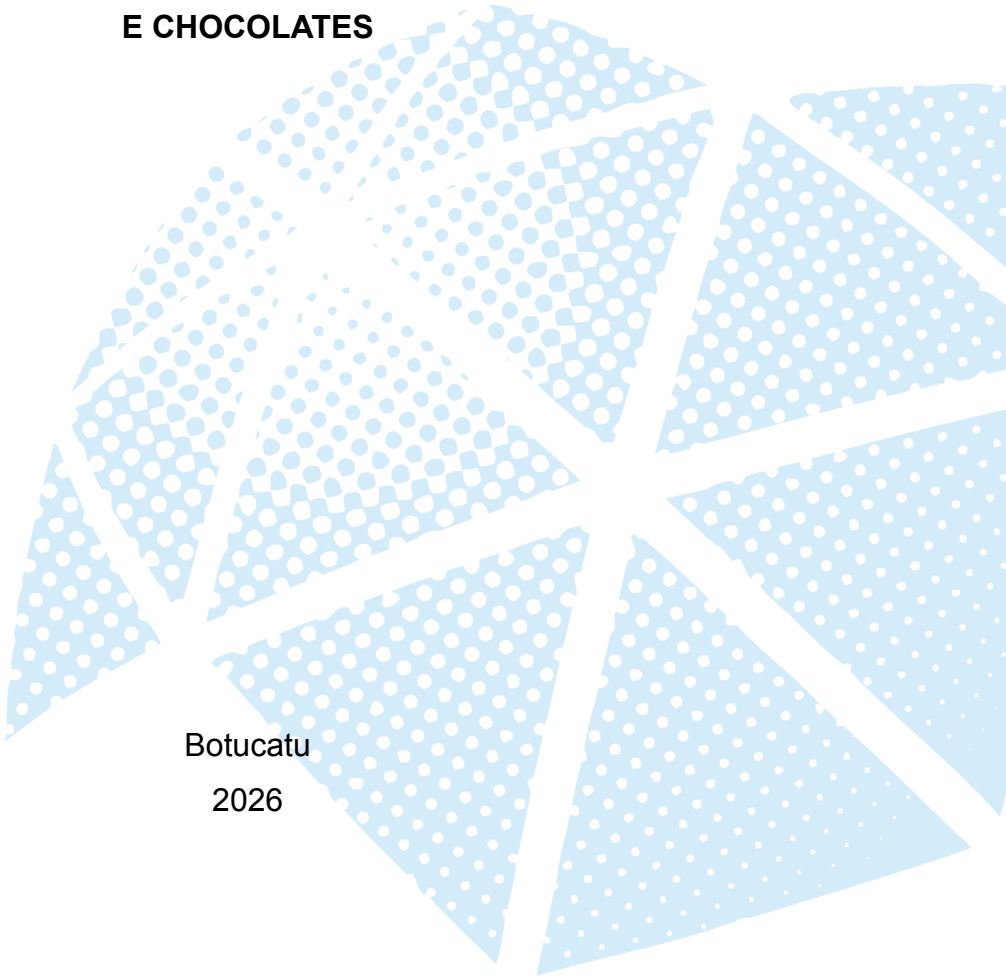


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Agrônômicas - Campus de Botucatu

MARIA GABRIELA DE ALBUQUERQUE SANTIAGO

**OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO EFICIENTE E DE BAIXO IMPACTO
AMBIENTAL PARA DETERMINAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU
E CHOCOLATES**



Botucatu
2026

MARIA GABRIELA DE ALBUQUERQUE SANTIAGO

**OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO EFICIENTE E DE BAIXO IMPACTO
AMBIENTAL PARA DETERMINAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU
E CHOCOLATES**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari

Botucatu

2026

S235o

Santiago, Maria Gabriela de Albuquerque

otimização de um método analítico eficiente e de baixo impacto ambiental para determinação de teobromina e cafeína em cacau e chocolates / Maria Gabriela de Albuquerque Santiago. -- Botucatu, 2026

71 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Cristiano Soleo de Funari

1. Theobroma cacao. 2. Cromatografia líquida. 3. Química verde. 4. Preparo de amostras (Química). 5. Planejamento experimental. I. Título.

Contextualização biotecnológica e social (Texto em português e Inglês)

Impacto potencial desta pesquisa:

O trabalho apresenta um potencial impacto biotecnológico ao integrar a análise de metabólitos secundários do cacau e seus derivados à responsabilidade socioambiental, fundamentada nos preceitos da química verde. Por meio da cromatografia líquida (UHPLC), foi possível identificar e quantificar teobromina e cafeína em diversas amostras comerciais, incluindo chocolates, sementes e nibs. Adicionalmente, o estudo contemplou amostras do Programa Cacau SP, direcionando o olhar científico para a expansão desse plantio no estado de São Paulo.

Potential impact of this research:

This work presents a potential biotechnological impact by integrating the analysis of secondary metabolites of cocoa and its derivatives with socioenvironmental responsibility, based on the principles of green chemistry. Through ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC), it was possible to identify and quantify theobromine and caffeine in various commercial samples, including chocolates, seeds, and nibs. Additionally, the study included samples from the Cocoa SP Program, directing scientific attention towards the expansion of cocoa cultivation in the state of São Paulo.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIA GABRIELA DE ALBUQUERQUE SANTIAGO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 27 de maio de 2026, às 9h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARIA GABRIELA DE ALBUQUERQUE SANTIAGO, intitulada "Otimização de um método analítico eficiente e de baixo impacto ambiental para determinação de teobromina e cafeína em cacau e chocolates". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - FCA, Prof. Dr. EDENIR RODRIGUES PEREIRA FILHO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos/Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia , Pós-Doutorando FELIPE SANCHEZ BRAGAGNOLO (Participação Virtual) do(a) Laboratório Multidisciplinar em Alimentos e Saúde / Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP, Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 **CRISTIANO SOLEO DE FUNARI**
Data: 27/05/2026 15:17:14-0300
Verifique em <https://validar.ibi.gov.br>

Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

Para Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, principalmente ao Eduardo Mendes, por me apoiar, revisar os textos, me fazer dar risada. Sem ele esse trabalho não seria possível.

Aos meus pais, Santiago e Adriana, pelo amor e por apoiarem a decisão de continuar estudando. À minha irmã pelos memes trocados.

Aos colegas do LACEM, em especial ao Afonso e Martin, pelas conversas e aprendizados ao longo do Mestrado.

Ao professor Cristiano, pela oportunidade de aprender mais sobre a filosofia da química verde.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de pesquisa de processo 88887.172509/2025-00 e 130534/2024-2, respectivamente.

RESUMO

O tema da sustentabilidade ambiental tem permeado o debate público, contudo, diversos métodos analíticos amplamente utilizados na indústria alimentícia ainda não incorporaram conceitos de química verde. Este trabalho apresenta um método otimizado utilizando princípios da química verde combinados com uma abordagem de planejamento experimental, e validado de acordo com as diretrizes da EURACHEM. Resumidamente, 0,08 g de *nibs* de cacau ou amêndoas (ou 0,18 g de chocolate) são extraídos por maceração bifásica com 4 mL de EtOH-H₂O (45:55, v/v) e 12 mL de n-heptano, pré-saturados, a 45 °C e 800 rpm por 35 min. A fase hidroetanólica é filtrada e 1,5 µL são analisados por UHPLC-UV a 272 nm, usando uma coluna C18 (100 × 2,1 mm, 1,6 µm) e 10% de EtOH em água a 0,3 mL/min, a 30 °C. O método apresentou eficiência de extração dos metabólitos de interesse superior, tempo de análise mais curto e menor impacto ambiental em comparação com o método de referência AOAC 980.14. Além disso, apresentou linearidade em toda a faixa investigada, precisão adequada para análises de matrizes complexas, baixos limites de detecção e quantificação, efeito de matriz e viés desprezíveis, boa exatidão e seletividade.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*; Química verde; química analítica; metilxantinas; UHPLC.

ABSTRACT

The topic of environmental sustainability has permeated public debate, however, several analytical methods widely used in the food industry have not yet incorporated green chemistry concepts. This work presents an optimized method utilizing green chemistry principles combined with an experimental design approach, validated according to EURACHEM guidelines. Briefly, 0.08 g of cocoa nibs or beans (or 0.18 g of chocolate) are extracted via biphasic maceration with 4 mL of EtOH–H₂O (45:55, v/v) and 12 mL of n-heptane, pre-saturated, at 45 °C and 800 rpm for 35 min. The hydroethanolic phase is filtered, and 1.5 µL is analyzed by UHPLC-UV at 272 nm, using a C18 column (100 × 2.1 mm, 1.6 µm) and 10% EtOH in water at 0.3 mL/min and 30 °C. The method demonstrated superior extraction efficiency of the metabolites of interest, shorter analysis time, and lower environmental impact compared to the AOAC 980.14 reference method. Furthermore, it showed linearity across the entire investigated range, adequate precision for complex matrix analysis, low limits of detection and quantification, negligible matrix effect and bias, and good accuracy and selectivity.

Keywords: *Theobroma cacao*; Green Chemistry; Analytical Chemistry; methylxanthines; UHPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Curvas cinéticas para extração por maceração dinâmica de teobromina (azul) e cafeína (laranja) a partir de amostras de nibs de cacau. A mesma letra em diferentes pontos da curva indica que não houve variações estatisticamente significativas entre os diferentes tempos de extração para aquele composto. Os extratos foram preparados em triplicata, onde 0,08 g de nibs foram extraídos com 4 mL de EtOH-H₂O 45:55 (v/v) e 12 mL de n-heptano, a 45 °C e 800 rpm..... 29
- Figura 2.** Comparação entre o procedimento proposto para preparação da amostra e o do método oficial AOAC 980.14. Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (teste t de Student, $p < 0,05$)..... 32
- Figura 3.** Cromatogramas UHPLC-PDA/UV a 272 nm de 1,5 µL de extrato EtOH-H₂O 45:55 (v/v) de nibs de cacau desengordurado, em triplicata. Scale down de coluna HPLC para UHPLC. Coluna Luna omega PS C18 100 x 2,1 mm, 1,6 µL (Phenomenex, EUA) a 30 °C. Fase móvel: A) MeOH-H₂O-CH₃OOH 20:79:1 (v/v/v) a 0,27 mL/min; B) EtOH:H₂O 1:9 (v/v) a 0,3 mL/min..... 33
- Figura 4.** Cromatograma de amêndoas obtido por SHIM-PACK UC-X RP C18, 250 x 4.6 mm 5 µm, modo isocrático (MeOH-H₂O-CH₃OOH 20:79:1 (v/v/v) a 1 mL/min. A) Deconvolução do pico de teobromina. B) Espectro UV do pico deconvoluído da teobromina. C) Deconvolução do pico de cafeína. D) Espectro UV do pico deconvoluído da cafeína..... 38
- Figura 5.** Cromatograma de nibs obtido por Luna Omega PS C18 100 × 2,1 mm, 1,6 µm a 0,27 mL/min, modo isocrático (MeOH-H₂O-CH₃OOH 20:79:1 (v/v/v)). A) Deconvolução do pico de teobromina. B) Espectro UV do pico deconvoluído da teobromina. C) Deconvolução do pico de cafeína. D) Espectro UV do pico deconvoluído da cafeína..... 39
- Figura 6.** Cromatograma de nibs obtido por Luna Omega PS C18 100 × 2,1 mm, 1,6 µm a 0,3 mL/min, modo isocrático (10% EtOH em H₂O). A) Deconvolução do pico de teobromina. B) Espectro UV do pico deconvoluído da teobromina. C) Deconvolução do pico de cafeína. D) Espectro UV do pico deconvoluído da cafeína..... 40
- Figura 7.** Representações de amostra 10xLOQ: A) Cromatograma UV; B) Cromatograma de massas; C) Espectro de massas da teobromina (modo positivo); e, D) Espectro de massas da cafeína..... 51
- Figura 8.** Representações de amostra de *nibs*: A) Cromatograma UV; B) Cromatograma de massas; C) Espectro de massas da teobromina (modo positivo); e, D) Espectro de massas da cafeína..... 52

Figura 9. Amostras de nibs analisadas UHPLC-PDA, representadas por média das áreas dos picos de teobromina e cafeína lidos a 272 nm. As diferenças estatísticas significativas para cada composto estão representadas por letras diferentes sobre as barras (teste de Tukey, $p < 0,05$).....	56
Figura 10. Amostras de sementes de cacau analisadas UHPLC-PDA, representadas por média das áreas dos picos de teobromina e cafeína lidos a 272 nm. As diferenças estatísticas significativas para cada composto estão representadas por letras diferentes sobre as barras (teste de Tukey, $p < 0,05$).....	57
Figura 11. Amostras de pó de cacau analisadas UHPLC-PDA, representadas por média das áreas dos picos de teobromina e cafeína lidos a 272 nm. As diferenças estatísticas significativas para cada composto estão representadas por letras diferentes sobre as barras (teste de Tukey, $p < 0,05$).....	57
Figura 12. Amostras de chocolate analisadas UHPLC-PDA, representadas por média das áreas dos picos de teobromina e cafeína lidos a 272 nm. As diferenças estatísticas significativas para cada composto estão representadas por letras diferentes sobre as barras (teste de Tukey, $p < 0,05$).....	58
Figura C1. Cromatogramas representativos de cada amostra analisada utilizando os métodos de extração e separação propostos.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fatores independentes utilizados no planejamento fatorial fracionado (2^{6-2}) e seus níveis.....	19
Tabela 2.	Fatores independentes utilizados no planejamento DCCR para extração e seus níveis.....	19
Tabela 3.	Fatores independentes utilizados no planejamento DCCR e seus níveis.....	20
Tabela 4.	Planejamento fatorial fracionário 26-2 aplicado para triagem de variáveis significativas para extração de teobromina e de cafeína de cacau, e resultados.....	24
Tabela 5.	Planejamento central composite rotatable design aplicado para otimização de extração de teobromina e de cafeína de cacau, e resultados.....	26
Tabela 6.	Resultados de extrações de teobromina e de cafeína com % de EtOH em H ₂ O indicadas como ótimas pelos modelos, bem como com aquela que levou aos melhores valores (45%) no DCCR original.....	28
Tabela 7.	Áreas dos picos de teobromina e de cafeína obtidas pelo procedimento de preparação de amostras aqui proposto e de acordo com o método AOAC 980.14.....	31
Tabela 8.	Planejamento DCCR aplicado para otimização de separação de teobromina e de cafeína de cacau por UHPLC-PAD/UV, e resultados.....	34
Tabela 9.	Comparação entre a separação AOAC em HPLC, AOAC escalonada para UHPLC-UV e a separação proposta por UHPLC-UV para teobromina.....	36
Tabela 10.	Comparação entre a separação AOAC em HPLC, AOAC escalonada para UHPLC-UV e a separação proposta por UHPLC-UV para cafeína.....	37
Tabela 11.	Comparação entre o procedimento proposto e o método oficial AOAC 980.14, abrangendo desde a preparação da amostra até a separação de teobromina e cafeína.....	41
Tabela 12.	Precisão instrumental UHPLC-PDA (dez injeções consecutivas do mesmo extrato).....	42
Tabela 13.	Precisão intra-dias e inter-dias.....	43
Tabela 14.	Precisão intermediária.....	44

Tabela 15. Linearidade e sensibilidade para os padrões de teobromina e cafeína.....	45
Tabela 16. Efeito matriz.....	46
Tabela 17. Teste de recuperação para teobromina.....	48
Tabela 18. Teste de recuperação para cafeína.....	49
Tabela 19. Teste de seletividade.....	50
Tabela 20. Teste de estabilidade.....	53
Tabela 21. Curva de calibração para os padrões de teobromina e cafeína.....	54
Tabela 22. Quantificação de teobromina e cafeína em diferentes amostras de chocolate, nibs, pó e semente de cacau.....	55
Tabela A1. Relação das amostras comerciais analisadas.....	63
Tabela B1. Métricas do ComplexMoGAPI aplicadas para o procedimento da AOAC e proposto.....	64
Tabela B2. Métricas do ComplexMoGAPI aplicadas para o procedimento da AOAC e proposto.....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 QUÍMICOS.....	17
2.2 CACAU E DERIVADOS.....	17
2.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVO PROCEDIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU E DERIVADOS BASEADO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A UM DETECTOR DE REDE DE FOTODIODOS (UHPLC-PDA/UV). 18	
2.3.1 Desenvolvimento da etapa de preparação das amostras.....	18
2.3.2 Desenvolvimento da etapa de separação por UHPLC-PDA/UV em modo isocrático.....	20
2.4 MÉTODO DE REFERÊNCIA.....	21
2.5 VALIDAÇÃO DO NOVO PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	21
2.5 QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM DIFERENTES AMOSTRAS DE CACAU E DERIVADOS.....	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
3.1 DESENVOLVIMENTO DE NOVO PROCEDIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU E DERIVADOS	23
3.1.1 Desenvolvimento da etapa de preparação das amostras.....	23
3.1.2 Comparação da etapa de preparação de amostras do novo procedimento com a do método de referência.....	30
3.1.2 Desenvolvimento da etapa de análise das amostras por UHPLC-PDA/UV.....	32
3.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCEDIMENTOS COMPLETOS, DESDE A PREPARAÇÃO DA AMOSTRA ATÉ A ANÁLISE POR UHPLC-PDA.....	40
3.3 VALIDAÇÃO DO NOVO PROCEDIMENTO COMPLETO.....	42
3.3.1 Precisão.....	42
3.3.1.1 Repetibilidade.....	42
3.3.1.2 Precisão intermediária.....	43
3.3.2 Linearidade, Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ). 45	
3.3.3 Efeito Matriz.....	46
3.3.4 Exatidão e viés (veracidade) por ensaios de recuperação.....	47
3.3.5 Seletividade e Especificidade.....	49
3.3.5 Estabilidade das amostras.....	52
3.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE NIBS, AMÊNDOAS E CHOCOLATES.....	53
4 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE A - AMOSTRAGEM.....	63

APÊNDICE B - MÉTRICAS VERDES.....	64
APÊNDICE C - CROMATOGRAMAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Theobroma* (Malvaceae) é constituído por um importante grupo de árvores frutíferas nativas da Amazônia, também conhecido como grupo dos cacaos¹. Dentro desse gênero destaca-se o *Theobroma cacao* L., cacaueiro, pelo intenso uso de seu fruto (cacau) por povos originários do Brasil, por ser amplamente cultivado e processado industrialmente para obtenção do chocolate. Além disso, essa espécie concentra o número de pedidos de patentes relativos às suas aplicações nas áreas de tecnologia de alimentos, alimentos funcionais, medicinal e biotecnológica^{1,2}.

Embora seja de origem neotropical¹, atualmente o cacau pode ser encontrado na África, Ásia e Oceania, além da América Latina. Cerca de 70% da produção global está concentrada em países africanos, como Costa do Marfim, Gana, Camarões e Nigéria. Entretanto, na safra de 2023/24, houve uma queda de produtividade das plantações na África Ocidental devido às crises climáticas (secas e inundações), fitossanitárias (vírus do broto inchado e podridão negra) e fase de senescência dos pés de cacau. Essa queda de produtividade gerou um déficit no mercado global, visto que a baixa oferta de matéria-prima e a moagem contínua contribuíram para o aumento do preço do cacau na safra 2024/25³ e consequentemente aumentaram o preço final de seu principal produto, o chocolate.

Do ponto de vista econômico brasileiro, o fruto do cacaueiro foi utilizado desde moeda de troca até o estabelecimento de plantações massivas, levando o país a experimentar o que foi chamado de “ciclo do cacau”⁴. Em 2022, o país se encontrava como o 6º maior produtor mundial, com cerca de 200 mil toneladas de cacau colhidas por ano por aproximadamente 75 mil produtores, em sua maioria cultivando-o em sistemas agroflorestais (SAF), dentro do que se classifica como agricultura familiar. Os principais estados produtores são Pará e Bahia, correspondendo a aproximadamente 96% da produção nacional⁵. De acordo com o IBGE, em 2024, o Brasil aumentou sua produção para cerca de 297 mil toneladas de cacau por ano⁶.

O Brasil atua em toda a cadeia produtiva, desde a produção de cacau, passando pelo processamento até a comercialização do chocolate^{5,7}. Tendo em vista o cenário mundial do cacau, o país pode aumentar sua produtividade por meio da

modernização de técnicas agrícolas, maior participação do produtor na cadeia de valor (e.g. *bean to bar*), plantio integrado (culturas com interesse econômico) e incentivo ao plantio em regiões diferentes (e.g. Programa Cacau SP)^{3,8}.

Diferentes métodos de plantio, processamento e beneficiamento do cacau podem alterar a composição dos metabólitos secundários presentes nas amêndoas de cacau e consequentemente alterar o sensorial do chocolate^{3,5,9}. Os metabólitos secundários mais quantificados no cacau são as metilxantinas teobromina e cafeína², que podem ser considerados marcadores para chocolates com maiores concentrações de cacau^{2,9-14}.

Nos últimos anos, houve um aumento de pesquisas acerca da teobromina em relação à saúde humana, indicando potenciais usos farmacêuticos devido à neuroproteção em relação a doenças cerebrais degenerativas (Parkinson e Alzheimer)^{14,15}, propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias^{15,16}, ação vasodilatadora e diurética^{14,15}. Os efeitos da cafeína são estabelecidos na literatura, principalmente devido à sua ação de estímulo do sistema nervoso central, utilizada em suplementos alimentares, bebidas energéticas e ativos farmacêuticos^{14,17}.

A quantidade de metilxantinas, teobromina e cafeína, é considerada essencial para determinar a qualidade do cacau¹³. A AOAC apresenta um procedimento para tal quantificação, o AOAC 980.14. Basicamente, este procedimento utiliza um desengorduramento com éter de petróleo, secagem do solvente, seguido de uma extração com água à 100 °C e, por fim, uma análise por HPLC utilizando uma coluna C18 (300 x 4 mm)¹⁸. Este procedimento apresenta algumas características não alinhadas à química verde problemas, como tempo de análise elevado¹⁹; utilização de solvente perigoso para o meio ambiente e experimentador (éter de petróleo, uma mistura de hexanos e pentanos)^{19,20}; alto consumo de energia durante a preparação da amostra; e alto consumo de fase móvel em HPLC¹⁹.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um procedimento analítico eficiente, mais simples e de menor impacto ambiental para quantificação de teobromina e de cafeína em amêndoas de cacau (*commodities*) e derivados⁴, em comparação ao método oficial AOAC 980.14¹⁸.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 QUÍMICOS

Padrões de medição de teobromina (>98%) e cafeína (>98%), e solventes de grau HPLC, como ácido fórmico, ácido acético, n-heptano e metanol, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Etanol de grau HPLC, catequina (90-100%), epicatequina (90-100%) e procianidina B2 (90-100%) foram adquiridos da Merck (Alemanha). A água foi obtida diariamente utilizando o sistema DIRECT-Q 3 UV (Millipore, EUA).

2.2 CACAU E DERIVADOS

Sementes e *nibs* de *T. cacao* (Figura 1) foram obtidas em parceria com o Programa Cacau SP, iniciativa da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo por meio da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), na cidade de Adolfo-SP. As amostras foram desidratadas em até 10% de umidade em estufa com circulação forçada de ar (Solidsteel, SSDc-64i, Brasil). Foram adquiridas amostras comerciais de *nibs* e pó de cacau. As amostras foram moídas separadamente, em moinho analítico (Ika® A11 basic, Alemanha). Após a moagem, as partículas foram separadas por meio de um agitador eletromagnético de peneiras (Bertel, Brasil) e armazenadas no freezer. Apenas partículas na faixa de 32 a 48 Mesh foram submetidas aos processos de extração. Chocolates em barra foram comprados no mercado da cidade de Botucatu, congelados, separados em lascas e extraídos conforme procedimentos descritos mais adiante no texto. A relação de amostras comerciais pode ser encontrada na Tabela A1 do Apêndice A.

2.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVO PROCEDIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU E DERIVADOS BASEADO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A UM DETECTOR DE REDE DE FOTODIODOS (UHPLC-PDA/UV)

Todas as análises foram realizadas em um sistema UHPLC (Nexera UC, Shimadzu, Japão) equipado com duas bombas LC-30AD, unidade de degaseificação DGU-20A5R, injetor automático SIL-30AC, forno de coluna CTO-20AC, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, módulo de comunicação CBM-20A e um espectrômetro de massas de quadrupolo simples com fonte de ionização do tipo ESI (LCMS-2020, Shimadzu, Japão). Um pré-aquecedor de fase móvel de 1 µL foi instalado antes de uma coluna Luna Omega PS C18 100 × 2,1 mm, 1,6 µm column (Phenomenex, EUA). Os dados foram processados utilizando o software LabSolutions LCMS, versão 5.96 (Shimadzu, Japão).

Todos os extratos foram filtrados com filtro seringa de PVDF 13 mm; 0,22 µm para subseqüentes análises em UHPLC.

2.3.1 Desenvolvimento da etapa de preparação das amostras

A técnica de extração utilizada para a otimização do processo de extração foi a maceração dinâmica com dois solventes imiscíveis²³. Em cada experimento, uma quantidade de nibs foi adicionada a um vial de vidro de 20 mL (23 mm x 75 mm). Em seguida, foram adicionados 4 mL de uma solução hidroetanólica (EtOH-H₂O) acidificada ou não com ácido fórmico (HCOOH) e 12 mL de n-heptano.

Esta etapa foi iniciada por uma triagem de variáveis, aplicando-se um planejamento fatorial fracionado (26–2), com as seguintes variáveis (Tabela 1): tempo de extração (x_1), agitação (x_2), % de EtOH em H₂O (x_3), % de HCOOH (x_4), temperatura da extração (x_5) e razão planta/solvente hidroetanólico (x_6).

Tabela 1. Fatores independentes utilizados no planejamento fatorial fracionado (2^{6-2}) e seus níveis.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
X1: Tempo (min)	10	35	60
X2: Agitação (rpm)	800	1100	1400
X3: EtOH em H ₂ O (%)	0	25	50
X4: HCOOH (%)	0,00	0,15	0,30
X5: Temperatura (°C)	30	45	60
X6: Razão planta/solvente (g/mL)	0,02	0,06	0,1

Em seguida, foi executado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), resumido na Tabela 2. Esse modelo contemplou apenas as variáveis que se mostraram estatisticamente significativas na etapa de triagem: tempo de extração (x_1), % de EtOH em H₂O (x_2), temperatura da extração (x_3) e razão planta/hidroetanólico (x_4). O procedimento otimizado final consistiu na extração de 0,08 g de *nibs* ou amêndoas de cacau com 4 mL de EtOH-H₂O 45:55 (v/v) e 12 mL de n-heptano, a 45 °C, 800 rpm, por 35 min. Para chocolates, 0,18 g são extraídos, mantendo-se todos os demais valores aqui informados.

Tabela 2. Fatores independentes utilizados no planejamento DCCR para extração e seus níveis

Fatores	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
X1: Tempo (min)	10	22,5	35	47,5	60
X2: EtOH em H ₂ O (%)	0	15	30	45	60
X3: Temperatura (°C)	30	37,5	45	52,5	60
X4: Razão planta/solvente (g/mL)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1

Cada extrato hidroetanólico produzido foi filtrado e analisado (1,5 µL) por UHPLC-PDA/UV utilizando um sistema de eluição gradiente em modo reverso,

desenvolvido para esta etapa: fase móvel composta por água com 0,3% de ácido fórmico (A) e metanol (B) a 0,32 mL/min, no seguinte gradiente: 7-26% B (0-12,6 min); 26-100% B (12,6-13,6 min); 100% B (13,6-17,6 min). A temperatura de análise foi de 30 °C. As respostas monitoradas foram as áreas de teobromina (y_1) e da cafeína (y_2) por UHPLC-DAD/UV a 272 nm.

2.3.2 Desenvolvimento da etapa de separação por UHPLC-PDA/UV em modo isocrático

Nesta etapa, avaliou-se a influência das variáveis porcentagem EtOH (x_1) e de HCOOH em água (x_2) na fase móvel, inseridos em um DCCR, na separação de teobromina e de cafeína (Tabela 3).

Tabela 3. Fatores independentes utilizados no planejamento DCCR e seus níveis

Fatores	Níveis				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
X1: EtOH (%)	10	12,9	20	27,1	30
X2: HCOOH (%)	0	0,06	0,2	0,34	0,4

Foram fixados os seguintes valores: vazão a 0,3 mL/min., e temperatura de análise a 30 °C. O volume de injeção foi 1,5 µL de um extrato hidroetanólico de *nibs* obtido segundo procedimento otimizado (subseção 2.3.1). A resposta utilizada foi a resolução entre os picos de teobromina e cafeína (R_s), de acordo com a equação 1, onde R_t é o tempo de retenção dos compostos e $W_{h/2}$ é a largura à meia altura do pico, obtidos por UHPLC-PDA/UV a 272 nm.

$$R_s = 1,18 \times \frac{R_{t_{cafeína}} - R_{t_{teobromina}}}{W_{h/2_{cafeína}} + W_{h/2_{teobromina}}} \quad (\text{Equação 1})$$

A condição final obtida foi com coluna Luna Omega PS C18 100 × 2,1 mm, 1,6 µm column (Phenomenex, EUA) e 10% EtOH em H₂O, a 0,3 mL/min. e temperatura de análise de 30 °C, 1,5 µL de volume de injeção.

2.4 MÉTODO DE REFERÊNCIA

Como referência para cada etapa descrita acima, foi selecionado o método “AOAC official method 980.14 (theobromine and caffeine in cacao products)”¹⁸. Separações por HPLC-UV foram alcançadas usando uma coluna SHIM-PACK UC-X RP C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm (Shimadzu, Japão), a 1 mL/min. Para chocolate, 4,5 g de chocolate desengordurado com hexano foram extraídos com 100 mL de água (0,045 g/mL). Já para as amêndoas, 0,6 g de material desengordurado com hexano foi extraído com 100 mL de água (0,006 g/mL).

2.5 VALIDAÇÃO DO NOVO PROCEDIMENTO ANALÍTICO

A validação do novo método analítico foi realizada de acordo com “The Fitness for Purpose of Analytical Methods”, contemplando extração e separação por UHPLC-PDA²⁴. A estabilidade dos extratos foi monitorada por ao analisar 3 extratos a cada 24 h, até 72 h, mantendo-os no escuro após a análise.

2.5 QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM DIFERENTES AMOSTRAS DE CACAU E DERIVADOS

Amostras de *nibs* de cacau foram compradas de diferentes regiões do Brasil, enquanto os chocolates foram adquiridos no mercado local, compondo nacionais e importados (Tabela A1). Extratos foram preparados e analisados de acordo com o novo procedimento proposto neste trabalho. As quantificações de teobromina e de cafeína foram obtidas a partir de curvas de calibração para teobromina ($y = 6.684.464,71x + 4877,65$; $R^2 = 0,99995$) e cafeína ($y = 5.771.956,67x - 115,13$; $R^2 = 0,999956$), construídas em triplicatas, usando sete concentrações de padrões analíticos vs. área dos respectivos picos cromatográficos.

Os cálculos foram realizados utilizando Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, EUA) e Google Sheets (Google, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 DESENVOLVIMENTO DE NOVO PROCEDIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU E DERIVADOS

3.1.1 Desenvolvimento da etapa de preparação das amostras

O planejamento fracionário 2^{6-2} , aplicado à triagem de variáveis na etapa de extração de amostras, visando quantificar teobromina e cafeína em cacau e derivados, bem como os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4. As respostas monitoradas foram as áreas dos picos da teobromina (y_1) e da cafeína (y_2).

Para eliminar conclusões errôneas devidas a diferentes proporções de massa de cacau/solvente de experimentos dos planejamentos de extração (Tabelas 4 e 5), as áreas dos picos cromatográficos foram multiplicadas por um fator de compensação proporcional à diferença entre elas, permitindo uma comparação estatística direta. Experimentos com razão planta:solvente de 0,02 g/mL, 0,06 g/mL e 0,1 g/mL foram multiplicados por 5, 1,667 e 1, respectivamente.

Tabela 4. Planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} aplicado para triagem de variáveis significativas para extração de *teobromina* e de *cafeína de cacau*, e resultados

Experimento	Fatores e níveis ^a						Respostas	
	X1: Tempo (min)	X2: Agitação (rpm)	X3: EtOH em H ₂ O (%) ^b	X4: HCOOH (%)	X5: Temperatura (°C) (5 = 123)	X6: Razão planta/ solvente (g/mL) (6 = -234)	Área do pico a 272 nm ajustada (mA) ^c	
							(Y1) Teobromina	(Y2) Cafeína
1	-1 (10)	-1 (800)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (30)	+1 (0,10)	2.976	347
2	+1 (60)	-1 (800)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (60)	+1 (0,10)	3.873	565
3	-1 (10)	+1 (1400)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (60)	-1 (0,02)	4.610	617
4	+1 (60)	+1 (1400)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (30)	-1 (0,02)	4.730	617
5	-1 (10)	-1 (800)	+1 (50)	-1 (0)	+1 (60)	-1 (0,02)	5.528	1.013
6	+1 (60)	-1 (800)	+1 (50)	-1 (0)	-1 (30)	-1 (0,02)	5.885	956
7	-1 (10)	+1 (1400)	+1 (50)	-1 (0)	-1 (30)	+1 (0,10)	4.512	794
8	+1 (60)	+1 (1400)	+1 (50)	-1 (0)	+1 (60)	+1 (0,10)	5.966	1.047
9	-1 (10)	-1 (800)	-1 (0)	+1 (0,30)	-1 (30)	-1 (0,02)	4.542	594
10	+1 (60)	-1 (800)	-1 (0)	+1 (0,30)	+1 (60)	-1 (0,02)	5.528	729
11	-1 (10)	+1 (1400)	-1 (0)	+1 (0,30)	+1 (60)	+1 (0,10)	3.757	451
12	+1 (60)	+1 (1400)	-1 (0)	+1 (0,30)	-1 (30)	+1 (0,10)	3.133	385
13	-1 (10)	-1 (800)	+1 (50)	+1 (0,30)	+1 (60)	+1 (0,10)	5.486	984
14	+1 (60)	-1 (800)	+1 (50)	+1 (0,30)	-1 (30)	+1 (0,10)	5.399	906
15	-1 (10)	+1 (1400)	+1 (50)	+1 (0,30)	-1 (30)	-1 (0,02)	4.185	775
16	+1 (60)	+1 (1400)	+1 (50)	+1 (0,30)	+1 (60)	-1 (0,02)	6.480	1.003
PC 1 ^d	0 (35)	0 (1100)	0 (25)	0 (0,15)	0 (45)	0 (0,06)	5.578	848
PC 2 ^d	0 (35)	0 (1100)	0 (25)	0 (0,15)	0 (45)	0 (0,06)	5.162	811
PC 3 ^d	0 (35)	0 (1100)	0 (25)	0 (0,15)	0 (45)	0 (0,06)	5.139	760
PC 4 ^d	0 (35)	0 (1100)	0 (25)	0 (0,15)	0 (45)	0 (0,06)	5.616	788

^aOs valores codificados são apresentados sem parênteses, enquanto os valores reais correspondentes são indicados entre parênteses. ^bSobre a qual foram adicionados 12 mL de heptano como solvente imiscível; ^cÁreas obtidas para extrações realizadas na razão de 0,02; 0,06 mg de nibs/mL de solvente hidroetanólico foram multiplicadas por fatores de correção 5, 1.667, respectivamente, para que pudessem ser diretamente comparados àquele a 0,10 mg de nibs/mL de solvente hidroetanólico ^dPC: ponto central.

Considerando uma resposta para teobromina e cafeína juntas, quatro variáveis foram estatisticamente significativas: tempo de extração (x_1), % de EtOH em H₂O (x_3), temperatura da extração (x_5) e razão planta:solvente hidroetanólico (x_6); ao nível de confiança de 95% com p-valores de 0.02954, 0.00001, 0.0035 e 0.01011, respectivamente.

Em seguida, essas quatro variáveis significativas foram inseridas em um DCCR (Tabela 5) para obtenção de um modelo matemático. As variáveis não significativas x_2 (agitação) e x_4 (HCOOH) foram fixadas nos pontos mínimos, 800 rpm e 0% de HCOOH, respectivamente, afim de reduzir energia e solvente utilizados no processo, indo ao encontro dos princípios da química verde. Assim como no planejamento fatorial fracionado, as áreas obtidas para os picos de teobromina e cafeína de diferentes razões planta/solvente foram multiplicadas para se igualarem a razão de 0,10 g/mL para que pudessem ser comparadas entre si (Tabela 5).

Tabela 5. Planejamento central composite rotatable design aplicado para otimização de extração de *teobromina* e de *cafeína de cacau*, e resultados.^{a)}

Experimento	X1: Tempo (min)	X2: EtOH em H ₂ O (%)	X3: Temperatura (°C)	X4: Razão planta/solvente (g/mL)	Área ajustada de acordo com fator de correção (mA) ^{a)}	
					Teobromina	Cafeína
1	-1 (22,5)	-1 (15)	-1 (37,5)	-1 (0,04)	4.691	777
2	+1 (47,5)	-1 (15)	-1 (37,5)	-1 (0,04)	4.680	768
3	-1 (22,5)	+1 (45)	-1 (37,5)	-1 (0,04)	5.657	1.077
4	+1 (47,5)	+1 (45)	-1 (37,5)	-1 (0,04)	5.798	1.059
5	-1 (22,5)	-1 (15)	+1 (52,5)	-1 (0,04)	4.636	766
6	+1 (47,5)	-1 (15)	+1 (52,5)	-1 (0,04)	4.751	772
7	-1 (22,5)	+1 (45)	+1 (52,5)	-1 (0,04)	5.630	1.023
8	+1 (47,5)	+1 (45)	+1 (52,5)	-1 (0,04)	5.419	1.006
9	-1 (22,5)	-1 (15)	-1 (37,5)	+1 (0,08)	3.916	636
10	+1 (47,5)	-1 (15)	-1 (37,5)	+1 (0,08)	4.094	644
11	-1 (22,5)	+1 (45)	-1 (37,5)	+1 (0,08)	5.123	1.005
12	+1 (47,5)	+1 (45)	-1 (37,5)	+1 (0,08)	5.144	973
13	-1 (22,5)	-1 (15)	+1 (52,5)	+1 (0,08)	4.142	652
14	+1 (47,5)	-1 (15)	+1 (52,5)	+1 (0,08)	4.494	718
15	-1 (22,5)	+1 (45)	+1 (52,5)	+1 (0,08)	5.375	998
16	+1 (47,5)	+1 (45)	+1 (52,5)	+1 (0,08)	5.183	999
17	-2 (10)	0 (30)	0 (45)	0 (0,06)	5.143	890
18	+2 (60)	0 (30)	0 (45)	0 (0,06)	5.017	895
19	0 (35)	-2 (0)	0 (45)	0 (0,06)	3.992	567
20	0 (35)	+2 (60)	0 (45)	0 (0,06)	4.963	994
21	0 (35)	0 (30)	-2 (30)	0 (0,06)	5.049	857
22	0 (35)	0 (30)	+2 (60)	0 (0,06)	5.282	943
23	0 (35)	0 (30)	0 (45)	-2 (0,02)	5.560	1.041
24	0 (35)	0 (30)	0 (45)	+2 (0,10)	4.532	781
PC 1 ^{a)}	0 (35)	0 (30)	0 (45)	0 (0,06)	5.339	916
PC 2 ^{a)}	0 (35)	0 (30)	0 (45)	0 (0,06)	5.168	913
PC 3 ^{a)}	0 (35)	0 (30)	0 (45)	0 (0,06)	4.896	904
PC 4 ^{a)}	0 (35)	0 (30)	0 (45)	0 (0,06)	5.088	910

^{a)}Áreas obtidas para extrações realizadas na razão de 0,02; 0,06 mg de *nibs*/mL de solvente hidroetanólico foram multiplicadas por fatores de correção 5, 1.667, respectivamente, para que pudessem ser diretamente comparados àquele a 0,10 mg de *nibs*/mL de solvente hidroetanólico ^{b)}PC: ponto central.

A partir da execução do planejamento DCCR (Tabela 5), os seguintes modelos matemáticos com níveis de confiança de 90% foram obtidos para as áreas dos picos de teobromina ($R^2 = 0,8844$) e cafeína ($R^2 = 0,9457$), conforme as Eqs. (2) e (3):

$$y_1 = 5091,89 + 411,19x_2 - 243,66x_4 - 159,37x_2^2 \quad (\text{Equação 2})$$

$$y_1 = 901,38 + 135,94x_2 - 47,93x_4 - 31,58x_2^2 \quad (\text{Equação 3})$$

A partir das equações obtidas, uma extração ótima para teobromina (Eq. 2) seria atingida com x_2 (EtOH em H₂O) em aproximadamente 49,4% (+1,29) e x_4 (razão planta/solvente) em 0,02 g/mL (-2). Já para cafeína (Eq. 3), o ponto ótimo de extração seria com x_2 (EtOH em H₂O) em 60% (+2) e x_4 (razão planta/solvente) em 0,02 g/mL (-2). Em ambas a razão planta/solvente indicada foi de 0,02 g/mL em relação à fase hidroetanólica (e sempre adicionando 12 mL de heptano como solvente imiscível).

Adicionalmente, um modelo com 98% de desejabilidade indicou como condição compromisso para a extração de ambas as metilxantinas usando uma solução com 52% de EtOH em H₂O.

Então, foram realizadas extrações em triplicatas com estas três soluções hidroetanólicas, além da 45% de EtOH em H₂O, porcentagem dos experimentos 3 e 4 do DCCR original, que levaram aos melhores valores (Tabela 5). Em todos estes casos, a razão planta/solvente de 0,02 mg/mL indicada pelos modelos matemáticos (Eqs. 2 e 3) foi adotada. As variáveis não significativas, tempo de extração (x_1) e temperatura (x_3), foram fixadas em 35 min e 45 °C (pontos centrais das variáveis). Os resultados são demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados de extrações de teobromina e de cafeína com % de EtOH em H₂O indicadas como ótimas pelos modelos, bem como com aquela que levou aos melhores valores (45%) no DCCR original.

Etanol em H ₂ O (%)	Amostra	Área lida a 272 nm (mA)	
		Teobromina	Cafeína
45	1	1.194	230
	2	1.162	229
	3	1.115	211
	Média	1.157,09	223,30
	DP	39,63	10,52
	DPR	3,43	4,71
49	1	1.098	217
	2	1.103	203
	3	1.110	219
	Média	1.103,62	213,34
	DP	5,95	8,83
	DPR	0,54	4,14
52	1	1.131	214
	2	1.052	193
	3	1.222	229
	Média	1.135,02	211,81
	DP	85,18	17,60
	DPR	7,50	8,31
60	1	1.078	218
	2	1.117	231
	3	1.232	221
	Média	1.141,97	223,35
	DP	79,93	6,97
	DPR	7,00	3,12

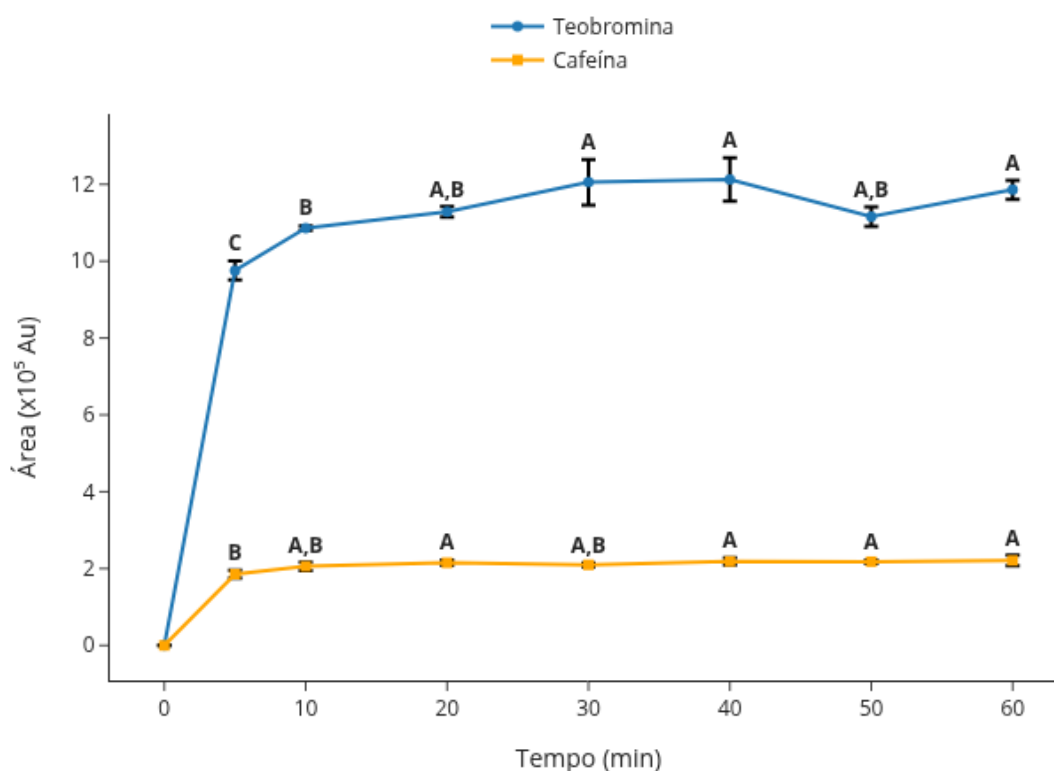
Parâmetros fixados: 0,02 g/mL, 35 min., 45 °C, 800 rpm e 12 mL de heptano como solvente imiscível

Uma ANOVA com 95% de confiança não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os experimentos da Tabela 6. Então, optou-se por 45% EtOH em H₂O por ser aquele que levou à maior média de área para

teobromina e, ao mesmo tempo, empregando a menor quantidade de EtOH, com potencial para elevar o caráter verde do novo procedimento.

Finalmente, como a variável tempo de extração não se mostrou significativa na faixa de valores adotada (10 a 60 min - Tabela 6), sendo este um parâmetro de alto impacto em sample *throughput* e ambiental do método, decidiu-se checar se seria possível diminuir ainda mais o tempo de extração. Para isso foi realizado um teste de cinética de extração, analisando a área dos picos de teobromina e cafeína como resposta. Os resultados podem ser observados na Figura 1.

Figura 1. Curvas cinéticas para extração por maceração dinâmica de teobromina (azul) e cafeína (laranja) a partir de amostras de *nibs* de cacau. A mesma letra em diferentes pontos da curva indica que não houve variações estatisticamente significativas entre os diferentes tempos de extração para aquele composto. Os extratos foram preparados em triplicata, onde 0,08 g de *nibs* foram extraídos com 4 mL de EtOH-H₂O 45:55 (v/v) e 12 mL de n-heptano, a 45 °C e 800 rpm.



Para a teobromina, uma ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0.05$) indicou que as melhores extrações foram obtidas entre 20 min. e 60 min., não havendo diferenças significativas neste intervalo. Já para a cafeína, as melhores extrações foram obtidas entre 10 e 60 min. Estes resultados indicam que uma extração entre 20 e 60 min. levaria à máxima extração de ambos os compostos, ou seja, que o tempo de extração poderia ser reduzido a 20 min. sem perda de eficiência de extração dos dois metabólitos-alvo simultaneamente.

3.1.2 Comparação da etapa de preparação de amostras do novo procedimento com a do método de referência

Então, a eficiência do novo procedimento de preparação de amostras foi comparada àquela do AOAC 980.14, tanto para amêndoas de cacau como para chocolates. Para se permitir uma análise direta entre os métodos sob comparação em termos de áreas de picos de teobromina e de cafeína, evitando conclusões errôneas devido a diferentes proporções massa/solvente empregadas neles, foram adotadas as seguintes estratégias: a) os extratos de amêndoas obtidos pelo novo procedimento, na razão da massa de matriz sólida pelo volume de solvente extrator hidroetanólico (0,02 g/mL), foram filtrados e diluídos com o mesmo solvente hidroetanólico de extração até 0,006 g/mL, a mesma do método de referência; b) para amostras de chocolate, menos ricas em teobromina e cafeína, as extrações com o novo procedimento foram realizadas mantendo-se a proporção 0,045 g/mL do método de referência. Nesta etapa comparativa entre procedimentos de preparação de amostra, todas as análises por HPLC-UV foram feitas de acordo com AOAC official method 980.14. Os resultados completos são mostrados na Tabela 7, e sumarizados na Figura 2.

Tabela 7. Áreas dos picos de teobromina e de cafeína obtidas pelo procedimento de preparação de amostras aqui proposto e de acordo com o método AOAC 980.14 ^a

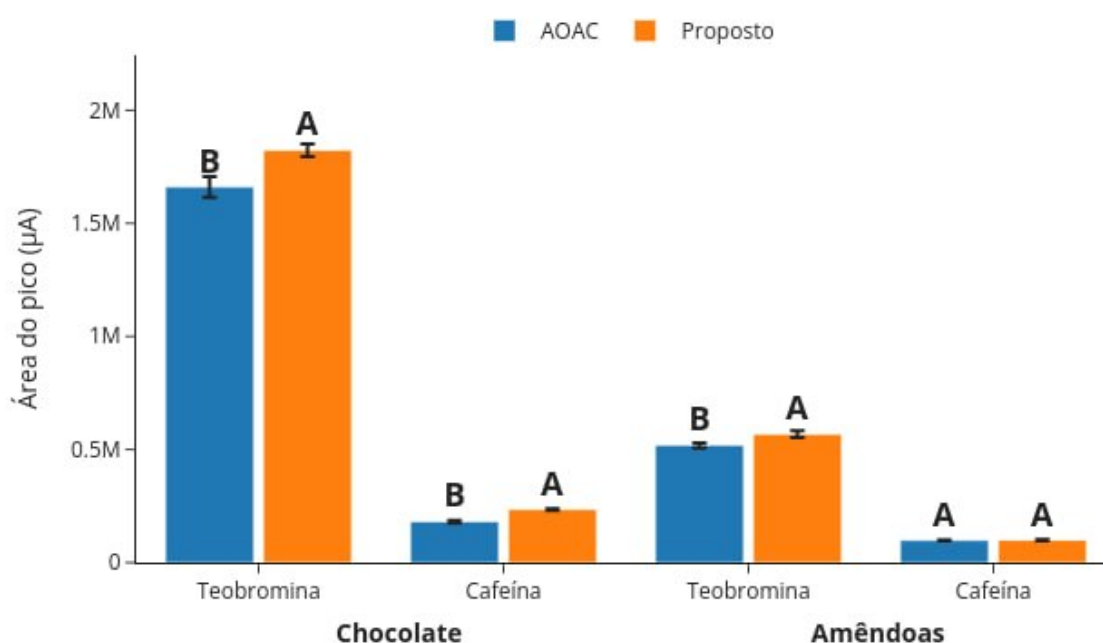
Amostra	Preparação de amostra	Amostra	Área a 272 nm (mA)	
			Teobromina	Cafeína
Chocolate	AOAC 980.14	AOAC 1	1.701	186
		AOAC 2	1.610	174
		AOAC 3	1.669	182
		Média	1.659,91	180,74
		DP	46,21	5,94
		DPR	2,78	3,29
	Proposto	Proposto 1	1.849	238
		Proposto 2	1.827	237
		Proposto 3	1.793	229
		Média	1.822,99	234,50
		DP	28,16	4,66
		DPR	1,54	1,99
Amêndoas	AOAC 980.14	AOAC 1	1.701	186
		AOAC 2	1.610	174
		AOAC 3	1.669	182
		Média	1.659,91	180,74
		DP	46,21	5,94
		DPR	2,78	3,29
	Proposto	Proposto 1	1.849	238
		Proposto 2	1.827	237
		Proposto 3	1.793	229
		Média	1.822,99	234,50
		DP	28,16	4,66
		DPR	1,54	1,99

^aTodas as medidas apresentadas nesta tabela foram obtidas com o método HPLC-UV AOAC 980.14 (coluna SHIM-PACK UC-X RP C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm; fase móvel a 1 mL/min.).

