

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE CAMPINAS
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

LUNARA MORENA CUNHA

**ANÁLISE COMPARATIVA DAS METODOLOGIAS PARA
ANÁLISE DA CAFEÍNA**

CAMPINAS/SP

2018

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE CAMPINAS
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

LUNARA MORENA CUNHA

**ANÁLISE COMPARATIVA DAS METODOLOGIAS PARA
ANÁLISE DA CAFEÍNA**

Trabalho de Graduação apresentado como pré-requisito para a conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, da Faculdade de Tecnologia de Campinas, elaborado sob a orientação da Profa. Me. Fabiana Yoshinaga.

CAMPINAS/SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Biblioteca Fatec Campinas – CEETEPS

C972a

CUNHA, Lunara Morena

Análise comparativa das metodologias para análise da cafeína. Lunara Morena Cunha. Campinas, 2018.

75 p.; 30 cm.

Trabalho de Graduação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos – Faculdade de Tecnologia de Campinas, 2018.

Orientador: Profa. Me Fabiana Yoshinaga.

1. Cafeína. 2. Controle de qualidade analítico. 3. Métodos Farmacopeicos. I. Autor. II. Faculdade de Tecnologia de Campinas. III. Título.

CDD 615.321

Catálogo-na-fonte: Bibliotecária: Aparecida Stradiotto Mendes – CRB8/6553

TG PQ18.2

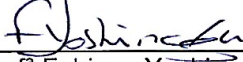
LUNARA MORENA CUNHA

Análise comparativa das metodologias para análise da cafeína.

Trabalho de Graduação apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos pelo CEETEPS/Faculdade de Tecnologia – Fatec Campinas.

Campinas, 12 de dezembro de 2018.

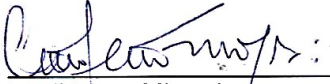
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Fabiana Yoshinaga
Fatec Campinas



Prof^a Juliana Pedrilho Foltin
Fatec Campinas



Prof^a Mara Miranda
Fatec Campinas

AGRADECIMENTOS

Agradeço aqueles que estão ao meu lado nos percalços da vida; independente do que ocorra: Olavo Cunha, Marisa Cunha, Oton Cunha, Éder Azevedo, Geter Nobre, Maria Carolina Teixeira, Verônica Pizzolatto, Fabiana Giora, Mariana Teixeira, Carolina Luchetta, Fábio Bonk, Fabiana Corbi, Júnior Leite. Agradeço à toda a comunidade acadêmica por ter propiciado esta experiência, em especial à banca: professoras Fabiana Yoshinaga, Juliana Foltin e Mara Miranda; a qual me direcionou a novos horizontes. Ademais, o meu muito obrigado à instituição Fatec Campinas.

EPÍGRAFE

*“Qualquer árvore que queira tocar os céus
precisa ter raízes tão profundas a ponto de tocar
os infernos.”*

Carl Jung

RESUMO

Bioquimicamente, a cafeína é um alcaloide natural encontra-se em mais de 60 espécies de plantas, tais como o café, guaraná, cacau entre outros. Suas principais propriedades nos seres humanos são o fornecimento de energia e o aumento do estado de alerta. Em demasia pode causar desde azia, até taquicardias. Possui mercados alimentícios (bebidas estimulantes), farmacêuticos (analgésicos) e químicos (controle de qualidade). Os efeitos da cafeína no corpo, juntamente com o consumo de 340 milhões de dólares globalmente equivalente a 120.000 toneladas em 2017 e expectativa de crescimento em 7,5% entre 2018-2025 justificam o seu pertinente controle de qualidade analítico. O objetivo deste trabalho foi realizar o levantamento de metodologias na quantificação da cafeína, independente da fonte de obtenção e métodos analíticos. Para tal, exigiu-se a revisão bibliográfica acerca da molécula da cafeína nos aspectos operacionais de origem, obtenção, purificação e mercados; avaliação sobre as metodologias clássicas para análises quantitativas sobre esta molécula com base nos órgãos reguladores tanto brasileiros como mundiais; pesquisa sobre metodologias alternativas que possam substituir os métodos clássicos com as mesmas finalidades analíticas. O levantamento baseou-se em pesquisas bibliográficas, comparativas e exploratórias em compêndios (americano, brasileiro e europeu) e artigos científicos. As certificações são a chave aos sistemas de qualidade pertinentes. O controle de qualidade depende dos métodos analíticos empregados, validação, técnicas de identificação e obtenção. Entre todos os métodos estudados; os mais pertinentes foram os físico-químicos aliados às ferramentas matemáticas. Portanto, os mais adequados foram-se HPLC diferencial (clássico) e voltametria de onda quadrada com eletrodo BDD (alternativo).

Palavras-chave: cafeína; controle de qualidade analítico; métodos farmacopeicos

ABSTRACT

Biochemically, caffeine is a natural alkaloid found in more than 60 species of plants, such as coffee, guarana, cocoa among others. Its main properties in humans are the provision of energy and increased alertness. Too much can cause from heartburn to tachycardias. The effects of caffeine on the body, along with consumption of 340 million dollars globally equivalent to 120,000 tons in 2017 and expectation of growth in 7,5 % between 2018-2025 justify their relevant analytical quality control. The objective of this work was to carry out the survey of methodologies in the quantification of caffeine, independent of source of acquisition and analytical methods. For this, a bibliographical review about the caffeine molecule was required in the operational aspects of origin, obtaining, purification and markets; evaluation of the classical methodologies for quantitative analyzes on this molecule based on the Brazilian and world regulatory bodies; research on alternative methodologies that can replace the classical methods with the same analytical purposes. The survey was based on bibliographic, comparative and exploratory research in compendia (American, Brazilian and European) and scientific articles. The certifications are the key to relevant quality systems. Quality control depends on the analytical methods employed, validation, identification and procurement techniques. Among all the methods studied; the most pertinent were the physical-chemical allied to the mathematical tools. Therefore, the most suitable were differential HPLC (classical) and square wave voltammetry with BDD electrode (alternative).

Keywords: caffeine; quality control analytical; pharmacopoeial methods

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Descrição da rota de biossíntese para construção da molécula da cafeína.....	16
Figura 2 - Descrição das rotas dinâmicas de degradação da cafeína.....	17
Figura 3 -Histórico do controle da qualidade.....	21
Figura 4 - Voltamogramas otimizados de VAN e CAF.....	39
Figura 5 - Molécula de dimenidrato.....	58
Figura 6 - Molécula de aminofilina.....	61
Figura 7 -Molécula de oxitrifilina.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teores de cafeína conforme as fontes de espécies naturais usadas industrialmente.....	18
Tabela 2 — Análises na cafeína por compostos descritos nas farmacopeias.....	24
Tabela 3 -Comparação dos métodos usados para determinar VAN e CAF.....	40
Tabela 4 -Limites de detecção e quantificação nos métodos validados.....	40
Tabela 5 -Tabela de impurezas reportadas na Ph.Eur.....	49
Tabela 6 -Tabela das impurezas relatadas como compostos nas monografias.....	50
Tabela 7 -Gradiente de eluição para dimenidrato.....	60

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µm	Micrometro
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
ANOVA	Software estatístico para validação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	Pré-tratamento anódico
BDD	Eletrodo de boro dopado com diamante
BR	Solução tampão de Britton- Robinson
Bras.	Farmacopeia Brasileira
C ₇ H ₇ ClN ₄ O ₃	Fórmula molecular da 8-cloroteofilina
C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	Fórmula molecular da teobromina
C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	Fórmula molecular da teofilina anidra
C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₅	Fórmula molecular da cafeína anidra
C ₁₂ H ₂₁ N ₅ O ₃	Fórmula molecular da oxitrifilina
C ₁₇ H ₂₁ NO	Fórmula molecular da difenihidramina
C ₂₄ H ₂₈ ClN ₅ O ₂	Fórmula molecular da dimenidrato
C ₃₆ H ₂₄ N ₃₀ O ₄	Fórmula molecular da aminofilina
CAF	Cafeína
CAS	Chemical Academical Society
CC	Coluna Cromatográfica
Cm	Centímetro
Cm ⁻¹	1/centímetro ou 1/comprimento de onda nos gráficos de FTIR
CO ₂	Gás carbônico
DPR	Desvio Padrão Relativo
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food, Drugs and Alimentation
FTIR	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier
g/mol	Grama por mol
G ₂₅₄	Placa de sílica gel suportada por alumínio ou grafite, para revelar em 254 nm
h	Hora
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Hz	Hertz
ISO	International Standardization Organization
IV	Luz infravermelho
Kg	Quilograma

KOH	Hidróxido de potássio
L	Litro
LD ou L.D.	Limite de detecção
LQ ou L.Q.	Limite de quantificação
M ou mol.L ⁻¹	Mol/ litro ou molaridade ou molar
Mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mV	Milivolts
N	Normalidade medido em mol por equivalente-grama
Ng	Nanograma
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
PF	Ponto de fusão
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph. Eur.	European Pharmacopoeial
S.Ref.A1	Solução Referência A1
S.Ref.A2	Solução Referência A2
S.Ref.B1	Solução Referência B1
S.Ref.B2	Solução Referência B2
ST1	Solução Teste 1
ST2	Solução Teste 2
TLC	Cromatografia em Camada Delgada
USP	United States Pharmacopeia
UV	Luz ultravioleta
UV-VIS	Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível
V	Volts
VAN	Vanilina
VM-SW	Voltametria de onda quadrada
v/v	Solução feita em proporções de volume do soluto para o solvente (título)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	METODOLOGIA DE PESQUISA CIENTÍFICA.....	12
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA SOBRE A CAFEÍNA.....	13
	3.1. HISTÓRIA DA CAFEÍNA PELO MUNDO.....	13
	3.2. BIOQUÍMICA DA CAFEÍNA.....	15
	3.3. EFEITOS BIOLÓGICOS DA CAFEÍNA.....	18
4.	METODOLOGIAS CLÁSSICAS E ALTERNATIVAS PARA ANÁLISE DA CAFEÍNA.....	21
	4.1. HISTÓRICO DO CONTROLE DA QUALIDADE.....	21
	4.2. HISTÓRICO DAS FARMACOPEIAS COMO CONTROLE DE QUALIDADE.....	23
	4.3. MONOGRAFIAS COMO METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	24
	4.3.1. Consulta em compêndios.....	24
	4.4. TÉCNICAS USADAS NA ANÁLISE DA CAFEÍNA.....	26
	4.4.1. Métodos oficiais.....	26
	4.4.2. Métodos Alternativos.....	28
	4.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODO.....	30
	4.6. COMUNIDADE CIENTÍFICA SOBRE OS MÉTODOS OFICIAIS.....	31
	4.6.1. Método envolvida: UV-VIS de 2ª derivada.....	31
	4.6.2. Método envolvido: FTIR.....	32
	4.6.3. Método envolvido: HPLC diferencial para cafeína e catequim.....	32
	4.6.4. Método Espectrofotometria de Absorção.....	32
	4.6.4.1. Método da cromatografia líquida.....	33
	4.6.5. Cromatografia líquida diferencial.....	33
	4.7. COMUNIDADE CIENTÍFICA SOBRE OS MÉTODOS ALTERNATIVOS.....	34
	4.7.1. Extração com destilação de Soxhlet.....	34
	4.7.2. Voltametria com eletrodo de náfion-rubênio.....	34
	4.7.3. Voltametria com eletrodo de boro dopado de diamante.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
	5.1. QUESTÕES SOBRE A FARMACOPEIA.....	36
	5.2. METODOLOGIAS CLÁSSICAS E ALTERNATIVAS.....	36
	5.2.1. Peculiaridades da metodologia UV-VIS-2º derivada.....	36
	5.2.2. Resultados da metodologia da extração de Soxhlet.....	37
	5.2.3. Peculiaridades sobre o método de HPLC para cafeína e catequim.....	37
	5.2.4. Método de HPLC para cafeína, teobromina e teofilina em bebidas.....	38

5.2.5. Voltametria de onda quadrada para VAN e CAF.....	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
7.REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE A - DESCRIÇÕES DAS MONOGRAFIAS FARMACOPEICAS: MÉTODOS OFICIAIS PARA ANÁLISE DA CAFEÍNA.....	49

1 INTRODUÇÃO

Bioquimicamente, a cafeína (1,3,7-trimetil-xantina) é um exemplo de alcaloide; cuja incidência está no metabolismo secundário das plantas medicinais. Isto posto, a cafeína pode ser encontrada em 60 espécies de plantas, tais como o café (gênero *Coffea*), chá verde e/ou mate (gênero *Camellia*), guaraná (gênero *Paullinea*); e/ou como derivados da configuração xantina, tal como o cacau (gênero *Teobroma*). Assim sendo, a cafeína é uma das moléculas mais consumidas no mundo, devido às suas propriedades energéticas, aromas e sabor; os quais propiciam maiores níveis de produtividade em atividades que requerem altos níveis de atenção (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002; MACHADO, 2015; NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012; SALDAÑA, MAZZAFERA e MOHAMED, 1997; TAVARES, 2010).

Comercialmente, a cafeína é consumida como bebidas estimulantes (chás, cafés, refrigerantes a base de cola); suplementos alimentares (associados a vitaminas), medicamentos de uso liberado (antigripais). Devido às suas formas de consumo, a cafeína tem diferentes nichos de mercado supracitados (MARKETERS MEDIA, 2018); o qual movimentou cerca de 340 milhões de dólares globalmente (ano base: 2017) e estima-se que gerará uma renda bruta de 610 milhões de dólares até o final de 2025; com um crescimento anual (CAGR) de 7,7 % entre o período de 2018-2025. Os onze maiores fabricantes de cafeína detêm 89 % da produção desta molécula no mundo, estando polarizados na China, Índia e Europa (NEUMANN, 2012; NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012; SALDAÑA, MAZZAFERA e MOHAMED, 1997).

Segundo Latonsinska, M. e Latonsinska, J.N. (2017); Neumann (2012) no ano base 2017, as estimativas para o consumo global da cafeína estavam entre 120.000 toneladas por ano, o que seria em torno de 1 copo de café por dia por pessoa. Em termos de produção, para a indústria do chá, os maiores líderes são: China, Índia, Quênia, Sri Lanka, Turquia, Indonésia, Vietnã, Japão, Irã e Argentina. Para o café são: Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia, Honduras, Etiópia, Índia, México, Peru e Guatemala.

Da estimativa do consumo mundial da cafeína, 79 % diz respeito sobre o café, 15 % do chá, 3 % do mate e 4 % do cacau. Os consumos dos chás são mais relevantes na Turquia, Rússia, Irã, Maurítânia, Síria e China; assim como o consumo do mate é mais pronunciado no Paraguai, Argentina e Brasil. O cacau é mais consumido na Suíça, Alemanha, Irlanda, Reino Unido e Noruega. As bebidas à base de cola são preponderantes no México, Chile, EUA,

Panamá e Argentina. Para o mercado das bebidas não-alcóolicas, os energéticos representam 1 % mundialmente, sendo liderados por Áustria, Irlanda, Suíça, EUA e Austrália. Em contrapartida, de acordo com a International Coffee Organization, em 2017, os maiores consumidores de café foram: Finlândia, Noruega, Islândia, Dinamarca, Países Baixos, Suécia, Suíça, Bélgica, Luxemburgo, Canadá, estando o Brasil em 15°. Os 10 maiores exportadores de café são: Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia, Etiópia, Honduras, Índia, Uganda, México e Guatemala (LATOSINSKA, M. e LATOSINSKA, J.N., 2017; NEUMANN, 2012; SMITH, 2017).

Para que o consumo da cafeína seja considerado seguro à saúde humana, deve ser fiscalizado conforme os órgãos reguladores, em que determinam esta faixa (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002; BRASIL,1999; NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012). Para tanto, estes órgãos se baseiam nas pesquisas científicas e demais órgãos internacionais (BRASIL,2009). Neste sentido, a legislação brasileira se fundamenta nos métodos analíticos voltados aos grãos de café torrados (BRASIL,1999) e aos extratos de chá (BRASIL, 1978; BRASIL,1998). A problemática deste trabalho envolve as pesquisas aprofundadas sobre estas lacunas auferidas nas legislações supracitadas. Deste modo, conforme os nichos de mercado, a legislação pode apresentar a falta de metodologias específicas que analisem a cafeína de acordo com a sua fonte de obtenção em conjunto com as técnicas de extração e/ou purificação. Estas lacunas tornam a cafeína irregular nos mercados mundiais.

O objetivo deste presente trabalho é fazer um levantamento das metodologias capazes de quantificar a cafeína independente da fonte de obtenção. Para isto, planeja-se realizar uma revisão bibliográfica acerca da molécula da cafeína nos aspectos operacionais de origem, obtenção, purificação e mercados; avaliar as metodologias clássicas para análises quantitativas sobre esta molécula com base nos órgãos reguladores tanto brasileiros como mundiais; pesquisar se há metodologias alternativas que possam substituir os métodos clássicos com as mesmas finalidades analíticas.

A metodologia para este projeto é a pesquisa bibliográfica; portanto será feito o levantamento bibliográfico com pesquisas em periódicos, artigos, livros e demais materiais que sejam de referenciais teóricos tanto em bases nacionais como internacionais. Para este trabalho, os capítulos estão divididos em introdução, abordando os fatores primordiais para a apresentação deste trabalho; metodologia de pesquisa científica, relacionando o método teórico de pesquisa envolta no trabalho; revisão bibliográfica sobre os conceitos da cafeína, tais como sua origem, fontes de obtenção, nichos de mercados, extração e purificação, propriedades físico-químicas; metodologias clássicas para análises da cafeína, conforme os

órgãos reguladores nacionais e internacionais, assim como os métodos analíticos envolvidos; metodologias alternativas de quantificação, tal como métodos analíticos envolvidos; discussões teóricas das metodologias comparativas e considerações finais.

