



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA

FILIPA COELHO PIRES

Licenciada em Bioquímica

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM DIFERENTES GÉNEROS ALI- MENTÍCIOS, COM O USO DE CROMATO- GRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

MESTRADO EM TECNOLOGIA E SEGURANÇA ALIMENTAR

Universidade NOVA de Lisboa
setembro, 2023



IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM DIFEREN- TES GÉNEROS ALIMENTÍCIOS, COM O USO DE CRO- MATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

FILIPA COELHO PIRES

Licenciada em Bioquímica

Orientadora: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professor Associada, FCT, Universidade NOVA de Lisboa

Coorientadora: Engenheira Catarina Brito,
Técnica Superior no Laboratório do Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar,
Pontinha

Júri:

Presidente: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT, Universidade NOVA de Lisboa

Arguentes: Doutora Ana Maria Álvares Tavares da Mata,
Professora Adjunta da Escola Superior Tecnologia de Setúbal do Insti-
tuto Politécnico de Setúbal

Orientador: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professor Associada, FCT, Universidade NOVA de Lisboa

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM DIFERENTES GÉNEROS ALIMENTÍCIOS, COM O USO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Copyright © Filipa Coelho Pires, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Este documento foi criado com o processador de texto Microsoft Word e o template NOVAThesis Word (Lourenço. J. M., 2021).

Dedicado ao meu futuro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Prof. Ana Luísa Fernando por todo o apoio prestado, a todos os esclarecimentos de dúvidas, pelos ensinamentos nas diferentes unidades curriculares e por me ajudar a encontrar um estágio adequado aos meus objetivos e, no qual fui imensamente bem recebida. Também gostaria de agradecer a sua prontidão e boa disposição contínua, levo os seus ensinamentos para o futuro com grande carinho, e agradeço todas as oportunidades que me deu neste mestrado.

A todos os professores do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar obrigado pelos ensinamentos práticos e teóricos. Às Técnicas dos laboratórios da FCT-UNL Dona Rosa e especialmente à Dona Rita, um muito obrigado pelo apoio, compreensão, sem vocês não teria evoluído na componente laboratorial da mesma maneira.

Ao Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar e a todos os profissionais que lá trabalham pela boa disposição, boa comida e agradeço por me terem acolhido da melhor forma possível.

Agradeço agora aos que estiveram presentes comigo neste estágio desde o primeiro dia: a Dr^a Ana Cristina Amaro e a minha orientadora Eng^a Catarina Brito, que foram sempre prestáveis em qualquer situação. Ao Nuno Couto por me ter ajudado imenso na aprendizagem da técnica experimental e, pelo apoio na compreensão de todo o funcionamento do aparelho de HPLC. À Ivone Fernandes, Dina Sousa, Gabriela Silva, Suzete Silva e Vitória Sacoer por me terem mostrado todo o universo da microbiologia de uma forma prática, divertida e elucidativa. Não quero deixar de agradecer também à Leyre Lopez pela companhia durante uma parte do estágio, por ter seguido as minhas dicas do que visitar em Portugal e, certamente vou seguir as dadas por ela quando for a Espanha, espero que tenhas gostado da tua estadia por cá.

E para finalizar agradeço aos meus pais, irmão, restante família, amigos e namorado por apostarem na minha formação, por serem os meus pilares e, pela confiança que me transmitiram durante toda esta etapa.

E para todos aqueles que não mencionei, mas que também me auxiliaram no meu percurso um grande obrigado!

x

x

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas"

(Marie Currie)

RESUMO

A cafeína é um estimulante muito consumido na forma de café, bebidas refrigerantes, energéticas, entre outras. Este composto apresenta alguns riscos para a saúde quando consumido em grandes quantidades. Atualmente existe legislação para géneros alimentícios que contenham este aromatizante, presente nos Regulamentos (UE) N.º 1169/2011 e N.º 872/2012, no entanto não existe nenhum documento oficial que dê informações sobre as doses consideradas perigosas. De modo a garantir a segurança alimentar, determinar o teor de cafeína em produtos com café é importante, nomeadamente em bebidas e preparados instantâneos, para avaliar se estão dentro dos limites legislados. Para tal, o presente trabalho visa implementar e validar um método para a quantificação dos teores de cafeína em géneros alimentícios com o auxílio da técnica cromatográfica de alta eficiência (HPLC) no Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar (CFPSA). Para a validação do método foram avaliados diversos parâmetros, verificando-se que o método é linear para uma gama de trabalho alta entre os 5 e os 160 mg/L, e para uma gama baixa entre 0,5 e 2,5 mg/L. Observou-se que os limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) eram, respetivamente, LD = 0,150 mg/L e LQ = 0,455 mg/L, valores abaixo do último padrão e, como tal satisfatórios. Os limites de repetibilidade e reprodutibilidade mostraram-se satisfatórios e inferiores a 5%, respetivamente 0,083 e 0,364. Pelo que, os resultados demonstraram que a validação do método foi conseguida. Posteriormente foi ainda analisado o teor de cafeína em diferentes géneros alimentícios tendo-se observado que o café instantâneo (3324 mg/100 g) apresentava o maior teor de cafeína, seguido do chá preto (1737 mg/100 g) e chicória + café (1685 mg/100 g), cappuccino descafeinado (51 mg/100 g), bebida energética (14 mg/100 mL), coca-cola (9 mg/100 mL) e ice tea (4 mg/100 mL).