Foram realizados testes t de student para comparar as áreas médias de teobromina e cafeína extraídas de chocolate e amêndoas de acordo com o método de extração realizado. Os resultados podem ser visualizados na Figura 2. O procedimento aqui proposto foi estatisticamente superior para ambos os compostos

extraídos do chocolate. Já para as amêndoas, foi superior para teobromina e cafeína, sem diferença significativa para cafeína. Em suma, o método proposto apresentou um desempenho de extração maior dos compostos em relação ao método da AOAC.

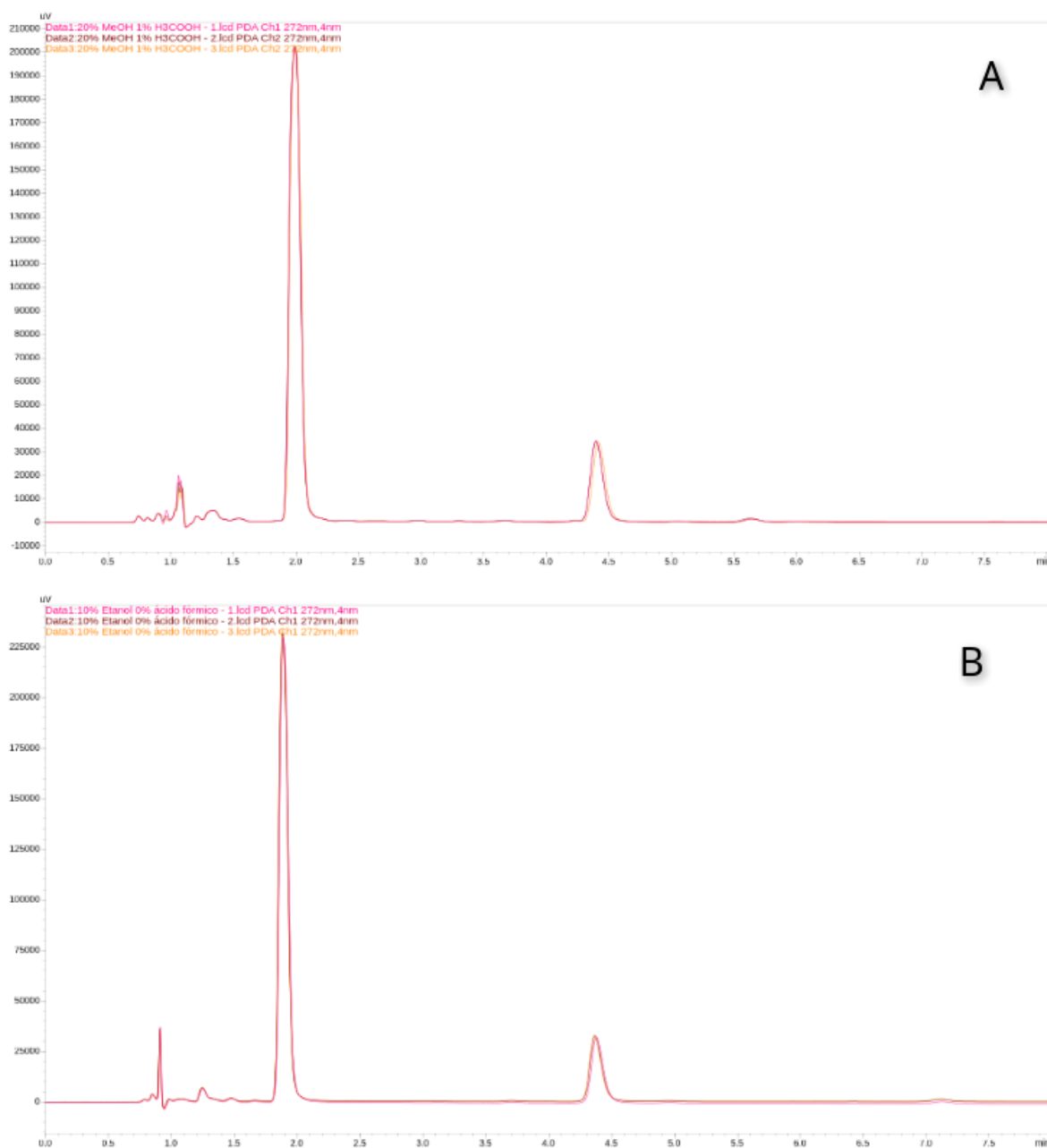
Figura 2. Comparação entre o procedimento proposto para preparação da amostra e o do método oficial AOAC 980.14. Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (teste t de Student, $p < 0,05$).



3.1.2 Desenvolvimento da etapa de análise das amostras por UHPLC-PDA/UV

Nesta fase, buscou-se avançar ainda mais na sustentabilidade de um procedimento completo para quantificação de teobromina e de cafeína em cacau e derivados, incluindo a etapa de análise das amostras preparadas por cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria UV. Inicialmente, procedeu-se à transposição das condições HPLC-UV do método AOAC 980.14 para UHPLC-UV, pois a miniaturização desta etapa reduziria o consumo dos componentes da fase móvel e o tempo de análise, aumentando a eficiência. Os cromatogramas resultantes podem ser vistos na Figura 3A.

Figura 3. Cromatogramas UHPLC-PDA/UV a 272 nm de 1,5 μ L de extrato EtOH-H₂O 45:55 (v/v) de *nibs* de cacau desengordurado, em triplicata. *Scale down* de coluna HPLC para UHPLC. Coluna Luna omega PS C18 100 x 2,1 mm, 1,6 μ L (Phenomenex, EUA) a 30 °C. Fase móvel: A) MeOH-H₂O-CH₃OOH 20:79:1 (v/v/v) a 0,27 mL/min; B) EtOH:H₂O 1:9 (v/v) a 0,3 mL/min.



Em seguida, as possibilidades de substituição de MeOH por um solvente orgânico de menor toxicidade e de redução ou eliminação de CH₃COOH na fase móvel foram investigadas. Um planejamento DCCR foi empregado, tendo-se como

fatores % EtOH (x_1) e de HCOOH (x_2) nas fases móveis. A resposta monitorada foi a resolução entre os picos de teobromina e cafeína. Os experimentos e suas respectivas respostas são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Planejamento DCCR aplicado para otimização de separação de *teobromina e de cafeína de cacau* por UHPLC-PAD/UV, e resultados.

Corrida	Fatores e níveis		Resposta
	X1: EtOH na fase móvel (%)	X2: HCOOH em água (%)	Resolução entre teobromina e cafeína a 272 nm
1	-1 (12,9)	-1 (0,06)	12,11
2	+1 (27,1)	-1 (0,06)	3,61
3	-1 (12,9)	+1 (0,34)	12,01
4	+1 (27,1)	+1 (0,34)	3,55
5	-1,414 (10)	0 (0,2)	15,79
6	+1,414 (30)	0 (0,2)	2,85
7	0 (20)	-1,414 (0)	6,61
8	0 (20)	+1,414 (0,4)	6,30
PC 1	0 (20)	0 (0,2)	6,08
PC 3	0 (20)	0 (0,2)	6,45
PC 2	0 (20)	0 (0,2)	6,41
PC 4	0 (20)	0 (0,2)	6,41

Fixados: vazão de 0,3 mL/min., temperatura de análise de 30 °C, volume de injeção 1,5 µL de um extrato de nibs obtido segundo procedimento otimizado.

A partir da execução deste planejamento CCDR (Tabela 6), obteve-se o seguinte modelo matemático (Eq. 4), com 95% de confiança para a significância dos coeficientes de regressão e R^2 de 99,78%:

$$y_1 = 6,36 - 4,40x_1 + 1.47x_1^2 \quad (\text{Equação 4})$$

De acordo com o modelo, para maximizar a resolução entre teobromina e cafeína (y), a variável x_1 deveria ser 10% EtOH (-1,414). A variável x_2 não foi estatisticamente significativa ($p = 0.3209$), sendo assim, a porcentagem de ácido fórmico na fase móvel pode ser fixada em 0% (-1,414) sem perda estatisticamente significativa na resolução entre os picos. Assim, em concordância com os preceitos da química verde, a redução do uso de solventes levou a uma melhora no desempenho do método. A resolução prevista para essas condições foi de 15,62. Sendo assim, o experimento 5 da Tabela 8 foi repetido em triplicata, levando a uma média de resolução de $16,25 \pm 0,03$.

Neste ponto, cabe apontar que todos os experimentos do planejamento levaram a uma resolução maior que 1,5 para os picos de teobromina e de cafeína, demonstrando a grande seletividade de um sistema baseado em uma fase estacionária C18 com fase móvel composta por EtOH e H₂O para este par de compostos. Contudo, um exame detalhado indicou que apenas a fase móvel com 10% de EtOH levou à separação entre estes dois componentes e interferentes da amostra (veja seletividade, em validação do método), condição necessária para quantificação de compostos sem valores sub ou superestimados. Os cromatogramas resultantes são mostrados na Figura 3B, podendo ser comparados com aqueles obtidos pela AOAC escalada para UHPLC da Figura 3A.

Foram observados picos ligeiramente mais finos à meia altura ($W_{0,5}$) para o método aqui desenvolvido em relação ao de referência escalonado para UHPLC, ao passo que o fator de encaudamento a 5% de altura ($T_{0,05}$) foi ligeiramente inferior para o segundo. Em ambos os casos, foram obtidos $T_{0,05} \leq 1,3$, indicando a robustez necessária a métodos quantitativos (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. Comparação entre a separação de acordo com AOAC em HPLC, AOAC escalonada para UHPLC-UV e a separação proposta por UHPLC-UV para teobromina.

Método	Injeção	Tr (min)	Área do pico (mA)	Largura 50% (min)	Fator de encaudamento a 5%	Nº de picos na deconvolução
AOAC HPLC (Amêndoas)	1	4,16	510	0,19	1,27	1
	2	4,15	530	0,19	1,27	1
	3	4,16	514	0,19	1,27	1
	Média	4,16	517,93	0,19	1,27	1
	DP	0,00	10,62	0,00	0,00	0,00
	DPR	0,11	2,05	0,00	0,27	0,00
AOAC escalonado para UHPLC (nibs)	1	1,99	1.480	0,10	1,15	1
	2	1,99	1.326	0,10	1,15	1
	3	2,00	1.321	0,10	1,14	1
	Média	1,99	1.376,02	0,10	1,15	1
	DP	0,00	90,42	0,00	0,01	0,00
	DPR	0,21	6,57	0,57	0,56	0,00
Proposto para UHPLC (nibs)	1	1,89	1.190	0,08	1,24	1
	2	1,89	1.184	0,08	1,25	1
	3	1,89	1.189	0,08	1,25	1
	Média	1,89	1.187,61	0,08	1,25	1
	DP	0,00	3,39	0,00	0,01	0,00
	DPR	0,20	0,29	0,00	0,41	0,00

Tabela 10. Comparação entre a separação de acordo com AOAC em HPLC, AOAC escalonada para UHPLC-UV e a separação proposta por UHPLC-UV para cafeína.

Método	Injeção	Tr (min)	Área do pico (mÅ)	Largura 50% (min)	Fator de encaudamento a 5%	Nº de picos na deconvolução
AOAC HPLC (Amêndoas)	1	7,92	96	0,30	1,09	1
	2	7,90	98	0,30	1,09	1
	3	7,91	99	0,30	1,09	1
	Média	7,91	97,80	0,30	1,09	1
	DP	0,01	1,77	0,00	0,00	0,00
	DPR	0,16	1,81	0,00	0,28	0,00
AOAC escalonado para UHPLC (nibs)	1	4,40	266	0,11	1,25	2
	2	4,40	263	0,11	1,25	2
	3	4,42	246	0,11	1,24	2
	Média	4,40	258,54	0,11	1,25	2
	DP	0,01	10,99	0,00	0,01	0
	DPR	0,24	4,25	0,00	0,58	0
Proposto para UHPLC (nibs)	1	4,38	225	0,10	1,30	1
	2	4,37	224	0,10	1,31	1
	3	4,36	224	0,10	1,30	1
	Média	4,37	224,39	0,10	1,30	1
	DP	0,01	0,56	0,00	0,00	0
	DPR	0,20	0,25	0,56	0,35	0

Os cromatogramas de cada procedimento podem ser visualizados na Figura 4, 5 e 6, assim como as deconvoluções de teobromina e cafeína e seus respectivos espectros UV.

Figura 4. Cromatograma de amêndoas obtido por SHIM-PACK UC-X RP C18, 250 x 4.6 mm 5 μ m, modo isocrático (MeOH-H₂O-CH₃OOH 20:79:1 (v/v/v) a 1 mL/min. A) Deconvolução do pico de teobromina. B) Espectro UV do pico deconvoluído da teobromina. C) Deconvolução do pico de cafeína. D) Espectro UV do pico deconvoluído da cafeína.

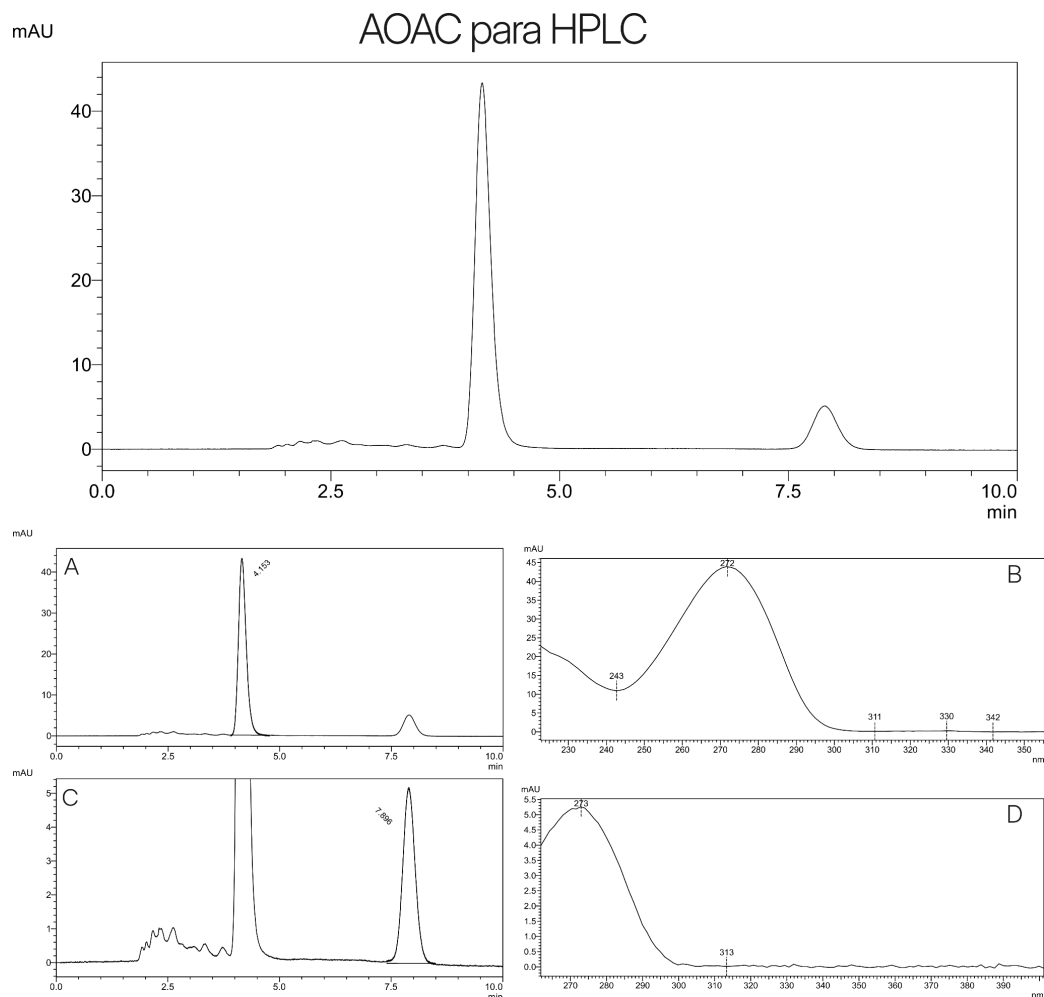


Figura 5. Cromatograma de *nibs* obtido por Luna Omega PS C18 100 × 2,1 mm, 1,6 µm a 0,27 mL/min, modo isocrático (MeOH-H₂O-CH₃OOH 20:79:1 (v/v/v)). A) Deconvolução do pico de teobromina. B) Espectro UV do pico deconvoluído da teobromina. C) Deconvolução do pico de cafeína. D) Espectro UV do pico deconvoluído da cafeína.

