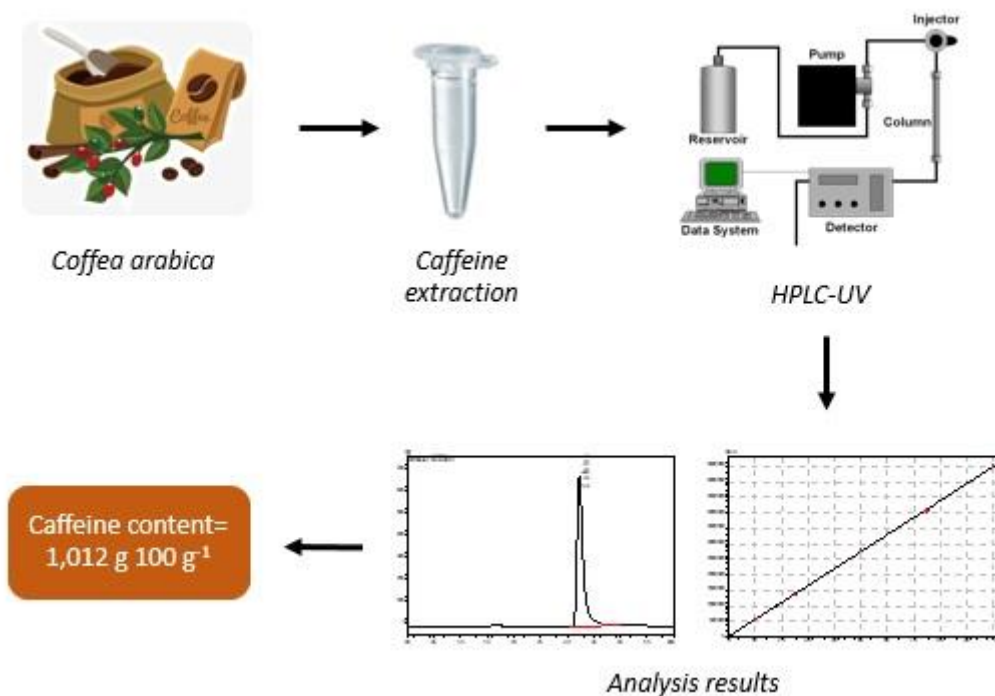


Graphical Abstract



The figure shows the caffeine extraction process and the results obtained after the development and validation of the method for determination of this methylxanthine in HPLC-UV.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM AMOSTRA DE CAFÉ ORGÂNICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Bárbara Aryela Bezerra da Silva Rocha^{a,*}, Maria Rafaella Siqueira de Oliveira e Silva^a e Paula Grazielle Souza da Silva^a, Carlos Eduardo Miranda de Souza^a, Analúcia Guedes Oliveira Cabral^a

^aDepartamento de Farmácia, Centro Universitário Tabosa de Almeida/Asces-Unita, 55016-901 Caruaru – PE, Brasil.

-----*-marque uma alternativa, não apague o texto em azul-*-----

() Manuscrito com material suplementar

(x) Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: barbara.aryela13@gmail.com

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINING CAFFEINE IN ORGANIC COFFEE SAMPLES BY HIGH EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY

The present work consists of the development and validation of analytical method for detection of caffeine in coffee organic by high performance liquid chromatography (HPLC). A solution of water/acetonitrile (85:15 v/v) was used as mobile phase and detection was carried out in the UV. The method validated was specific, linear in the range of 10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r=0.9997948$), precise (CV < 5% for both inter- and intra-assays), accurate (maximum deviation of 101,78%), and robust to the parameters evaluated. The method applied to coffee arabica organic proved to be simple, useful and fast (~5 min) and allowed for determination of caffeine.

Keywords: caffeine; method validation; HPLC.

INTRODUÇÃO

A produção de café no Nordeste brasileiro concentra-se nos estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Alagoas. No Estado de Pernambuco, situa-se a cidade de Taquaritinga do Norte que fica a cerca de 900 metros de altitude proporcionando um clima frio, esta condição favorece o desenvolvimento e produção de café de qualidade para o Estado.

A qualidade do café orgânico de Taquaritinga do Norte e os seus atributos já foram certificados pelo instituto biodinâmico (IBD), sendo também reconhecido pela sua originalidade pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) que atesta que a variedade é remanescente das primeiras mudas de café aportadas no Brasil no ano de 1727. Conforme IAC trata-se de um verdadeiro patrimônio genético e cultural que deve ser preservado e estudado em seu desenvolvimento¹. O conteúdo nutricional do pó de café possui uma grande variedade de minerais, aminoácidos e lipídeos. Além dos nutrientes, o café é rico em compostos bioativos, sendo os mais estudados: a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), Figura 1, estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) e do músculo cardíaco, os ácidos clorogênicos (cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos, feruloilquínicos e p-cumaroilquínicos), que possuem atividade anticancerígena e propriedades antioxidantes, e os diterpenos cafestol e kahweol, relacionados com o metabolismo lipídico (dislipidemias). Estes compostos são os mais estudados devido as repercussões sobre a saúde humana de seus efeitos fisiológicos².

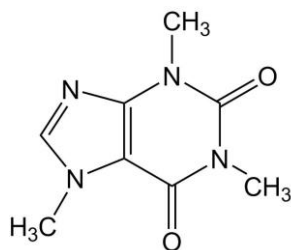


Figura 1. Estrutura química da cafeína

Em face do seu largo espectro de ação fisiológica, existe, de fato, um grande interesse da comunidade científica no estabelecimento de níveis seguros de ingestão de cafeína para diversos subgrupos populacionais humanos. Além disso, a cafeína é uma substância estimulante que pode ser usada indevidamente em atividades esportivas oficiais e, portanto, necessita ser monitorada continuamente durante as competições. Evidentemente o conhecimento das técnicas para análise de cafeína em matrizes alimentícias e fluidos biológicos, bem como suas vantagens e limitações, é um fator primordial para monitorar os níveis de cafeína no organismo³.

Entre as várias técnicas disponíveis para a análise de cafeína em alimentos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido a escolhida. Entre as vantagens desta técnica estão a sensibilidade, especificidade, rapidez e a não necessidade de intensa manipulação da amostra⁴. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2017) CLAE é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica.

Em decorrência da popularidade, alto consumo no Brasil e importância econômica atribuída ao café o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica simples e rápida, que permitisse determinar o teor de cafeína através da CLAE em *Coffea arábica* orgânico cultivado na cidade de Taquaritinga do Norte-PE.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Foram utilizados para as análises o café orgânico (*Coffea arábica*) produzido na cidade de Taquaritinga do Norte (Pernambuco, Brasil) e padrão de cafeína obtida do fornecedor Shandong Xinhua Pharmaceutical, lote 17122118/F1(1). O hidróxido de sódio e de potássio empregados com o objetivo de melhorar a extração da cafeína foram obtidos do fornecedor Merck KGaA.

A água purificada foi obtida através de sistema Milli-Q (Millipore Corporation®). A acetonitrila e o metanol utilizados foram grau CLAE obtidos do fornecedor Merck KGaA. Os demais reagentes utilizados na extração foram de grau analítico: clorofórmio da OmmiSolv e ácido sulfúrico da Vetec.

Equipamento

As análises cromatográficas para quantificação da cafeína foram realizadas utilizando um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com sistema de bombeamento de solventes (duas bombas LC 20AD) e injetor manual SIL com alça de amostragem de 20 µL. Acoplado ao sistema tem-se um detector espectrofotométrico UV-Visível SPD 10A_{VP} conectado a um controlador CBM 20A e software Lab-Solutions versão 3.6.

Para a obtenção das melhores condições cromatográficas foram aplicadas colunas cromatográficas de fase reversa, com tamanho de partículas de 5 µm. Foram analisados o perfis de separação nas colunas C-8: (0,46 x 150 mm) e (4,6 x 250 mm) da marca Shim-Pack e coluna reversa C-18: (0.46 x 150 mm) e (4,6 x 250 mm), da marca Phenomenex. Durante o desenvolvimento do método foram analisadas

nas colunas as separações por troca iônica com fase móvel entre os fluxos de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e 1 mL min^{-1} e solventes acetonitrila:água e metanol:água em variados gradientes e no comprimento de onda de 280 nm.

A identificação da cafeína foi feita no próprio cromatógrafo a líquido, com base no tempo de retenção do soluto eluído na coluna comparado com o do padrão. A quantificação foi feita por padronização externa, construindo-se as curvas de calibração, onde a área do pico cromatográfico foi proporcional a quantidade de padrão injetado.

Preparo da extração

Pesar cerca de 0,25 g de café orgânico, adicionar à solução de 0,5 ml de ácido sulfúrico, 5 mL de água à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ e 0,25 mL de hidróxido de potássio e submeter a agitação no vórtex. O ácido em questão tem como finalidade promover a dissolução da amostra em meio aquoso e a base neutralizar e aumentar a eficiência da extração da cafeína pelo clorofórmio. Em seguida adicionar 8mL de clorofórmio, composto fundamental para realização da extração. E submete-se amostra à centrifugação.

Os próximos passos consiste em diluições para adequar a amostra para injeção: pipetar 2 mL da fase orgânica, adicionar 4 mL de clorofórmio e centrifugar. Pipetar novamente 2 mL da fase orgânica, despejar num Becker e secar no bico de Bunsen com tela de amianto e chama baixa até a evaporação completa do solvente tomando cuidado para não carbonizar a amostra. Ressuspender com 4 mL de fase móvel (90:10 v/v água/acetonitrila), agitar por 1 min no vórtex e fazer injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$ no equipamento. É necessário a filtração da mistura em filtros de espessura de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, para posterior análise direta no CLAE.

Análise do método

O método foi desenvolvido e validado com o objetivo de atender os parâmetros de qualidade analítica. Para confirmar a especificidade e seletividade do método foi visualizada a capacidade do método medir a cafeína no café orgânico na presença de outros componentes que constituem a amostra. Foi preparada uma solução padrão de cafeína $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol ou acetonitrila; uma solução placebo, contendo somente um dos solventes; e uma solução de metanol ou acetonitrila contaminada com o material extraído. A avaliação foi baseada na verificação dos picos obtidos e a comparação entre eles para verificar se os componentes indesejados interferiram na análise.

A linearidade de um método tem como objetivo alcançar resultados analíticos diretamente proporcionais à concentração de analito em uma amostra. Para avaliação desse parâmetro foram preparadas soluções padrão de cafeína em acetonitrila em triplicata nas seguintes concentrações: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; constituindo-se curvas de calibração para cálculo e análise do coeficiente de correlação.

A precisão e a exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos do método analítico por meio de uma série de análises com várias amostras. Na precisão, foram analisadas duas soluções de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de cafeína padrão em metanol ou acetonitrila, produzidas por dois analistas diferentes e em dois dias consecutivos. A análise consiste em seis injeções da solução no sistema, por cada analista e em cada dia. Na exatidão, foram analisados em triplicata as concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados gerados fornecerão a média aritmética, o desvio padrão que representará a precisão; e o desvio padrão relativo, servindo estimar a precisão intermediária da análise, que representará a precisão no diferentes dias e os diferentes analistas.

A robustez do método analítico foi avaliada a partir da verificação da estabilidade das soluções analíticas (5 °C, 7 dias) e mudança dos fornecedores dos solventes para o preparo da fase móvel (acetonitrila das marcas Merck KGaA e J.T. Backer).

Análise estatística

Após cada experimento realizado foram feitas as análises dos dados processados no CLAE-UV. Para o tratamento estatístico empregou-se o Programa Microsoft Excel, com aplicação dos seguintes tratamentos estatísticos: média, desvio padrão, coeficiente de variação, ANOVA, regressão linear e coeficiente de correlação linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da extração e condições cromatográficas

A escolha do método de extração foi baseada em métodos já descritos na literatura porém algumas mudanças foram feitas visando obter uma extração rápida, eficiente e econômica capaz de fornecer bons resultados. Tendo como referência a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz⁵ optou-se pela extração com clorofórmio, apesar da toxicidade deste solvente orgânico, e, água quente para simular o preparo comumente realizado pelos consumidores. O procedimento final da extração foi

realizada com solução de acetonitrila/água (10:90 v/v) para uma melhor resolução do pico da cafeína e por apresentar porcentagem semelhante de fase móvel estabelecida para a corrida cromatográfica. Inicialmente trabalhou-se com padrões utilizando coluna C-8 Shim Pack e, como fase móvel uma mistura isocrática de acetonitrila/água (10:90 v/v). No detector, foi empregada uma programação de maneira a detectar o analito no comprimento de onda de máxima absorvância, 280 nm. Nessas condições o tempo de retenção da cafeína foi de 8,5 min, porém as condições estabelecidas não foram suficientes para uma separação adequada obtendo um pico com os parâmetros cromatográficos não aceitáveis, principalmente sua simetria.

Portanto, as análises cromatográficas foram efetuadas empregando uma coluna C18 Phenomenex (150 x 4.6 nm, 5 µm). A fase móvel foi constituída por água (85% v/v) (A) e acetonitrila (15% v/v) (B), utilizando eluição isocrática com fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A detecção UV/Vis foi programada no comprimento de onda em 280 nm e o tempo de retenção nestas condições foi de 3,5 min. As análises foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C).