2 METODOLOGIA DE PESQUISA CIENTÍFICA

Admitindo-se o fato desta monografia possuir o caráter teórico para a temática envolvida na mesma; estão previstos um conjunto de métodos e/ou técnicas tangíveis desde o momento da abordagem até a escrita e construção dos conhecimentos apresentados neste trabalho. Para isto, serão usadas como recursos as pesquisas comparativa, qualitativa, bibliográfica, descritiva e exploratória, documental sob as construções lógicas da dialética, observação e o processo do levantamento bibliográfico por fichamentos (SEVERINO, 2008; ZANELLA, 2011).

Com isto, este trabalho passará por momentos aos quais os objetos de estudo serão tratados como estudos do caso; sem interferir os demais métodos dentro do contexto da revisão bibliográfica, ao qual norteia o trabalho. Estas ferramentas estão em sinergia com os materiais disponíveis em meios acadêmicos, tais como: consultas exploratórias em periódicos, artigos, jornais, livros, índices, legislações brasileiras ou não; e quaisquer outros meios de pesquisa semelhantes.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA SOBRE A CAFEÍNA

3.1. HISTÓRIA DA CAFEÍNA PELO MUNDO

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo em função do aroma e sabor pertinentes. Ao mesmo tempo, o mercado do café descafeinado é proveniente dos EUA e Europa; com as espécies *Coffea canephora* (teor de cafeína a 2 %) e *C. arabica* (teor de 1 % de cafeína). Deste modo, o café mais valorado é o *c. canephora*. Uma sinonímia para o *canephora* é o café robusta. As plantas de café, quando consumidas no formato de bebida tem extraordinário poder econômico nos setores científico, agrícola, social e comercial, perdendo apenas para a gasolina no mercado internacional (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002; PATAY *et al*, 2017; SALDAÑA, MAZZAFERA e MOHAMED; 1997).

Para a molécula da cafeína, sua composição é em função da planta que a origina. Ademais, dependendo das técnicas de extração e purificação, podem ser encontrados como matriz a cafeína, trigonelina, teofilina, teobromina. Geralmente essas moléculas se encontram em equilíbrio dinâmico. As fontes industriais da cafeína são os chás, cafés, derivados do cacau e refrigerantes a base de cola. Naturalmente, a cafeína pode ser encontrada em 60 espécies (PATAY *et al*, 2017).

O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae e tem 124 espécies; sendo os mais famosos e usados o *Coffea arabica* L, *Coffea robusta* L Linden (*sinônimo: c. canephora* Pierre ex. A. Froehner) e *c. liberica* Hiern (*sinônimo: c. dewevrei* de Selvagem & T. Durand). O café arábico é em torno de 75 % da produção total de café do mundo; o café robusta é até 24 % e o café liberiano até 1 % (PATAY *et al*, 2017).

Em regiões remotas do planeta, o café foi consumido preferencialmente como uma semente crua e comestível. Um exemplo disto é a história do monge que teve suas cabras mais enérgicas após passarem por um arbusto de café no século XV. Outros modos de consumo são a pasta feita de semente com gordura animal, e o café enquanto bebida na Constantinopla para a alta sociedade no século XVI (PATAY *et al*, 2017).

O café pode ser cultivado como plantação em países como o Iêmen, Etiópia, África e Madagascar, Austrália e China; devido as condições climáticas tropicais e/ou subtropicais em conjunto com as altitudes de 1300 m a 1600 m. Porém, esta planta pode ser encontrada em

regiões de baixa altitude (950 m a 2000 m) e subtropicais. Uma planta arbustiva rende por pelo menos, 20 anos, sendo os seus frutos maduros e vermelhos colhidos individualmente (PATAY *et al*, 2017; TAVARES, 2010).

A cola (*Cola acuminata*, *cola nítida* Schott & Endl.) é uma árvore nativa da África tropical conhecida desde o século XIV como fonte natural de cafeína. Sua etimologia deriva da forma latinizada de um nome de árvore da África Ocidental. Suas nozes foram mastigadas como fonte de vitalidade e erradica o apetite. As nozes foram exportadas para a Inglaterra e EUA desde o século XIX, sendo mais conhecida pela receita de Coca-Cola, a qual era uma mistura da noz com cocaína no combate de dor de cabeça e ressaca (LATOSINSKA, M e LATOSINSKA, J.N; 2017).

Uma fonte menos popular de cafeína são as folhas e caules das espécies de azevinho: *Ilex vomitoria* (Saint Yaupon), *Ilex paraguariensis* (Erva Mate) e *Ilex guayusa* (Loes). Essas espécies eram usadas pelos índios norte-americanos para fazer o chá preto remotamente; para fortificar o corpo e alma, tendo seis vezes mais cafeína que o café (LATOSINSKA, M e LATOSINSKA, J.N; 2017).

Na América do Sul (Argentina, Uruguai e Paraguai) tem a bebida de erva mate, o *I. paraguariensis*, sendo no Brasil conhecido como chimarrão. Sua etimologia quer dizer cabaça para erva-mate; a lenda diz que quando a lua e a nuvem rosada do crepúsculo vieram à Terra, um jaguar os atacou. Eles foram resgatados por um pajé, que recebeu como prêmio a planta da erva-mate. Os indígenas da América do Sul a chamam de bebida dos deuses por resistirem à seca. Ela foi popularizada na Europa como uma alternativa ao chá asiático através do consumo pelos jesuítas. No Brasil ela veio pelo Equador, sendo cultivada no Peru e Colômbia. A bebida feita das suas folhas tem poder energético (LATOSINSKA, M e LATOSINSKA, J.N; 2017).

O guaraná, pelas espécies *Paullinia guarana* (Kunth), *P. cupana* (Kunth) e *P. sorbiis* (Mart); por meio de suas sementes, são usados pelos habitantes da bacia amazônica para recuperar as forças. Foi descoberto no século XVIII pelo botânico alemão C.F.Paulini. Seu uso comercial foi difundido em 1958 como um ingrediente nas formulações de cervejas no Brasil e EUA (LATOSINSKA, M e LATOSINSKA, J.N; 2017).

A fonte mais fraca de cafeína é o gênero *Citrus L.*: as árvores cítricas sendo *Poncirus (L.)*, *Fortunella (Swingle)* e *Microcitrus (Swingle)*. É originada da Austrália, Nova Caledônia e Nova Guiné com fronteiras com a Índia, Mianmar e China. A etimologia vem do nome do gênero em latim. Apesar das folhas de *Citrus* terem cafeína, elas foram cultivadas desde a

antiguidade pelas frutas, nas quais a cafeína não era presente (LATOSINSKA, M. e LATOSINSKA, J.N; 2017).

Porém, as folhas de cidra em açúcar ou mel coreano feito das folhas cozidas foi dissipado. Os óleos essenciais cítricos foram usados como perfume desde o século XIII no Chipre. No mel de laranja grega há poucas quantidades de cafeína, uma vez que as abelhas são atraídas pelas plantas cítricas do café (LATOSINSKA, M. e LATOSINSKA, J.N; 2017).

3.2. BIOQUÍMICA DA CAFEÍNA

O metabolismo é o conjunto das reações químicas nas células dos seres vivos. Para os vegetais, o metabolismo pode ser classificado como: primário ou secundário. Cada classe possui uma função. Para o primário, há funções fundamentais, principalmente transporte de nutrientes e fotossíntese. Para o secundário, há as funções como: combate aos patógenos, hormônios para polinizadores e dispersão de sementes (BARRACA, 1999; GOMES, 2010; PERES, 2014).

Os princípios ativos são agrupados conforme a rota bioquímica de origem, tais como as classes: alcaloides, compostos fenólicos, glicosídeos, taninos e terpenos (BARRACA, 1999; PERES, 2014).

Os alcaloides são mensurados como compostos cíclicos com nitrogênio, podendo ou não ser aromático. Estas moléculas são fabricadas no retículo endoplasmático – via do ácido chiquímico- e destinam-se aos vacúolos: células, raízes, caules, folhas e sementes. Aquele atua na proteção da planta em relação aos demais organismos, com efeitos no sistema nervoso dos animais; geralmente alucinógenos e/ou venenosos. A saber, respectivamente: beladona e coca (BARRACA, 1999; PERES, 2014).

Os compostos fenólicos podem ser sintetizados pelas vias dos ácidos chiquímico e/ou melavônico. São responsáveis pela dispersão de sementes, infere a polinização, proteção aos fatores abióticos e/ou demais organismos potencialmente patógenos. Têm efeitos de alelopatia e cedem sustentação aos vasos condutores às plantas (GOMES,2010; PERES, 2014).

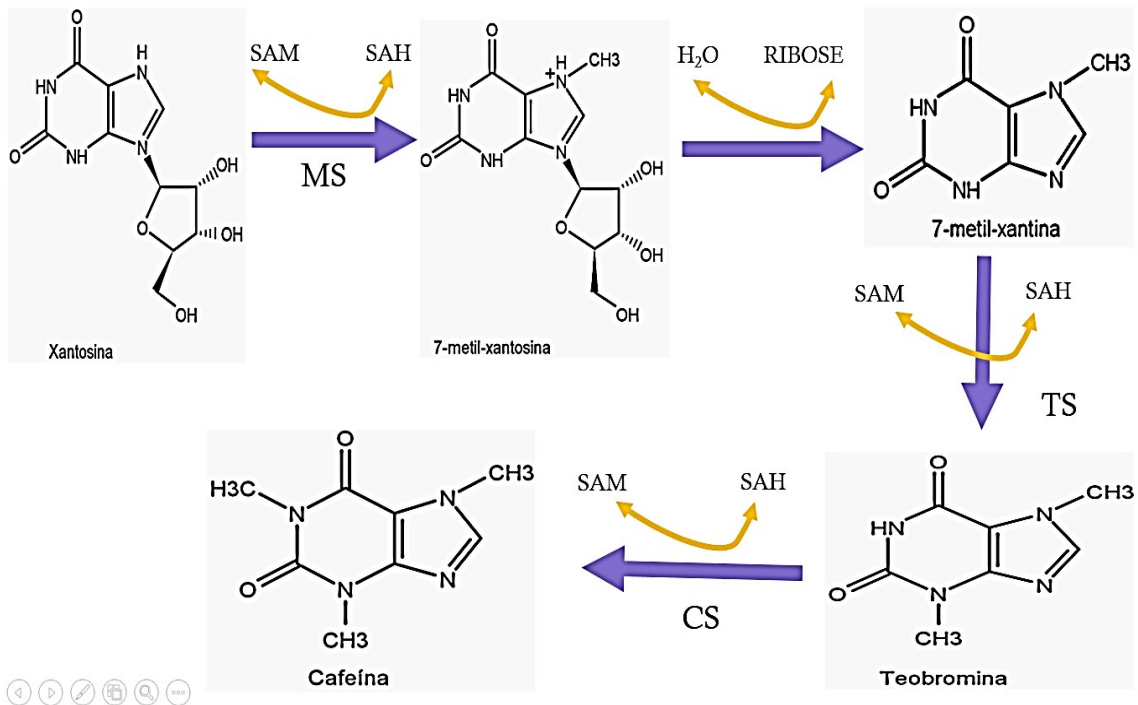
Os terpenos são polímeros nos quais cada monômero deve possuir no mínimo um isopreno- unidade de 5 carbonos- em sua molécula. O isopreno é derivado do ácido melavônico. Cada terpeno é montado de maneira diferente: ou pela adição solitária de isoprenos ou pela junção de algumas moléculas de uma única vez. Os terpenos são classificados em: isopreno (1 unidade); monoterpeno (2 unidades); sesquiterpeno (3

unidades); diterpeno (4 unidades); triterpeno (6 unidades); tetraterpeno (8 unidades) e polisopreno (acima de 8 unidades). As funções de cada tipo de terpeno diferem conforme a família da planta, o que reflete na composição dos óleos. Assim sendo, podem atuar no desenvolvimento do fruto, inseticida e afins (GOMES, 2010; PERES, 2014).

Bioquimicamente, a cafeína é uma molécula pertencente ao grupo dos alcaloides, cujo esqueleto estrutural é uma purina. Este alcaloide pode se acumular em alguns tecidos do cafeeiro, cuja parte oficialmente usada é a semente, que contém principalmente os alcaloides e os polifenóis como substâncias biologicamente ativas. Em termos de rota de biossíntese, esta molécula advém da xantosina, um composto intermediário das purinas. Algumas enzimas são responsáveis pelas transformações catabólicas das purinas, tais como reações de metilação e remoção da ribose. A biossíntese da cafeína está na figura 1 (PATAY *et al*, 2017; TAVARES, 2010).

Quando a cafeína é consumida, esta pode percorrer alguns caminhos até que a sua meia-vida (de 4 h a 5 h) no organismo consumidor acabe. Após este período, a molécula estará degradada. Com isto, há dois perfis possíveis de degradação, derivados do processo de fabricação natural da molécula dentro das espécies de plantas anteriormente citadas.

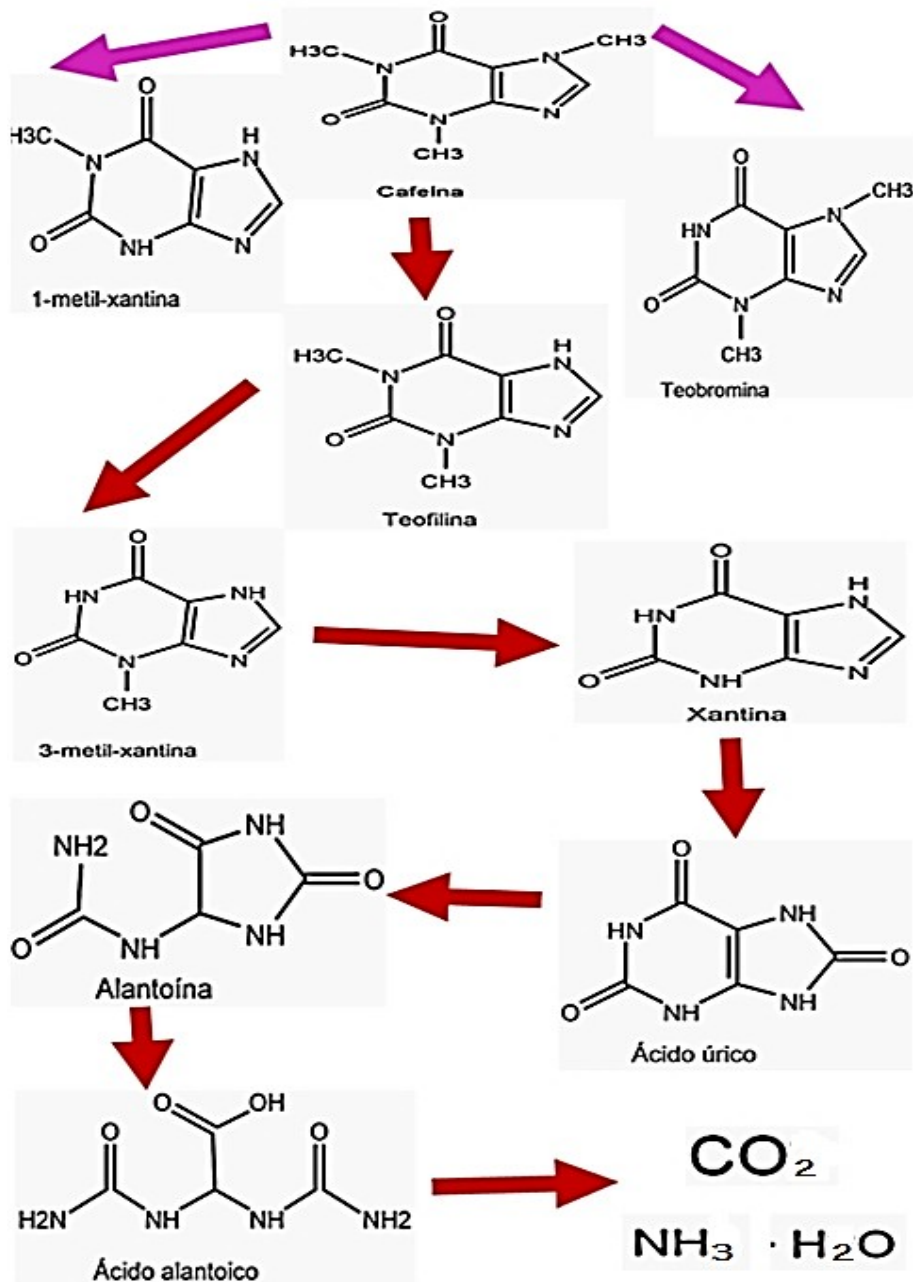
Figura 1 -Descrição da rota de biossíntese para construção da molécula da cafeína.



As siglas utilizadas na figura 1 têm os seguintes significados: SAM= S-adenosil-L-metionina; SAH= S-adenosil-L-homocisteína; MS= 7-metilxantosina sintase; TS= teobromina sintase; CS = cafeína sintase. Fonte: Adaptado de ASHIARA, SANO E CROZIER (2008); TAVARES (2010).

Em termos de degradação da cafeína, a mesma pode ter dois perfis que podem se inter-relacionar. O perfil 1, mais relevante é elucidado como: cafeína, teofilina, 3-metilxantina, xantina, ácido úrico, alantoína, ácido alantóico, ureia, gás carbônico e amônia. O perfil 2 é descrito como: cafeína, teobromina, 3-metilxantina. As interrelações de degradação estão explícitas na figura 2 (TAVARES,2010).

Figura 2 - Descrição das rotas dinâmicas de degradação da cafeína



As moléculas cafeína, 1-metil-xantina, teofilina, teobromina, 3-metil-xantina representam o catabolismo proveniente da cafeína. Entretanto, as moléculas advindas a partir da xantina são o processo do catabolismo da purina. Fonte: Adaptado de TAVARES (2010).

3.3. EFEITOS BIOLÓGICOS DA CAFEÍNA

A cafeína é conhecida por estimular o sistema nervoso central (atrapalha o sono; promove a excitação, cognição, aprendizagem e memória), assim como os problemas

musculares, respiratórios e circulares. Os efeitos da cafeína são devidos aos seus metabólitos (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002; LATOSINSKA, M. e LATOSINSKA, J.N, 2017; NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012; TAVARES, 2010).

Os resumos dos teores da cafeína estão emitidos na Tabela 1.