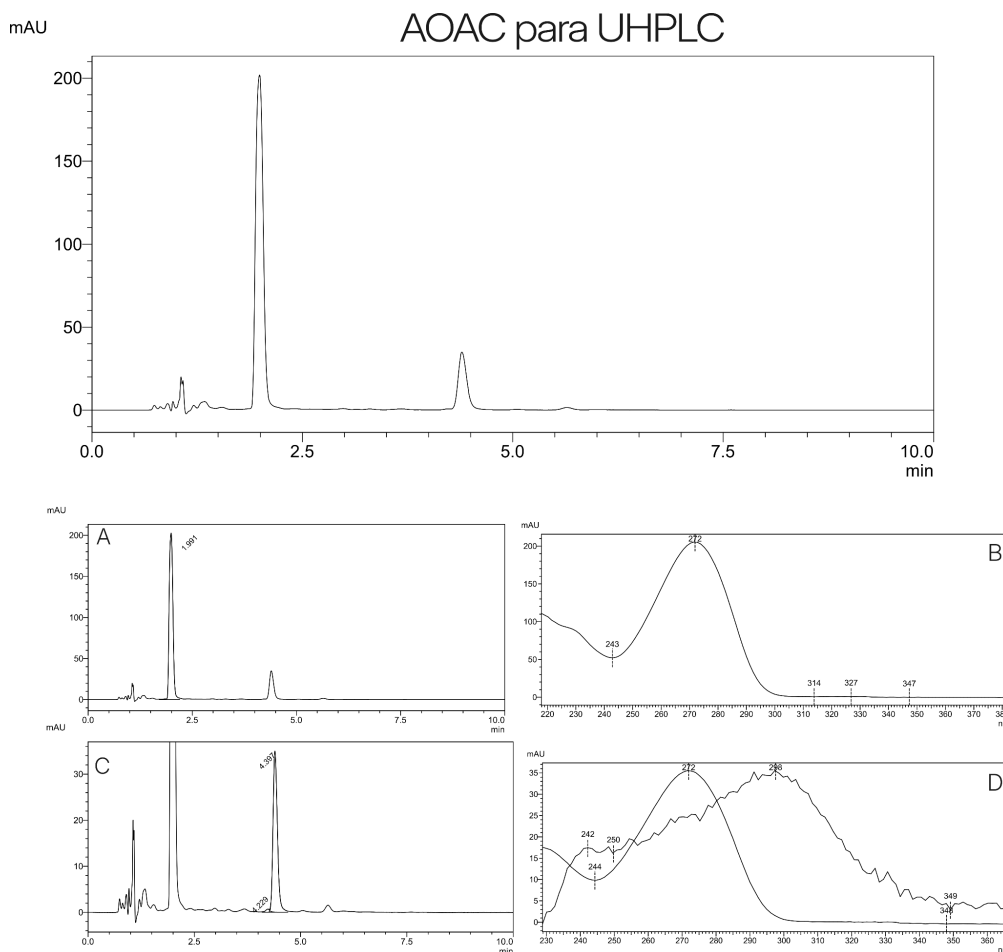
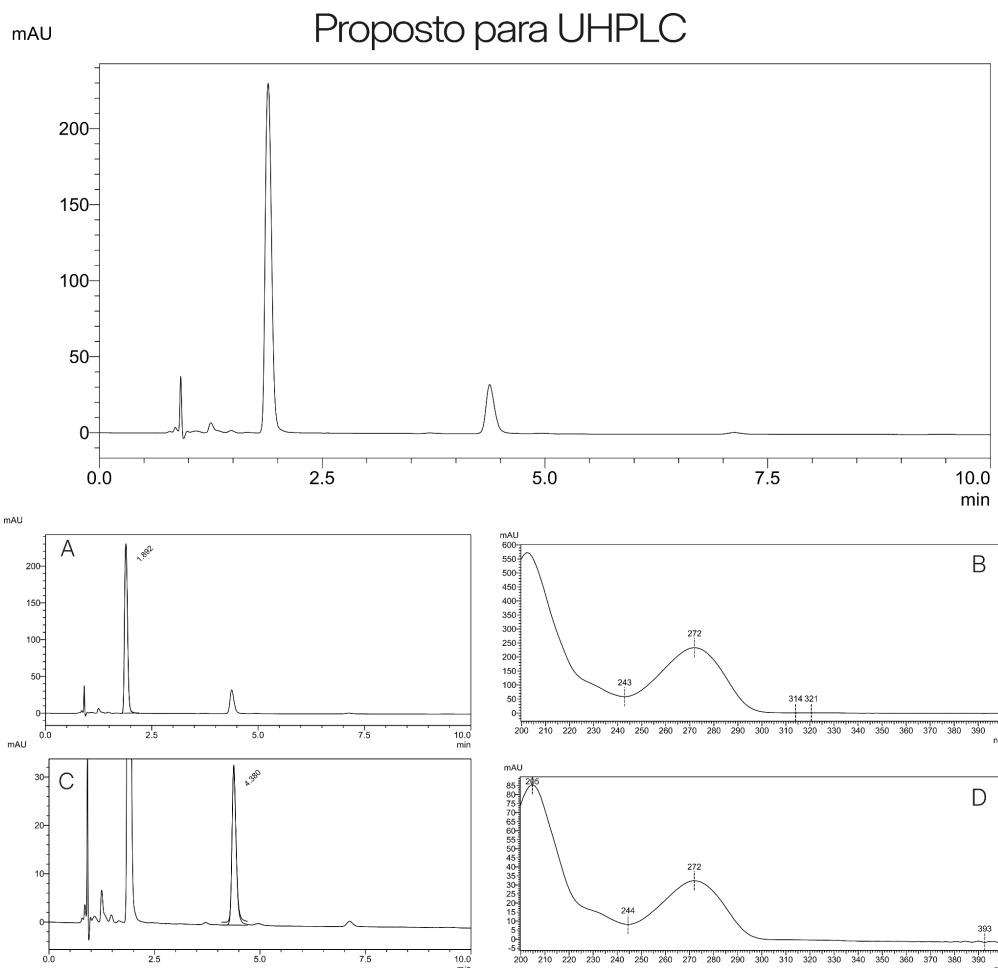


Figura 6. Cromatograma de *nibs* obtido por Luna Omega PS C18 100 × 2,1 mm, 1,6 µm a 0,3 mL/min, modo isocrático (10% EtOH em H₂O). A) Deconvolução do pico de teobromina. B) Espectro UV do pico deconvolvido da teobromina. C) Deconvolução do pico de cafeína. D) Espectro UV do pico deconvolvido da cafeína.

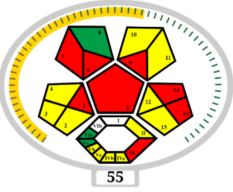


3.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCEDIMENTOS COMPLETOS, DESDE A PREPARAÇÃO DA AMOSTRA ATÉ A ANÁLISE POR UHPLC-PDA.

O novo procedimento analítico completo, desde a preparação da amostra até a separação, foi comparado ao método de referência (AOAC 980.14) a partir de parâmetros ambientais e tradicionais. As métricas de avaliação de impacto ambiental de métodos analíticos empregadas foram Analytical GREENness Calculator (AGREE) e Complex Modified GAPI (ComplexMoGAPI), desenvolvido a partir do ComplexGAPI. A Tabela 11 resume os resultados obtidos, bem como evidencia os prós e contras de cada método. As tabelas B1 e B2 do Anexo B

fornece informações detalhadas acerca das métricas AGREE e ComplexMoGAPI, respectivamente.

Tabela 11. Comparação entre o procedimento proposto e o método oficial AOAC 980.14, abrangendo desde a preparação da amostra até a separação de teobromina e cafeína.

Método	Energia (KWh)	AGREE	Complex MoGAPI	Vantagens	Desvantagens
AOAC 980.14	0,053			1. Método de separação isocrático. 2. Método oficial.	1. Uso de solventes tóxicos (hexano e MeOH). 2. Extração com várias etapas.
Proposto	0,014			1. Método de separação isocrático 2. Menor número de passos para preparação de amostras. 3. Menor quantidade de amostra utilizada 4. Uso de solventes de baixa toxicidade 5. Várias extrações concomitantes.	1. Necessidade de uma bomba que suporte até 60 MPa de pressão.

3.3 VALIDAÇÃO DO NOVO PROCEDIMENTO COMPLETO

Em todas as etapas da validação, monitorou-se tanto o tempo de retenção como a área dos picos de teobromina e de cafeína. Os desvios-padrão relativos foram medidos e reportados.

3.3.1 Precisão

3.3.1.1 Repetibilidade

A repetibilidade do procedimento foi avaliada em etapas consecutivas. A primeira etapa consistiu em dez injeções consecutivas de um mesmo extrato. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Precisão instrumental UHPLC-PDA (dez injeções consecutivas do mesmo extrato)

Corrida	Teobromina		Cafeína	
	Tr (min)	Área a 272 nm (mA)	Tr (min)	Área a 272 nm (mA)
1	1,85	1.216	4,28	224
2	1,85	1.146	4,28	227
3	1,85	1.220	4,29	228
4	1,85	1.153	4,29	228
5	1,85	1.150	4,29	228
6	1,85	1.222	4,29	227
7	1,85	1.151	4,29	227
8	1,85	1.189	4,29	228
9	1,85	1.192	4,29	228
10	1,85	1.185	4,28	228
Média	1,85	1.182,29	4,29	227,04
DP	0,00	30,68	0,00	1,23
DPR	0,07	2,59	0,07	0,54

Na segunda etapa, um mesmo analista preparou quatro extratos por dia e os analisou por UHPLC-UV durante três dias consecutivos. Os resultados são sumarizados na Tabela 13, como precisão intra-dias e precisão inter-dias .

Tabela 13. Precisão intra-dias e inter-dias.

Dia	Corrida	Teobromina		Cafeína	
		Tr (min)	Área a 272 nm (mÅ)	Tr (min)	Área a 272 nm (mÅ)
1	1	1,81	1.288	4,15	235
	2	1,81	1.247	4,15	214
	3	1,81	1.249	4,16	227
	4	1,89	1.186	4,43	236
	Média	1,83	1.242,40	4,22	228,16
	DP	0,04	42,30	0,14	10,06
	DPR	2,07	3,40	3,29	4,41
2	1	1,89	1.329	4,44	252
	2	1,89	1.261	4,43	238
	3	1,88	1.147	4,42	224
	4	1,89	1.265	4,43	246
	Média	1,89	1.250,41	4,43	239,85
	DP	0,00	75,73	0,01	12,05
	DPR	0,16	6,06	0,19	5,02
3	1	1,89	1.319	4,44	247
	2	1,89	1.517	4,44	218
	3	1,89	1.459	4,44	252
	4	1,89	1.353	4,43	241
	Média	1,89	1.412,01	4,44	239,34
	DP	0,00	92,05	0,00	15,10
	DPR	0,03	6,52	0,06	6,31
1-3	Média	1,87	1.301,61	4,36	235,78
	DP	0,04	104,99	0,13	12,69
	DPR	1,88	8,07	2,94	5,38

3.3.1.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi estimada variando os seguintes parâmetros em um mesmo laboratório: analista (3), dias diferentes (intervalo de 5 dias) e lotes de EtOH diferentes, conforme Tabela 14.

Tabela 14. Precisão intermediária

Dia	Analista	Lote do etanol	Corrida	Teobromina		Cafeína	
				Tr (min)	Área a 272 nm (mA)	Tr (min)	Área a 272 nm (mA)
1	MGAS	I1174427 144	1	1,81	1.288	4,15	235
			2	1,81	1.247	4,15	214
			3	1,81	1.249	4,16	227
			4	1,89	1.186	4,43	236
			Média	1,83	1.242,40	4,22	228,16
			DP	0,04	42,30	0,14	10,06
			DPR	2,07	3,40	3,29	4,41
4	LOS	I1174427 144	1	1,89	1.230	4,45	217
			2	1,90	1.345	4,46	236
			3	1,90	1.292	4,46	227
			4	1,90	1.225	4,46	253
			Média	1,90	1.272,90	4,45	233,22
			DP	0,00	56,99	0,00	15,62
			DPR	0,07	4,48	0,06	6,70
5	MKL	I1144827 119	1	1,89	1.357	4,44	220
			2	1,90	1.152	4,44	199
			3	1,90	1.170	4,45	219
			4	1,89	1.194	4,44	217
			Média	1,89	1.218,30	4,44	213,67
			DP	0,00	94,11	0,00	10,18
			DPR	0,13	7,72	0,09	4,76
Todos os dias, analistas e lotes de etanol			Média	1,87	1.244,53	4,37	225,02
			DP	0,04	65,83	0,13	14,05
			DPR	1,98	5,29	3,04	6,24

Considerando-se todo o conjunto de experimentos para se avaliar a precisão do novo procedimento, os maiores DPR foram observados para áreas de teobromina e de cafeína, respectivamente (8,07 e 5,38% - Tabela 13). Considerando-se a complexidade da amostra, estes valores são plenamente satisfatórios ($DPR \leq 10\%$ para área de pico).

3.3.2 Linearidade, Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Devido à natureza da matriz (*nibs* de cacau e chocolates), não foi possível obter um branco de amostra isento de teobromina e cafeína. De acordo com a EURACHEM, neste caso, a calibração pode ser realizada em solvente ou em branco do procedimento, desde que os efeitos de matriz sejam avaliados e a recuperação seja determinada. Assim, a linearidade foi avaliada por meio de curvas preparadas no branco do procedimento, de 0,00047 a 0,8000 mg/mL para teobromina (16 níveis) e 0,00073 a 0,212000 mg/mL para cafeína (11 níveis). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram baseados no desvio padrão do intercepto, em curva de 6 níveis, entre 0,0001 e 0,0013 mg/mL para teobromina e 0,000200 e 0,002783 mg/mL.

As faixas lineares validadas foram estabelecidas desde o limite de quantificação (LOQ) até o nível de calibração mais alto, correspondendo a 0,00047–0,80000 mg mL⁻¹ para a teobromina e 0,00073–0,21200 mg mL⁻¹ para a cafeína. Os coeficientes de determinação foram 0,9995 e 0,9997, respectivamente, indicando excelente linearidade na faixa de trabalho (Tabela 15).

Tabela 15. Linearidade e sensibilidade para os padrões de teobromina e cafeína.

Composto	Faixa de linearidade (mg/mL)	Equação	R ²	LOD S/N ≥ 3 (mg/mL)	LOQ S/N ≥ 10 (mg/mL)
Teobromina	0,00047 - 0,80000	$6,71 \times 10^6 x + 3439,40$	0,9995	0,00016	0,00047
Cafeína	0,00073 - 0,21200	$5,82 \times 10^6 x - 504,53$	0,9997	0,00024	0,00073

3.3.3 Efeito Matriz

Para a curva em matriz, alíquotas do extrato hidroetanólico de *nibs* (matriz real) foram fortificadas na proporção 1:1 (v/v), nos níveis baixo, médio e alto, em triplicata (Tabela 16).

Tabela 16. Efeito matriz

Nível	Teobromina		Cafeína	
	Concentração Adicionada (mg/mL)	Área do pico em extrato fortificado 1:1 (mA) ^a	Concentração Adicionada (mg/mL)	Área do pico em extrato fortificado 1:1 (mA) ^a
Baixo	0,021	802,22 ± 12,89	0,006	147,55 ± 1,77
Médio	0,053	1.005,38 ± 7,52	0,014	196,32 ± 3,96
Alto	0,105	1.358,67 ± 13,13	0,028	275,23 ± 2,34

^a Área reportada como Média ± Desvio Padrão das triplicatas

Então, o efeito de matriz (ME, em %) foi calculado pela razão entre as inclinações das curvas em matriz e em solvente, segundo a equação 5:

$$ME (\%) = \left[\left(\frac{b_{matriz}}{b_{solvente}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde b_{matriz} e $b_{solvente}$ são os coeficientes angulares das curvas em matriz e em solvente, respectivamente.

Para a teobromina, obtiveram-se $b_{matriz} = 6.640.786,93$ e $b_{solvente} = 6.848.328,52$ resultando em $ME = -3,03\%$. Para cafeína, $b_{matriz} = 5.784.970,43$ e $b_{solvente} = 5.850.242,77$ com $ME = -1,12\%$. Esses resultados indicam supressão de sinal abaixo de 10%, ou seja, demonstram que os componentes da matriz do cacau não afetam significativamente a resposta do detector, corroborando o uso da calibração baseada em solvente.

3.3.4 Exatidão e viés (veracidade) por ensaios de recuperação

Visto que não estavam disponíveis materiais de referência certificados nem amostras de branco de matriz, as matrizes reais (*nibs*) foram fortificadas com soluções de teobromina e cafeína antes do processo de extração, em níveis baixo, médio e alto, em quadruplicata (Tabelas 17 e 18). As recuperações e vieses foram calculados de acordo com as equações 6 e 7, respectivamente.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{A_{\text{fortificada}} - A_{\text{nativa}}}{A_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

$$\text{Viés (\%)} = \text{Recuperação} - 100 \quad (\text{Equação 7})$$

As recuperações obtidas para teobromina variaram de 92,26% a 103,29% (vieses de 3,29 a 12,86%), enquanto para cafeína variaram de 86,55% a 95,23% (vieses -13,45 a -4,77%). A recuperação ligeiramente inferior observada para a cafeína pode ser atribuída à sua menor concentração nativa na matriz do cacau e à incerteza cumulativa associada à subtração do fundo. Considerando os níveis de concentração envolvidos e a aplicação pretendida, esses valores demonstram precisão satisfatória do método, de acordo com os princípios de adequação à finalidade.

Tabela 17. Teste de recuperação para teobromina.

Nível	Corrida	Área lida a 272 nm (mA)			Recuperação (%)	Viés (%)
		Fortificada	Nativa	Adicionada		
Baixo (0,03 mg/mL)	1	1.464	1.329	216	92,26	-7,74
	2	1.481	1.261	217		
	3	1.400	1.147	218		
	4	1.459	1.265	218		
	Média	1.451,08	1.250,41	217,51		
	DP	35,47	75,73	0,89		
	DPR	2,44	6,06	0,41		
Médio (0,08 mg/mL)	1	1.828	1.329	562	112,86	12,86
	2	1.806	1.261	562		
	3	1.956	1.147	562		
	4	1.954	1.265	567		
	Média	1.886,06	1.250,41	563,23		
	DP	80,13	75,73	2,42		
	DPR	4,25	6,06	0,43		
Alto (0,15 mg/mL)	1	2.325	1.329	1.050	103,29	3,29
	2	2.418	1.261	1.055		
	3	2.331	1.147	1.053		
	4	2.282	1.265	1.058		
	Média	2.338,98	1.250,41	1.053,93		
	DP	57,22	75,73	3,53		
	DPR	2,45	6,06	0,34		

Tabela 18. Teste de recuperação para cafeína.

Nível	Corrida	Área lida a 272 nm (mA)			Recuperação (%)	Viés (%)
		Fortificada	Nativa	Adicionada		
Baixo (0,008 mg/mL)	1	287	252	48	86,55	-13,45
	2	289	238	49		
	3	276	224	49		
	4	276	246	48		
	Média	281,70	239,85	48,36		
	DP	7,02	12,05	0,49		
	DPR	2,49	5,02	1,01		
Médio (0,021 mg/mL)	1	349	252	127	89,99	-10,01
	2	346	238	127		
	3	362	224	127		
	4	361	246	128		
	Média	354,47	239,85	127,37		
	DP	7,69	12,05	0,56		
	DPR	2,17	5,02	0,44		
Alto (0,040 mg/mL)	1	468	252	239	95,23	-4,77
	2	449	238	241		
	3	479	224	241		
	4	479	246	241		
	Média	468,62	239,85	240,21		
	DP	14,19	12,05	0,85		
	DPR	3,03	5,02	0,35		

3.3.5 Seletividade e Especificidade

Para atestar a seletividade/especificidade do método, foi preparada uma solução próxima ao LOQ da teobromina (0,00047 mg/mL) e cafeína (0,00073 mg/mL), uma solução 10xLOQ (0,0047 e 0,0073 mg/mL, respectivamente) e analisadas em triplicata. Para efeito de comparação, foi realizada uma extração de *nibs* utilizando a solução próxima ao LOQ como solução extratora. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19. Teste de seletividade

Amostra	Teobromina		Cafeína	
	Tr	Área (mA)	Tr	Área (mA)
LOQ				
1	1,93	3,45	4,59	4,08
2	1,93	3,52	4,58	4,22
3	1,94	3,53	4,59	4,15
Média	1,93	3,50	4,59	4,15
DP	0,00	0,05	0,00	0,07
DPR	0,13	1,36	0,06	1,72
10xLOQ				
1	1,95	37,86	4,64	48,84
2	1,95	37,69	4,64	48,68
3	1,95	37,59	4,64	48,39
Média	1,95	37,72	4,64	48,64
DP	0,00	0,14	0,00	0,23
DPR	0,03	0,37	0,05	0,48
Nibs+LOQ				
1	1,93	1.162,92	4,57	216,36
2	1,93	1.259,77	4,58	226,12
3	1,93	1.291,93	4,57	234,52
Média	1,93	1.238,21	4,57	225,67
DP	0,00	67,15	0,00	9,09
DPR	0,13	5,42	0,05	4,03

Foi realizada a análise dos cromatogramas UV e massas, e espectros de massas de cada amostra constatando que não houve coeluição dos picos de teobromina e cafeína. Os cromatogramas e espectros de massas representativos de 10xLOQ e *nibs* podem ser visualizados nas Figura 7 e 8.

Figura 7. Representações de amostra 10xLOQ: A) Cromatograma UV; B) Cromatograma de massas modo positivo; C) Espectro de massas da teobromina; e, D) Espectro de massas da cafeína.

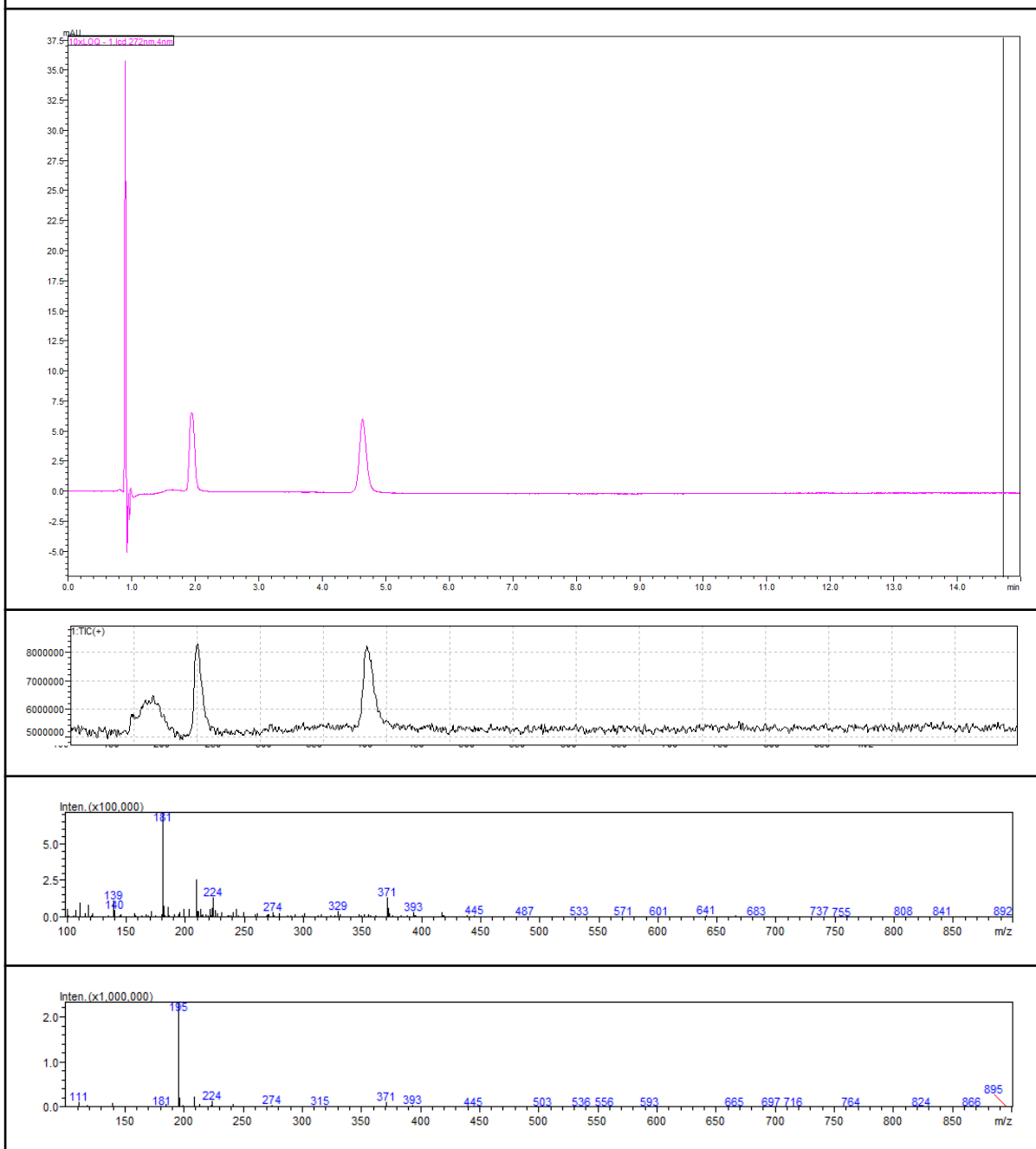
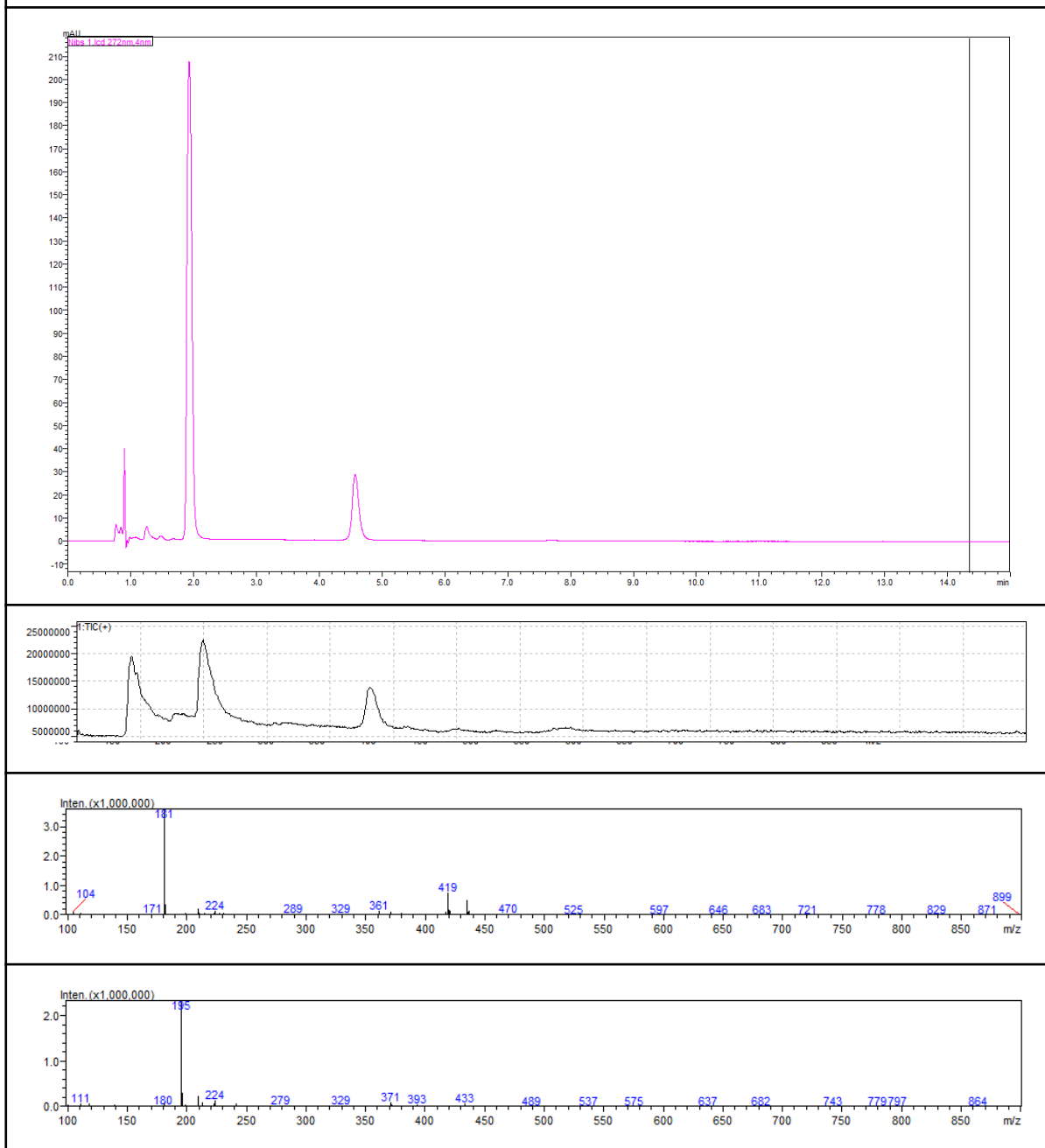


Figura 8. Representações de amostra *nibs*: A) Cromatograma UV; B) Cromatograma de massas modo positivo; C) Espectro de massas da teobromina; e, D) Espectro de massas da cafeína.



3.3.5 Estabilidade das amostras

Três extratos foram preparados e analisados nos tempos 0, 24, 36 e 72 h. Os extratos foram mantidos no escuro (no amostrador automático do UHPLC). O maior DPR observado foi para a área de teobromina, sendo de 6,08% (Tabela 20), ou seja, menor que a precisão interdias do método (Tabela 12), indicando alta

estabilidade de teobromina e de cafeína, por até 72 h, em extrato preparado nas condições otimizadas neste trabalho.

Tabela 20. Teste de estabilidade

Data	Corrida	Teobromina		Cafeína	
		Tr (min)	Área a 272 nm (mA)	Tr (min)	Área a 272 nm (mA)
03/02/2026 (0 h)	1	1,89	1.329	4,44	252
	2	1,89	1.261	4,43	238
	3	1,88	1.147	4,42	224
	4	1,89	1.265	4,43	246
	Média	1,89	1.250,41	4,43	239,85
	DP	0,00	75,73	0,01	12,05
	DPR	0,16	6,06	0,19	5,02
04/02/2026 (24 h)	1	1,89	1.408	4,43	250
	2	1,89	1.322	4,43	236
	3	1,89	1.189	4,43	226
	4	1,89	1.355	4,44	244
	Média	1,89	1.318,45	4,43	238,79
	DP	0,00	93,19	0,00	10,34
	DPR	0,12	7,07	0,08	4,33
05/02/2026 (48 h)	1	1,89	1.393	4,45	251
	2	1,90	1.302	4,45	237
	3	1,89	1.194	4,45	224
	4	1,89	1.300	4,45	243
	Média	1,89	1.296,89	4,45	238,99
	DP	0,00	81,43	0,00	11,53
	DPR	0,07	6,28	0,07	4,82
06/02/2026 (72 h)	1	1,89	1.367	4,42	252
	2	1,89	1.292	4,42	237
	3	1,88	1.183	4,42	227
	4	1,89	1.334	4,42	247
	Média	1,89	1.294,12	4,42	240,65
	DP	0,00	80,04	0,00	10,99
	DPR	0,07	6,18	0,07	4,57
Todos os dias	Média	1,89	1.289,97	4,43	239,57
	DP	0,00	78,37	0,01	10,09
	DPR	0,19	6,08	0,29	4,21

3.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE NIBS, AMÊNDOAS E CHOCOLATES

Após a etapa de validação, o procedimento analítico foi aplicado em *nibs*, sementes, cacau em pó e chocolate. A quantificação foi calculada de acordo com as curvas de calibração utilizando as seguintes faixas de concentração: 0,01050 - 0,42000 mg/mL para teobromina e 0,002783 - 0,11130 mg/mL para cafeína, conforme Tabela 21.

Tabela 21. Curva de calibração para os padrões de teobromina e cafeína

Composto	Faixa de trabalho (mg/mL)	Equação	R ²
Teobromina	0,01050 - 0,42000	$6.684.464,71x + 4877,65$	0,99995
Cafeína	0,002783 - 0,11130	$5.771.956,67x - 115,13$	0,99996

Os chocolates analisados foram: ao leite e intenso (acima de 40% de cacau). Os *nibs* analisados foram orgânicos ou convencionais, sendo eles do Pará, Bahia, São Paulo ou sem localização indicada pelo fabricante. Já as sementes provenientes do estado de São Paulo são: secas sem fermentação e torradas após a fermentação. Os resultados das quantificações estão dispostos na Tabela 22.

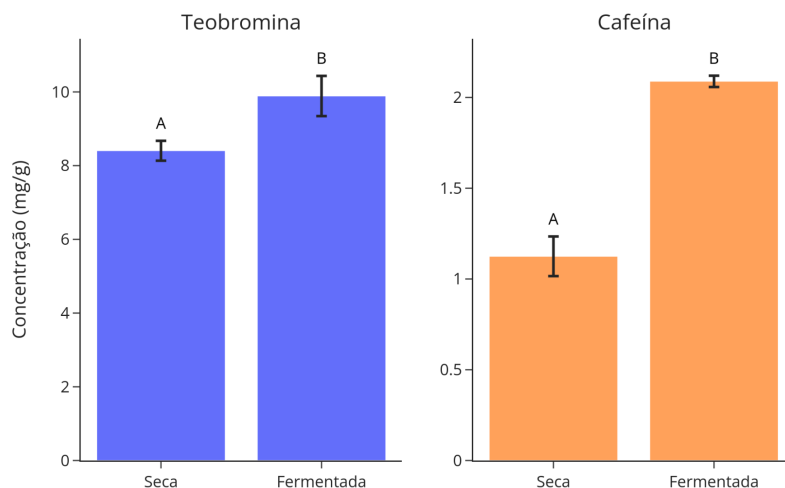
Tabela 22. Quantificação de teobromina e cafeína em diferentes amostras de chocolate, *nibs*, pó e semente de cacau.

Chocolate		
Amostra	Teobromina^a	Cafeína^a
Chocolate ao leite 01	1,721 ± 0,022	0,281 ± 0,006
Chocolate Ao Leite 02	2,005 ± 0,026	0,306 ± 0,002
Chocolate Ao Leite 03	1,711 ± 0,025	0,298 ± 0,004
Chocolate Ao Leite 04	1,548 ± 0,050	0,213 ± 0,009
Chocolate Intenso 01	4,204 ± 0,146	0,572 ± 0,007
Chocolate Intenso 02	5,332 ± 0,028	0,694 ± 0,022
Chocolate Intenso 03	4,703 ± 0,068	0,837 ± 0,011
Chocolate Intenso 04	6,025 ± 0,048	0,856 ± 0,002
Chocolate Intenso 05	5,726 ± 0,028	0,996 ± 0,025
Nibs		
Nibs Orgânico BA 01	13,059 ± 0,112	2,129 ± 0,112
Nibs Orgânico BA 02	12,512 ± 0,283	2,118 ± 0,073
Nibs Orgânico BA 03	13,331 ± 0,313	2,150 ± 0,088
Nibs Orgânico PA 01	12,704 ± 0,469	1,166 ± 0,079
Nibs Orgânico PA 02	12,271 ± 0,649	1,439 ± 0,058
Nibs Convencional BA 01	12,705 ± 0,113	1,860 ± 0,095
Nibs Convencional SP 01	9,439 ± 0,700	2,095 ± 0,123
Nibs Convencional SL 01	12,232 ± 0,974	2,158 ± 0,383
Pó de cacau		
Pó de cacau Convencional SL 01	7,676 ± 0,101	1,063 ± 0,034
Pó de cacau Orgânico BA 01	7,433 ± 0,305	1,008 ± 0,048
Sementes		
Semente seca	8,405 ± 0,269	1,125 ± 0,109
Semente fermentada	9,889 ± 0,545	2,089 ± 0,031

^a Valores reportados como Média ± DP das triplicatas

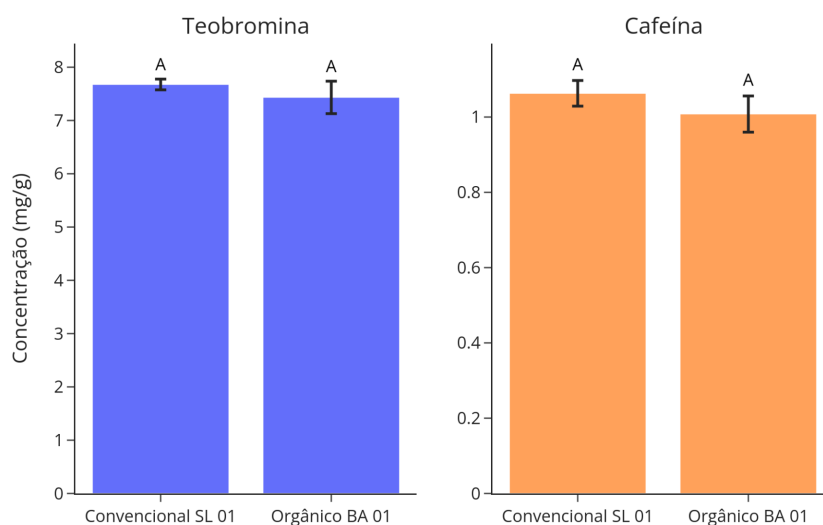
De maneira geral, as concentrações médias de teobromina variam de 1,55 - 13,33 mg/g, e a cafeína 0,21 - 12,16 mg/g. Os *nibs* de cacau apresentam maiores concentrações dos compostos, o pó apresenta concentrações intermediárias, enquanto as menores concentrações são encontradas em

Figura 10. Amostras de sementes de cacau analisadas UHPLC-PDA, representadas por média das áreas dos picos de teobromina e cafeína lidos a 272 nm. As diferenças estatísticas significativas para cada composto estão representadas por letras diferentes sobre as barras (teste de Tukey, $p < 0,05$).



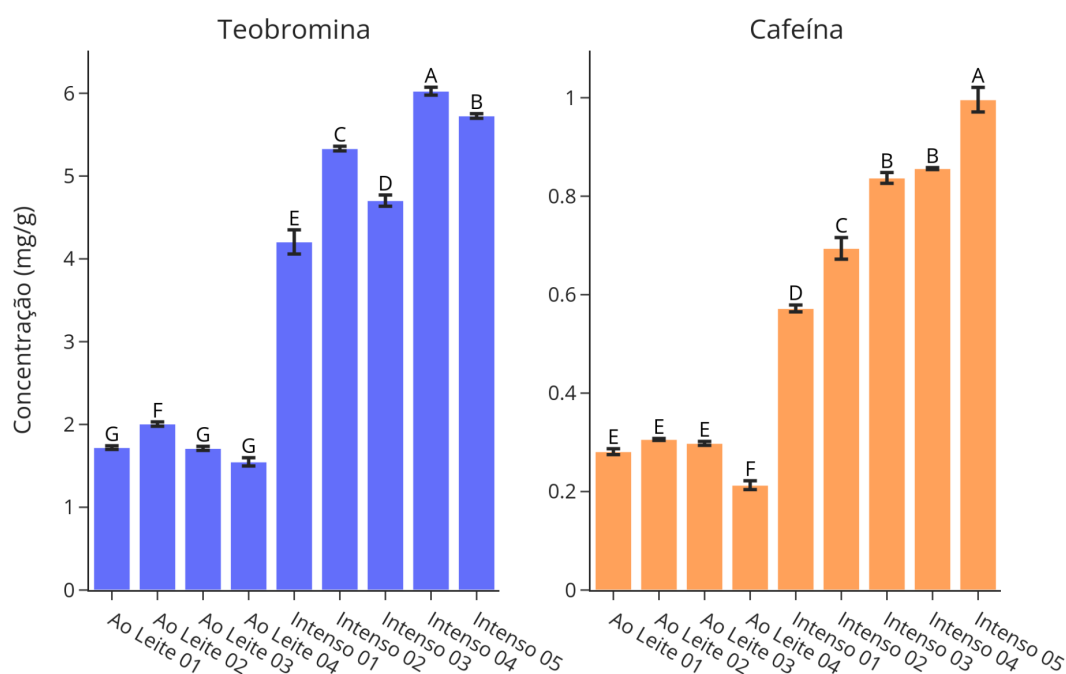
As amostras de cacau em pó (Figura 11) apresentaram valores similares tanto para teobromina, quanto para cafeína, não havendo diferença estatística significativa de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 11. Amostras de pó de cacau analisadas UHPLC-PDA, representadas por média das áreas dos picos de teobromina e cafeína lidos a 272 nm. As diferenças estatísticas significativas para cada composto estão representadas por letras diferentes sobre as barras (teste de Tukey, $p < 0,05$).



Nos chocolates, as menores concentrações de teobromina e cafeína encontradas foram em chocolates ao leite (1,55 mg/g e 0,213 mg/g, respectivamente) e as maiores em chocolates meio amargo (6,03 mg/g e 1 mg/g, respectivamente). No Brasil, chocolate é definido como uma mistura de ingredientes com no mínimo 25% de sólidos de cacau (liquor, massa de cacau, cacau em pó ou manteiga de cacau)^{27,28}. Não há uma definição para chocolate meio amargo, embora nos últimos anos esses chocolates tenham maior teor de cacau²⁷. Visto isso, é esperado que chocolates intensos apresentem maiores concentrações de teobromina e cafeína devido ao maior teor de cacau em sua formulação. Houve maior variação entre as amostras de chocolate que as outras analisadas. De maneira geral, é possível observar maior similaridade entre os chocolates ao leite, tanto para teobromina, quanto para cafeína, conforme Figura 12.

Figura 12. Amostras de chocolate analisadas UHPLC-PDA, representadas por média das áreas dos picos de teobromina e cafeína lidos a 272 nm. As diferenças estatísticas significativas para cada composto estão representadas por letras diferentes sobre as barras (teste de Tukey, $p < 0,05$).



4 CONCLUSÃO

O trabalho foi guiado pelos princípios da química verde, buscando, principalmente, minimizar o número de experimentos realizados por meio de planejamento de experimentos e substituir solventes tradicionais por solventes verdes. Foram propostos procedimentos de extração e separação de cacau alternativos ao método oficial AOAC 980.14. Ao comparar com a metodologia oficial, tanto o procedimento de extração, quanto a separação proposta se mostraram eficientes, com menor consumo de solvente, menor tempo de extração e menor impacto ambiental. O procedimento completo pôde ser aplicado a diferentes amostras relacionadas ao cacau, como sementes, *nibs*, pós e chocolates, totalizando 21 amostras comerciais quantificadas, nas quais foi possível observar concentrações de teobromina entre 1,55 - 13,33 mg/g, e a cafeína 0,21 - 12,16 mg/g. O trabalho mostrou que é possível utilizar técnicas de alto desempenho, utilizando solventes verdes (etanol e água), com tempo de extração e número de etapas reduzidos para analisar cacau e seus produtos e derivados.

Declaração sobre o uso de IA generativa e tecnologias assistidas por IA no processo de escrita

Durante a preparação deste trabalho, os autores utilizaram Grammarly, Gemini e ChatGPT para melhorar a legibilidade e a linguagem do manuscrito. Após a utilização dessas ferramentas, os autores revisaram o conteúdo conforme necessário e assumem total responsabilidade pelo conteúdo do artigo publicado.

REFERÊNCIAS

1. Colli-Silva, M.; Pirani, J.R.; Fernandes-Júnior, A.J. *Theobroma in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23617>>. Acesso em: 26 mar. 2026.
2. MAR, Josiana Moreira et al. Theobroma spp.: A review of it's chemical and innovation potential for the food industry. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100683, jun. 2024.
3. MAPA. **Inovações tecnológicas no cultivo e exploração do cacaueiro**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2025. Disponível em: <<https://repositorio-dspace.agricultura.gov.br/handle/1/6058>>.
4. Rocha, L. B. **A Região Cacaueira Da Bahia: Dos Coronéis À Vassoura-De-Bruxa: Saga, Percepção, Representação**. (Editus, 2008).
5. MAPA. **Cacau do Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/outras-publicacoes/cacau-do-brasil-versao-portugues/view>>. Acesso em: 10 mar. 2024.
6. IBGE. **Produção de Cacau**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cacau/br>>. Acesso em: 26 mar. 2026.
7. VIDAL, Maria de Fátima. CACAU: v. 10 n. 389, junho de 2025. **Caderno Setorial ETENE**, Fortaleza, v. 10, 2025. Disponível em: <<https://www.bnb.gov.br/revista/cse/article/view/3211>>. Acesso em: 26 mar. 2026.
8. BORGES, A. V.; MIQUELETTI, F.; STUCCHI NETO, F. Cacau no Estado de São Paulo: implantação e manejo em diferentes modelos de cultivo. **Documento Técnico**., p. 96p., 2022.
9. TOMARU, Júlia Mayumi et al. Beyond Taste: The Impact of Chocolate on Cardiovascular and Steatotic Liver Disease Risk Factors. **Nutrients**, v. 18, n. 4, p. 636, 14 fev. 2026.
10. BALCÁZAR-ZUMAETA, César R. et al. Unveiling the enhanced bioactive and thermal properties of dark chocolates with tropical fruit enrichment. **Applied Food Research**, v. 6, n. 1, p. 101660, jun. 2026.
11. EDO, Great Iruoghene et al. Review on the Biological and Bioactive components of Cocoa (Theobroma Cacao). Insight on Food, Health and Nutrition. **Natural Resources for Human Health**, v. 3, n. 4, p. 426–448, 18 nov. 2023.
12. BRAGAGNOLO, Felipe Sanchez et al. An updated gradient PLE-SPE×HPLC-PDA system for the extraction, concentration, fractionation,

and analysis of valuable compounds from cocoa bean shells. **Food Chemistry**, v. 494, p. 146198, dez. 2025.

13. GONZÁLEZ-NUÑEZ, Leslie N.; CAÑIZARES-MACÍAS, María P. Focused microwaves-assisted extraction of theobromine and caffeine from cacao. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1819–1824, dez. 2011.
14. ALVAREZ-YANAMANGO, Erick; OBREGON, Daniel; IBÁÑEZ, Alfredo. A Comprehensive Review of the Development of Green Extraction Methods and Encapsulation of Theobromine from Cocoa Bean Shells for Nutraceutical Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 17, n. 4, p. 1083–1104, dez. 2025.
15. ZHANG, Mengjuan *et al.* Health benefits and mechanisms of theobromine. **Journal of Functional Foods**, v. 115, p. 106126, abr. 2024.
16. AFZAL, Hafiza-Sara *et al.* Theobromine as a multi-target therapeutic agent: Analgesic, anti-inflammatory, and anti-arthritis potential with network pharmacology insights. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 83, n. 6, p. 1114–1129, nov. 2025.
17. BESSADA, Sílvia M. F.; ALVES, Rita C.; OLIVEIRA, M. Beatriz P. P. Caffeine-based food supplements and beverages: Trends of consumption for performance purposes and safety concerns. **Food Research International**, v. 109, p. 310–319, jul. 2018.
18. LATIMER, George W. (ORG.). Official Methods of Analysis: 22nd Edition (2023). In: **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 22. ed. New York: Oxford University Press, 2023.
19. FUNARI, Cristiano S. *et al.* Reaction of the Phytochemistry Community to Green Chemistry: Insights Obtained Since 1990. **Journal of Natural Products**, v. 86, n. 2, p. 440–459, 24 fev. 2023.
20. PRAT, Denis *et al.* CHEM21 selection guide of classical and less classical-solvents. **Green Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 288–296, 2016.
21. PENA-PEREIRA, Francisco; WOJNOWSKI, Wojciech; TOBISZEWSKI, Marek. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 21 jul. 2020.
22. PŁOTKA-WASYLKA, Justyna; WOJNOWSKI, Wojciech. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. **Green Chemistry**, v. 23, n. 21, p. 8657–8665, 2021.
23. ASSIRATI, Júlia *et al.* A green, simplified, and efficient experimental setup for a high-throughput screening of agri-food by-products – From polar to nonpolar metabolites in sugarcane solid residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1634, p. 461693, dez. 2020.

24. H. Cantwell (ed.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (3rd ed. 2025)
25. BRUNETTO, María Del Rosario et al. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, v. 100, n. 2, p. 459–467, jan. 2007.
26. GUTIÉRREZ, Tomy J. State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 16, n. 6, p. 1313–1344, nov. 2017.
27. GONÇALVES DA SILVA, Karina et al. Isotopic model as a tool for the prediction of cocoa content in cocoa-derived products: $\delta^{13}\text{C}$ as a proxy for cocoa percentage. *Food Control*, v. 183, p. 111945, maio 2026.
28. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 723, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos alimentos para fins especiais. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, ed. 126, p. 238, 6 jul. 2022.

APÊNDICE A - AMOSTRAGEM

Tabela A1. Relação das amostras comerciais analisadas.

	Identificação	Produto	Estado do plantio de cacau	Lote
Nibs	Nibs Orgânico PA 01	Orgânico	Pará	-
	Nibs Orgânico PA 02	Orgânico	Pará	-
	Nibs Orgânico BA 01	Orgânico	Bahia	352252
	Nibs Orgânico BA 02	Orgânico	Bahia	116
	Nibs Orgânico BA 03	Orgânico	Bahia	42025
	Nibs convencional SP 01	Convencional	São Paulo	-
	Nibs Convencional BA 01	Convencional	Bahia	105
	Nibs Convencional SL 01	Convencional	S/L	L49R12V07
Chocolate	Chocolate Intenso 01	Intenso 40%	S/L	CC18025491
	Chocolate Intenso 02	Intenso 70%	S/L	CC29825493
	Chocolate Intenso 03	Orgânico 76%	S/L	L 257605
	Chocolate Intenso 04	Orgânico 81%	S/L	L 702532
	Chocolate Intenso 05	Clássico 70%	S/L	L 258102
	Chocolate Ao Leite 01	Ao leite	S/L	60159265C 4
	Chocolate Ao Leite 02	Ao leite	S/L	CC03526191
	Chocolate Ao Leite 03	Ao leite	S/L	53319265C 1
	Chocolate Ao Leite 04	Ao leite	S/L	L 518812941G1
Pó de cacau	Pó de cacau Orgânico BA 01	Orgânico	Bahia	-
	Pó de cacau Convencional SL 01	Convencional	S/L	L57R01V08
Semente	Semente seca	Seca sem fermentar	São Paulo	-
	Semente fermentada	Seca, fermentada e torrada	São Paulo	-

APÊNDICE B - MÉTRICAS VERDES

Tabela B1. Métricas AGREE aplicadas para o procedimento da AOAC e proposto.

Procedimento	AOAC	Proposto
1. Amostragem	Tratamento externo de amostras com número reduzido de etapas	Tratamento externo de amostras com número reduzido de etapas
2. Quantidade de amostra	1 g	0,08 g
3. Localização da análise	Off-line	Off-line
4. Etapas mais importantes	1. Centrifugação 2. Centrifugação 3. Secagem em banho maria 4. Extração sólido-líquido 5. Centrifugação	1. Extração sólido-líquido 2. Centrifugação
5. Grau de automatização	Semi-automatizado, não miniaturizado	Semi-automatizado, miniaturizado
6. Agente de derivatização	Nenhum	Nenhum
7. Quantidade de resíduo	159 mL (60 mL de éter de petróleo e 99 mL de água)	3 mL de solução hidroetanólica
8.1. Número de analitos	2	2
8.2. Amostra analisada por hora	• 10 minutos centrifugação • 10 minutos centrifugação • 60 minutos secagem • 25 minutos extração • 5 minutos centrifugação • 10 minutos corrida cromatográfica	• 35 minutos extração • 5 minutos centrifugação • 17 minutos corrida cromatográfica

	0,50 amostra/hora	1,05 amostra/hora
8. Técnica mais intensiva em energia	UHPLC	UHPLC
9. Tipos de reagentes	Alguns reagentes são obtidos de fontes renováveis (etanol). Reagentes de fontes não renováveis também são usados (éter de petróleo).	Todos os reagentes são obtidos de fontes renováveis (etanol).
10. O método envolve reagentes tóxicos?	Sim (60 mL de éter de petróleo)	Não
11. Ameaças que não podem ser evitadas	1. Altamente inflamável 2. Tóxico para a vida aquática	1. Altamente inflamável

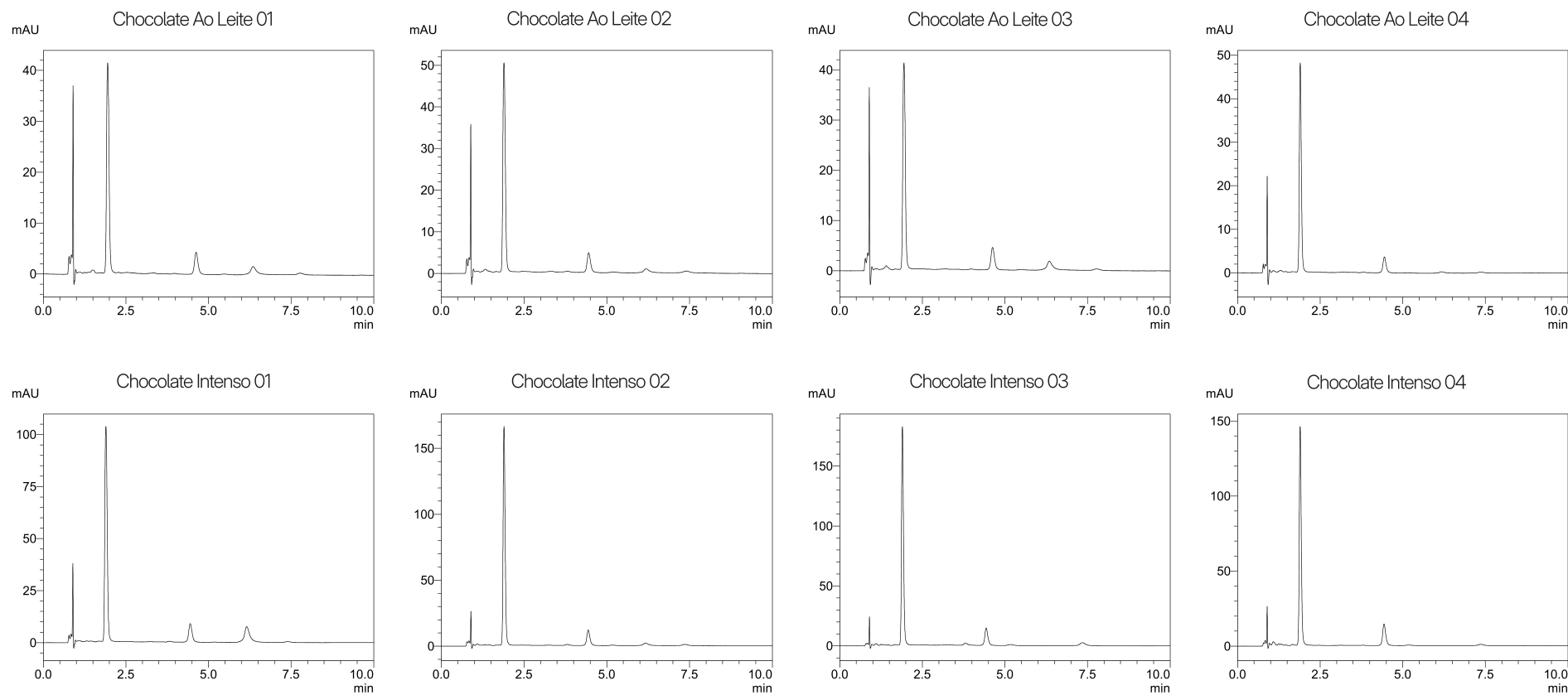
Tabela B2. Métricas do ComplexMoGAPI aplicadas para o procedimento da AOAC e proposto.		
Procedimento	Proposto	AOAC
Preparação da amostra e análise		
1. Coleta	Off-line	Off-line
2. Preservação	Químico ou físico	Químico ou físico
3. Transporte	Necessário	Necessário
4. Armazenamento	Sob condições normais	Sob condições normais
5. Tipo de método	Extração necessária	Extração necessária
6. Escala da extração	Macro-extração	Macro-extração
7. Solventes/Reagentes utilizados	Solventes/reagentes não verdes	Solventes/reagentes verdes
8. Tratamento adicional	Nenhum	Nenhum
Reagentes e Solventes		
9. Quantidade	< 10 mL (< 10 g)	> 100 mL (> 100 g)
10. Risco à saúde	Moderadamente tóxico, pode causar incapacitação temporária; NFPA = 2 ou 3	Moderadamente tóxico, pode causar incapacitação temporária; NFPA = 2 ou 3
11. Risco à segurança	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido
Instrumentação		

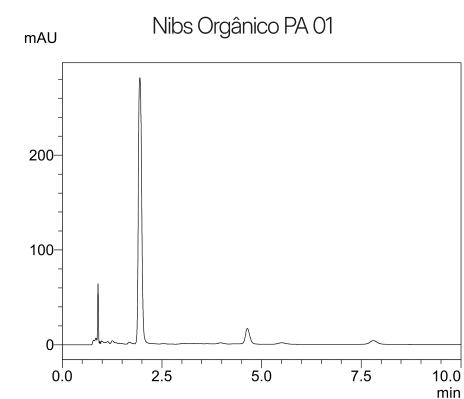
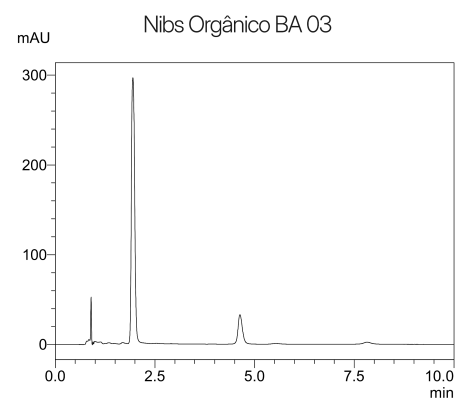
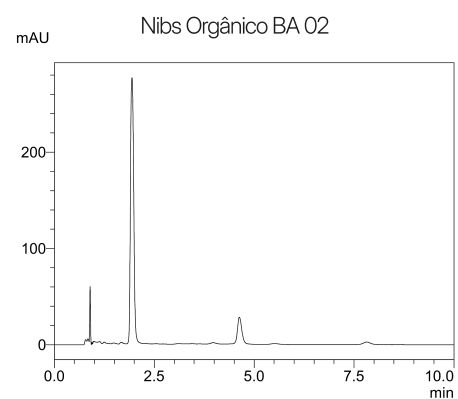
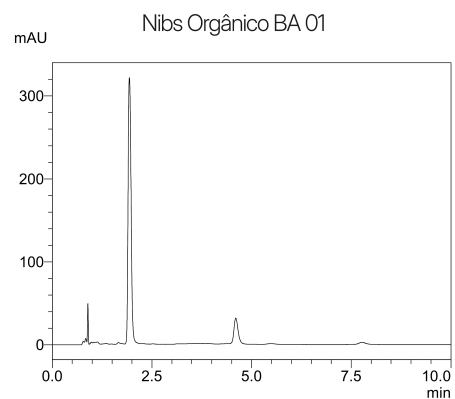
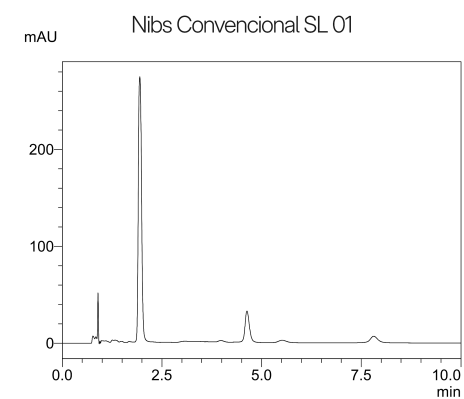
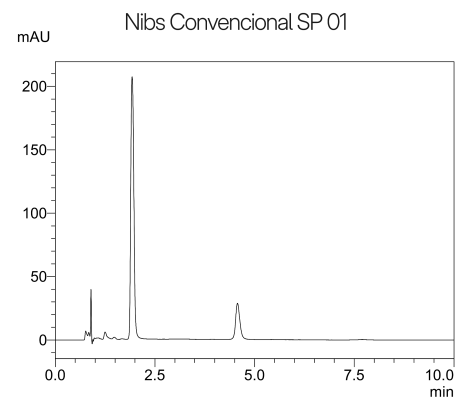
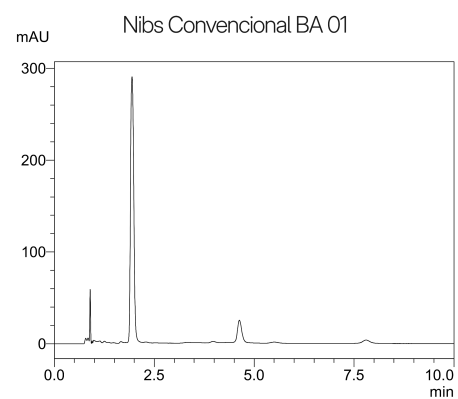
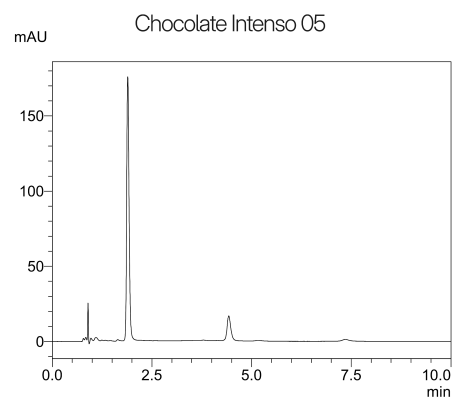
12. Energia	≤ 0.1 kWh per sample	≤ 1.5 kWh per sample
13. Risco ocupacional	Hermetização do processo analítico	Emissão de vapores na atmosfera
14. Resíduo	1 mL - 10 mL (1 - 10 g)	> 10 mL (>10 g)
15. Tratamento do resíduo	Degradação, passivação	Degradação, passivação
Tipo de método		
Tipo de análise	Qualitativo e quantitativo	Qualitativo e quantitativo
Pré-análise		
I. Rendimento	-	-
II. Temperatura/Tempo	Temperatura ambiente, >1 h, Aquecimento, <1 h Resfriamento <0 °C	Temperatura ambiente, >1 h, Aquecimento, <1 h Resfriamento <0 °C
Relação com economia verde		
III. Número de regras atendidas	5-6	1-2
Reagentes e Solventes		
IVb. Risco à saúde	Moderadamente tóxico, pode causa Incapacitação temporária; NFPA = 2 or 3	Moderadamente tóxico, pode causa Incapacitação temporária; NFPA = 2 or 3
IVb. Risco à segurança	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido
Instrumentação		
Va. Configuração técnica	Configuração comum	Configurações adicionais/semi-avançadas

		instrumentos usados
Vb. Energia	≤ 0.1 kWh per sample	≤ 1.5 kWh per sample
Vc. Risco ocupacional	Hermetização do processo analítico	Emissão de vapores na atmosfera
Processamento e purificação		
Vla. Processamento de produtos finais, purificação	Nenhum ou processo simples	Nenhum ou processo simples
Vlb. Pureza	Não aplicado	Não aplicado
E-factor		
VII. E-factor input E-factor = (massa total de resíduo do processo)/(massa de produto total)	-	-

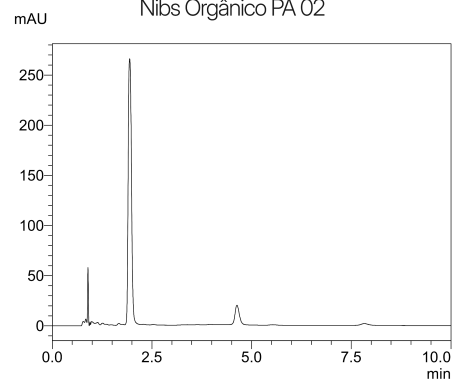
APÊNDICE C - CROMATOGRAMAS

Figura C1. Cromatogramas representativos de cada amostra analisada utilizando os métodos de extração e separação propostos.

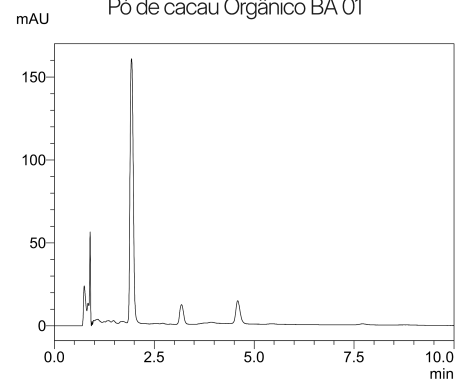




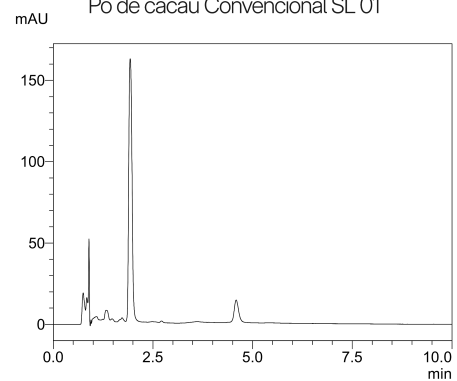
Nibs Orgânico PA 02



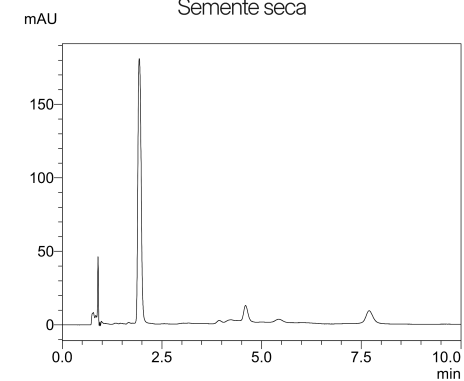
Pó de cacau Orgânico BA 01



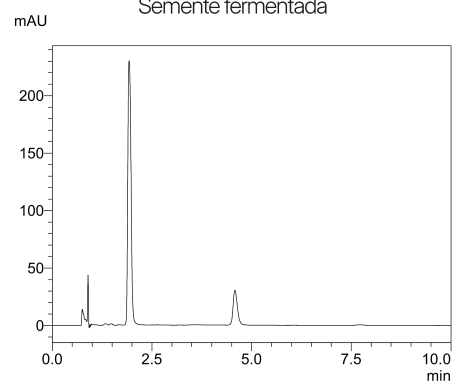
Pó de cacau Convencional SL 01



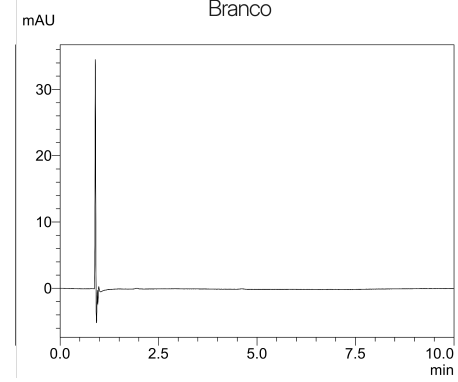
Semente seca



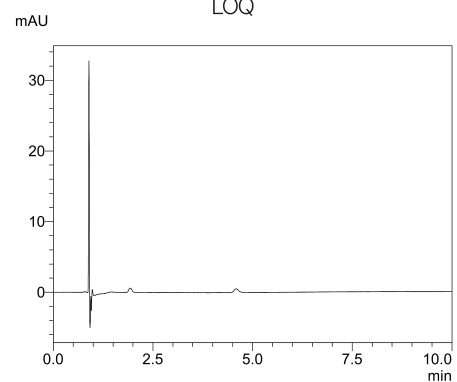
Semente fermentada



Branco



LOQ



10xLOQ