Palavras chave: Cafeína, RP-HPLC, Café, Chá preto, Coca-cola, Validação de Métodos, Implementação, CFPSA.

ABSTRACT

Caffeine is a stimulant widely consumed in the form of coffee, soft drinks, energy drinks, among others. This compound poses some health risks when consumed in large amounts. Currently there is legislation for food containing this flavoring in Regulations (EU) N°. 1169/2011 and N°. 872/2012, however there is no official document that gives information on the doses considered dangerous. To guarantee food safety, it is important to determine the caffeine content in coffee products, namely in beverages and instant preparations. To assess whether they are within the legislated limits, it is proposed to use high-performance chromatography (HPLC) for the quantification of caffeine levels. This method was implemented at "Centro de Formação Profissional para o Setor Alimentar" (CFPSA). For the validation of the method, several parameters were evaluated, verifying that the method is linear for a high working range between 5 and 160 mg/L, and for a low range of 0,5 and 2,5 mg/L. It was observed that the limits of detection and quantification were, respectively, LD = 0,150 mg/L and LQ = 0,455 mg/L, these values were considered satisfactory because they are below the last standard. It was also possible to obtain repeatability and reproducibility, since the limits were lower than 5%, respectively 0,083 and 0,364. Therefore, the results showed that the validation of the method was achieved. Subsequently, the caffeine content of different foods was analyzed, and it was observed that instant coffee (3324 mg/100 g) had the highest caffeine content, followed by black tea (1737 mg/100 g), chicory + coffee (1685 mg/100 g), decaffeinated cappuccino (51 mg/100 g), energy drink (14 mg/100 mL), coke (9 mg/100 mL) and ice tea (4 mg/100 mL).

Keywords: Caffeine, RP-HPLC, Coffee, Black Tea, Coca-Cola, Method Validation, Implementation, CFPSA.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Enquadramento e objetivos do trabalho	1
1.2	Contexto e motivação	2
1.3	Cafeína.....	3
1.3.1	Legislação para Cafeína em produtos alimentares	6
1.3.2	Café solúvel.....	7
1.4	O HPLC e a sua importância no contexto da análise de matrizes alimentares	8
1.5	Cromatografia Líquida.....	10
1.6	Constituição do aparelho de HPLC	11
1.6.1	Injetor	11
1.6.2	Bomba	13
1.6.3	Sistema de eluição.....	13
1.6.4	Coluna cromatográfica.....	14
1.6.5	Pré-coluna.....	14
1.6.6	Forno da coluna.....	14
1.6.7	Detetores.....	14
1.6.8	Sistema de aquisição e controlo	16
1.7	Boas práticas na utilização do HPLC.....	16
1.8	Conceitos cromatográficos.....	18

1.9	Validação de Métodos e a sua importância no contexto da análise de matrizes alimentares.....	20
1.9.1	Seletividade/Especificidade.....	21
1.9.2	Quantificação.....	22
1.9.2.1	Curvas de calibração	22
1.9.2.1.1	Gama de trabalho	23
1.9.2.1.2	Linearidade	24
1.9.2.2	Limites Analíticos do Método de Ensaio.....	25
1.9.2.2.1	Limite de Detecção.....	25
1.9.2.2.1	Limite de Quantificação.....	25
1.9.2.3	Sensibilidade	26
1.9.3	Precisão.....	26
1.9.3.1	Repetibilidade.....	27
1.9.3.2	Reprodutibilidade.....	28
1.9.3.3	Precisão Intermédia.....	30
1.9.4	Exatidão	30
1.9.5	Robustez.....	31
2	METODOLOGIA.....	33
2.1	CFPSA - Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar.....	33
2.2	Metodologia Experimental	36
2.2.1	Método para a quantificação da cafeína	36
2.2.1.1	O aparelho de HPLC.....	36
2.2.1.2	Software	37
2.2.1.3	Coluna cromatográfica.....	37
2.2.1.4	Fase móvel	37

2.2.1.5	Soluções Padrão de Cafeína.....	37
2.2.1.5.1	Solução Stock	37
2.2.1.5.2	Solução Padrão diluída para café normal.....	38
2.2.1.5.3	Solução Padrão diluída para descafeinado	38
2.2.1.6	Preparação das amostras	38
2.2.1.6.1	Café Verde e Café Torrado	38
2.2.1.6.2	Café Solúvel e bebidas em pó.....	39
2.2.1.6.3	Bebidas.....	39
2.2.1.6.4	Chá.....	39
2.2.1.7	Extração da cafeína.....	39
2.2.1.8	Parâmetros da análise por HPLC	39
2.2.1.9	Construção da reta de calibração	40
2.2.1.10	Esquema representativo do procedimento experimental.....	41
2.2.1.10.1	Soluções Padrão de Cafeína	41
2.2.1.10.2	Amostras	42
2.2.1.10.3	Quantificação do teor em Cafeína por HPLC	43
2.3	Análises extra, fora do âmbito do trabalho para a tese	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.1	Método para a determinação de Cafeína	45
3.1.1	Resultados da Validação do Método	45
3.1.1.1	Especificidade/Seletividade	45
3.1.1.2	Quantificação	46
3.1.1.2.1	Linearidade/Curvas de calibração, Limites de Detecção e Quantificação e Sensibilidade.....	46
3.1.1.3	Precisão	52
3.1.1.3.1	Repetibilidade.....	53
3.1.1.3.2	Reprodutibilidade.....	54

3.1.2	Cálculo do conteúdo de cafeína em cada amostra.....	57
4	CONCLUSÃO	75
4.1	Apêndice ácido Benzóico.....	86
4.2	Apêndice Cafeína	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura ilustrativa em 2D da molécula de:	5
Figura 1.2 - Café solúvel aglomerado (A) e liofilizado (B). Fontes: https://www.tatacoffee.com/instant-coffee e https://coffeebeanandbirds.com/blogs/news/our-wisdom-the-secret-behind-freezed-dried-coffee-lyophilized-coffee . Acedido a 19 de abril de 2023.....	8
Figura 1.3 - Esquema representativo do equipamento de HPLC. Fonte: https://www.dctech.com.br/problemas-na-bomba-no-injetor-ou-no-detector-hplc-como-identifica-los-e-resolve-los/ . Acedido a 2 de fevereiro de 2023.....	11
Figura 1.4 - Figura ilustrativa de um injetor manual (A) e injetor automático (B) de Hitachi High Performance Liquid Chromatograph. Fonte: HITACHI, 2012.....	12
Figura 1.5 - Representação gráfica do injetor manual. Fonte: Steiner, F. <i>et al</i> , 2019.....	12
Figura 1.6 - Esquema representativo do mecanismo da bomba de HPLC. Fonte: HITACHI, 2012.	13
Figura 1.7 - Cromatograma ilustrativo. Adaptado de: Deepak (2013) em https://lab-training.com/how-to-read-a-chromatogram/ . Acedido a 24 de janeiro de 2023.....	18
Figura 2.1 - Logotipo do Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar. Fonte: https://www.cfpsa.pt/ . Acedido a 2 de fevereiro de 2023.	33
Figura 2.2 - Fotografia ilustrativa do Álcool gel comercializado no CFPSA. Fonte: CFPSA (n.d. (2)). Acedido a 24 de maio de 2023.....	34
Figura 2.3 - Esquema ilustrativo do teste rápido comercializado no CFPSA, Veóleo. Fonte: CFPSA (n.d. (3)). Acedido a 24 de maio de 2023.	35
Figura 2.4 - HITACHI High-Tech GLOBAL. Fonte: HITACHI, 2012.....	37
Figura 2.5 - Esquema representativo da preparação da amostra stock de cafeína.	41

Figura 2.6 - Esquema representativo da preparação de algumas das amostras padrão para a cafeína. Continuação do processo no ponto 2.2.1.10.3.....	41
Figura 2.7 - Esquema representativo da preparação das amostras sólidas para quantificação por HPLC de acordo com ISO 20481:2008. Continuação do processo no ponto 2.2.1.10.3...42	42
Figura 2.8 - Esquema representativo da preparação das amostras de bebidas para quantificação por HPLC. Continuação do processo no ponto 2.2.1.10.3.....	42
Figura 2.9 - Esquema representativo da preparação da amostra de chá preto para quantificação por HPLC. Continuação do processo no ponto 2.2.1.10.3.....	43
Figura 2.10 - Esquema representativo da preparação das diferentes soluções para quantificação dos teores de cafeína por HPLC.....	43
Figura 3.1 - Cromatograma obtido para a amostra de cappuccino descafeinado, com o pico de cafeína identificado sem a interferência de outros componentes, com $t_r=11,827$	46
Figura 3.2 - Representação esquemática da reta de calibração ($y = 42314 x - 24299$) para a gama de concentrações elevadas, entre 5 e 160 mg/L.....	48
Figura 3.3 - Representação esquemática dos valores obtidos nos cromatogramas para os padrões da gama baixa de cafeína e a respetiva apresentação da reta de calibração ($y = 36833 x - 3699,4$).	49
Figura 3.4 - Imagens representativas dos géneros alimentícios analisados e obtidos em supermercado: Chá preto aromatizado com frutos vermelhos da marca Pingo Doce (1); Chicória com café da marca Bellarom (2); Café instantâneo da marca Branca (3); Cappuccino descafeinado da marca Nescafé (4); Ice Tea de limão da marca Lipton (5); Coca-Cola da marca Branca (6); Bebida Energética da marca Branca (7).	58
Figura 3.5 - Teores de cafeína em diferentes tipos de géneros alimentícios. Fonte: DECO PROTESTE, 2021. Acedido a 27 de março de 2023.....	59
Figura 3.6 - Amostras de bebidas: Ice Tea (1), Coca-Cola (2), Bebida Energética (3) e Chicória com Café (4). No plano mais distante na sua forma original, no meio com o precipitado de óxido de zinco e no plano frontal após a filtração com os filtros de membrana de 0,45 μm . .62	62
Figura 3.7 - Cromatograma obtido para Chá Preto com $t_r = 11,793$	63
Figura 3.8 - Cromatograma obtido para Chicória e Café com $t_r = 12,680$	63
Figura 3.9 - Cromatograma obtido para Café solúvel com $t_r = 12,727$	64
Figura 3.10 - Cromatograma obtido para Cappuccino descafeinado com $t_r = 11,827$	64
Figura 3.11 - Cromatograma obtido para Iced-Tea com $t_r = 13,027$	65

Figura 3.12 - Cromatograma obtido para Coca-Cola com $t_r = 12,793$	65
Figura 3.13 - Cromatograma obtido para Bebida Energética com $t_r = 12,707$	66
Figura 3.14 - Representação gráfica dos resultados obtidos para o teor de cafeína nas diferentes amostras de géneros alimentícios analisadas para as amostras que apresentaram valores superiores: o café instantâneo, o chá preto e a chicória café (A) e para as amostras que apresentaram baixos valores de cafeína: o Cappuccino Descafeinado, a Bebida energética, a Coca-cola e o Ice-Tea (B).....	68
Figura 4.1 - Reta de calibração obtida pelos padrões 5, 10, 20, 40, 80 e 160 mg/L de ácido benzóico. Obtenção dos valores para a curva de calibração exposta em 4.1.....	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Tipos de detetores de cromatografia líquida. Fonte: HITACHI (n.d) (2).....	15
Tabela 2.1 - Parâmetros para a corrida cromatográfica na detecção de cafeína em diferentes géneros alimentares.....	40
Tabela 3.1 - Resultados obtidos para o sinal dado pelo equipamento de HPLC para os respetivos padrões de cafeína da gama alta (com a concentração conhecida de 5, 10, 20, 40, 80 e 160 mg/L), com a apresentação do seu tempo de retenção e respetivos limites de quantificação e deteção.....	47
Tabela 3.2 - Resultados obtidos para o sinal dado pelo equipamento de HPLC para os respetivos padrões de cafeína da gama baixa (com a concentração conhecida de 0,5; 1; 2 e 2,5 mg/L), com a apresentação do seu tempo de retenção e respetivos limites de quantificação e deteção.....	49
Tabela 3.3 - Teste de homogeneidade aos padrões da gama alta, 160mg/L e 5mg/L, com a respetiva média de áreas, tempo de retenção (tr) e concentração em mg/L (a partir da equação $y = 35439x + 9824,5$); variâncias associadas ao primeiro (S12) e último (S102) padrão e o respetivo valor de PG e o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher.	51
Tabela 3.4 - Teste de homogeneidade aos padrões da gama baixa 2,5mg/L e 0,5 mg/L, com a respetiva média de áreas, tempo de retenção (tr) e concentração em mg/L (a partir da equação apresentada em 3.2); variâncias associadas ao primeiro (S12) e último (S102) padrão e o respetivo valor de PG e o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher.	52
Tabela 3.5 - Dados do teste interlaboratorial de precisão para a determinação de cafeína em café liofilizado e café aglomerado. Fonte: ISO 20481:2008.	53
Tabela 3.6 - Estudo da Repetibilidade para a amostra de Café Solúvel (para n=10), com obtenção da média do teor de cafeína em %(m/m) e respetivos: desvio padrão de repetibilidade (sr), limite de repetibilidade (r) e coeficiente de variação da repetibilidade (CV _r). Sendo as observações efetuadas no dia 06/07/2023. As concentrações em mg/L, foram	

determinadas com a reta do dia 04/07/2023: $y = 42314x - 24299$ e, para a determinação de W_c (g/100g): as concentrações e áreas dos padrões usados no dia, de acordo com a equação 3.3.....54

Tabela 3.7 - Estudo da Reprodutibilidade para a amostra de Café Solúvel (para $n=10$), com obtenção da média do teor de cafeína em $\%(m/m)$ e respectivos: desvio padrão de reprodutibilidade (s_R), limite de reprodutibilidade (R) e coeficiente de variação da reprodutibilidade (CV_R). Sendo as observações efetuadas no dia 04/07/2023 e 05/07/2023. As concentrações, em mg/L, foram determinadas com a reta do dia 04/07/2023: $y = 42314x - 24299$ e, para a determinação de W_c (g/100g): as concentrações e áreas dos padrões usados no dia, de acordo com a equação 3.3.....55

Tabela 3.8 - Comparação dos resultados experimentais com os da ISO 20481:2008 e, apresentação do desvio absoluto dos resultados obtidos experimentalmente, com os presentes na ISO. *Nota: este valor corresponde à média dos valores da repetibilidade e reprodutibilidade em g/100 g.....56

Tabela 3.9 - Compilação dos rótulos dos diferentes produtos analisados, com indicação da listagem de ingredientes, algumas informações relevantes e as imagens do rótulo.....60

Tabela 3.10 - Resultados para a análise a diferentes amostras da gama alta: chá preto aromatizado com frutos vermelhos e café instantâneo, com a determinação da respetiva concentração (mg/L) com o auxílio das retas de 15/03/2023: $y = 35439x + 9824,5$; 03/04/2023: $y = 41490x - 42730$; 09/05/2023: $y = 37488x - 57613$; e 16/05/2023: $y = 35114x - 6540,7$, o conteúdo de cafeína nas nossas amostras, w_c (g cafeína/100 g ou 100 mL de amostra) e a concentração de cafeína com o auxílio da concentração obtida pela reta de calibração e respetiva média.....68

Tabela 3.11 - Comparação dos valores experimentais com dados de referência de diversas fontes, dos teores de cafeína de mg por 100 mL ou 100 g de produto.....69

Tabela 4.1 - Resultados obtidos para os cromatogramas dos padrões 5, 10, 20, 40, 80 e 160 mg/L de ácido benzóico, e o respetivo desvio padrão, como o auxílio da curva de calibração exposta na equação 4.1.88

Tabela 4.2 - Resultados obtidos para o teor em ácido benzóico para o doce de alperce e, as respetivas manipulações, com o respetivo cálculo da concentração de ácido benzóico, como o auxílio da curva de calibração exposta na equação 4.1, média e desvio padrão.89

Tabela 4.3 - Teste de homogeneidade aos padrões da gama alta, 200mg/L e 5mg/L, com a respectiva média de áreas, tempo de retenção (tr) e concentração em mg/L (a partir da equação $y = 35439x + 9824,5$); variâncias associadas ao primeiro (S12) e último (S102) padrão e o respectivo valor de PG e o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher.91

Tabela 4.4 - Resultados obtidos para a determinação dos teores de cafeína para as amostras de Bebida energética, Cappuccino descafeinado, Ice Tea e Coca-cola e, respectivos padrões analisados. Uso das retas de 15/03: $y = 35439x + 9824,5$; 09/05: $y = 37488x - 57613$; e 16/05: $y = 35114x - 6540,7$94

Tabela 4.5 - Resultados obtidos para a determinação dos teores de cafeína para as amostras de Chicória + Café, Chá preto e Café. as concentrações foram obtidas com o uso das retas de 15/03: $y = 35439x + 9824,5$; 03/04: $y = 41490x - 42730$; e 09/05: $y = 37488x - 57613$95

Tabela 4.6 - Tabela de distribuição de Fisher-Snedecor para um intervalo de confiança de 99%.
 Fonte: <http://wiki.icmc.usp.br/images/f/f2/2011-TabelaFSnedecor.pdf>. Acedido a 13 de março de 2023..... 1

GLOSSÁRIO

Adsorver	Reter/Fixar as moléculas de um líquido (o adsorvido) numa superfície sólida (adsorvente).
Cromatografia	Método físico de separação no qual os componentes da amostra a serem separados distribuem-se entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel, que flui numa direção definida.
Fase móvel	Fluído (gás/líquido) que transporta a amostra numa direção definida ao longo da fase estacionária, é o solvente na técnica cromatográfica.
Faze estacionária	Matriz de suporte composta por micropartículas porosas de sílica muito pura, permeáveis ao solvente e com uma grande área superficial, sendo estas esféricas e rígidas, com uma distribuição de tamanhos de poros uniformes.
Eluição isocrática	Técnica caracterizada pelo uso da mesma força cromatográfica durante toda a corrida cromatográfica.
RP-HPLC	Técnica cromatográfica líquida de alta eficiência de fase reversa, é um método físico para separação de diferentes componentes numa amostra, na qual a fase móvel é polar, a fase estacionária é apolar, os compostos polares eluem mais facilmente.
Tempo morto (t₀)	Tempo que uma amostra inerte demora a migrar deste o início da coluna (injetor) e o fim (detetor) sem qualquer afinidade para com a fase estacionária e que permite verificar se há algum problema com o aparelho é caracteristicamente observado no cromatograma como o "primeiro pico".

Tempo de retenção (t_r)	Tempo que uma amostra a analisar demora a migrar desde o início da coluna (injetor) e o fim (detetor).
Tempo de retenção líquido (t'_r)	Tempo no tal fica retida a amostra na fase estacionária.
Número de pratos teóricos (N)	Caracteriza a qualidade de uma coluna cromatográfica e fenómenos de transferência de massa. Valores elevados de N, quantificam a coluna para separar misturas complexas.
Desgaseificar	Processo no qual é retirado a maioria do gás presente numa amostra.
Banho de Ultrassons	Aparelho usado para desgaseificar amostras.

SIGLAS

ADI	"Admissible Daily Intake" / Dose Diária Admissível
CFPSA	Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar / "European Food Safety Authority"
HPLC	"High Pressure Liquid Chromatography" / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISO	"International Organization for Standardization" / Organização Internacional de Normalização
ISQUA	"The International Society for Quality in Health Care" / Sociedade Internacional para a Qualidade em Cuidados de Saúde
LD	Limite de Detecção
LE	Laboratório de Ensaios
LQ	Limite de Quantificação
N	Número de pratos teóricos
ODS	Octadecil
ONA	Organismo Nacional de Acreditação
RP-HPLC	"Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography" / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa.
S	Sensibilidade

SD	"Standard Deviation" / Desvio Padrão
UV-VIS	Ultravioleta-visível
WHO	"World Health Organization" / Organização Mundial de Saúde

SÍMBOLOS

b	Ordenada da origem da reta ($y = mx + b$).
m	Declive da equação da reta ($y = mx + b$).
<i>t_r</i>	Tempo de retenção.

INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento e objetivos do trabalho

A presente tese destina-se a implementar e validar um método de quantificação dos teores de cafeína, em diferentes géneros alimentícios, utilizando o sistema de HPLC, e sua posterior aplicação em amostras de: café, descafeinado e bebidas (como: capuchino, chá preto, coca-cola, etc.), com base na ISO 20481:2008.

Atualmente empresas da Indústria Alimentar recorrem a laboratórios como é o caso do Laboratório de Ensaios (L.E.) do CFPSA, para a realização de análises em alimentos, obtendo assim resultados fidedignos de fontes certificadas, garantindo a credibilidade das análises.

A validação de um método é cada vez mais um requisito importante e fundamental nos laboratórios já que, segundo a World Health Organization (WHO), a validação é uma "avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado" (WHO em Perez, M. Â. F., 2010), isto é, a validação do método vai permitir demonstrar que o método em estudo é adequado, neste caso, para a avaliação de géneros alimentícios que contenham cafeína.

Este processo de validação é muitas das vezes dispendioso para o laboratório, no entanto é considerado como um investimento devido à obtenção de lucros posteriores (Perez, M. Â. F., 2010), neste caso os lucros podem ser obtidos pela proposta deste tipo de análises nos serviços realizados pelo L.E. do CFPSA.

1.2 Contexto e motivação

Atualmente o CFPSA tem implementado desde 2015, para a técnica de HPLC, um método para a determinação do ácido benzoico em compotas e marmeladas. O ácido benzoico é um conservante alimentar (com o código E210) capaz de provocar reações alérgicas, semelhantes às do corante E 102 (Tartarazina), como é o caso de manifestações de urticária, rinites, alterações na visão e problemas respiratórios. Ainda em concentrações elevadas pode provocar irritações gástricas e, tem sido referido, como responsável por certas desordens de natureza neurológica (ASAE., n.d (1); ASAE., n.d. (2)) pelo que a sua concentração acima dos limites legislados torna-se um problema do ponto de vista da segurança alimentar.

Também a cafeína, pode ser um composto perigoso pelo que, a quantidade desta em alimentos e bebidas deve ser monitorada de perto (Alkhamaisah, S. I., 2019), já que é capaz de gerar complicações cardiovasculares, insônia, ansiedade e dores de estômago (Temple et al., 2017 em Rodda, S. 2020).

O CFPSA realiza análises físico-químicas no L.E., frequentemente a novos produtos. Para por exemplo: sorvetes, produtos lácteos, produtos de confeitaria e bebidas não alcoólicas que contenham cafeína, é importante realizar a sua quantificação já que se deve garantir que os teores deste aromatizante não ultrapassem os requeridos por legislação. Devido a este facto, o L.E. achou que a implementação e consequente validação de um método para a determinação deste composto será benéfico para os seus clientes fazendo-lhes chegar novos resultados.

É importante referir que sendo um Centro de Formação Profissional a grande área em que este investe é em Cursos de Formação Profissional, nomeadamente na área Alimentar, entre os quais tem o curso de Técnico de Controlo de Qualidade Alimentar. Neste os formandos são instruídos sobre diferentes técnicas laboratoriais para garantir a segurança alimentar de géneros alimentícios. A consequente validação do método descrito nesta tese, será uma vantagem para a formação, já que este estudo proporcionará ao CFPSA informações sobre como determinar teores de cafeína em diferentes géneros alimentícios, cuja área tem tido um interesse acrescido nas indústrias alimentares (nomeadamente na área das bebidas gaseificadas). Estes ensinamentos podem ser transmitidos aos formandos, proporcionando-lhes temas atuais neste curso e, a aquisição de conhecimentos práticos e teóricos sobre o HPLC, capacitando-os para o mercado de trabalho, já que esta técnica é frequentemente usada em laboratórios de renome para diversos tipos de análises.

Posteriormente este método poderá ser acreditado. A acreditação, segundo o Artigo 4º do Decreto-Lei n.º 140/2004, é "o procedimento através do qual o organismo nacional de acreditação (ONA) reconhece, formalmente, que uma entidade é competente tecnicamente para efetuar uma determinada função específica, de acordo com normas internacionais, europeias ou nacionais, baseando-se, complementarmente, nas orientações emitidas pelos organismos internacionais de acreditação de que Portugal faça parte" (Decreto-Lei n.º 140/2004). A acreditação dá assim às entidades que procuram este serviço, o respeito e o reconhecimento pelas suas competências técnicas. Atualmente a acreditação é obtida pelo organismo oficial de acreditação, o IPAC (Instituto Português de Acreditação) (Campelo, D. C. T., 2020).

De uma forma geral, a necessidade de existirem laboratórios acreditados para determinados métodos, para a análise de alimentos, passa por assegurar aos clientes que os resultados são credíveis e fidedignos. As acreditações trazem benefícios para as empresas, tais como: padronização de processos; identificação de falhas e, conseqüentemente redução de custos, devido à eliminação de ineficiências no processo; identificação de pontos de melhoria contínua; promoção da imagem da empresa, entre outras (IBES, 2011). No entanto, estes processos são dispendiosos, pelo que numa fase inicial não será compensatório a acreditação, sem antes existir mercado para o tipo de método/análise a aplicar.

1.3 Cafeína

Produtos à base de cafeína são facilmente adquiridos e mundialmente consumidos, desde produtos que incluem cafeína, como os cafés (instantâneos, expressos, etc.), bebidas energéticas, comprimidos, chás e bebidas gaseificadas com cafeína. Pelo menos um destes produtos é consumido diariamente, ex.: nos EUA 89% da população adulta consome, em média, 200 mg de cafeína por dia (Rodda, S., *et al.* 2020).

O consumo de cafeína é influenciado pela cultural origem geográfica, estilo de vida e o poder económico das pessoas. Estudos indicam que chás e bebidas com cafeína são muito mais consumidas na África e Ásia, enquanto café e bebidas com cafeína são mais consumidas na Europa e Norte da América (Rodda, S., *et al.* 2020).

Atualmente a cafeína pode ser considerada uma dependência, no entanto ao contrário de outras substâncias viciantes, a maioria dos produtos com cafeína não têm quaisquer requisitos de idade legal para compra ou consumo. Aliás vários estudos recomendaram que as bebidas energéticas não fossem direcionadas, disponíveis ou consumidas por crianças ou

adolescentes (Rodda, S., *et al.* 2020), mas no fundo a cafeína continua a ser altamente consumida por estas faixas etárias em cadeias de restauração e até nas suas casas.

Para além disso a dependência de cafeína, denominada em inglês: "*Caffeine Use Disorder*", ainda não é vista como uma condição psiquiátrica, no entanto a abstinência de cafeína está incluída no "American Psychiatric Association", indicando que para consumidores frequentes deste produto, a abstinência (após um período de uso prolongado) resulta em sintomas como dor de cabeça, fadiga ou sonolência, dificuldade de concentração, irritação, e aparecimento de alguns sintomas semelhantes aos da gripe (Rodda, S., *et al.* 2020), tornando-se assim importante a limitação do uso, e consumo, deste produto de forma excessiva.

Passando agora para a caracterização da cafeína, de acordo com a IUPAC, é denominada cientificamente de 1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione, sendo uma molécula alcaloide de metilxantina (Figura 1.1. A). Esta encontra-se presente em sementes e folhas de um grande número de plantas, nativas do Sul da América e do Este da Ásia e, nestas plantas funciona como um pesticida natural (National Center for Biotechnology Information, 2023). Visualmente apresenta-se sob a forma de um pó branco, cristalino, sendo solúvel em água. A sua solubilidade aumenta com o incremento da temperatura (Reis, R. J. P., 2015).

A cafeína é estruturalmente semelhante à adenosina (Figura 1.1. B) e atua principalmente como um antagonista do recetor de adenosina com atividades psicotrópicas e anti-inflamatórias, ou seja, consegue ligar-se da mesma forma aos recetores sem que seja detetada por mecanismos de inibição. Após a ingestão desta molécula, ocorre a sua ligação aos recetores de adenosina no sistema nervoso central (SNC), o que inibe a ligação da adenosina (Figura 1.1. C). A adenosina é uma purina que funciona como um inibidor geral da atividade neuronal, pelo que a sua inibição pela cafeína estimula a atividade dos centros medular, vagal, vasomotor e respiratório no cérebro. Este agente também promove a liberação de neurotransmissores que estimulam ainda mais o SNC (Fisone, G. *et al.*, 2004; National Center for Biotechnology Information, 2023). Já os efeitos anti-inflamatórios da cafeína são decorrentes da inibição competitiva não seletiva das fosfodiesterases (PDEs). A inibição de PDEs aumenta a concentração intracelular de AMP cíclico, o que ativa a proteína quinase A e inibe a síntese de leucotrienos, levando à redução de inflamações (National Center for Biotechnology Information, 2023).

Uma vez que a cafeína é um metabolito estimulante do sistema nervoso, é usado pela indústria farmacêutica como um medicamento para reduzir a fadiga física e para restaurar os níveis de alerta quando estão em baixo. Este é um produto que leva a um aumento do estado

de vigília, levando a um aumento do fluxo de pensamento, tornando-se rápido e claro, maior foco e melhor coordenação geral do corpo (Pokhrel, P. *et al.*, 2016).

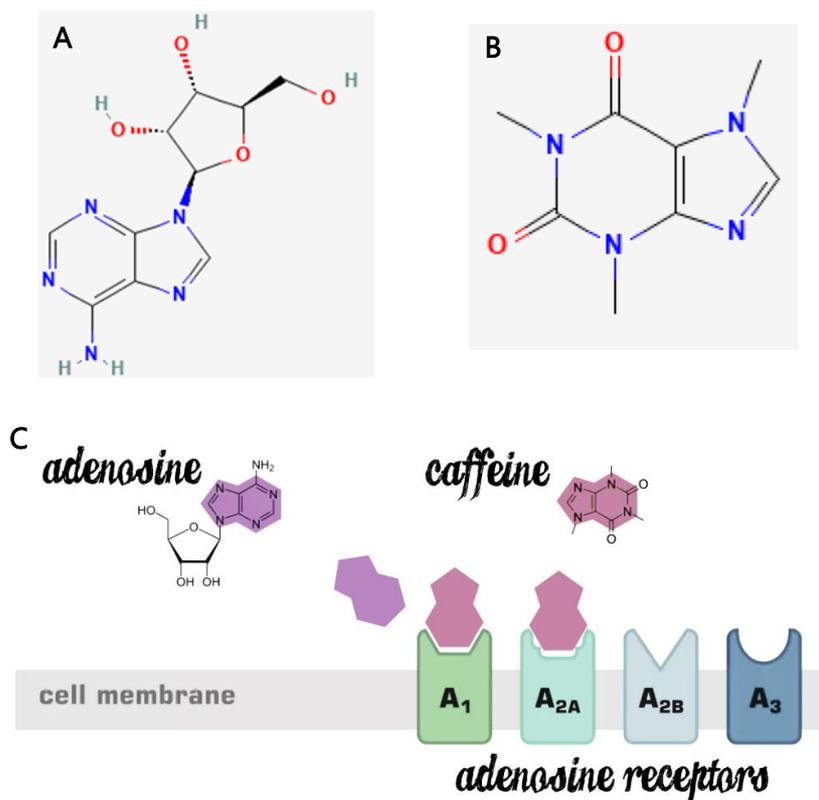


Figura 1.1 - Estrutura ilustrativa em 2D da molécula de:

A – Adenosina. Fonte: National Center for Biotechnology Information (2023) acessido a 16 de janeiro de 2023 (última modificação no site a 15/01/2023).

B – