de casca de mangostão (*Garcinia mangostana* Linn.) para a melhoria de propriedades nutricionais do chocolate. As formulações foram realizadas com 0, 1 e 3% de pó, sendo que o chocolate amargo obteve uma melhora de 3% na quantidade de polifenóis totais, além de uma melhora no perfil de compostos bioativos, sendo uma possível alternativa como aditivo para enriquecimento de formulação de chocolates.

Todorovik et al. (2015) avaliaram o perfil de polifenóis de chocolates produzidos na Sérvia, sendo que foram avaliados chocolates ao leite, amargos e amargos com adição de raspberry. Neste estudo não foi encontrada diferença entre a quantidade de polifenóis dos chocolates amargos com e sem a adição de raspberry. Mesmo assim, os resultados mostraram um aumento da capacidade antirradicalar frente ao radical DPPH e ABTS nos chocolates com adição de *raspberry*.

Os trabalhos citados acima demonstram que é possível adicionar frutas ou folhas secas em chocolate e obter uma maior capacidade antirradicalar.

Os chocolates desenvolvidos no presente trabalho apresentaram altas capacidades antirradicalares, o que sugere seus efeitos benéficos para o corpo, pele e saúde. Para o aumento significativo da capacidade antirradicalar, no entanto, mais testes deveriam ser realizados, de modo a definir se há uma interação entre estes compostos e as proteínas do leite presentes no chocolate.

5.5.10. Perfil cromatográfico de compostos fenólicos por CLAE-DAD

A análise em CLAE-DAD foi realizada para o perfil cromatográfico dos compostos fenólicos e verificação se os componentes presentes na couve e na uva foram transferidos para os chocolates com adição desses produtos. As comparações entre cromatogramas de mesmo comprimento de onda para o chocolate ao leite, chocolate com couve e couve liofilizada se encontram nas **Figuras 45 a 48**.

Figura 45: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 260 nm, sendo: Cor verde: Couve, Cor laranja: Chocolate ao leite com couve e cor azul: Chocolate ao leite

Figura 46 Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 280 nm, sendo: Cor verde: Couve, Cor laranja: Chocolate ao leite com couve e cor azul: Chocolate ao leite

Figura 47: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 320 nm, sendo: Cor verde: Couve, Cor laranja: Chocolate ao leite com couve e cor azul: Chocolate ao leite

Figura 48: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 350 nm, sendo: Cor verde: Couve, Cor laranja: Chocolate ao leite com couve e cor azul: Chocolate ao leite

A análise dos cromatogramas do chocolate ao leite com couve, chocolate ao leite e da couve permite concluir que alguns dos picos da couve foram transferidos para o chocolate ao leite com couve, assim como alguns picos do chocolate ao leite foram transferidos para o chocolate com couve. A comparação entre os picos e as áreas encontradas está disposta na **Tabela 18**.

Os cromatogramas obtidos para o chocolate ao leite, chocolate ao leite com uva e uva liofilizada estão dispostos nas **Figuras 49 a 52**.

Figura 49: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 260 nm, sendo: Cor roxa: uva liofilizada, Cor vermelha: Chocolate ao leite com uva e cor azul: Chocolate ao leite

Figura 50: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 280 nm, sendo: Cor roxa: uva liofilizada, Cor vermelha: Chocolate ao leite com uva e cor azul: Chocolate ao leite

Figura 51: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 320 nm, sendo: Cor roxa: uva liofilizada, Cor vermelha: Chocolate ao leite com uva e cor azul: Chocolate ao leite

Figura 52: Cromatogramas referentes ao comprimento de onda 350 nm, sendo: Cor roxa: uva liofilizada, Cor vermelha: Chocolate ao leite com uva e cor azul: Chocolate ao leite

Assim como na primeira avaliação, é possível perceber que muitos dos picos presentes no chocolate ao leite estão presentes no chocolate ao leite com uva. Também se observa que alguns picos da uva liofilizada foram transferidos para o chocolate ao leite com uva, conforme demonstra a **Tabela 19**.

A utilização da técnica de CLAE-DAD para identificação de compostos fenólicos é largamente utilizada na literatura atual. Esta identificação de compostos pode ser realizada através da comparação de tempos de retenção presentes na literatura, assim como comparação com padrões. No caso dos chocolates, no entanto,

[illegible]

existe uma grande complexidade de compostos presentes em sua estrutura, o que dificulta a utilização de adição de padrões.

Sendo assim, o método mais adequado seria a utilização de um CLAE-MS, capaz de identificar as massas dos picos e, assim, permitir a sua correta caracterização. No presente trabalho, no entanto, não foi possível realizar esta análise, levando, então, à conclusão através de hipóteses sobre os tempos de retenção conhecidos em literatura.