Validação do método

Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade de um método é determinada através da sua capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros. A eficiência da metodologia proposta na identificação da cafeína pode ser comprovada pela observação do cromatograma gerado para o extrato (Figura 2), onde se verifica uma boa resolução e seletividade satisfatória. Além disso o cromatograma apresentou pico com o tempo de retenção (3,5 min) igual ao padrão de cafeína, comprovando a presença desse composto na amostra. A análise total pode ser realizada num curto período de tempo (~5 min) quando comparada ao estudo desenvolvido por Prasniewski *et al.*,⁶ em que o pico cromatográfico apareceu após 7 min de análise.

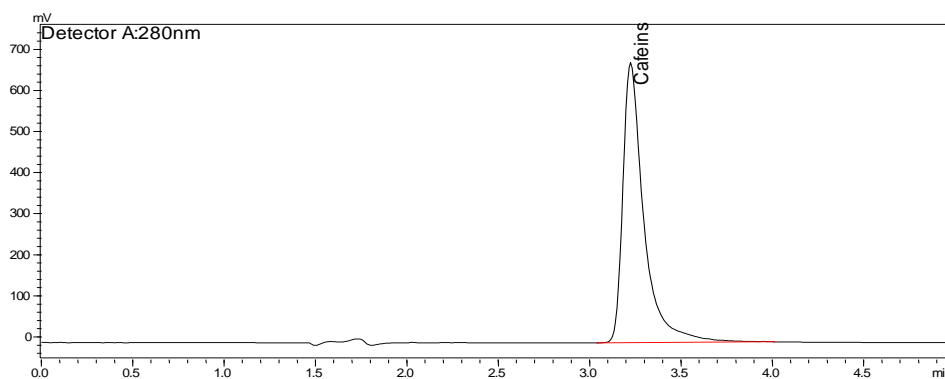


Figura 2. Cromatograma do extrato da cafeína

Linearidade

A cafeína exibiu uma resposta linear no intervalo de concentrações testadas, isto é, de 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como pode ser observada na Tabela 1. O coeficiente de correlação (r) foi de 0.9997948, demonstrando que o pico de resposta foi linear e relacionado à concentração de cafeína, possibilitando a abordagem para quantificá-la. A curva analítica obtida pode ser expressa pela equação: $y = 54532.02x - 25234.92$.

Tabela 1. Exatidão e precisão da Linearidade (n=3)

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração determinada (n=3) (Média \pm DP)	Coefficiente de variação (%)	Exatidão (%)
10	10,107 \pm 0,265	2,619	1,067
25	25,610 \pm 0,776	3,031	2,440
50	50,869 \pm 1,339	2,633	1,739
75	76,556 \pm 0,808	1,055	2,075
100	100,425 \pm 2,285	2,275	0,425

Precisão

Os resultados de precisão (repetibilidade) e precisão intermediária foram satisfatórios e os resultados de desvio padrão relativo (DPR) foram menores que 5,0%. Os resultados obtidos constam da Tabela 2.

Tabela 2. Precisão do método cromatográfico utilizado na análise da cafeína. (n=6)

Conc.=50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=6)	Dia 1		Dia 2	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Média	50,140	50,717	50,053	50,660
Desvio padrão	1,10	1,54	0,55	0,60
Coefficiente de variação (%)	2,18	3,03	1,10	1,18
Exatidão (%)	100,28	101,43	100,11	101,32

Exatidão

Os resultados de exatidão também foram satisfatórios, com os valores de desvio padrão relativo (DPR) menores que 5,0%, considerados satisfatórios para o método analítico. Os resultados obtidos constam da Tabela 3.

Tabela 3. Exatidão do método cromatográfico utilizado na análise da cafeína (n=3)

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração determinada (n=3) (Média \pm DP)	Coefficiente de variação (%)	Exatidão (%)
100	101,780 \pm 0,407	0,400	101,78
50	50,497 \pm 0,191	0,379	100,99
10	9,950 \pm 0,011	0,112	99,50

Robustez

O método cromatográfico desenvolvido e validado se revelou robusto diante a verificação da estabilidade das soluções analíticas (teste 1) e mudança dos fornecedores de solventes (teste 2). As alterações realizadas não produziram mudanças significativas nos resultados de concentração do pico de cafeína e na estabilidade do sistema (DPR menor que 2%).

Tabela 4. Robustez do método cromatográfico utilizado na análise da cafeína (n=3)

Conc.=50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=6)	Padrão	Teste 1	Teste 2
Média	50,492	50,229	50,369
Desvio padrão	0,88	0,62	0,38
Coefficiente de variação (%)	1,73	1,22	0,76
Exatidão (%)	100,98	100,46	100,74

Determinação do teor de cafeína no *Coffea arabica* orgânico

A partir do método validado, foi possível determinar a concentração de cafeína extraída do café orgânico. O teor obtido foi de 1,012 g 100g⁻¹ o que forneceu evidência da seletividade do método, já

que as demais substâncias químicas que compõe o café não interferiram a análise. O resultado obtido permite a confirmação também da sensibilidade e precisão ao comparar o presente estudo ao desenvolvido por Monteiro e Trugo⁷ em que os teores de cafeína encontram-se na faixa de 0,8 g 100 g⁻¹ a 1,4 g 100 g⁻¹.

Dados reportados na literatura demonstram que os teores de cafeína variam de acordo com a espécie do grão. Cafés provenientes de grãos robusta apresentam teores maiores de cafeína quando comparados aos grãos de café arábica.⁸

CONCLUSÃO

O método desenvolvido foi validado e mostrou-se seletivo, linear na faixa de 10 a 100 µg mL⁻¹, preciso, exato e robusto frente a verificação da estabilidade das soluções e das variações de fornecedores de solventes, atendendo às exigências analíticas. O mesmo apresentou-se adequado para a análise da cafeína utilizando a técnica de CLAE permitindo a detecção e quantificação desta metilxantina nas amostras de café orgânico detectando teor semelhante aos estudos publicados. Apesar da técnica cromatográfica apresentar um custo mais alto devido à pureza dos reagentes e equipamento, o método desenvolvido foi econômico, empregando uma fase móvel constituída por 85% de água e 15% de acetonitrila e quantidade de amostra reduzida (0,25 g), as condições empregadas são simples e permite a execução rápida (~5 min) e eficiente dos testes com resultados satisfatórios.

AGRADECIMENTOS

Ao docente C. E. M. Sousa, ao Laboratório de Práticas Integradas onde foram realizados os testes e a instituição Centro Universitário Tabosa de Almeida/Asces - Unita por permitir a realização deste trabalho em suas instalações.

REFERÊNCIAS

1. OLIVEIRA JÚNIOR, Roques Matias de; *Dissertação*, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil, 2015.
2. LIMA, A. R. et al.; *Química Nova* **2010**, Vol. 33, No. 1, 20-24.

3. MARIA, C. A. B; MOREIRA R. F. A.; *Química Nova* **2007**, 30, 99-105.
4. CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F.; *Ciênc. Tecno. Aliment. Campinas*. **1998**, v. 18, n. 4, p. 421-424.
5. ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos* - 4ª Edição 1ª Edição Digital, São Paulo, 2008.
6. PRASNIEWSKI, A; DE AQUAR, L.M; OLDONI, T. L. C. *Synergismus scyentifica UTFPR* **2015**, v. 10, n. 1, p. 108–115.
7. MONTEIRO, M. C; TRUGO, L. C.; *Química Nova* **2005**, v. 28, n. 4, p. 637-641.
8. ABRAHÃO, S. A. et al.; *Ciência agrotecnologia* **2010**, v. 34, n. 2, p. 414-420.
9. MOREIRA, I. et al.; *Química Nova* **2014**, vol. 37, n. 1, p. 39-43.
10. TEIXEIRA, A. L. et al.; *Revista Ciências Agronômicas* **2012**, v. 43, n. 1, p. 129-137.
11. ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B.; *Química Nova* **2009**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481.
12. HARRIS, D. C., *Análise Química Quantitativa*. 6ª Edição, Rio de Janeiro, 2005.
13. ANVISA. *Farmacopeia Brasileira*, volume 1. 5ª Edição, Brasília, 2010. Acesso em 30 abr. 2017.
14. WALTON, H. F.; EICEMAN, G. A.; OTTO J. L *Journal of Chromatography* **1979**, v.180, n.1, p.145-156.
- 15- BORTOLINI, K., SICKA, P., FOPPA,. *Revista Saúde* **2010**, v. 4, n. 2, p. 23-27.
16. ANVISA.. Resolução da diretoria colegiada- RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em: 15 mar. 2018.

17. COSTA, M. A. B. et al.; *Química Nova* **2012**, Vol. 35, No. 4, 808-813.
18. SIMON, A; CABRAL, L. M; SOUZA, V.P.; *Química Nova* **2012**, Vol. 35, No. 3, 593-600.
19. TAGLIARI, M. P. et al.; *Química Nova* **2012**, Vol. 35, No. 6, 1228-1232.
20. CIONE, A. P. P; LIBERALE, M. J; SILVA, P. M. et al.; *Química Nova* **2010**, Vol. 33, No. 1, 203-207.
21. ABREU, A. B. G; MATTA, M. H. R; MONTAGNER, E.; *Quim. Nova* **2008**, Vol. 31, No. 1, 5-9.
22. MARCUCCI, C. T. et al.; *Química Nova* **2013**, vol. 36, n. 4, p. 544-548.