Tabela 1- Teores de cafeína conforme as fontes de espécies naturais usadas industrialmente

Fonte de Cafeína	Origem	Espécie de Planta	Parte da Planta	Concentração de cafeína em miligramas (%)	Número de todos os compostos químicos
Chá	Natural	<i>Camellia sinensis</i> (L.)	Folha	4,8 - 9,3*	771
Café	Natural	<i>Coffea arabica</i> (L.)	Semente ou fruto	0,06-3,2*	154
Cacau	Natural	<i>Theobroma cacao</i> (L.)	Semente	0,062-1,29*	261
Mate	Natural	<i>Ilex paraguariensis</i>	Folha	0,2-2,0*	39
Guaraná	Natural	<i>Paullinia cupana</i> (L.)	Semente ou fruto	0,9-7,6*	23
Cola	Natural	<i>Cola acuminata</i> (Schot & Endl.)	Semente	1,5-2,5*	9
Citro	Natural	<i>Poncirus</i> (L.), <i>Fortunella</i> (Swingle), <i>Microcitrus</i> (Swingle)	Folha ou flor	0-0,008*	495
Cafeína Anidra	Sintética	N.D.	N.D.	>98,5	1
Malato de Dicafeína	Natural	N.D.	N.D.	65-70	2
Citrato de Cafeína	Natural	N.D.	N.D.	45-55	3

Fonte: Adaptado de LATOSINSKA, M. E LATOSINSKA, J.N (2017). * Do banco de dados Fitoquímico e Etnobotânico Dr. Duke

Pesquisas demonstraram que a cafeína aumenta a memória, melhora o tempo de reação e raciocínio lógico, auxilia nos tempos de restrição de sono atrelados ao trabalho, reduz o risco de suicídio, depressão. Pode proteger contra as doenças de Alzheimer, aumenta a resistência na musculação, alivia o ácido láctico no pós-treino, previne o ganho de peso; pode combater a hipertensão arterial, endurecimento das artérias e doenças cardíacas. Pode proteger contra o espasmo da pálpebra, cataratas, degeneração da retina, câncer de pele. Pode ser útil contra a asma, desintoxicação do fígado e do cólon, redução de pedras do rim, risco de pedras e prevenção da gota. Pode ser um estimulante capilar na calvície de homens e mulheres (LATOSINSKA, M. e LATOSINSKA, J.N 2017; NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012).

Os estudos em cima da molécula da cafeína permitiram a descoberta de dois tipos de cafeína com propriedades físico-químicas diferentes entre si. A cafeína anidra pode ser na forma estável com fundição a 508 K (fase II ou forma β) ou metaestável com fundição a 512 K (fase I ou forma α). Para enxergar estas fases, podem ser usados como técnicas o raios-X, difração de raios X, espectroscopia Raman do infravermelho médio, infravermelho próximo, medidas dielétricas, espectroscopia RMN-NQR. Mesmo com estas técnicas, existem dúvidas. Assim sendo, o controle de qualidade e o extenso estudo sobre os efeitos da molécula no corpo humano é de interesse público (LATOSINSKA, M. e LATOSINSKA, J.N; 2017).

Segundo a FDA, 5 g de cafeína anidra (uma colher de chá) é equivalente em torno de 28 xícaras de café fabricado ou 6 batidas energéticas. Os animais domésticos não metabolizam a cafeína, que é tóxico para cães, gatos, aves; prejudicial aos organismos selvagens tais como herbívoros, insetos, aranhas. Por isto é um defensivo contra herbívoros, larvas, mosquitos, chifres de tabaco, lesmas e caracóis. O único defensivo resistente é a broca de café, que decai em 80 % a colheita e sobrevive a dose igual a 500 doses de expresso/pessoa (LATOSINSKA, M e LATOSINSKA, J.N, 2017; NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012).

De acordo com a legislação regulatória da Nova Zelândia, baseada na Austrália (Código de Padrões Alimentares), uma bebida com cafeína deve conter a molécula entre a faixa de 145 mg/L a 320 mg/L em termos totais, incluindo o guaraná (NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012).

Por conta da sensibilidade individual, a cafeína pode gerar overdose se for consumido acima de 6 xícaras de café. Isso faz com que a pressão arterial se eleve, aumentando o infarto, aumento a probabilidade dos cistos no tecido mamário das mulheres, causando insônia, ansiedade, depressão, enxaquecas, alergias, inibição da produção de colágeno na pele. Ainda sim os efeitos da cafeína no organismo humano são poucos compreendidos, o que requer uma investigação mais extensa (LATOSINSKA, M. e LATOSINSKA, J.N., 2017; NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012).

Em um amplo estudo efetuado na Nova Zelândia (NEW ZEALAND GOVERNMENT,2012), no qual foram comprados amostras das fontes de cafeína; descobriram-se que: uma dose unitária de café possui entre 15 mg a 254 mg; uma dose unitária de chá, entre 1 mg a 90 mg; na dose unitária de café instantâneo, entre 21 mg a 120 mg; em cápsulas de café, entre 259 mg a 564 mg por porção; nas bebidas energéticas, entre 75 mg a 240 mg nas latas de 250 mL a 600 mL; nos drinques energéticos, entre 10 mg a 30 mg por lata de 30 mL a 120 mL. O consumo da Nova Zelândia é semelhante aos EUA e Dinamarca; e aquém a Argentina e Reino Unido.

Um nível mais seguro de consumo diário de cafeína é de 210 mg para adultos e 95 mg para crianças; enquanto que o consumo seguro máximo em grávidas seria de 6 xícaras de chá ou café (NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012).

Ademais, há dificuldades em determinar a dose letal de cafeína (LD50) que é cerca de 150-200mg/kg; o que seria em torno de 80 xícaras a 100 xícaras de café. Ocorreram alguns casos de morte com adolescentes de menos de 20 anos, como atletas, com quantidades bem abaixo da LD50. Isto faz com que a LD50 seja diferente entre cada pessoa ou então que as quantidades de cafeína e seus metabólitos não estejam esclarecidas nas suas bebidas populares (LATOSINSKA, M. e LATOSINSKA, J.N; 2017).

Se consumido entre 4 mg a 6 mg de cafeína por peso corpóreo, por dia, pode surgir pressão alta; em pessoas cujos genes estejam latentes quando ocorre uma interrupção abrupta do consumo de cafeína, há a cefaleia como consequência da abstinência. Em pessoas com dependência (consumo diário maior que 400 mg cafeína por dia), o cálcio deve ser repostado, pois o corpo excreta este nutriente em demasia. Para mulheres grávidas, o consumo da cafeína maior do que 300mg por dia pode aumentar a iminência do aborto espontâneo. O consumo acima do recomendado pela FDA pode causar a morte humana (NEW ZEALAND GOVERNMENT, 2012).

As questões acerca dos assuntos regulatórios referentes à cafeína no Brasil e seu sistema de controle de qualidade serão expostos no próximo capítulo.

4. METODOLOGIAS CLÁSSICAS E ALTERNATIVAS PARA ANÁLISE DA CAFEÍNA

4.1. HISTÓRICO DO CONTROLE DA QUALIDADE

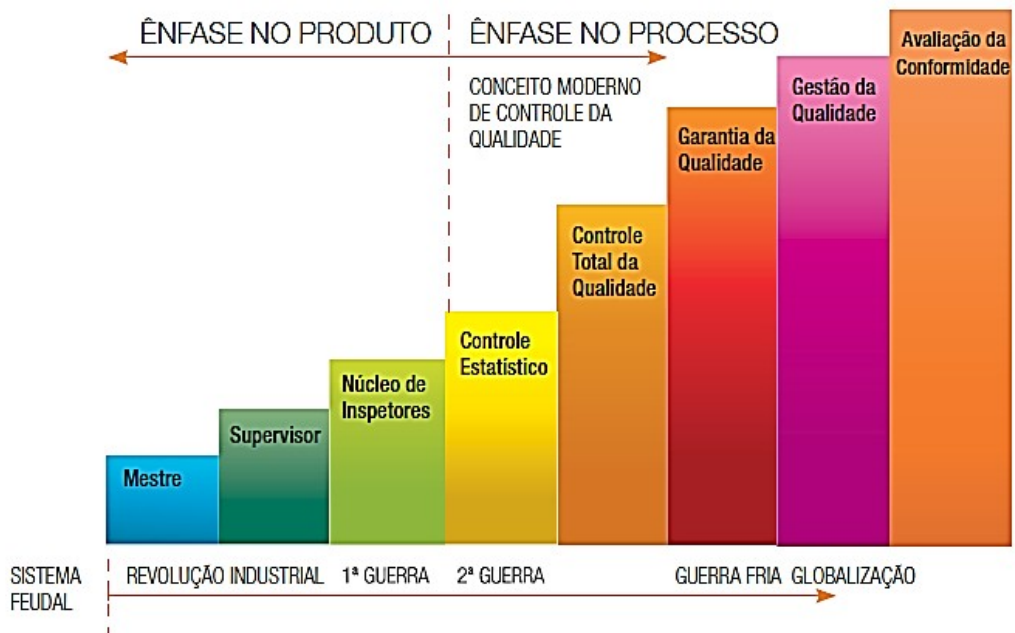
O conceito de qualidade é embutido como um conjunto de processos que agrega valor excelente ao produto ou serviço prestado durante todas as etapas na cadeia produtiva. Note-se que este conceito está focado no cliente. Todavia, devido à abrangência do termo, são necessários maiores estudos que aperfeiçoar este conceito, a depender da sua finalidade. Neste sentido, são adotados alguns programas, a saber: Gestão de Qualidade Total, Gerência de Qualidade Total e Controle de Qualidade Total. Isto posto, ao se analisar a palavra qualidade, deve-se ter em mente o momento histórico em conjunto com o autor a ser analisado (FERNANDES, 2011; SOARES, 2004).

A história da qualidade pode ser elucidada na figura 3 (FERNANDES, 2011).

Figura 3 -Histórico do controle da qualidade

Fonte: Adaptado de FERNANDES (2011).

Historicamente, a qualidade sempre acompanhou a humanidade; servindo como um meio adaptado a sobrevivência. Deste modo, passou por momentos como as Idades da Pré-



História à Moderna (domínios do fogo e dos instrumentos de caça e guerra, com aprimoramento dos artesãos). Na Idade Contemporânea ocorreu um conjunto de eventos que serão explicados a seguir (CAMARGO 2011; FERNANDES,2011; SOARES,2004).

Após a Primeira Revolução Industrial, houve a tendência da produção em massa para atender à grande demanda (Fordismo). Após lutas por direitos trabalhistas, ocorreu o Taylorismo. Em contrapartida, os altos retrabalhos e defeitos de produção seriada mantiveram o baixo nível de qualidade, típico da Primeira Guerra Mundial. Para resolver este problema, surgiu Stewart com a sua administração científica, respaldando a probabilidade e estatística para inspecionar as linhas de produção em 1930 nos EUA (CAMARGO, 2011; FERNANDES, 2011; SOARES, 2004).

Na Segunda Guerra Mundial foi desenvolvido o controle estatístico em prol da indústria bélica. Sincronicamente, o Japão produzia em massa; mas passou pela industrialização forçada para se tornar competitivo aliando pesquisas e recursos naturais; com a formação da Union of Japanese Scientists and Engineers, fundada por Deming e Juran na década de 1950 para haver as normas de qualidade a partir da ideologia de Stewart (CAMARGO, 2011; FERNANDES, 2011; SOARES, 2004).

Conseqüentemente, a qualidade era polarizada por EUA x Japão; através da satisfação ao cliente e da melhoria contínua, respectivamente. Com a criação dos blocos econômicos a partir da União Europeia (1986), o Japão era a insígnia da alta qualidade. Conseqüentemente, surgiram-se no mundo as concepções de Controle de Qualidade Total, certificações, prêmios de qualidade no intuito de padronizar processos, produtos e serviços no mundo (CAMARGO, 2011; FERNANDES, 2011; SOARES, 2004).

Dentro do contexto do Controle de Qualidade Total referido acima, surgiram-se a ISO, com representantes de todos os países, cuja norma matriz é a ISO 9000. Nacionalmente, há a Associação Brasileira de Normas Técnicas e o Instituto Nacional de Metrologia. Antes de passar pelo processo da certificação, um produto ou serviço deve ser verificada as suas especificações sistematicamente; e a sua gestão de normas documentais deve ser auditada, isto é, investigada documentalmente na cadeia produtiva (CAMARGO, 2011; FERNANDES, 2011; SOARES, 2004).

As certificações são um modo documental de atestar a excelência prestada no produto e/ou serviço que está sendo entregue ao público-alvo. Por isto, a certificação de produtos envolve a garantia de que o produto analisado contenha as características descritas; através de testes e ensaios por laboratórios acreditados pelas instituições anteriormente citadas em conjunto com as agências reguladoras nas áreas atuantes da empresa (CAMARGO, 2011; FERNANDES, 2011; SOARES, 2004).

4.2. HISTÓRICO DAS FARMACOPEIAS COMO CONTROLE DE QUALIDADE

A Farmacopeia é um guia que dita os parâmetros de qualidade e métodos laboratoriais para analisar os insumos e medicamentos. No Brasil, existe a Farmacopeia Brasileira (Farm. Bras.); sendo o principal documento oficial usado pela ANVISA; com a finalidade de ser referência no Controle de Qualidade com o poder de lei nas fiscalizações (BRANDÃO, 2001; MORETTO, 2016).

A Farmacopeia Brasileira nasceu em 1929, sob a estrutura de convênios com o respaldo da ANVISA e demais órgãos de pesquisa e/ou fiscalização em sua maioria públicos (universidades, centros de pesquisa e afins); tal como o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde em 1980 (BRANDÃO, 2001; MORETTO, 2016).

Mundialmente, as informações contidas nas farmacopeias sustentam as agências de saúde. A Farmacopeia Americana (USP) foi promulgada em 1820 por iniciativa privada. A FDA possuiu este nome desde 1930, sendo herdado do Comitê da Associação de Químicos Agrícolas desde 1898. Em comparativo, na Inglaterra a Farmacopeia surgiu em 1618; quando foi-se afiliar a Edimburgo e Dublin, surgira a Farmacopeia Britânica em 1864. Deste modo, as farmacopeias simbolizaram-se como o embrião ao controle de qualidade. Tradicionalmente, são instituições de capital privado (BRANDÃO, 2001).

As principais diferenças entre as maiores referências mundiais em farmacopeias, tais como a USP e a Europeia (Ph. Eur); demanda do fato de que a USP possui monografias de matérias-primas e as individualidades farmacêuticas, além da emissão de substâncias como padrões de referência enquanto insumos. Entretanto, primordialmente nas monografias, a Ph. Eur. somente apresentou-se o conteúdo em análises de matérias-primas (BRANDÃO, 2001; MORETTO, 2016).

Inicialmente, a Farmacopeia Brasileira era fundamentada na Americana. Após algumas edições, a Brasileira inspirou-se também na Europeia. A Brasileira tinha como novidades exemplos de testes e análises alternativas, as principais metodologias analíticas tradicionais. Nos meados dos anos 2000, o Brasil ganhou o formulário brasileiro de medicamentos seguindo a tendência mundial (BRANDÃO, 2001; MORETTO, 2016).

4.3. MONOGRAFIAS COMO METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Quebra tabela

Para a análise da cafeína, foram consultados os compêndios que serviram como literatura-base de referência, tais como: Brasil (2010); Council of Europe (2010); United States Pharmacopeial Convention (2006), uma vez que as importâncias destas farmacopeias foram amplamente discutidas anteriormente. Isto posto, foi realizada uma ampla pesquisa bibliográfica nas monografias pertencentes às farmacopeias americana, brasileira e europeia relativo às análises oficiais para a cafeína e todas as suas moléculas envolvidas em sistemas de identificação, extração e quantificação. A partir deste momento, aconselha-se estar familiarizado com a linguagem técnica deste capítulo, expressos nas siglas de métodos e/ou técnicas analíticas que serão abordados futuramente. Para isto, consulte a lista de símbolos.

O uso de mais de uma farmacopeia se justifica inclusive pelos dizeres da farmacopeia brasileira; no qual quando há a ausência de uma monografia (cartela de testes de identificação, extração e quantificação) é autorizado o uso de farmacopeias internacionais (MORETTO, 2016).

Para a tabela 2, as análises indicadas foram relatadas de acordo com a ordem de aparecimento nas monografias, sendo individualizados por ponto e vírgula. Salvo as exceções de teofilina, teobromina e cafeína; as monografias apresentaram em suas moléculas os derivados dos analitos descritos como exceções. Os solventes descritos representaram as reações de identificação. O padrão de análise foi adotado como: ensaios de identificação do tipo presença-ausência; e de quantificação (potenciometria e HPLC). Nos ensaios qualitativos, priorizaram a rapidez: TLC, PF, FTIR e reações. Os resultados destas consultados foram compilados na tabela 2 descrita adiante.

4.3.1. Consulta em compêndios

Tabela 2 — Análises na cafeína por compostos descritos nas farmacopeias

MONOGRAFIAS: COMPOSTOS vs. ANÁLISES	FARMACOPEIAS		
	EUROPEIA	BRASILEIRA	AMERICANA

Quebra tabela

Quebra tabela

Cafeína Anidra	PF; FTIR; iodeto de potássio e ácido clorídrico; acetilacetona, hidróxido de sódio e dimetilbenzaldeído; HPLC; potenciometria	PF; FTIR; iodo e ácido clorídrico; ácido clorídrico com clorato de potássio; TLC e potenciometria	PF; FTIR; iodo e ácido clorídrico; ácido clorídrico com clorato de potássio; HPLC.
Cafeína Hidratada	PF; FTIR; iodeto de potássio e ácido clorídrico; acetilacetona, hidróxido de sódio e dimetilbenzaldeído; HPLC	N.D.	N.D.
Teofilina Anidra	PF; FTIR; hidróxido de potássio com ácido sulfanílico diazotizado; potenciometria; HPLC	N.D.	N.D.
Teofilina Hidratada	PF; FTIR; hidróxido de potássio com ácido sulfanílico diazotizado; potenciometria; HPLC	N.D.	N.D.
Dimenidrato	PF; água, etanol, ácido clorídrico, clorato de potássio e amônia; FTIR; etanol e ácido pícrico; HPLC; potenciometria	N.D.	N.D.
Aminofilina Anidra	PF; FTIR; cloreto de benzoíla, hidróxido de sódio, água e etanol; hidróxido de potássio e ácido sulfanílico diazotizado; HPLC; potenciometria	FTIR; água e ácido clorídrico; ácido clorídrico, cloreto de potássio e hidróxido de amônio; TLC; potenciometria; HPLC	FTIR; água e ácido clorídrico; ácido clorídrico, cloreto de potássio e hidróxido de amônio; TLC; potenciometria; HPLC
Aminofilina Hidratada	PF; FTIR; cloreto de benzoíla, hidróxido de sódio, água e etanol; hidróxido de potássio e ácido sulfanílico diazotizado; HPLC; potenciometria	N.D.	N.D.
Oxitrifilina	N.D.	N.D.	Iodeto de mercúrio-potássio; hidróxido de amônio e nitrato de prata; PF; TLC; potenciometria
Oxitrifilina em	N.D.	N.D.	TLC; HPLC

Quebra tabela			
Teobromina	FTIR; hidróxido de amônio e nitrato de prata; TLC; potenciometria	N.D.	N.D.

Fonte: Adaptado das farmacopeias europeia, brasileira e americana (COUNCIL OF EUROPE, 2010; BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2006).

4.4. TÉCNICAS USADAS NA ANÁLISE DA CAFEÍNA

As técnicas analíticas que compuseram os métodos foram descritas abaixo, sendo segregados em métodos oficiais encontrados nos compêndios. Embora as produções científicas possuem como referências estes compêndios; como métodos alternativos foram considerados os artigos científicos aos quais propuseram o desenvolvimento de novos métodos analíticos. Ademais, a nível de monografia, foram selecionados os artigos e seus recortes mais pertinentes para a avaliação dos métodos e/ou técnicas, as quais diversos grupos de pesquisa já trabalharam e continuam atuando em diversas linhas de pensamento dentro de um mesmo macroprojeto. Com isto, o nível de detalhamento destes artigos está atrelado aos demais destas linhas, as quais na maioria das vezes está bloqueado a grandes públicos acadêmicos. Sob esta ótica, é aconselhável consultar o capítulo de referências para maiores informações.

4.4.1. Métodos oficiais

4.4.1.1.: Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia surgiu com técnica de filtração de amostras em sistemas de gradiente de eluição, tal a separação do carotenóide (pigmento laranja) da cenoura por coluna cromatográfica (SOUZA, 2016).

A ideia central da cromatografia é a separação gradual dos componentes de uma mistura para diversas finalidades: presença, quantificação ou pureza. O processo físico-químico de separação é a passagem de uma fase móvel (eluente) sobre a amostra, a qual está suportada na fase fixa (fase estacionárias); o equilíbrio desta separação é a velocidade

relativa de cada componente em relação a fase estacionária, isto é, a afinidade química entre si (SOUZA, 2016).

Na cromatografia líquida de alta eficiência; as amostras são preparadas para estarem na fase líquida e são inseridas na coluna cromatográfica preenchida pela fase estacionária. A fase móvel deve ser eluída a uma vazão constante para que as moléculas da amostra cheguem à coluna. Após a passagem na coluna, os analitos passarão no detector, que transmitirá um sinal elétrico ao software. A cromatografia líquida possui esta denominação pois a fase móvel líquida é bombeada sob alta pressão (SOUZA, 2016).

4.4.1.2. Titulação potenciométrica ou potenciometria

A titulação potenciométrica é uma análise em que é medido o potencial elétrico do fluido com corrente constante. A titulação chega ao ponto de equivalência quando os mols do reagente se igualam ao dos produtos estequiometricamente; sendo detectados pelos sensores (eletrodos). Os eletrodos usados são o de referência (hidrogênio) e o de trabalho (calomelano) (SOUZA, 2012).

Em titulações automáticas, são usadas o potenciostato acoplado ao eletrodo combinado. A concentração do analito se baseia na Equação de Nernst. A determinação do ponto final da titulação eletronicamente é determinada via primeira derivada no gráfico de resposta, visualmente, é o ponto de inflexão (SOUZA, 2012).

4.4.1.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho

A espectroscopia do infravermelho é uma análise empregada a partir da região entre as micro-ondas e o infravermelho, correspondendo à faixa de comprimento de onda entre 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} (infravermelho médio). Para o sistema de equipamento supracitado, usa-se o sistema de espectroscopia de refletância total; onde o feixe de luz passa pelo interferômetro e é dinamicamente refletido para o cristal de seleneto de zinco ao qual refletirá a amostra sólida, líquida ou semissólida (FIORINI, 2000; SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005).

A amostra absorverá uma certa quantidade de energia quantizada, mas transmitirá o restante, ao qual será destinado ao detector, de tal modo que o seu gráfico correspondente serão as bandas de comprimento de onda de acordo com as interações vibracionais: deformações angulares (simétricas ou assimétricas, dentro ou fora do plano) e/ou deformações axiais ou estiramentos (FIORINI, 2000; SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005).

Conforme os autores Fiorini (2000); Silverstein, Webster e Kiemle (2005) um estiramento é uma vibração entre o esqueleto da ligação covalente, em função da vibração de um elemento em cada lado deste esqueleto, sem sair do lugar. Essas vibrações em termos de comprimentos de ondas podem indicar as ligações existentes na molécula estudada, assim como os seus respectivos grupos funcionais. Cada molécula estudada possui um gráfico específico. Uma molécula tem 3 graus de liberdade (eixos x, y e z), no FTIR as interações que conseguem ser observadas são as axiais.

4.4.2. Métodos Alternativos

4.4.2.1. Voltametria

A voltametria é uma técnica analítica baseada em propriedades elétricas no qual variam-se as intensidades da corrente e do potencial aplicados. A voltametria nasceu da polarografia (uso do eletrodo de mercúrio gotejante). A polarografia tem-se a corrente em função do potencial. A intensidade da corrente é a consequência da concentração dos analitos, enquanto que o potencial identifica a espécie na matriz (solução aquosa) (ALMEIDA, 2000).

A voltametria é uma técnica interfacial, uma vez que a superfície da amostra interage com a superfície do eletrodo. A difusão como transporte de massa é devido ao gradiente de concentração existente (ALMEIDA, 2000).

Por questões de segurança ambiental, o eletrodo de mercúrio foi relido como um eletrodo automático (carbono vítreo) com fios de revestimento de mercúrio interno para polarografia. Na voltametria o padrão é o eletrodo de aço revestido com pasta de carbono. Há também o eletrodo multimodo, no qual um potencial é aplicado e controlado pelo tempo, estando junto à célula voltamétrica e juntamente ao computador (software) (ALMEIDA, 2000).

A voltametria de onda quadrada soltam impulsos seriados elétricos que aumentam com o decorrer do tempo. Além disso, ela é uma análise mais rápida para voltamogramas e tem excelsa sensibilidade. Por conta das características do método, como baixo tempo de duração de impulso, a frequência aumenta. São mensurados a intensidade da corrente no final de cada pulso direto ora e/ou reverso, para que haja o mínimo possível de interferentes, como a corrente de fundo (não faradaica). Aos procedimentos reversíveis, o impulso na corrente anódica deve ser igual na catódica (ALMEIDA, 2000).

4.4.2.2. Espectrofotometria de absorção no ultravioleta

No espectro eletromagnético, as moléculas emitem sinais em comprimentos de onda diferentes. Em conjunto com demais técnicas moleculares, pode-se caracterizar a substância (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002).

Se a radiação ultrapassar um material transparente, parte dela será absorvida. Se isso ocorrer com um prisma, haverá um espectro transparente de absorção. A molécula se excita com o incremento da energia vinda pelo espectro (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002).

Para as espectroscopias ultravioleta e visível; as transições provenientes das absorções ocorrem em níveis de orbitais eletrônicos; um elétron é delegado a um nível maior de energia no orbital desocupado de menor energia (ligações sigma ou ligações simples) (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002).

Se um átomo absorve no ultravioleta, o espectro de absorção será de linhas agudas entre dois níveis de energia. Para as moléculas, a absorção pode acontecer em uma gama de comprimentos de energia, a depender de como a molécula fora excitada. Quanto maior a concentração das moléculas que absorvem no mesmo comprimento de onda, mais extenso será o processo. Na espectroscopia de UV-VIS a quantificação é feita seguindo a Lei de Lambert Beer (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002).

O sistema conta com uma fonte de luz, da qual seleciona-se o comprimento de onda requerido (deutério para UV e tungstênio para IV). O detector é um tubo como fotodiodo para receber os sinais analíticos. As celas contêm as substâncias de referência e amostra respectivamente e um computador. Se for um instrumento de feixe duplo, um feixe passará pela amostra e outra pela referência (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002).

4.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Para que haja confiabilidade nos resultados dos métodos analíticos, principalmente na área da cromatografia, se faz necessário o uso de algumas medidas, tais como: padrões farmacopeicos de referência (com certificados), métodos validados, ferramentas da informática validada (planilhas de cálculos e sistemas de acervo de dados). Desta forma, sob um mesmo sistema de garantia de qualidade haverá maior controle dos resultados emitidos, de tal forma que possibilite a comunicação entre laboratórios mundiais (SOARES, 2001).

No que tange à validação do método analítico, este pode ocorrer entre dois analistas ou entre dois laboratórios independentes. Se for uma validação interna, usa-se o teste de recuperação em conjunto com uma das duas alternativas: comparação a método solitário ou materiais certificados. Se for entre empresas distintas, há o formato das colaborações (SOARES, 2001).

No teste de recuperação, o analito almejado é incluso à matriz e o método escolhido é processado. Para obter a porcentagem real do analito na matriz, divide-se o valor real (mensurado) pelo teórico (metodologia) e multiplica-se por 100. Neste cálculo, parte-se da premissa de que o analito é uma substância estranha à matriz, ao qual se destaca o suficiente para ser devidamente extraído. Se este resultado for considerado em conjunto aos demais parâmetros explicados adiante, o conjunto pode revelar possíveis comportamentos dos diversos analitos na matriz (SOARES, 2001).

Se a escolha da validação estiver sob a ótica do método independente, as propriedades físicas ou químicas do método da situação-problema devem ser obrigatoriamente discordantes do método referência, desde que a referência esteja validada. Por exemplo: usar a cromatografia líquida por detector amperométrico (referência) e outro com índice de refração-situação problema (SOARES, 2001).

Um material de referência certificado é aquele mais pertinente à calibração do instrumento, validação de método analítico ou que agrega valores em materiais, devido às propriedades intrínsecas ao material produzido.

4.6. COMUNIDADE CIENTÍFICA SOBRE OS MÉTODOS OFICIAIS

4.6.1. Método envolvida: UV-VIS de 2ª derivada

Lau *et al* (1992) analisou as amostras de café instantâneo, café em pó e chá utilizando o método de UV-vis com segunda derivada. Para isso, preparou as soluções aquosas-padrões de cafeína, hidróxido de sódio e acetato de cobre II, todos reagentes de grau analítico. Essas soluções foram ultrassonificadas e filtradas para retirada dos sólidos em suspensão e do gás carbônico.

As soluções- estoques de café instantâneo, café em pó e chá sofreram as etapas de extrações a quente com água (exceto instantâneo), filtração a frio e alíquotagem de 5,0 mL de filtrado em balão de 50,0 mL (exceto instantâneo, que não houve). Com isto, as concentrações finais aquosas foram-se de 1,50 mg/mL (café instantâneo), 0,00467 mL/mL (café em pó) e 0,0010 mL/mL (chá) (LAU *et al*, 1992).

Para a etapa da determinação foram empregados dois métodos distintos: alcalino e acetato de cobre para amostras de café e de chá, respectivamente. Em cada uma há as etapas de correção da linha de base, gráfico de calibração e análise da amostra. Todas as soluções eram avolumadas com água em padronagem de 10,0 mL. A etapa da correção da linha de base foi universal, a saber: para cada tipo de amostra, procedeu-se a alíquotagem de 10,00 mL de amostra, extraídos com clorofórmio e centrifugados. Como solução final colocou-se 1,00 mL do centrifugado aquoso e entre 0,20 mL a 1,50 mL de hidróxido de sódio diluído e obteve-se a segunda derivada em 298,60 nm (LAU *et al*, 1992).

Para as amostras de café realizou-se a correção da linha de base, seguido pela montagem da curva de calibração com os padrões de cafeína (0 mL a 1,00 mL do estoque de 100,00 µg/mL) e o volume fixo de hidróxido de sódio diluído (1,50 mL). Para a análise das amostras, seguiu-se os passos da curva de calibração com 1,00 mL de amostra no lugar do padrão de cafeína (LAU *et al*, 1992).

Para as amostras de chá, efetuou-se a correção da linha de base e prosseguiu-se pela montagem da curva de calibração. Nesta última, incrementou-se 5,00 mL do padrão de cafeína nas faixas de 0 µg/mL a 50 µg/mL; 4,00 mL de acetato de cobre (0,02 mol.L⁻¹) e 1,00

mL de hidróxido de sódio ($1,00 \text{ mol.L}^{-1}$). A análise da amostra partiu da adaptação da curva de calibração, onde trasladou-se o padrão de cafeína pela amostra (LAU *et al*, 1992).

4.6.2. Método envolvido: FTIR

Foram torradas, moídas e secas as amostras de café, tanto para semente como para a casca. Para FTIR fizeram uma pasta com prensa hidráulica e colocaram no respectivo equipamento. O uso da quimiometria havia funcionado pelo uso do tratamento dos dados estatísticos com base avançada (TAVARES *et al*, 2012).

4.6.3. Método envolvido: HPLC diferencial para cafeína e catequim

Logrou-se o chá verde através da secagem e fermentação do chá preto, no qual liberou-se as moléculas de catequim e, ao mesmo tempo, a de cafeína. Para ambas, adotou-se o uso do HPLC com as ferramentas da eluição isocrática com rampa de tempo e controle de temperatura (FERNÁNDEZ *et al*, 2000).

Aprontou-se as amostras de chás hortelã, preto, Ceilão, bergamota, floral e laranja em uma mistura de acetonitrila: água (1:1) e filtrou-as conforme o método adaptado originalmente de Suematsu. Na metodologia do HPLC diferencial, contou-se com o auxílio das técnicas quimiométricas, a citar: análise multivariada de dados, análise do principal componente e do discriminante linear (FERNÁNDEZ *et al*, 2000).

4.6.4. Método Espectrofotometria de Absorção

Considerou-se como amostras as mesmas de Fernández *et al* (2000).

Usou-se o método de extração de alcaloides para UV-VIS, adaptado de Schormuller. No erlenmeyer, pesou-se 2,00 g de amostra, 5,00 g de óxido de magnésio com 200,00 mL de água fervente. Filtrou-se a frio, extraiu-se com 4,00 mL de ácido sulfúrico e 100,00 mL de clorofórmio. Posteriormente, no extrativo orgânico passou-se 5,00 mL de hidróxido de potássio 1 % sob agitação. Ao filtrado de 100,00 mL, alíquotou-se 2,00 mL e completou-se para 50,00 mL de solução clorofórmica. Uso de 273 nm e 320 nm ao espectrofotômetro de absorvância (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

Para a curva de trabalho, montou-se com 0,20 mg a 1,00 mg de cafeína padrão em 50,00 mL de clorofórmio. No equipamento, injetou-se o branco (clorofórmio), a linearidade e as amostras. Tinha-se que o cálculo devia-se ser: % cafeína = (mg cafeína X 10000) / (g de amostra x 2000) (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

4.6.4.1. Método da cromatografia líquida

A extração de alcaloides encontrou-se justaposto a ISO 10095:2002. Com as massas do erlenmeyer, acrescentou-se 3,00 g de amostra, 6,00 g de óxido de magnésio e 100,00 mL de água destilada. Ebuliu-se e descobriu-se a massa perdida. Centrifugou-se e purificou-se por membrana; ao sobrenadante, injetou-se no cromatógrafo. Usitou-se a técnica de HPLC com detector de UV-VIS (273 nm) e eluição isocrática acetonitrila: solução aquosa de ácido acético. Instituiu-se a curva de calibração com os padrões isolados de 0,20 µg/mL a 60,00 µg/mL (teobromina, teofilina) e 0,20 µg/mL a 700,00 µg/mL (cafeína). Cálculo dos teores de analitos na amostra (%) = (µg de analito * 100) / (g de amostra x 10000) (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

4.6.5. Cromatografia líquida diferencial

Aprestou-se a curva de padrões com 1,00 mg/mL – 200,00 mg/mL de soluções de trabalho a partir do estoque de 2000 µg/mL. Ajuste de pH com ácido acético ou hidróxido de sódio. Para a solução de amostra, dispôs-se em tubo de centrifuga 2,00 mL de amostra e 8,00 mL de água. Sob agitação contínua, acidificou-se com pH 3,0 e adicionou-se 1,5 g de NaCl e encaminhou-se à microextração (YOUSEFI *et al*, 2017).

Na microextração, acrescentou-se 0,45 mL de etanol (dispensor) e 0,08 mL de n-octanol (extrator); agitou-se, suspendeu-se naturalmente e centrifugou-se. A fase superior coou-se por membrana e injetou-se no cromatógrafo líquido; usitou-se o detector de UV-VIS (274 nm) com eluição isocrática de metanol, água e ácido acético 50:49:1. Sincronicamente, para análises comportamentais das substâncias sob os métodos referenciados, usitou-se o alicerce do desenho de compósito central com vistas a superfície de respostas adequado e modelo matemáticos (YOUSEFI *et al*, 2017). Posteriormente, delatarão as pesquisas envoltas em prováveis melhorias aos métodos analíticos farmacopeicos.

4.7. COMUNIDADE CIENTÍFICA SOBRE OS MÉTODOS ALTERNATIVOS

4.7.1. Extração com destilação de Soxhlet

Como um exemplo de um método exclusivamente extrativo, reportou-se aos estudos de Brenelli (2003) sobre como extrair a cafeína em bebidas estimulantes, principalmente em matrizes solúveis em água. Assim sendo, este método é qualitativo, podendo ser empregado em análises cromatográficas que serão referidos na discussão.

O método extrativo consistiu-se em: pesagem de 10,00 g de amostra, 150,00 mL de etanol em balão de extração com cacos de porcelana. Após montagem e refrigeração, acrescentou-se 100,00 mL de óxido de magnésio 10 %; evaporou-se o etanol por secagem rotatório. Quanto à pasta de fundo, realocou-se no béquer com 125,00 mL de água destilada. Aqueceu-se com ácido sulfúrico diluído para concentração, extraiu-se com clorofórmio. Prontamente usou-se KOH diluído na extração de diclorometano. No extrato orgânico aditou-se o sulfato de sódio anidro e secou-se por rotação (BRENELLI, 2003).

4.7.2. Voltametria com eletrodo de náfon-rubênio

As condições de análise foram: uso de eletrodo pronto de náfon-rubênio com revestimento de óxido de pirocloro ambientado na solução de cafeína; técnica de voltametria por onda quadrada (VM-SW) com varredura no potencial entre +1,0 V a +1,6 V, eletrodo de trabalho Ag/AgCl, frequência de 105 Hz, amplitude de 70 mV e altura de 6 mV. Efetivou-se a correção da linha de base com corrente de oxidação através do eletrólito com ácido perclórico a 5 %. Este estudo foi um exemplo de eletrodo quimicamente alterado (eletrodo de trabalho) (ZEN; TING e SHIH, 1998).

Quanto à manipulação das amostras, mensurou-se as soluções de 0,1107 g (café comum) e 3,3523 g (café descafeinado) nos volumes de 100,00 mL cada. Destes anteriores, operou-se com 2,00 mL no volume de 25,00 mL cada. No que diz respeito ao chá, pesou-se 2,00 g para extração com água quente; aliquotou-se 2,00 mL do extrato em 25,00 mL de água. Ao que tange o refrigerante, aliquotou-se 3,00 mL em 10,00 mL de água (ZEN; TING e SHIH, 1998).

4.7.3. Voltametria com eletrodo de boro dopado de diamante

Na indústria alimentícia é corriqueiro encontrar amostras adjuntas de baunilha com cafeína, por ambos terem funções oxigenadas em suas estruturas moleculares (aldeído e amida, nessa ordem), podendo haver resultados falsos- positivos do ponto de vista analítico. Uma técnica presumível é a voltametria de onda quadrada, tais como os exemplos das utilidades do eletrodo de nanocompósito de grafeno dopado com nitrogênio em meio ácido por Jiang *et al* (2014); eletrodo de carbono vítreo com película de alizarina vermelha S, vide estudos de Filik, Avan, Mümin (2017). Para erradicar o risco daqueles interferentes, necessita-se do pré-tratamento da linha de base digitalmente (Savicky e Golay) com oxigênio, para neutralizar os efeitos do hidrogênio no meio. Dentro deste pensamento, surgiu o estudo de Ali *et al* (2017) com a utilidade do eletrodo de boro dopado com diamante, com destaques ao amplo potencial eletroquímico nas soluções aquosas (amostras); pequena e estável corrente de fundo; excelsas resistências aos interferentes na sua superfície, corrosão e robustez mecânica.

No eletrodo de BDD, usou-se como procedimentos de limpeza de eletrodo a ambientação diária em solução de ácido sulfúrico e a correção da linha de base. Entre os métodos em exercício eram: HPLC e VM-SW (ALI *et al*, 2017).

Em ambos os métodos, elaborou-se as soluções padrões (trabalho) doravante as soluções estoque. Nestas, para VAN e CAF (1,00 mg/mL cada) tendo como diluente a mistura água: etanol aquoso a 50 % (1:1). Todas as soluções em grau analítico (ALI *et al*, 2017).

Para as amostras comerciais, optou-se por açúcar baunilhado, café instantâneo e refrigerante. Aos sólidos, misturou-se até virar argamassa, coletou-se 1,00 g. Diluiu-se em 50,00 mL e 25,00 mL de água e água: etanol para baunilha e café, reciprocamente. Ultrassonificou e aqueceu-se. Ao refrigerante, usou-se 10,00 mL no ultrassom e retirou-se o CO₂ em pH 2,50 (ALI *et al*, 2017).

Ao método de HPLC, usitou-se o detector de arranjo de diodos (207 nm), fase móvel por eluição isocrática com acetonitrila: água (1:4) e acertou o pH em 2,50 com ácido

fosfórico. As amostras efetuaram-se na fase móvel. A calibração do HPLC deu-se por regressão linear para a curva de calibração (ALI *et al*, 2017).

Ao método de VM-SW, elaborou-se as soluções estoque de VAN e CAF. A partir disto, construiu-se as soluções de trabalho no eletrólito de suporte. Para avaliação dos eletrólitos de suporte com melhor atividade elegeu-se: acetato (0,10 M e pH 4,70), fosfato (0,10 M e pH 2,50 a 7,40) e Britton-Robbinson ou BR (0,10 M e pH 2,70). O método de VM-SW foi otimizado com a curva de calibração e os cálculos de LQ e LD (ALI *et al*, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. QUESTÕES SOBRE A FARMACOPEIA

A única farmacopeia que disponibilizou informações como o limite de detecção foi a europeia, a qual forneceu dados em termos de porcentagem do analito em relação à área do pico principal fornecido no cromatograma para a análise de substâncias relatadas. Este analito deve estar em uma faixa de detecção para estar dentro dos padrões de qualidade almejados.

As monografias consultadas foram cafeína anidra, cafeína monohidratada, teobromina anidra, teofilina anidra, teofilina hidratada, teofilina dietilenoamina anidra, teofilina dietilenoamina hidratada. As monografias anidras e hidratadas são muito semelhantes, as quais determinam o conteúdo de água por secagem na estufa a partir da massa de 1,0 g de amostra e por porcentagem. Dentro destas monografias pode-se ter ou não mais moléculas relacionadas.

5.2. METODOLOGIAS CLÁSSICAS E ALTERNATIVAS

A cromatografia em camada delgada caracteriza-se por ser uma técnica rápida, versátil e econômica, as quais fornecem noções sobre a polaridade da molécula estudada, isto é, auxilia na escolha da melhor fase móvel em ensaios mais complexos como o HPLC (DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998; MOREIRA, 2015).

É válido ressaltar que em todos os métodos descritos anteriormente, foi mantido os valores das quantidades usadas de insumos; visto que os resultados são consequências do efeito de concentração, principalmente em métodos não-oficiais que dependeu da eficiência da extração para purificar e das validações analíticas.

5.2.1. Peculiaridades da metodologia UV-VIS-2° derivada

Sem os métodos extrativos, os interferentes iriam prejudicar as medições nos espectros de UV, tais como os caramelos (276,4 nm), taninos (275,8 nm) e ácido clorogênico (324 nm). A seletividade pode estar na escolha da faixa de luz pertinente para a cafeína. Este método analítico com cálculo diferencial pode ser o agente para a possível tendência em corrigir erros laboratoriais e/ou de natureza dos métodos e suas moléculas com adventos matemáticos. Um exemplo desta situação é a popularização da técnica UV-VIS (LAU *et al*, 1992).

Em termos de cálculo, os métodos foram baseados em Abdel-Moety, cujos resultados foram escopos para melhorias. Os objetos de estudo eram os caramelos e taninos com cafeína desprezível. Todavia, com a correção da linha de base, os picos de caramelo no espectro têm zero pontos em 267,6 nm; 288,8 nm e 299,0 nm (pH neutro). O ácido tânico tem picos a 257,2 nm e 301,6 nm. Nestas condições a cafeína manifestou-se em 299,0 nm, ficando mascarado no pico do caramelo (LAU *et al*, 1992).

Após estudos posteriores revelou-se que o problema estava na ação do tanino sob a cafeína na quantificação, sendo este problema corrigido com o hidróxido. A estabilidade do corante pode ser quebrada com base acima de 0,20 µg/mL, baixando-se as detecções do ácido (LAU *et al*, 1992).

Assim sendo, o limite de quantificação era de 41,40 µg/mL para ácido tanínico, e o limite de detecção em 13,8 µg/mL para a cafeína no método da correção da linha de base. Entretanto, para o cenário do chá houve a exigência do cobre como um corretor do tanino (LAU *et al*, 1992).

O ácido tanínico (128 µg/mL) na presença da cafeína (9,7 µg/mL) induziu o sinal do tanino, em proporções de 13:2:1 com desvio padrão relativo de 5,0 %. O ácido clorogênico produziu DPR negativa, sendo relacionado ao HPLC e o analito foi controlado pelo hidróxido (LAU *et al*, 1992).

5.2.2. Resultados da metodologia da extração de Soxhlet

Com a metodologia empregada e com as devidas correções, foi o suficiente para detectar adulterações nos grãos de café com a inserção da casca na torração. O LD foi de 0,5 % e L.Q. de 1,0 %. (TAVARES *et al*, 2012).

5.2.3. Peculiaridades sobre o método de HPLC para cafeína e catequim

No desenvolvimento do método a que foi otimizado realizou-se a validação. Nela, o L.D. para cafeína foi de 1,90 µg/mL e L.Q. de 6,30 µg/mL. As espécies de catequim variaram entre 0,20 µg/mL a 1,30 µg/mL para L.D.; e entre 0,90 µg/mL a 4,60 µg/mL. O teor de cafeína nos chás foi de 1,00 % a 3,50 %, enquanto que o de catequim estavam entre 0,50 % a 5,00 %. Os métodos quimiométricos serviram para separar espécies químicas próximas, tais como as moléculas da família do catequim de modo independente (FERNÁNDEZ *et al*, 2000).

5.2.4. Método de HPLC para cafeína, teobromina e teofilina em bebidas

O método do HPLC sofreu a validação de método analítico. Os métodos da espectrofotometria e da cromatografia passaram por análise estatística. No HPLC, em termos de limites de detecção, foram avaliados os analitos no padrão (mg/100mL) e na amostra (mg/100g). Deste modo, os analitos teobromina e teofilina tiveram os mesmos resultados: 0,01 mg no padrão e 0,3 mg na amostra. A cafeína teve 0,02 mg no padrão e 0,70 mg na amostra (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

Os limites foram calculados em média a partir dos dados obtidos da recuperação (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

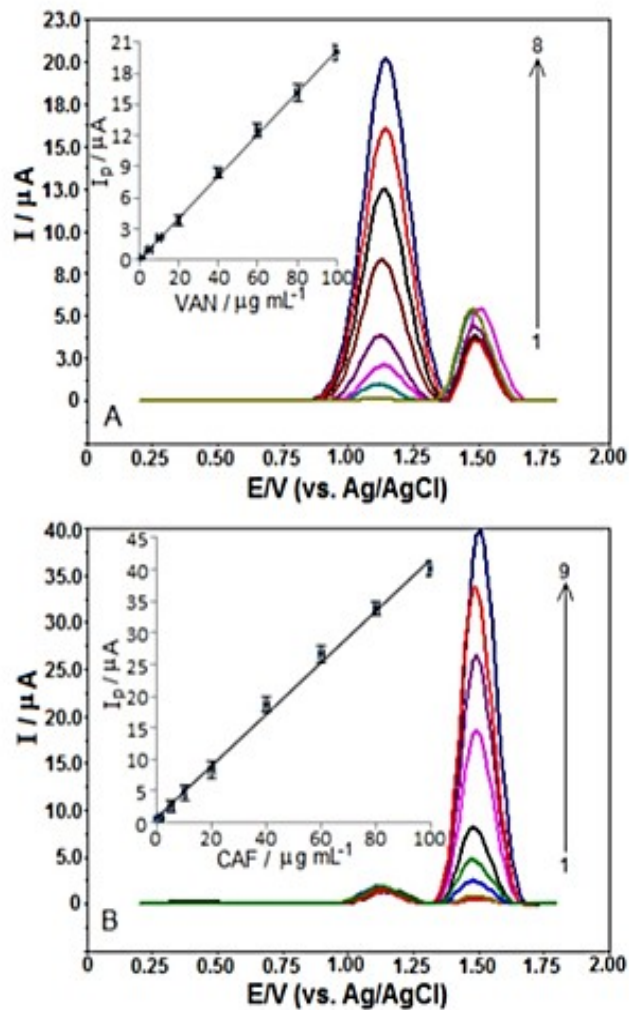
Em termos de mg de analito / 100 g de amostra; no HPLC, uma minoria das amostras apresentou a presença da cafeína, embora na espectrofotometria somente na camomila não foi detectado. Todavia, foram detectadas cafeína no chá preto por ambos os métodos (2405 mg a 2612 mg no HPLC e 2145 mg a 2655 mg no espectrofotométrico), aos quais se igualaram estatisticamente. A teobromina foi expressiva no chá preto (56 mg a 130 mg) por HPLC. A teofilina foi expressiva no chá preto por HPLC: entre 1 mg a 2 mg. A tendência em possuir a presença da teobromina foi delatada nos chás herbais (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

5.2.5. Voltametria de onda quadrada para VAN e CAF

Para a análise voltametria das amostras foi feito o branco com as soluções padrões da seguinte maneira: a pré-concentração de VAN e CAF na superfície do eletrodo BDD tratado foi feito por acumulação de adsorção na condição de circuito aberto por 60 s enquanto houve a agitação magnética a 500 rpm. Após 10 s os voltamogramas foram registrados com a faixa de +0,2 V a +1,8 V com a modulação otimizada de SW, varredura de 14 mV, amplitude de pulso de 70 mV e frequência de 50 Hz (ALI *et al*, 2017).

Fez-se o desenvolvimento de método no sentido de entender o comportamento do eletrodo no sistema de amostras. Para garantir a confiança do método, fez-se o programa de ativação diário, as correções de linha de base matematicamente e a otimização do método. As melhores condições são relatadas adiante (ALI *et al*, 2017).

Figura 4 - Voltamogramas otimizados de VAN e CAF



Estudo dos efeitos dos padrões internos em amostras puras de VAN e CAF para aplicação nas análises das matrizes comerciais. Voltamogramas SW para diferentes concentrações de VAN (A) e CAF (B) em

concentrações fixas de 10,0 µg mL⁻¹ de CAF e 10,0 µg mL⁻¹ VAN, respectivamente. Concentrações de VAN (1-8): 1,0–100,0 µg mL⁻¹. Concentrações de CAF (1 a 9): 0,25 a 100,0 µg mL⁻¹. Insets: as respectivas curvas analíticas para VAN (A) e CAF (B). Eletrodo, APT-BDD; eletrólito de suporte, tampão fosfato pH 2,5; Período de pré-concentração, 60 s em condição de circuito aberto; Parâmetros de VM-SW: frequência, 50 Hz; potencial de passo, 14 mV; amplitude de pulso, 70 mV. Fonte: Adaptado de ALI *et al* (2017).

Os resultados analíticos de ambos os métodos estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 -Comparação dos métodos usados para determinar VAN e CAF

Amostras	Analito	VM-SW	HPLC
açúcar de baunilha	VAN	32,65 em ± 1,22	31,88 em ± 0,68
refrigerante de cola	CAF	106,25 em ± 2,83	110,08 em ± 1,09
baunilha em espuma	VAN	0,272 em ± 0,014	0,259 em ± 0,006
	CAF	2,58 em ± 0,11	2,49 em ± 0,05

Fonte: Adaptado de ALI *et al* (2017).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos apenas para o HPLC. Assim sendo, a VAN teve LD de 0,59 µg/mL e LQ de 1,97 µg/mL; CAF em LD de 0,46 µg/mL e LQ de 1,53 µg/mL. Na análise simultânea de CAF+VAN, os valores de VAN foram de 0,63 µg/mL para LD e 2,10 µg/mL para LQ; para CAF, 0,47 µg/mL de LD e 1,57 µg/mL de LQ (ALI *et al*, 2017).

Ademais, para a HPLC, fez-se a validação do método analítico vigente. A cafeína teve o limite de detecção em 0,90 ng/mL e o limite de quantificação em 2,90 ng/mL (YOUSEFI *et al*, 2017). Adiante serão expressos os dados dos métodos que contenham os limites de detecção (L.D.) e de quantificação (L.Q.), conforme tabela 4.

Tabela 4 -Limites de detecção e quantificação nos métodos validados

METODOLOGIA	TÉCNICA EXTRATIVA	L.D. (em µg/mL)	L.Q. (em µg/mL)	REFERÊNCIA USADA
UV-VIS 2ª DERIVADA	Método alcalino geral	13,60	41,40 para ácido tanínico	Lau <i>et al</i> , 1992
HPLC	Secagem por fermentação	1,90	6,30	Fernández <i>et al</i> , 2000

HPLC	Secagem por fermentação	0,20 a 1,30 para catequim	0,90 a 4,60 para catequim	Fernández <i>et al</i> , 2000
HPLC	Extração de alcaloides	0,010 mg/mL para teobromina e teofilina (cada um)	0,30 mg/mL	Alves e Bragagnolo, 2002
HPLC DIFERENCIAL	Microextração	0,90 ng/mL	2,90 ng/mL	Yousefi <i>et al</i> , 2017
HPLC para VAN	PT para amostras comerciais	0,59	1,97	Ali <i>et al</i> , 2017
HPLC para CAF	PT para amostras comerciais	0,46	1,53	Ali <i>et al</i> , 2017
HPLC para VAN+ CAF	PT para amostras comerciais	0,63 para VAN; 0,47 para CAF	2,10 para VAN; 1,57 para CAF	Ali <i>et al</i> , 2017

Nas colunas de L.D. e L.Q. foram omitidos os padrões de amostras medidas em µg/mL para cafeína, sendo as demais substâncias e medidas descritas. PT como pré-tratamento. Fonte: Formulado pela aluna.

As técnicas analíticas usadas no capítulo dos métodos alternativos, embora fossem oferecidos dados importantes para efeitos comparativos, ainda necessitam de maiores estudos, tal como a validação completa como um dos ensaios de caracterização química completa; aliadas às técnicas físicas (difração de raio- X e/ou ressonância magnética nuclear). Os métodos clássicos (HPLC) possuem a vantagem de oferecer maiores possibilidades de análise, desde que se trabalhem os diferentes parâmetros dos equipamentos, assim como os softwares matemáticos mais completos. Por outro viés, os métodos alternativos (voltametria, potenciometria, UV-VIS) são mais baratos, simples e cada vez mais operantes devido aos softwares mais básicos. Ensaios mais complexos como a validação só são executáveis em softwares de ponta como o ANOVA, ou em ambientes com alta tecnologia voltados à pesquisa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso das farmacopeias como método oficial empregado por agências reguladoras de saúde por blocos econômicos, em conjunto com as instituições provedoras de materiais de certificação no contexto da fiscalização de diversos produtos, matérias-primas e demais produtos acabados industrialmente com excelso valor agregado, são de majoritária importância na implantação e fiscalização de sistemas que cumpram ao controle de qualidade total. Este, com ferramentas regulatórias, documentais e com todos os parâmetros analíticos respaldam-se nos preceitos da Química Analítica, Bioquímicos e Farmacêuticos (genéricos e/ou fitoterápicos), bem como nos segmentos alimentícios (bebidas).

As metodologias analíticas empregadas mundialmente, principalmente com o uso da farmacopeia americana com respaldo na sociedade científica, deve permanecer em constante busca de métodos e/ou técnicas de aperfeiçoamento. Neste conluio, as técnicas com maior rapidez de análise no processo analítico em aliança aos altos níveis de qualidade geraram a questão estatística de validação. Portanto, inferiu-se que os mais pertinentes métodos analíticos, considerando-se as peculiaridades de cada parâmetro, custo de tecnologias e inovações, as metodologias referenciais validadas inteiramente e o comportamento da amostra, são aqueles projetadas em análises avançadas estatisticamente, com demanda de ensaios em caracterização físico-química das moléculas e/ou em matrizes destas supracitadas moléculas.

Entre todas as técnicas apresentadas, tanto para os métodos clássicos como os alternativos, as mais adequadas são HPLC diferencial e voltametria de onda quadrada com o

eletrodo BDD, uma vez que o ideal são os métodos físico-químicos aliados aos tratamentos de dados estatísticos.

7.REFERÊNCIAS

ALI, H.S.; ABDULLAH, A.A.; PINAR, P.T.; YARDIM, Y.; SENTÜRK, Z. Simultaneous voltammetric determination of vanillin and caffeine in food products using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode: Its comparison with HPLC-DAD. **Talanta**, v.170, p.389-591, 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.037> > Acesso em: 15 Out 2018

ALMEIDA, P.J.F. **Aplicações analíticas da voltametria com adsorção**.2000, 200 p. Tese em Química Analítica. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Porto, 2000.

Disponível em:

<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/10676/2/3411_TD_01_C.pdf> Acesso em : 13 Out 2018

ALVES, A.B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n.2, v.38, p.237-244, 2002. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322002000200013>.> Acesso em: 13 Ago 2018.

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids:

Biosynthesis, catabolism and genetic engineering. **Phytochemistry**, n.4, v.69, p.841-

856,2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.029> > Acesso em: 19 Out 2018

BARRACA, S.A. **Relatório do Estágio Supervisionado Produção Vegetal II: Manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas**. 1999, 49 p. Departamento de Produção Vegetal; Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’. (ESALQ/USP), Piracicaba, 1999. Disponível em:

< <http://www.pppmac.org/sites/default/files/p02.pdf> > Acesso: 14 Set 2018.

BRANDÃO, A. (Ed.). Farmacopeia Brasileira: O sonho de crescer. **Farmacopeia Brasileira**, n.97, p.13-18, Mai/Abr 2001. Disponível em. :<

<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/97/farmacopeia.pdf> > Acesso em: 10 Out 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão Nacional de Normas Técnicas e Padrões para Alimentos. Resolução da Diretoria Colegiada – CNNPA n.12, de 24 de Jul de 1978. **Normas técnicas especiais para alimentos e bebidas**, Brasília, DF. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/Resolucao_CNNPA_n_12_de_1978.pdf/4f93730f-65b8-4d3c-a362-eae311de5547> Acesso em: 16 Ago 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1 e 2, Brasília: 2º Ed, 2010. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeias-virtuais>> Acesso em.: 05 Out 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.519, de 26 de Jun de 1998. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de chás-plantas destinadas a preparação de infusões ou decocções.** Brasília, DF. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_519_1998.pdf/0f05b918-ef72-41b3-8dec-02d1944813be> Acesso em: 15 Ago 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.377, de 26 de Abr de 1999. **Regulamento técnico para fixação de identificação e qualidade de café torrado em grão e café torrado e moído.** Brasília, DF. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_377_1999.pdf/8c15dcc6-3d04-4bea-bb9d-1799ef6e64df> Acesso em: 15 Ago 2018

BRASIL. Presidência da República, Planalto. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto n.6871, de 04 de Jun de 2009. **Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas.** Brasília, DF. Disponível em: <

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm > Acesso em: 16 Ago 2018

BRENELLI, E.C.S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes – uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Quim Nova**, n.1, v.26, p.136-138. 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000100023> > Acesso em: 18 Out 2018

CAMARGO, W. **Controle de Qualidade Total: Curso Técnico em Segurança do Trabalho.** Instituto Federal Paraná, e-Tec Brasil: Curitiba, 2011.152 p. Disponível em:

<<http://ead.ifap.edu.br/netsys/public/livros/LIVROS%20SEGURAN%C3%87A%20DO%20TRABALHO/M%C3%B3dulo%20I/Livro%20Controle%20da%20Qualidade%20Total.pdf>> Acesso em: 14 Out 2018

COUNCIL OF EUROPE (Ed). **European Pharmacopoeia.** Strasbourg. 7th ed, v.1. and 2, 2010. Disponível em:< <http://www.fptl.ru/biblioteka/farmacop/EP-7.0-2.pdf>> Acesso em: 23 Out 2018

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola.** Cromatografia, n.7, p.21-25, 1998. Disponível em:

< <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf> > Acesso em: 24 Out 2018

FERNANDES, W. **A.O Movimento da Qualidade no Brasil.** São Paulo: Essencial Ideia, 2011. 161p. Disponível em:

< http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/Livro_Qualidade.pdf> Acesso em: 12 Out. 2018.

FERNÁNDEZ, P.L.; MARTÍN, M.J.; GONZÁLEZ, A.G.; PABLOS, F. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. **Analyst**, n.3, v.125, p.421-425, 2000. Publisher by RSC. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/a909219f>> Acesso em: 30 Out 2018

FILIK, H.; AVAN, A. A.; MÜMIN, Y. Simultaneous electrochemical determination of caffeine and vanillin by using poly (alizarin red S) modified glassy carbon electrode, **Food Anal. Methods**, n.1, v. 10, p.31-40, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-016-0545-z> > Acesso em: 26 Out 2018

FIORINI, E. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Medidas para Caracterização e Análise de Materiais**, Universidade de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica, 2000. Disponível em: < <http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/FTIR.pdf> > Acesso em: 19 Out 2018

GOMES, P.A. **Óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.) de áreas nativas**, 2010, 69 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PRODVEGETAL_3434_1303935920.pdf> Acesso: 18 Set 2018.

JIANG, L.; DING, Y.; JIANG, F.; LI, L.; MO, F. Electrodeposited nitrogen-doped graphene/carbon nanotubes nanocomposite as enhancer for simultaneous and sensitive voltammetric determination of caffeine and vanillin, **Anal. Chim. Acta**, v. 833, p.22-28, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.010> > Acesso em: 25 Out 2018

LATOSINSKA, M.; LATOSINSKA, J.N. **Introductory chapter: Caffeine, A Major Component Of Nectar Of The Gods And Favourite Beverage Of Kings, Popes, Artists And Revolutionists, A Drug Or A Poison?** IN: LATOSINSKA, J.N. (Ed.). **The Question of Caffeine**. Londres: Intechopen, 2017, chapter 1, p.1-27. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69693> > Acesso em.: 13 Ago 2018

LAU, O.W.; LUK, S.F.; CHENG, O.M.; CHIU, T.P.Y. Background-correction methods for the determination of caffeine in beverages, coffee and tea by using second-derivate ultraviolet spectrophotometry. **Analyst**, n.4, v.117, p.777-783, 1992. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/AN9921700777> > Acesso em: 28 Out 2018

MACHADO, G.C. **Contaminantes químicos emergentes em águas naturais e de abastecimento público: desenvolvimento analítico e estudo de caso envolvendo capitais estaduais do Brasil**.2015.138 p. Tese em Química Analítica. Instituto de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/1884/46353> > Acesso em: 13 Ago 2018

MARKETERS MEDIA. **Caffeine Market Research 2018: Global Size, Growth, Trends, Outlook and Future Scope Analysis**. Índia, 14/06/2018. Disponível em: < <https://marketersmedia.com/caffeine-market-research-2018-global-size-growth-trends-outlook-and-future-scope-analysis/360071> > Acesso em: 14 Ago 2018

MOREIRA, C.C.C. **Identificação de cafeína em Saridon por cromatografia em camada delgada (TLC): uma abordagem para o ensino de química aplicado à toxicologia**. Brasília, 2015.51 p. Monografia em Química, Instituto de Química, Universidade de Brasília,

Brasília, 2015. Disponível em: < <http://bdm.unb.br/handle/10483/16240> > Acesso em: 02 Out 2018

MORETTO, L.D. **Status regulatório para injetáveis e acondicionamento primário: atualização sobre embalagens primárias e injetáveis**. IN: SIMPÓSIO INOVAÇÃO EM EMBALAGENS PRIMÁRIAS, Academia Nacional de Farmácia, Academia Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2016. 35 p. Disponível em: < http://www.academiafarmacia.org.br/01_02122016.pdf > Acesso: 18 Out 2018.

NEUMANN, D.V. **The World of Coffee in 2017**. Neumann Kaffee Gruppe. 22 p, 2012. Disponível em.: < <https://www.sintercafe.com/uploads/File/2012/presentations/0.neumann.pdf> > Acesso em: 14 Ago 2018

NEW ZEALAND GOVERNMENT. **Caffeine**. Ministry for Primary Industries: Manat Ahu Matua. 4 p, 2012. Disponível em.: < <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/3569/loggedIn> > Acesso em: 14 Ago 2018

PATAY, E.B.; FRITEA, L.; ANTONESCU, ANDREEA; ANTONESCU, ANGELA; DOBJANSCHI, L. **Coffea arabica: A plant with rich content in caffeine?** In: LATOSINSKA, J.N. (Ed.). **The Question of Caffeine**. Londres: Intechopen, 2017, chapter 2, p.27-43. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68149> > Acesso em.: 13 Set 2018

PERES, L.E.P. 2014. **Metabolismo secundário**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, 26 p, 2014. Disponível em: < <http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762> > Acesso: 19 Set 2018.

SALDAÑA, M.D.A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R.S. Extração dos alcaloides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com C supercrítico. **Food Science and Technology**, n.4, v.17, p.1-8, 1997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611997000400005> > Acesso em: 13 Ago 2018

SEVERINO, A.J. **Metodologia do trabalho científico**. 23ª ed, 2ª reimpressão. São Paulo: Cortez, 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds**. Ed. John Wiley & Sons, 70 ed, 2005.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª Edição, Editora Bookman, São Paulo -SP, 2002.

SMITH, O. Mapped: The countries that drink the most coffee. **The Telegraph**, London, Oct. 01, 2017. Travel, Maps and Graphics, p.1-8. Disponível em:

< <https://www.telegraph.co.uk/travel/maps-and-graphics/countries-that-drink-the-most-coffee/> > Acesso em: 28 Ago 2018

SOARES, C.S. **As ferramentas de comunicação interna na gestão para a qualidade**. 2004. Monografia em Comunicação Social. Projeto Experimental do Curso de Comunicação Social. Facom, UFJF: Juiz de Fora, 2.sem 2004. Disponível em:
< <http://www.ufjf.br/facom/files/2013/04/CSoares.pdf> > Acesso em: 25 Out 2018

SOARES, L.M.V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n.60, v.1, p.79-84, 2001. Disponível em: < http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/rial60_1_completa/895.pdf > Acesso em: 18 Out 2018

SOUZA, R. **Potenciometria**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química- ICE. Disciplina de Química Analítica V. 2012. 29 p. Disponível em:
<www.ufjf.br/baccan> Acesso em: 18 Out 2018

SOUZA, R. **Potenciometria**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química- ICE. Disciplina de Química Analítica V. 2016. 29 p. Disponível em:
<www.ufjf.br/baccan> Acesso em: 18 Out 2018

TAVARES, A.G. **Análise da expressão dos genes envolvidos na via de síntese de cafeína em plantas de café (*Coffea arabica*) apresentando diferentes teores de cafeína**. 2010. 92 p. Dissertação em Genética. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/92719> > Acesso em: 13 Ago 2018

TAVARES, K.M.; PEREIRA, R.G.F.A.; NUNES, C.A.; PINHEIRO, A.C.M. Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de café torrado por adição de cascas de café. **Quim Nova**, n.6, v.35, p.1164-1168, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000600018>.> Acesso em: 29 Out 2018

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. (Ed). **The Pharmacopeia of the US: National Formulary 24**. Rockville. Board of Trustees: 24th ed, v.1 and 2. 2006. Disponível em: < <http://www.uspbpep.com/search.asp> > Acesso em: 26 Out 2018

YOUSEFI, S.; KAMANKESH, M.; JAZAERI, S.; ATTARAN, A.; MOHAMMADI, A. Simple, effective and highly sensitive analytical method for determining caffeine in tea and energy drink samples and method optimization using central composite design. **Analytical Methods**, n.10, v.9, 2017. Publisher by RSC. Disponível em:
< <http://dx.doi.org/10.1039/C6AY03490J> > Acesso em: 28 Out 2018

ZANELLA, L.C.H. **Metodologia de Pesquisa**. 2ª ed. rev. Atual. Florianópolis: Departamento de Ciências de Administração – UFSC. 2011. Disponível em.:
<
http://arquivos.eadadm.ufsc.br/EaDADM/UAB3_2013-2/Modulo_1/Metodologia_Pesquisa/material_didatico/Livro-texto%20metodologia.PDF> Acesso em: 16 Ago 2018.

ZEN, J.M.; TING, Y.S.; SHIH, Y. Voltammetric determination of caffeine in beverages using a chemically modified electrode. **Analyst**, n.5, v.123, p.1145-1147, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/A708360B>> Acesso em: 23 Out 2018

APÊNDICE A - DESCRIÇÕES DAS MONOGRAFIAS

FARMACOPEICAS: MÉTODOS OFICIAIS PARA ANÁLISE DA CAFEÍNA

A.0. Monografia da cafeína

O emprego da cafeína nos analgésicos é justamente por dois fatores: contração dos vasos sanguíneos em episódios de crises e catalisador para absorção do ativo no organismo (DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998; MOREIRA, 2015). As impurezas relatadas da Farmacopeia Europeia nas monografias estão expostas nas tabelas 5 e 6 (COUNCIL OF EUROPE, 2010).

Tabela 5 -Tabela de impurezas reportadas na Ph.Eur.

Monografia vs. Composto	MONOGRAFIAS					
IMPUREZAS RELATADAS COMO COMPOSTOS	Cafeína Anidra	Cafeína Hidratada	Teofilina Anidra	Teofilina Hidratada	Teofilina Dietileno- amina Anidra	Teofilina Dietileno- amina Hidratada
COMPOSTO A	Teofilina	Teofilina	Cafeína	Cafeína	Cafeína	Cafeína
COMPOSTO B	Compost o B da cafeína	Composto B da cafeína	3-metil- xantina	3-metil- xantina	3-metil- xantina	3-metil- xantina
COMPOSTO C	Isocafeín a	Isocafeína	Compost o B da cafeína	Composto B da cafeína	Composto B da cafeína	Compost o B da cafeína
COMPOSTO D	Teobromi na	Teobromin a	Teofilidin a	Teofilidina	Teofilidina	Teofilidin a
COMPOSTO E	Cafeidina	Cafeidina	1,3- dimetilur ato	1,3- dimetilura to	1,3- dimetilurat o	1,3- dimetilur ato
COMPOSTO F	Paraxanti na	Paraxantin a	Etofilina	Etofilina	Etofilina	Etofilina

Fonte: Adaptado de Farmacopeia Europeia (COUNCIL OF EUROPE, 2010)

Quebra tabela

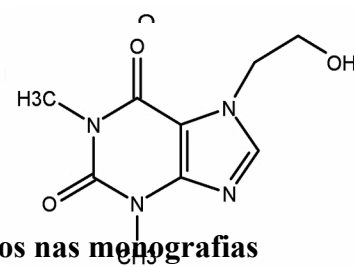


Tabela 6 -Tabela das impurezas relatadas como compostos nas monografias da Tabela 5

COMPOSTO RELATADO	NOMENCLATURA IUPAC	FÓRMULA ESTRUTURAL
TEOFILINA	1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona	
COMPOSTO B DA CAFEÍNA	N-(6-amino-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pirimidina-5-il)-formamida	
ISOCAFEÍNA	1,3,9-trimetil-3,9-dihidro-1H-purina-2,6-diona	
TEOBROMINA	3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona	
CAFEIDINA	N,1-dimetil-4-(metilamino)-1H-imidazole-5-carboxamida	
PARAXANTINA	1,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona	
CAFEÍNA	1,3,7-trimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona	
3-METILXANTINA	3-metil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona	
TEOFILIDINA	N-metil-5(metilamino)-1H-imidazole-4-carboxamida	
1,3-DIMETILURATO	1,3-dimetil-7,9-dihidro-1H-purina-2,6,8(3H)-triona	
ETOFILINA	7-(2-hidroxietil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona	

Fonte: Adaptado da Farmacopeia Europeia (COUNCIL OF EUROPE, 2010).

A.1. Monografia da Cafeína Anidra

Com relação à cafeína anidra, as farmacopeias consultadas trouxeram as monografias adiante.

A.1.1. Farmacopeia Europeia

A cafeína anidra possui as seguintes características: 1,3,7-trimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona. O conteúdo de cafeína está em 98,50 % na substância seca. CAS n.: 58-08-4,20 g/mol. Fórmula molecular: C₈H₁₀N₄O₅. É um pó cristalino branco e

Quebra tabela

com toque macio. Em termos de solubilidade, são considerados a água fervente, benzoatos alcalinos ou salicatos concentrados, água fria e etanol.

A.1.1.1. Testes de Identificação:

A. Ponto de fusão: Ocorre entre 235°C a 239°C.

B. FTIR com análise comparativa do padrão farmacopeico de cafeína.

C. Em tubo de ensaio, colocar 0,20 mL de solução concentrada de amostra, 0,05 mL de iodeto de potássio e 0,10 mL de ácido hidrocloreídrico diluído. O precipitado marrom deve ser diluído com hidróxido de sódio concentrado.

D. Fazer uma solução de 0,50 mL de acetilacetona e 5,00 mL de hidróxido de sódio diluído. (Solução 1). Em tubo de vidro moído, dissolver 10,00 mg de amostra e acrescentar 0,25 mL da solução 1. Colocar o tubo em banho de aquecimento de 80°C em 7 min. Após resfriar, adicionar 0,50 mL de dimetilaminobenzaldeído. Volte ao passo do aquecimento. Esperar esfriar, acrescentar 10,00 mL de água e notar a cor azul.

A.1.1.2. Substâncias Relatadas

Método de quantificação por HPLC.

- *Solução Teste.* Em balão volumétrico de 50,00 mL dissolver 100,00 mg da amostra em fase móvel. (ST1). Em balão volumétrico 10,00 mL, dissolver 1,00 mL da ST1 e avolumar com fase móvel (ST2).
- *Solução Referência A.* Em balão volumétrico de 100,00 mL aliquotar 2,00 mL da ST2 e avolumar em fase móvel. (S.Ref.A1). Em balão volumétrico de 10,00 mL; dissolver 1,00 mL da S.Ref.A1 e completar com fase móvel. (S.Ref.A2).
- *Solução Referência B.* Em balão volumétrico de 5,00 mL dissolver 5,00 mg do padrão farmacopeico de cafeína (impurezas A,C,D e F) e avolumar com fase móvel. (S.Ref.B1). Em balão volumétrico de 10,00 mL; aliquotar 2,00 mL da S.Ref.B1. e avolumar com fase móvel. (S.Ref.B2).
- *Fase móvel:* Em balão volumétrico de 1000,00 mL pesar 0,82 g de acetato de sódio anidro e completar com água corrigida em pH 4,50 com o uso do ácido acético glacial.

(Solução 1). Em balão volumétrico de 1000,00 mL acrescentar 20,00 mL de tetrahidrofurano; 25,00 mL de acetonitrila e 955,00 mL da solução 1. (Fase Móvel).

- *Condições cromatográficas.* Uso da coluna 0,15 m x 4,60 mm x 5,00 µm de material de base desativada, recoberta por sílica gel octadecilsililo; detector de espectrofotômetro em 275 nm; fluxo da fase móvel a 1,00 mL/min, volume de injeção de 10 µL, ciclo de corrida de 12,00 min. Para identificação das impurezas, compilar separadamente o cromatograma do padrão analítico de cafeína; e comparar com o cromatograma da solução referência B2. A cafeína tem tempo de retenção de 8,00 min.

A.1.1.3. Titulação potenciométrica

Em erlenmeyer de 125,00 mL pesar 170,00 mg de amostra. Levar ao banho de aquecimento, adicionar 5,00 mL de ácido acético glacial. Após resfriar, colocar 10,00 mL de anidrido acético e 20,00 mL de tolueno. Para titulação, usar a solução de ácido perclórico 0,10 N e determine o ponto final da titulação. É válido ressaltar que 0,10 N de ácido perclórico equivale a 19,42 mg de cafeína.

A.1.1.4. Limites cromatográficos de impurezas:

Tendo como analito referência à cafeína advinda da amostra e o parâmetro analisado a área do analito referência; em termos de impurezas, as não especificadas devem ter um limite individual de 0,10 % do parâmetro analisado, assim como o limite total. O limite de desconsideração é de 0,05 %.

A.1.2. Farmacopeia Brasileira

A farmacopeia brasileira apresentou-se com sutis mudanças em relação à europeia, sendo as diferenças demonstradas adiante.

A identificação por FTIR é considerada uma constante físico-química, e não um ensaio de identificação. No teste de identificação D (ensaio da cápsula de porcelana) usar os seguintes insumos: 5,00 mg de amostra diluído em 1,00 mL de ácido clorídrico e 50,00 mg de clorato de potássio. No teste de identificação C (formação de precipitado marrom) reportar o uso de 0,10 mL de iodo.

Outro método de identificação é a TLC, no qual a fase móvel é uma mistura de amônia, acetona, clorofórmio e n-butanol nas proporções 10:30:30:40; uso da sílica gel G₂₅₄ para suporte (15,00 cm x 5,00 cm) com alíquotas de 10 µL por ponto cromatográfico e visualização por lâmpada ultravioleta a 254 nm.

Para a TLC, o preparo de soluções é: em balão volumétrico de 10,00 mL, pesar 200,00 mg de amostra e completar com 4,00 mL de metanol e 6,00 mL de clorofórmio. (Solução 1). Em balão volumétrico de 100,00 mL alíquotar 0,50 mL da solução 1, acrescentar 40,00 mL de metanol e 60,00 mL de clorofórmio. (Solução 2).

A análise do conteúdo de água é denominada de perda por dessecação. Neste mensurar 1,00 g de amostra, dessecar em estufa a 115°C por 1 h ou fazer quantificação direta pelo método de Karl Fischer. Os limites máximos não de ser de 0,50 % para cafeína anidra e 8,50 % para cafeína hidratada.

O ensaio do doseamento é a realização da titulação potenciométrica. Nela deve-se pesar 400,00 mg de amostra, diluir a quente em 40,00 mL de anidrido acético em erlenmeyer de 250,00 mL. Após esfriar adicionar 80,00 mL de benzeno e titular com ácido perclórico 0,10 N com determinação do ponto final. Um mL de ácido corresponde a 19,47 mg de cafeína anidra.

A.1.3. Farmacopeia Americana

Na farmacopeia americana, até os ensaios de identificação de amostra são bem semelhantes aos da farmacopeia brasileira. Porém, o método de quantificação escolhido é o HPLC, tal como na farmacopeia europeia, mas com algumas ressalvas. Ademais, na farmacopeia americana é dispensado o uso da titulação uma vez que são trazidos os cálculos para pureza cromatográfica e a concentração de cafeína na amostra.

A.1.1.3.1. HPLC

- *Fase móvel:* em balão volumétrico de 2,00 L pesar 1,64 g de acetato de sódio anidro e avolumar com água. Em um segundo balão de 2,00 L alíquotar 1910,00 mL de acetato; incrementar com 50,00 mL de acetonitrila e 40,00 mL de tetrahidrofurano. Ajustar o pH para 4,50 com ácido acético glacial; misturar, ultrassonificar e filtrar.
- *Sistema de adequação:* em balão volumétrico de 100,00 mL pesar 2,00 mg de teofilina padrão e avolumar com fase móvel.
- *Solução Padrão:* em balão volumétrico de 25,00 mL, pesar 5,00 mg de padrão farmacopeico de cafeína, adicionar 5,00 mL da solução do sistema e avolumar com fase móvel.
- *Solução Teste:* pesar 10,00 mg de cafeína em balão volumétrico de 50,00 mL e avolumar com fase móvel.
- *Condições cromatográficas:* uso do detector 275 nm, coluna revestida L1 de 15,00 cm x 4,60 mm; taxa de fluxo de 1,00 mL/min. Tempos de retenção: teofilina (0,69 min) e cafeína (1,00 min). Injetar na ordem de preparo as soluções, com o volume solitário de 10 μ L.
- *Cálculo da pureza cromatográfica:* encontrar cada impureza contida na cafeína através da fórmula:

$$I = 100 * (R_i/R_s)$$
no qual I é a impureza estudada; R_i o pico da impureza em questão; R_s é a somatória das impurezas. R_i e R_s não podem ser maiores que 0,1% da área do pico da cafeína na amostra.
- *Cálculo da concentração de cafeína na amostra:* encontrar a massa em mg da cafeína na amostra reportada.

$$\text{Cafeína} = 50 * C * (R_u/R_s)$$
no qual C é a concentração (mg/mL) da cafeína na solução padrão; R_u é o pico de cafeína na solução teste; R_s é o pico de teofilina na solução padrão.

A.2. Monografia da cafeína hidratada

Na farmacopeia europeia, a cafeína hidratada tem em sua monografia ensaios idênticos ao da cafeína anidra; mas exclui a potenciometria e a molécula hidratada é dessecada na

estufa antes de qualquer procedimento. Na farmacopeia brasileira não é encontrada a monografia da cafeína hidratada, tal ocorrido também é notado na farmacopeia americana.

A.3. Teofilina Anidra

A.3.1. Farmacopeia Europeia

Na Farmacopeia Europeia, a teofilina anidra aparece nas monografias da dimenidrinato, teofilina hidratada, teofilina dietilenoamina anidra e teofilina dietilenoamina hidratada. Neste item será abordado somente a teofilina anidra.

A teofilina anidra tem a nomenclatura oficial de 1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona, CAS n.: 58-55-9. Peso molecular: 180,17 g/mol. Fórmula molecular: $C_7H_8N_4O_2$. Aparência: sólido branco cristalino e inodoro. Em ordem de solubilidade é extremamente solúvel em hidróxido de sódio, amônia e ácidos minerais; moderadamente solúvel em etanol e pouco solúvel em água. O conteúdo de teofilina deve estar em 99,00 %.

A.3.1.1. Identificação:

- A. Ponto de fusão: Após secagem em estufa de 100°C a 105°C, o ponto de fusão será de 270°C a 274°C.
- B. Uso do FTIR com comparação a molécula referência de teofilina (padrão farmacopeico).
- C. Fazer solução concentrada (6,42 N) de hidróxido de potássio. Em tubo de ensaio pesar 10,00 mg de amostra, incrementar 1,00 mL da solução de hidróxido de potássio a 90°C por 3,00 min em banho de aquecimento. Adicionar 1,00 mL de ácido sulfanílico diazotizado diluído. Uma cor vermelha aparecerá. Fazer um teste com branco.

A.3.1.2. Titulação potenciométrica.

Em erlenmeyer de 250,00 mL pesar 150,00 mg de amostra, colocar 100,00 mL de água; 20,00 mL de nitrato de prata 0,10 N e agitar. Colocar 1,00 mL de solução de azul de bromotimol. Titular com hidróxido de sódio 0,10 N. Cada mL de hidróxido equivale a 18,02 mg de teofilina.

A.3.1.3. Substâncias Relatadas:

Uso do HPLC.

- *Fase Móvel:* Em balão volumétrico de 1000,00 mL pesar 1,2648 g de acetato de sódio e colocar 4,65 mL de ácido acético glacial. Acrescentar 925,35 mL de água e completar com 7,00 mL de acetonitrila.
- *Solução Teste:* Em balão volumétrico de 20,00 mL diluir 40,00 mg de amostra na fase móvel.
- *Solução Referência A:* Em balão volumétrico de 100,00 mL aliquotar 1,00 mL da solução teste e avolumar com fase móvel. (Sol. Ref. A1). Em balão volumétrico de 10,00 mL transferir 1,00 mL da Sol. Ref. A1 e avolumar com fase móvel. (Sol. Ref. A2).
- *Solução Referência B:* Em balão volumétrico de 100,00 mL pesar 10,00 mg de teobromina padrão farmacopeico, incrementar com 5,00 mL da solução teste e avolumar com fase móvel. (Sol. Ref. B1). Em balão volumétrico de 50,00 mL aliquotar 5,00 mL da Sol. Ref. B1 e avolumar com fase móvel. (Sol. Ref. B2).
- *Características cromatográficas:* Uso da coluna octadecilsililo - sílica gel de dimensões 25,00 cm x 4,00 mm x 7,00 µm. Taxa de fluxo a 2,00 mL/min, uso do detector espectrofotômetro em 272 nm, injeções de 20 µL, ciclo de corrida de 21,0 min. Ordem de eluição: 0,30 min para impureza C; 0,40 min para impureza B; 0,50 min para impureza D; 2,50 min para impureza A.
- *Limites:* As impurezas de A a D não devem ser maiores (cada uma delas) de que 0,10 % da área de teofilina da amostra. Qualquer outra impureza não pode ultrapassar de 0,10 % da área de teofilina na amostra. O total não deve ultrapassar de 0,50 % da área de teofilina na amostra. O limite a ser descartado é de 0,05 % da área de teofilina na amostra.

A.3.2. Farmacopeia Brasileira

Na farmacopeia brasileira somente há o uso da teofilina na análise da aminofilina, este último é outro nome para teofilina dietilenoamina.

A.3.3. Farmacopeia Americana

Na farmacopeia americana foi encontrada somente a monografia da oxitrifilina (teofilina iônica associada à etanamina).

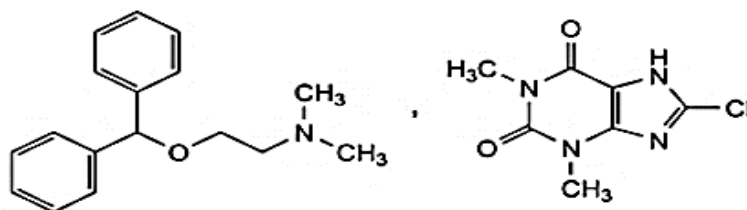
A.4. Teofilina Hidratada

A única farmacopeia em que encontrou a teofilina hidratada foi a europeia, e é semelhante à molécula anidra.

A.5. Dimenidrato

A monografia do dimenidrato é encontrado na farmacopeia europeia. O dimenidrato tem a seguinte estrutura molecular:

Figura 5 - Molécula de dimenidrato



Fonte: dimenidrinato, adaptado da farmacopeia europeia (COUNCIL OF EUROPE, 2010).

Molécula de

CAS n.: 52387-6; fórmula molecular: $C_{24}H_{28}ClN_5O_2$. Peso molecular: 470,00 g/mol. Aparência de um pó cristalino branco, sendo altamente solúvel em etanol e pouco solúvel em água. IUPAC:

- Para difenihidramina: 2-(difenilmetoxi)-N,N-dimetiletanamina. Fórmula molecular: $C_{17}H_{21}NO$; peso molecular: 255,40 g/mol. Pureza de 53,00 % a 55,50 % na substância seca.
- Para 8-cloroteofilina: 8-cloro-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona. Fórmula molecular: $C_7H_7ClN_4O_3$; peso molecular: 214,60 g/mol. Pureza de 44,00 % a 46,50 % na substância seca.

A.5.1. Identificação:

A. Ponto de fusão: 102°C a 106°C.

B. Em tubo de ensaio, pesar 100,00 mg de amostra, adicionar 9,00 mL de água; 3,00 mL de etanol e 1,00 mL de ácido hidrocloreídrico diluído. Resfriar em banho de gelo por 30 min e promover a cristalização arranhando a parede do tubo. Em outro tubo transferir 10,00 mg do precipitado cristalizado, adicionar 1,00 mL de ácido hidrocloreídrico, 100,00 mg de clorato de potássio. Evaporar a solução em almofariz de porcelana. O pó vermelho deve ser exposto aos vapores de amônia para se tornar vermelho-violeta.

C. Uso do FTIR com comparativo em dimenidrinato farmacopeico.

D. Em tubo de ensaio, pesar 200,00 mg de amostra, acrescentar 10,00 mL de etanol e 10,00 mL de ácido pícrico diluído. Após cristalização, lavar o precipitado com água e secar em estufa entre 100°C a 105°C.

A.5.2. Substâncias Relatadas

- Uso do HPLC.

- *Diluyente:* em proveta com tampa de 500,00 mL usar 55,80 mL de acetonitrila e 254,20 mL de água.
- *Solução teste:* em balão volumétrico de 100,00 mL pesar 100,00 mg de amostra e avolumar com o diluyente.
- *Solução referência A:* em balão volumétrico de 50,00 mL pesar 57,00 mg de difenihidramina padrão farmacopeico e avolumar com diluyente.
- *Solução referência B:* em balão volumétrico de 100,00 mL aliquotar 1,00 mL da solução referência A e avolumar com o diluyente. (Sol. Ref. B1). Em balão volumétrico de 10,00 mL aliquotar 2,00 mL da sol. Ref. B1. (Sol. Ref. B2).
- *Solução referência C:* em balão volumétrico de 50,00 mL diluir 5,00 mg do difenihidramina impureza A farmacopeica (impureza F) em 5,00 mL da solução referência A. Avolumar o sistema no diluyente.
- *Solução referência D:* em proveta com tampa, diluir o conteúdo do vial do dimenidrato para identificação de picos (impureza A e E) em 1,00 mL do diluyente.
- *Características da cromatografia:*
- Coluna de base desativada encoberta por sílica gel octadecilsililo; dimensões: 25,00 cm x 4,60 mm x 5,00 µm a temperatura de 30°C. A fase móvel é um gradiente de concentração A:B. Para isto:
- *Fase móvel A:* em balão volumétrico de 1000,00 mL pesar 10,00 g de trietilamina, adicionar 950,00 mL de água e ajustar o pH para 2,5 com o ácido fosfórico e avolumar com água.
- *Fase móvel B:* Acetonitrila.

Tabela 7 -Gradiente de eluição para dimenidrato

Tempo (min)	Fase móvel A (% v/v)	Fase móvel B (% v/v)	Taxa de Fluxo (mL/min)
0 a 2	82	18	1,2
2 a 15	82 a 90	18 a 50	1,2
15 a 20	50 a 20	50 a 80	1,2 a 2,0
20 a 30	20	80	2,0

Fonte: Adaptado da Farmacopeia Europeia (COUNCIL OF EUROPE,2010).

- Detecção por espectrofotômetro em 225 nm; injeção de 10 µL. Identificação de impurezas: usar o cromatograma da solução referência D para obter os tempos de retenção das impurezas A e E; compilar o cromatograma da solução referência C para encontrar a impureza F.
- *Ordem de eluição:* impureza A em 0,30 min; impureza E em 0,70 min; impureza F em 0,95 min; difenihidramina em 13,00 min.
- Para cada impureza (A ou F) o limite de área deve ser de 0,20 % da área de difenihidramina da solução referência B2. Para a impureza E, o seu limite de área deve equivaler a 0,15 % da área da difenihidramina da solução referência B2. O total de limite das impurezas (desconhecidas ou não) deve ser de 0,50 % da área de difenihidramina da solução referência B2. O limite a ser desconsiderado é de 0,05 % do pico de difenihidramina da solução referência B2.

A.5.3. Titulação potenciométrica para difenihidramina.

Em erlenmeyer de 125,00 mL diluir 200,00 mg de amostra em 60,00 mL de ácido acético glacial. Titular com ácido perclórico 0,10 N e encontrar o ponto final da titulação. Cada 1,00 mL de ácido perclórico equipara-se a 25,54 mg de dimenidrinato.

A.5.4. Titulação potenciométrica para 8-cloroteofilina

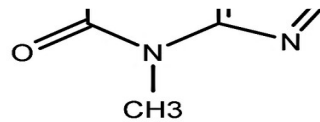
Em erlenmeyer de 500,00 mL pesar 800,00 mg de amostra, adicionar 50,00 mL de água; 3,00 mL de amônia diluída, 600,00 mg de nitrato de amônia e colocar em banho de aquecimento por 5 min. Acrescentar 25,00 mL de nitrato de prata 0,10 N e aquecer por 15 min com agitação. Resfriar em banho de gelo, adicionar 25,00 mL de ácido nítrico diluído e avolumar para 250,00 mL com água. Filtrar a solução e descartar o primeiro 25,00 mL do filtrado. Com 100,00 mL do filtrado; colocar 5,00 mL de sulfato férrico de amônia como indicador; titular com solução 0,10 N de tiocianato de amônio até cor amarelo-marrom como ponto final. Cada mL de nitrato de prata equivale a 21,46 mg de 8-cloroteofilina.

Nesta monografia, a impureza A é a teofilina. A impureza E é a 8-clorocafeína; e a impureza F é a difenihidramina impureza A.

A.6. Aminofilina anidra

A aminofilina é uma molécula encontrada nas farmacopeias americana, brasileira e europeia.

Figura 6 - Molécula de aminofilina



Fonte:

Molécula de aminofilina; adaptado das farmacopeias americana e brasileira (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2006).

Nomenclatura oficial: 3,9-dihidro-1,3-dimetil-1H-purina-2,6-diona com 1,2 - etanodiamina; teofilina em etilenodiamina anidra. CAS nº: 317-314-0. Peso molecular: 420,4 g/mol. Aparência sólida de um pó branco ou levemente amarelado; granulado e higroscópico. Altamente solúvel em água; pouco solúvel em etanol absoluto e éter etílico. Fórmula molecular: $C_{36}H_{24}N_{30}O_4$.

A.6.1. Farmacopeias Americana e Brasileira

A união da teofilina com a 1,2-etanodiamina é denominado aminofilina. O teor de teofilina é entre 84,00 % a 87,40 %; enquanto que a etilenodiamina está entre 13,50 % a 15,00 % em relação à substância anidra.

A.6.1.1. Identificações (Qualitativas):

- Uso do FTIR com pasta de KBr. Comparação ao espectro padrão de teofilina SQR.

- Em tubo de ensaio, diluir 500,00 mg de amostra em 20,00 mL de água; acrescentar 1,00 mL de ácido clorídrico 3,00 N com homogeneização. Usar filtração e lavagem do precipitado com água fria. Passar o precipitado a cápsula de porcelana, para secagem a 105°C por 1 h. Calcinar entre 270°C a 274°C.
- Usar 10,00 mg do precipitado seco em estufa; incrementar com 1,00 mL de ácido clorídrico 3,00 N e 100,00 mg de cloreto de potássio. Secar a solução em banho de aquecimento. Após esfriar, preparar vidro de relógio embebido com hidróxido de amônio 6,00 N e emborcar a cápsula no vidro. O resíduo fúcsia identifica a presença de xantinas.
- *Ensaio de Pureza:* Uso da TLC. Fase móvel composta por solventes concentrados, amônia, acetona, clorofórmio e 1-butanol nas proporções 10:30:30:40. Injetar 10 µL de cada solução adiante. Em balão volumétrico de 10,00 mL pesar 200,00 mg de amostra pulverizada em 2,00 mL de água e 8,00 mL de metanol (Solução 1). Em balão volumétrico de 100,00 mL alíquotar 0,50 mL da solução 1 e completar com metanol. Secar a placa naturalmente na capela; verificar manchas sob a luz ultravioleta.
- *Doseamento:* Em erlenmeyer de 100,00 mL pesar 250,00 mg de amostra e diluir em 30,00 mL de água. Acrescentar 0,10 mL de verde de bromocresol como indicador; tendo como ponto final a cor verde. Titular com ácido clorídrico 0,10 N. Cada mL de ácido titulado equivale a 3,0050 mg de etilenodiamina.

A.6.1.2. Teofilina:

Uso da técnica do HPLC com detector a 254 nm; coluna de 15,00 cm x 3,90 mm empacotada de sílica-octadecilsilano e fluxo de fase móvel a 1,00 mL/min. Uso das soluções descritas a seguir.

- *Fase móvel:* pesar 960,00 mg de 1-pentanossulfato de sódio monohidratado, colocar 200,00 mL de metanol e 800,00 mL de água em balão volumétrico. Manter o pH a 2,9 com ácido acético glacial.
- *Solução amostra:* em balão volumétrico de 250,00 mL transportar 24,00 mg de amostra, acrescentar 50,00 mL de metanol e 200,00 mL de água.

- *Solução de resolução:* em balão volumétrico de 100,00 mL pesar 0,08 mg de teofilina e dissolver em 80,00 mL de água e 20,00 mL de metanol. (Solução Padrão). Em balão volumétrico de 25,00 mL aliquotar 20,00 mL da solução padrão e preencher com 4,00 mL de água e 1,00 mL de metanol. (Solução de resolução).
- Injetar, separadamente; as soluções: padrão, resolução e amostra; com o volume individual de 10 µL de injeção. Tempos de retenção: 0,65 min para teobromina e 1,00 min para teofilina.

A.6.2. Farmacopeia Europeia

Na farmacopeia europeia esta molécula é a teofilina-etileno diamino anidra, tendo algumas diferenças quanto aos testes de identificação e no preparo das soluções dentro do HPLC; ele exclui o uso da TLC na identificação. Com isto em mente, são abordadas estas diferenças.

A.6.2.1. Teste de identificação

- C: ao filtrado da identificação B, adicionar 200,00 µL de cloreto de benzoíla e manter o meio alcalino com hidróxido de sódio diluído sob forte agitação. Filtrar o precipitado, lavar com 10,00 mL de água; dissolver em 5,00 mL de etanol quente e adicionar 5,00 mL de água. Ao precipitado formado lavar com água e drenar a 105°C; calcinar entre 248°C a 252°C.
- D. Aquecer 10,00 mg do precipitado e colocar 1,00 mL de hidróxido de potássio 6,41 N em banho de aquecimento a 90°C por 3min. Adicionar 1,0mL de ácido sulfanílico diazotado.

A.6.2.2. Substâncias Relatadas

Uso do HPLC.

- *Solução Teste.* dissolver 47,00 mg da amostra em 20,00 mL da fase móvel.

- *Fase móvel:* em balão volumétrico de 1000,00 mL pesar 13,60 g de NaAc e 3,0025 g de ácido acético glacial; avolumar com água. (Solução tampão de acetato). A fase móvel é uma solução com 70,00 mL de acetonitrila e 930,00 mL de solução tampão de acetato.
- *Solução Referência A:* em balão volumétrico de 100,00 mL, acrescentar 1,00 mL da solução teste e avolumar com a fase móvel. (Solução ref. A1). Em balão volumétrico de 10,00 mL diluir 1,00 mL da solução ref. A1 na fase móvel (solução ref. A2),
- *Solução referência B:* em balão volumétrico de 100,00 mL pesar 10,00 mg de teobromina (impureza G) em 10,00 mL de fase móvel; prosseguir com 5,00 mL da solução teste e avolumar com fase móvel. (Solução ref B1). Em balão volumétrico de 50,00 mL diluir 5,00 mL da solução ref B1. (Solução ref. B2)
- *Condições cromatográficas:* coluna 25,00 cm x 4,00 mm x 7,00 µm; sílica gel octadecilsílica; fluxo de 2,00 mL/min, detector espectrofotômetro em 272 nm, injeção de 20 µL; tempo de corrida em 21,00 minutos. Impureza G sai a 0,60 min e teofilina em 6,00 min.

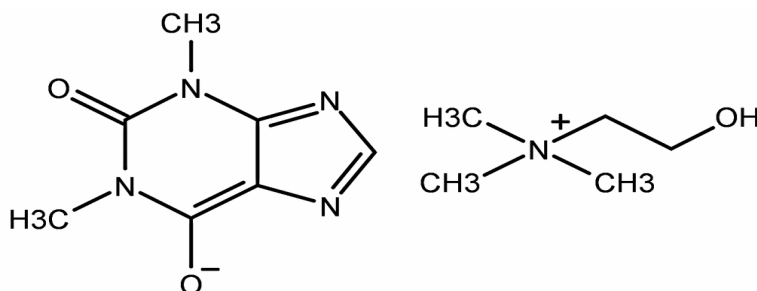
A.7. Aminofilina hidratada

A aminofilina hidratada só é encontrada na farmacopeia europeia; igualmente à aminofilina anidra da mesma farmacopeia.

A.8. Oxitriofilina

A oxitriofilina é encontrada somente na farmacopeia americana, com a seguinte estrutura molecular:

Figura 7 -Molécula de oxitrifilina



Fonte: Molécula de oxitrifilina. Adaptado da farmacopeia americana (COUNCIL OF EUROPE, 2010)

A oxitrifilina tem o nome oficial é etanamina 2-hidroxi-N,N,N-trimetil- sal com 3,7-dihidro-1,3-dimetil-1H-purina-2,6-diona. É um sal de colina com teofilina (1:1). CAS nº: 4499-40-5. Peso molecular. 283,33 g/mol. Aparência sólida de um pó branco e cristalino; com odor de amina. Fórmula molecular: $C_{12}H_{21}N_5O_3$. Ponto de fusão entre 185°C a 189°C. O teor de teofilina na amostra deve estar entre 61,70 % a 65,50 % na oxitrifilina seca (molécula padrão farmacopeico). É bem solúvel em água fria e/ou metanol.

A.8.1. Para métodos de identificação qualitativos:

- *Padrão de referência - Identificação*
- Em balão volumétrico de 25,00 mL dissolver 1,00 g de oxitrifilina padrão referência USP em 20,00 mL de água como uma solução teste.
- A: Em tubo de ensaio, adicionar 10,00 mL da solução teste; colocar 5,00 mL de iodeto de potássio e mercúrio; o precipitado amarelo indica presença de colina.
- B: Em tubo de ensaio, adicionar 10,00 mL da solução teste; colocar 5 gotas de NH_4OH concentrado e 5,00 mL de $AgNO_3$. O precipitado gelatinoso e coagulado por aquecimento indica teofilina.
- Ponto de fusão: entre 185°C a 189°C

A.8.2. Impurezas ordinárias

Uso da técnica de TLC. Preparar as soluções teste (100,00 mg de amostra), padrão e eluente; todas com as seguintes proporções: clorofórmio: metanol e ácido fórmico (88:10:2) em sistema de 10,00 mL para cada solução. Colocar 10 µL de cada solução na placa; secá-la com fluxo de nitrogênio e visualizar em luz ultravioleta a 254 nm.

A.8.3. Para métodos de quantificação:

Impurezas orgânicas voláteis:

1. Teor de Colina.: em balão volumétrico de 100,00 mL colocar 0,10 mL de azul de metileno e diluir em água (solução azul de metileno). Em balão volumétrico de 100,00 mL adicionar 30,00 mg de vermelho de metila em 100,00 mL de metanol (solução vermelho de metila). Em balão volumétrico de 100,00 mL colocar 900,00 mg da amostra (oxitriofilina); 50,00 mL de água; 15,00 mL da solução azul de metileno e 4 gotas da solução vermelho de metila e homogeneizar (Solução Teste). Titular com ácido sulfúrico 0,10 N até a solução teste ficar roxa. Cada mL de ácido titulado equivale a 12,12 mg de hidróxido de colina; o teor da colina deve ser de 652,00 mg a 693,00 mg por g de teofilina encontrada na análise da teofilina.

2. Teor de teofilina: da solução teste do teor de colina, colocar 35,00 mL de nitrato de prata; agitar gentilmente para promover a completa precipitação. Titular com hidróxido de sódio 0,10 N até a solução teste ficar verde. Cada mL do titulante equivale a 18,02 mg de teofilina.

A.8.4. Para comprimidos de liberação retardada de oxi-triofilina:

Identificar a molécula de oxi-triofilina pela técnica de TLC; igualmente ao descrito na monografia da oxi-triofilina seca. A quantificação da oxi-triofilina em comprimidos é realizado pela técnica do HPLC. As soluções necessárias para esta análise são:

- *Fase Móvel:* em balão volumétrico de 1,00 L diluir 6,80 g de fosfato monobásico de potássio em 800,00 mL de água; manter em pH 5,80 com o uso do hidróxido de

potássio 0,10 N. Filtrar, ultrassonificar e preencher o filtrado com 200,00 mL de metanol.

- *Padrão de solução:* dissolver 1,00 mg de oxitriofilina USP em balão volumétrico de 10mL tendo água como diluente; para ter a concentração de 0,10 mg/mL.
- *Preparo de ensaio:* em balão volumétrico de 1,00 L dissolver 10 comprimidos em 700,00 mL de água quente e em agitação. Após arrefecer, preencher o balão com água fria e filtre. Em um segundo balão de 1,00 L aliquotar 200,00 mL do filtrado e preencher com água para ter a concentração 0,10 mg/mL
- *Preparo do sistema de adequação:* Em um balão volumétrico de 10,00 mL dissolver 0,60 mg de oxitriofilina padrão USP em água (solução oxitriofilina USP). Em balão volumétrico de 10,0 mL dissolver 0,30 mg de teobromina em água (solução teobromina padrão). As soluções finais devem estar sempre a 0,10 mg/mL.
- *Sistema cromatográfico:* injetar separadamente (10 µL cada) cada solução preparada anteriormente. Uso do HPLC com detector 275 nm, coluna 30,00 cm x 3,90 mm do tipo L1. Fluxo de 1,00 mL/min. Tempos de retenção: 0,70 min para teobromina e 1,00 min para teofilina.

A.9. Teobromina

A teobromina é encontrada somente na farmacopeia europeia. A monografia da teobromina existe na farmacopeia americana, mas não está liberada ao público em geral; apenas existe a sua indicação dentro da análise dos comprimidos de oxitriofilina como um padrão referência; devido à similaridade nas estruturas das moléculas citadas.

A análise de teobromina enquanto monografia existe tanto na farmacopeia europeia como na brasileira. Dentro da europeia, o uso da teobromina é um padrão de referência na análise da teofilina, por similaridade de estruturas moleculares. Na farmacopeia brasileira, a teobromina é encontrada como um padrão de referência para encontrar a molécula de teofilina na análise da aminofilina.

Para a farmacopeia europeia, a análise de teobromina é reportada adiante. A pureza de teobromina está em 99,00 %; devendo ser calculada com base no padrão analítico de referência farmacopeico. Tem o aspecto de um pó branco; altamente solúvel em hidróxido de sódio diluído ou em ácido mineral. É pouco solúvel em amônia ou mistura água-etanol. A

teobromina tem o nome oficial de 3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona, CAS n.: 83-67-0. Peso molecular: 180,07 g/mol. Fórmula molecular: $C_7H_8N_4O_2$.

A.9.1. Identificação

- A. Uso do FTIR com o comparativo dos espectros do padrão de referência farmacopeico.
- B. Em tubo de ensaio, pesar 20,00 mg de amostra e dissolver a quente em solução de amônia 0,10 N. Após esfriar, adicionar 2,00 mL de nitrato de prata e aquecer a solução. A presença do precipitado cristalino branco confirma a teobromina.

A.9.2. Substâncias Relatadas.

- Uso da TLC.
- *Solução teste.*: em balão volumétrico de 25,00 mL pesar 200,00 mg de amostra, adicionar 4,00 mL de metanol e 6,00 mL de clorofórmio e o dispositivo para agitação. Montar o sistema para destilação com condensador e chapa de aquecimento munida de agitador magnético. A solução deve estar com o aquecimento mínimo para evitar a destilação por 15,00 min. Esperar esfriar e filtrar.
- *Solução Referência.*: em balão volumétrico de 50,00 mL pesar 5,00 mg do padrão de referência farmacopeico; adicionar 20,00 mL de metanol e avolumar com clorofórmio.
- *Solução eluente.*: em uma proveta de 200,00 mL com tampa misturar 10,00 mL de amônia; 30,00 mL de acetona; 30,00 mL de clorofórmio e 40,00 mL de n-butanol.
- Corte uma placa com a altura de 15,00 cm e largura de 5,00 cm. Aplicar individualmente (10 μ L para cada ponto) as soluções teste e referência. Na cubeta, ajustar a placa verticalmente; e colocar o eluente homogeneizado até a altura antes dos pontos construídos. Esperar correr até chegar 0,50 cm do limite superior da placa. Retire da cubeta e espere secar naturalmente. Visualize em lâmpada ultravioleta a 254 nm.

A.9.3. Titulação potenciométrica.

Em erlenmeyer de 250,00 mL pesar 150,00 mg de amostra e dissolver em 125,00 mL de água fervente. Resfriar entre 50°C a 60°C e adicionar 25,00 mL de solução 0,10 N de nitrato de prata e 1,00 mL de solução fenolftaleína como indicador. Titular este sistema com a hidróxido de sódio 0,10 N. O ponto final é uma solução rosa, no qual 1,00 mL da solução de hidróxido de sódio equipara-se a 18,02 mg de teobromina.