Primeiramente, é preciso lembrar que dependendo do tipo de estrutura química, há uma diferença na absorção em cada comprimento de onda. Zhang (2013) identificou os espectros de absorção de 14 compostos fenólicos mais conhecidos na literatura, sendo eles; (1) ácido gálico, (2) ácido protequínico, (3) ácido vanilínico, (4) ácido caféico, (5) ácido siríngico, (6) ácido cumárico, (7) ácido salicílico, (8) catequina, (9) epicatequina, (10) rutina, (11) morina, (12) cumarina, (13) quercetina (14) resveratrol.

Esses compostos fenólicos estão presentes tanto na uva quanto na couve, conforme abordado na revisão de literatura. A **Tabela 20** representa os comprimentos de onda de maior absorção para cada um dos fenólicos acima.

Tabela 20: Compostos fenólicos e seus valores de comprimento de onda onde apresentam maior absorção. Retirado de Zhang et al 2013.

Classes de substâncias	Compostos fenólicos	Comprimento de onda (nm)
Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido gálico	271
	Ácido protequínico	260
	Ácido vanilínico	260
Ácido hidroxicinâmico	Ácido caféico	324
Catequinas	Ácido cumárico	280
	Catequina	280
	Epicatequina	280
Flavonóis	Rutina	255
	Quercetina	374
Estibeno	Resverastrol	306

Todos os compostos citados absorvem nos comprimentos de onda avaliados para os chocolates: 260, 280, 320 e 360 nm, portanto existe uma possibilidade de que estes compostos estejam entre aqueles que se repetiram nos chocolates com adição, sendo assim, é provável que os picos encontrados estabeleçam uma relação com a adição de compostos da couve e da uva nos chocolates.

Comparando-se o chocolate ao leite com o chocolate com couve é possível perceber que existe maior quantidade de picos em 280 e 320 nm no chocolate com couve do que na amostra controle. Provavelmente, este fato indica que teriam sido adicionados ao chocolate compostos da classe das catequinas e compostos da classe dos flavonóis.

Já a comparação entre o chocolate controle e o chocolate com uva há uma adição de picos principalmente nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, o que provavelmente sugere que compostos das classes da catequinas e ácidos hidroxicinâmicos foram adicionados.

As catequinas são principal constituinte de chás e são associadas a altas capacidades antioxidantes. Estudos revelam que a ingestão de catequinas pode reduzir o risco de doenças crônicas, além de possuir potencial para inibir células cancerígenas e reduzir o processo de envelhecimento (BRAICU et al, 2013).

Os flavonóis são antioxidantes naturais encontrados principalmente no chá e em frutos como o cacau. Estudos a respeito dessa classe de compostos demonstram seu potencial em reduzir a peroxidação lipídica, representando um protetor cardiovascular importante (HEIM, TAGLIFERRO, BOBILYA, 2002).

Os ácidos hidroxicinâmicos também são altamente estudados por sua propriedade antioxidante. Estão presentes em frutas e vegetais e são conhecidos principalmente por sua bioatividade (RAZZZAGHI-ASI et al, 2013).

6.CONCLUSÃO

A adição de uva e couve em chocolate ao leite modificou suas propriedades, como segue:

- As propriedades físicas, como tamanho de partícula, textura, viscosidade e tensão inicial de Casson, sendo que a diferença de textura e tamanho de partícula foi percebida sensorialmente pelos provadores não treinados;
- As propriedades físico-químicas, como a quantidade de fibras, conteúdo mineral e quantidade de açúcares, conduzindo a melhora nas propriedades nutricionais dos chocolates;
- Nas propriedades sensoriais, 92% dos painelistas afirmaram que havia diferença entre as amostras. A análise sensorial também comprovou uma boa aceitação de todos os chocolates, sendo que mais de 60% dos provadores afirmou que provavelmente ou certamente compraria o chocolate;
- A quantidade de polifenóis aumentou no chocolate ao leite com uva, mas não no chocolate ao leite com couve para a metodologia de *Folin-Ciocalteu*.

A grande quantidade de polifenóis presentes no *liquor* de cacau utilizado impactou diretamente nos altos valores encontrados para todos os chocolates formulados. A adição de uva e couve liofilizadas, apesar de também apresentarem altas quantidades de polifenóis, não modificou a capacidade antirradicalar frente ao radical ABTS e ao radical DPPH. No processo de liofilização houve perdas de polifenóis na couve e na uva.

Os resultados do perfil cromatográfico dos compostos fenólicos por CLAE-DAD revelaram que muitos dos compostos presentes na couve e na uva foram transferidos para os chocolates formulados.

A utilização de frutas e hortaliças como alternativa para o enriquecimento de propriedades dos alimentos foi comprovada neste trabalho demonstrando melhorar as qualidades nutricionais e funcionais de alimentos como chocolate ao leite.

7.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A adição de frutas e vegetais em produtos alimentícios é uma área promissora para enriquecimento de formulações. Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram modificações em alguns aspectos do chocolate, o que é uma premissa interessante para futuros trabalhos.

Avalia-se que a adição de frutas e vegetais tem, no entanto, além do valor nutricional, um efeito benéfico para ajudar a balancear as espécies reativas no corpo e desacelerar o envelhecimento precoce. Essas propriedades funcionais, no entanto, só poderiam ser confirmadas com testes *in vivo* apropriados para a verificação deste benefício.

Além disso, estudos de cristalização dos chocolates formulados poderiam ser conduzidos . pelas técnicas- DSC, Difração de RAIO-X, que poderiam ser utilizadas para informações da estabilidade desses chocolates. .

REFERÊNCIAS

ABICAB. Pesquisas e estatísticas. Disponível em: <http://www.abicab.org.br/associado-chocolate-e-cacau/estatisticas/> Acesso em: 16 mar. 2015.

AFOAKWA, E.O. **Chocolate science and technology**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p.1-2, 12-13, 41-51.

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

AMARAI, A.A. **Comportamento reológico de recheios para chocolates com base gordurosa e formulados com polpa de frutas e gomas**. 2013. 140f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ANDRADE Jr., D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, n.1, p.60-68, 2005.

ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.; WILMS, L.C.; BEETSTRA, S.A.; HEIJNEN, C.G.; VOSS, H.P.; BAST, A. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.5, p.1184-1187, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000. CD-ROM.

AYAZ, F.A.; HAYIRLIOGLU-AYAZ, S.; ALPAY-KARAOGLUB, S.; GRÚZ, J.; VALENTOVÁD, K.; ULRICHOVÁD, J.; STRNAD, M. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var acephala DC) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chemistry**, v.107, n.1, p.19-25, 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**, v.26, n.1, p.113-123, 2006.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; BENKOVIĆ, M.; KARLOVIĆ, S.; HEČIMOVIĆ, I.; JEŽEK, D.; BAUMAN, I. Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. **Food Research International**, v.48, n.2, p.820–830, 2012.

BECKETT, S.T., ed. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4.ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. 688p.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BRAICU, C; LADOMERY, M.R; CHEDEA, V.S; IRIMIE, A; BERINDAN-NEAGOE, I. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. **Food Chemistry**, v.141, n.3, p.3282-3289, 2013.

CHEN, J.H.; HO, C.-T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.7, p.2374–2378, 1997.

CORRÊA, M.A. **Cosmetologia**: ciência e técnica. São Paulo: Medfarma, 2012. 492p.

COHEN, K.L.; LUCCAS, V.; JACKIX, M.N.H. Revisão: temperagem ou pré cristalização do chocolate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n.1, p.23-30, 2004.

CROWLEY, Brian; NAJMEDDINE, Christopher. **Fruit chocolate**. U.S. Patent Application n. 12/930,796, 18 jan. 2011.

DELONGA, K.; MAZOR, S. Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. **Czech Journal of Food Sciences**, v.27, n.5, p.330-337, 2009.

DUDONNE, S; VITRAC, S; COUTIERE, P; WOILEZ, M; MÉRILLON, J.M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p.1768-1774, 2009.

FARIA, F.; SANTOS, R.S.; VIANNA, L.M. Consumo de *Camellia sinensis* em população de origem oriental e incidência de doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.19, n.2, p.275-279, 2006.

FERREIRA, V.L.P.; ALMEIDA, T.C.A.; PETTINELLI, M.L.C.; SILVA, M.A.A.P.; CHAVES, J.B.P.; BARBOSA, E.M.M. **Análise sensorial**: testes discriminativos e afetivos. Campinas: SBCTA, 2000. p.1-6. (Manual: Série Qualidade).

FELLOWS, P.J. **Tecnologia de processamento de alimentos**. São Paulo: ARTMED, 2000. 563p.

FENNEMA, O.R.; PARKIN, K.L.; DAMODARAN, S. **Química de alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p. (Biblioteca Artmed. Nutrição e tecnologia de alimentos).

FLOEGEL, A.; CHUNG, S.J.; VON RUESTEN, A.; YANG, M.; CHUNG, C.E.; SONG, W.O.; KOO, S.I.; PISCHON, T.; CHUN, O.K. Antioxidant intake from diet and supplements and elevated serum C-reactive protein and plasma homocysteine concentrations in US adults: a cross-sectional study. **Public Health Nutrition**, v.14, n.11, p.2055-2064, 2011.

FURLANI, A.M.C.; FURLANI, P.R.; BATAGLIA, O.C.; HIROCE R.; GALLO, J.R.; BERNARDI, J.B.; FORNASIER J.B.; CAMPOS H.R. Composição mineral de diversas hortaliças. **Bragantia**, v.37, n.5, p.33-44, 1978.

GAVA, A.J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel, 1998. 284p.

GARTI, N.; WIDLAK, N.R., eds. **Cocoa butter and related compounds**. Urbana: AOCS Press, 2012. 540p.

GENOVESE, M.I.; LANNES, S.C.S. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and "chocolates" from cocoa and cupuassu. **Food Science and Technology**, v.29, n.4, p.810-814, 2010.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.13, n.4, p.435-448, 1992.

GUPTA, U.C.; GUPTA, S.C. Sources and deficiency diseases of mineral nutrients in human health and nutrition: a review. **Pedosphere**, v.24, n.1, p.13-38, 2014.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, H.G.; COLEPICOLOR, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v.30, n.1, p.206-213, 2007.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.11, n.1, p.210–218, 2010.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v.217, n.2, p.213–220, 2005.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. **Valor da produção dos principais produtos da agropecuária do estado de São Paulo**. Disponível

em: http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/vp.aspx?cod_sis=15 Acesso em: 12 mar. 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Procedimentos e determinações gerais. In: _____. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo: IMESP, 2005. cap.IV, p.83-158.

INTERNATIONAL OFFICE OF COCOA, CHOCOLATE AND SUGAR CONFECTIONERY – IOCCC. **Viscosity of cocoa and chocolate products**. Geneva: International Office of Cocoa, Chocolate and Confectionary, 2000. Pag 10 [Analytical method, 46-2000].

INTERNATIONAL COCOA CONFECTIONARY ORGANIZATION. **ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, Vol. XLII, No. 1, Cocoa year 2015/16.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v.175, p.556-567, 2015.

JAMES, B.J.; SMITH, B.G. Surface structure and composition of fresh and bloomed chocolate analysed using X-ray photoelectron spectroscopy, cryo-scanning electron microscopy and environmental scanning electron microscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.5, p.929–937, 2009.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R.M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v.21, p.16-29, 2015.

KAULMANN, A.; JONVILLE, M.C.; SCHNEIDER, Y.J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v.155, p.240-250, 2014.

KARNJANOLARN, R.; MCCARTHY, K.L. Rheology of different formulations of milk chocolate and the effect on coating thickness. **Journal of Texture Studies**, v.37, n.6, p.668-680, 2006.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D.A.F. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.19, n.2, p.229–234, 2011.

KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.7, p.2161–2168, 2002.

KILIÇ, I.; YEŞİLOĞLU, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.115, p.719–724, 2013.

KOMES, D.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; ŠKRABAL, S.; VOJVODIĆ, A.; BUŠIĆ, A. The influence of dried fruits enrichment on sensory properties of bitter and milk chocolates and bioactive content of their extracts affected by different solvents. **LWT - Food Science and Technology**, v.53, n.1, p.360-369, 2013.

KONAR, N.; OZHAN, B.; ARTIK, N.; DALABASMAZ, S.; POYRAZOĞLU, E.S. Rheological and physical properties of Inulin-containing milk chocolate prepared with different conditions. **CyTA-Journal of Food**, v.12, n.1, p.55-64, 2014.

LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, L. Longevity and aging: role of free radicals and xanthine oxidase: a review. **Pathologie Biologie**, v.62, n.2, p.61-66, 2014.

LANNES, S.C.S. **Cupuaçu**: uma abordagem para sua utilização como substituto do cacau. São Paulo, 2008. 144p. Tese de Livre Docência – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LANNES, S.C.S. **Estudo das propriedades físico-químicas e de textura de chocolates**. São Paulo, 1997. 175p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LANNES, S.C.S.; GIOIELLI, L.A. Uso de gorduras vegetais hidrogenadas na indústria de chocolates. **Óleos e Grãos**, v.8, n.43, p.44-46, 1998.

LANNES, S.C.S.; MEDEIROS, M.L.; AMARAL, R.L. Formulação de “chocolate” de cupuaçu e reologia do produto líquido. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p.463-469, 2002.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.4, p.1390-1393, 1997.

LIANG, Z.; OWENS, C.L.; ZHONG, G.Y.; CHENG, L. Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germ plasm. **Food Chemistry**, v.129, n.3, p.940-950, 2011.

LIPPI, D. Chocolate and medicine: dangerous liaisons? **Nutrition**, v.25, n.11/12, p.1100–1103, 2009.

LIPPI, D. Chocolate in health and disease. **Maturitas**, v.67, n.3, p.195–196, 2010.

LONCHAMPT, P.; HARTEL, R.W. Fat bloom in chocolate and compound coatings. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.106, n.4, p.241-274, 2004.

LONGO, C.; CASARI, A.; BERETTI, F. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.68, n.3, p.73–82, 2013.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v.224C, p.164-175, 2014.

MADI, L.; COSTA, ACPB; REGO, R. A. **Brasil food trends 2020**. São Paulo: FIESP: ITAL, 2010.

MEENA, F.; MEENA, A.; TRÉTON, J. **Polyphenols in human health and disease**. Arizona: Academic Press, 2013. p.819-830.

MINIFIE, B.W. **Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology**. 3.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 904p.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenilpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MORAIS, S.M.; CAVANCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p.315-320, 2009.

NESPOLO, C.R.; OLIVEIRA, F.A.; PINTO, F.S.T.; CLADERA-OLIVEIRA, F. **Práticas em tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: ARTMED, 2015. v.1, 205p.

NISETEO, T.; KOMES, D.; BELŠČAK-CVITANOVIC, A.; HORZIC, D.; BUDEC, M. Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. **Food chemistry**, v.132, p. 1870-1877, 2012.

OLIVEIRA, S. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**. São Paulo, 2011. 93p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, C.D.S.; MACIEL, L.F.; MIRANDA, M.S.; BISPO, E.D.S. Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. **British Food Journal**, v.113, n.9, p.1094–1102, 2011.

OLIVEIRA, A.C.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, D.M.; CLEMENTE, E.; AFONSO, M.R.A.; COSTA, J.M.C. Hygroscopic behaviour of lyophilized powder of Grugru Palm (*Acrocomia aculeata*). **American Journal of Analytical Chemistry**, v.4, p.1-7, 2013.

OLIVEIRA, S.; SOUZA, G.A.; ECKERT, C.R.; SILVA, T.A.; SOBRAL, E.S.; FAVERO, O.A.; FERREIRA, M.J.P, ROMOFF, P.; BAADER, W.J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Química Nova**, v.37, n.3, p.497-503, 2014.

OLIVEIRA, G.L.S.. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015 .

OTHMAN, A; ISMAIL, A; GHANI, N.A; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1523-1530, 2007.

OU, S.; KWOK, K.-C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.11, p.1261–1269, 2004.

PESCHAR, R.; POP, M.M.; DE RIDDER, D.J.A.; VAN MECHELEN, J.B.; DRIESSEN, R.A.J.; SCHENK, H. Crystal structures of 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol and cocoa butter in the $\beta(V)$ phase reveal the driving force behind the occurrence of fat bloom on chocolate. **Journal of Physical Chemistry B**, v.108, n.40, p.15450–15453, 2004.

POLJŠAK, B.; DAHMANE, R. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatology Research and Practice**, v.2012, art.135206, p.1-4, 2012.

PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): new horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v.18, pt.B, p.797-810, 2015.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v.20, n.36, p.4436-4450, 2013.

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

RATTÍ, C. Hot air and freeze-drying of high value food: a review. **Journal of Food Engineering**, v.49, n.4, p.311-319, 2001.

RAY, J.; MACNAUGHTAN, W.; CHONG, P.S.; VIEIRA, J.; WOLF, B. The effect of limonene on the crystallization of cocoa butter. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89, n.3, p.437-445, 2011.

REDDY, C.V.K.; SREERAMULU, D.; RAGHUNATH, D. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. **Food Research Internacional**, v.43, n.1, p.285-288, 2010.

REOLON, E.M.; SANTOS, A.R.B.; MOREIRA, V.E.; NASCIMENTO, M.S. Pesquisa de enterobactérias em chocolates. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.1, p.40-43, 2012.

RICHTER, M.; LANNES, S.C.S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, p.357-369, 2007.

ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, suppl., p.238-244, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, n.3, p.121-137, 2002.

SCHAICH, K.M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Food**, v.14, p.111-125, 2015.

SCHANTZ, B.; ROHM, H. Influence of lecithin-PGPR blends on the rheological properties of chocolate. **Food Science and Technology**, v.38, n.1, p.41-45, 2005.

SCHENK, H.; PESCHAR, R. Understanding the structure of chocolate. **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, n.3/4, p.829-835, 2004.

SERNA-COCK, L.; VARGAS-MUNOZ, D.P.; APONTE, A.A. Structural, physical, functional and nutraceutical changes of freeze-dried fruit. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.6, p.442-450, 2015.

SEVGI, K.; TEPE, B.; SARIKURKCU, C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v.77, p.12-21, 2015.

SIEBERT, K.J.; TROUKHANOVA, N.V.; LYNN, P.Y. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization and analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.2, p.353-362, 1999.

SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.; CORREA, L.C.; BATISTA, Â.G.; FURLAN, C.P.; BIASOTO, A.C.; PEREIRA, G.E.; CAMARGO, A.C.; MARÓSTICA JR., M.R. Bioactive compounds of juices from two Brazilian grape cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, n.6, p.1990-1996, 2016.

SIM, S.Y.; NG, J.W.; NG, W.K.; FORDE, C.G.; HENRY, C.J. Plant polyphenols to enhance the nutritional and sensory properties of chocolates. **Food Chemistry**, v.200, p.46-54, 2016.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, pt.A, p.152-178, 1999.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, n.6, p.753-758, 2003.

STEINDAL, A.L.H.; RODVEN, R.; HANSEN, E.; MOLMANN, J. Effects of photoperiod, growth temperature and cold acclimatisation on glucosinolates, sugars and fatty acids in kale. **Food Chemistry**, v.174, p.44-51, 2015.

TAVARES, J.T.Q.; CARDOSO, R.L.; COSTA, J.A.; FADIGAS, F.S.; FONSECA, A.A. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**, v.33, n.4, p.805-809, 2010.

TODOROVIC, V.; REDOVNIKOVIC, I.R.; TODOROVIC, C.; JANKOVIC, G.; DODEVSKA, M.; SOBAJIC, S. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.41, p.137-143, 2015.

TIMMS, R.E. Phase behaviour of fats and their mixtures. **Progress in Lipid Research**, v.23, n.1, p.1-38, 1984.

VAJDA, Gabor et al. **Fruit-containing chocolate products and process of their preparation**. U.S. Patent, 4,837,042, 6 jun. 1989.

VLACHOGIANNI, I.C.; FRAFOPOULOU, E.; KOSTAKIS, I.K.; ANTONOPOULOU, S. *In vitro* assessment of antioxidant activity of tyrosol,

resveratrol and their acetylated derivatives. **Food Chemistry**, v.117, n.15, p.165-173, 2014.

VIZZOTTO, M.; RASEIRA, M.C.B.; PEREIRA, M.C.; FETTER, M.R. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.3, p.853-858, 2012.

WU, D.; SUN, D.W. Part II. Advances in methods for instrumental assessment of food sensory quality: Food colour measurement using computer vision. In: KILCAST, D., ed. **Instrumental assessment of food sensory quality: a practical guide**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013. cap.6, p.165-195.

XIA, E.Q.; DENG, G.F.; GUO, Y.J.; BIN, H. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n.2, p.622-646, 2010.

YEN, G.C.; DUH, P.D.; TSAI, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v.79, n.3, p.307–313, 2002.

ZHANG, Y.; SHEN, Y.; ZHU, Y.; XU, Z. Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. **LWT - Food Science and Technology**, v.63, n.1, p.569-574, 2015.

ZHU, F.; DU, B.; ZHENG, L.; LI, J. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. **Food Chemistry**, v.186, n.1, p.207-212, 2015.

ANEXO A- Parecer cosubstanciado do CEP

PARECER COSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE CHOCOLATES COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS ACRESCIDOS DE FOLHAS DE Brassica oleracea E FRUTOS DE Vitis vinifera

Pesquisador: Suzana Caetano da Silva Lannes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50562715.2.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.393.285

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa da aluna Juliana Cajado Souza Carvalho. Trata-se de projeto que visa formular chocolate ao leite com acréscimo de couve manteiga e uva liofilizadas para aumentar as propriedades antioxidantes do chocolate. Esse chocolate será posteriormente testado em humanos para avaliação das propriedades para consumo além da intenção de compra.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal é desenvolver formulações de chocolate ao leite com propriedades antioxidantes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os participantes da pesquisa poderão ter risco de anafilaxia com o uso do produto, além de efeitos colaterais como diarreia, prurido e etc. Esses riscos serão minimizados pelos pesquisadores excluindo-se os indivíduos com possíveis alergias já conhecidas ao chocolate. Os benefícios serão a produção de um produto com melhor propriedade antioxidante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem elaborada, com justificativa consistente. Porém, sem previsão de patente para a possível formulação e comercialização em larga escala no mercado, uma vez que benefícios são esperados.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8586 E-mail: cepfci@usp.br

Continuação do Parecer: 1.393.285

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados à plataforma.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto pode ser aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_615046.pdf	08/12/2015 10:38:47		Acelto
Outros	cartacorrecãoCEP.pdf	08/12/2015 10:38:23	Suzana Caetano da Silva Lannes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	08/12/2015 10:37:49	Suzana Caetano da Silva Lannes	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoSensorial.pdf	26/10/2015 15:11:59	Suzana Caetano da Silva Lannes	Acelto
Folha de Rosto	folharostossinada.pdf	26/10/2015 15:08:15	Suzana Caetano da Silva Lannes	Acelto
Declaração de Pesquisadores	declaracaosuzana.pdf	23/10/2015 09:41:46	Suzana Caetano da Silva Lannes	Acelto
Declaração de Pesquisadores	declaracaoJuliana.pdf	23/10/2015 09:41:34	Suzana Caetano da Silva Lannes	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaodept.pdf	23/10/2015 09:41:20	Suzana Caetano da Silva Lannes	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-3522 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.393.285

SAO PAULO, 22 de Janeiro de 2016

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: ceptcf@usp.br

ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo): RG	Nº.:	Sexo: ( ) M ( ) F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento:	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo): RG	Nº.:	Sexo: ( ) M ( ) F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3. Título do Projeto de Pesquisa

DESENVOLVIMENTO DE CHOCOLATE COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS ACRESCIDO DE FOLHAS DE <i>Brassica oleracea</i> E FRUTOS DE <i>Vitis vinifera</i>

4. Duração da Pesquisa

2 anos

5. Nome do Pesquisador Responsável

Suzana Caetano da Silva Lannes	
Cargo/ Função:	Nº de registro do Conselho Regional:

6. Instituição/Instituições

Universidade de São Paulo – USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Somos pesquisadoras da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Estamos realizando uma pesquisa para conhecer e aprimorar preparações de chocolate ao leite. Serão servidas amostras com 26 g de chocolate ao leite, em prato plástico, sob temperatura de 20 °C, preparados com até 24 h de antecedência, produzidos e acondicionados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos, no Departamento de Tecnologia Bioquímico-

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O Sr. (a) receberá amostras de chocolates formulados contendo os seguintes ingredientes: Açúcar, Manteiga de cacau, Liquor de cacau, Leite em pó integral, Leite em pó desnatado, Lecitina de soja, Vanilina, Couve manteiga, Uva.

As análises serão realizadas sempre duas horas antes ou depois das refeições. Convidaremos pessoas que apreciem chocolate ao leite a experimentar três amostras de produtos, identificadas por diferentes números, e registrar suas impressões referentes à textura, sabor, cor, aspecto geral e intenção de compra de cada uma delas. As três amostras serão servidas de forma separada, uma por vez, e entre uma amostra e outra o Sr. (a) tomará um pouco de água e, se quiser poderá comer um biscoito água e sal. As avaliações são rápidas e não levarão mais do que 10 minutos e com suas informações poderemos aprimorar a qualidade dos produtos que estamos desenvolvendo, bem como verificar a aceitação dos mesmos, conjugando as suas informações com as conseguidas em laboratório.

Os benefícios serão novas formulações e a melhoria do processo de fabricação para que futuramente o consumidor tenha acesso a produtos diferenciados, com sabor agradável e com características benéficas à saúde.

Poderão participar da pesquisa homens e mulheres que gostem de comer chocolate ao leite (alunos e funcionários da Universidade), maiores de 18 anos, em bom estado de saúde e que não estejam fazendo nenhuma dieta especial. Serão tomados cuidados especiais para evitar que indivíduos subordinados ou diretamente ligados ao pesquisador se sintam obrigados a participar do estudo.

A pesquisa apresenta risco mínimo. Em caso de possíveis problemas alérgicos a algum dos componentes da formulação, estaremos à disposição para o devido amparo, utilizando para assistência médica no Sistema Único de Saúde (SUS), cujo encaminhamento se procederá através da pesquisadora responsável pelo projeto (orientadora).

A participação é voluntária e o Sr.(a) terá o direito de desistir a qualquer momento, com inteira liberdade de participar ou não da pesquisa, sem quaisquer represálias. O Sr.(a) será identificado por um número e todas e quaisquer opiniões e dados pessoais serão mantidos em sigilo. Em caso de dúvidas ou quaisquer outros problemas o Sr.(a) poderá interromper sua participação a qualquer momento.

Dessa forma, convido Sr.(a) a participar de nossa pesquisa e caso concorde, por gentileza, assine este documento.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Observações complementares:

Estamos à disposição para responder a quaisquer dúvidas quanto às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa através dos contatos:

Profa.Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes (Orientadora)
Av.Prof. Lineu Prestes, 580 bloco 18
Fone: 30913691

Juliana Cajado Souza Carvalho (aluna de Doutorado)
Av.Prof.Lineu Prestes, 580 bloco 18
Fone: 3091 2689

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do Participante de Pesquisa
ou do Responsável Legal

_____
Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: cepfcf@usp.br.

ANEXO C - FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome: _____ Data: _____

1. Você está recebendo amostras de chocolate. Por favor, prove e avalie as amostras para cada atributo- sabor, textura e aspecto geral de acordo com as escalas abaixo.

- (1) Desgostei muitíssimo
- (2) Desgostei muito
- (3) Desgostei regularmente
- (4) Desgostei ligeiramente
- (5) Indiferente
- (6) Gostei ligeiramente
- (7) Gostei regularmente
- (8) Gostei muito
- (9) Gostei muitíssimo

Amostra	Sabor	Textura	Aspecto geral

Existe diferença entre as amostras? Marque com um x a resposta.

Sim		Não	

Caso positivo, qual?

---

2. Indique na escala abaixo qual o grau de certeza que você estaria disposto a comprar se o encontrasse a venda.

- (1) Certamente não compraria
- (2) Provavelmente não compraria
- (3) Talvez comprasse, talvez não comprasse
- (4) Provavelmente compraria
- (5) Certamente compraria

Amostra	Avaliação

3. Justifique sua intenção de compra dizendo:

O que mais gostou: _____

O que menos gostou: _____

ANEXO D – NORMAS E DIRETRIZES PARA BANCA JULGADORA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO E – FICHA DO ALUNO

10/04/2016

Janus - Sistema Administrativo de Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9133 - 4373223/1 - Juliana Cajado Souza Carvalho

Email: jucajado@usp.br
 Data de Nascimento: 04/02/1991
 Cédula de Identidade: RG - 35.820.361-2 - SP
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Bacharel em Química - Escola de Engenharia - Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
 Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
 Área: Tecnologia de Alimentos
 Data de Matrícula: 22/04/2014
 Início da Contagem de Prazo: 22/04/2014
 Data Limite para o Depósito: 25/04/2016
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Suzana Caetano da Silva Lannes - 22/04/2014 até o presente. Email: scslan@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 22/04/2014
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 20/05/2015
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 22/04/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
 Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2016
 Impresso em: 10/04/2016 21:44:49

10/04/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9133 - 4373223/1 - Juliana Cajado Souza Carvalho

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5723-6/2	Conservação de Alimentos por Processos Térmicos	07/05/2014	08/07/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5773-7/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica	04/08/2014	12/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5743-3/2	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	06/08/2014	18/11/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	0	-	-	N	Pré-matricula Indeferida
FBT5735-7/1	Modificação Industrial de Óleos e Gorduras	02/10/2014	05/11/2014	75	5	89	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBT0537 Reologia de Produtos Farmacêuticos e Alimentícios, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/02/2015	30/06/2015	-	1	100	A	-	-
FBA5706-2/2	Planejamento Experimental para Otimização de Produtos e Processos em Alimentos	26/02/2015	21/05/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5785-4/2	Tecnologia de Produtos com Alto Teor Lipídico	11/03/2015	14/04/2015	75	5	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão Coordenadora de Programa, em Sessão de 08/09/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2016

Impresso em: 10/04/2016 21:44:49

ANEXO F – CURRICULO LATTES

01/04/2016 Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Juliana Cajado Souza Carvalho)

[English](#) [Imprimir currículo](#)

[Dados gerais](#) [Formação](#) [Atuação](#) [Produções](#) [Eventos](#) [»](#)

Juliana Cajado Souza Carvalho

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2772308890498180>

Última atualização do currículo em 11/01/2016

Possui graduação em Química pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (2012). Atualmente, é mestranda na Universidade de São Paulo, na área de Tecnologia de Alimentos. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Juliana Cajado Souza Carvalho

Nome em citações bibliográficas

CARVALHO, J. C. S.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2014

Mestrado em andamento em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (Conselho CAPES 6).
 Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
 Título: Desenvolvimento de chocolate com propriedades funcionais acentuado de folhas de Brassica oleracea e frutos de Vitis vinifera. Ano de Obtenção: 2015.
 Orientador: Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes.
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
 Grande área: Ciências Agrárias

2013 - 2014

Especialização em Pesquisa e Desenvolvimento de produtos cosméticos. (Carga horária: 450h).
 Instituto Racine, IR, Brasil.
 Título: Estudo do Impacto da Utilização de Fitossanéticos em Fotoprotetores.
 Orientador: Carla Aparecida Padriell.

2009 - 2011

Graduação em Química.
 Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil.
 Título: IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIRRADICALAR DE CONSTITUINTES FENÓLICOS DO CHÁ PRETO (Camellia sinensis).
 Orientador: Pauliete Rosoff.

Formação Complementar

2013 - 2014

Intensivo em Prática Magistrat. (Carga horária: 96h).
 Instituto Racine, IR, Brasil.

2013 - 2013

Legislação de atividades com produtos químicos. (Carga horária: 8h).
 Conselho Regional de Química IV Região, CRQ-IV, Brasil.

2010 - 2010

Cromatografia líquida e sólida (HPLC e CL). (Carga horária: 40h).

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?d=k4979614TB>

01/04/2018

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Juliana Cajado Sousa Carvalho)

Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, FUNDACENTRO, Brasil.

2010 - 2010

Riscos à saúde no trabalho com fungos. (Carga horária: 30h).
Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, FUNDACENTRO, Brasil.

2010 - 2010

Curso de segurança química. (Carga horária: 40h).
Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, FUNDACENTRO, Brasil.

2010 - 2010

International Chemical Control Toolkit. (Carga horária: 45h).
Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, FUNDACENTRO, Brasil.

Atuação Profissional

St. Paula School, STP, Brasil.

Vínculo Institucional

2012 - 2012

Vínculo: Celista, Enquadramento Funcional: Lab Technician, Carga horária: 40

Colégio Monte Castelo, CMC, Brasil.

Vínculo Institucional

2012 - 2012

Vínculo: Professor, Enquadramento Funcional: Professora de Química, Carga horária: 8

Clarant - São Paulo - Matriz, CLARANT/SP, Brasil.

Vínculo Institucional

2011 - 2012

Vínculo: Solista, Enquadramento Funcional: Solista, Carga horária: 30

Outras Informações

Laboratório Home & Personal Care setor de testes de aplicação de produtos

Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, FUNDACENTRO, Brasil.

Vínculo Institucional

2010 - 2011

Vínculo: Solista, Enquadramento Funcional: Solista, Carga horária: 30

Outras Informações

Laboratório de Química Inorgânica, setor de Riscos químicos

Áreas de atuação

1.

Grande área: Outros.

01/04/2018

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Juliana Cajado Souza Carvalho)

III Simpósio Internacional Darwiniano Rioja, 2010. (Simpósio).

6.

IX Semana de Pesquisa de Fundacentro, A FISPQ e sua importância para a segurança química, 2010. (Encontro).

7.

IX Semana de Pesquisa de Fundacentro, 2010. (Encontro).

8.

II Congresso Nacional das Licenciaturas: Ciência, Ensino e Aprendizagem na Formação de Professores, 2009. (Congresso).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 01/04/2018 às 15:09:33

[Baixar Currículo](#)[Imprimir Currículo](#)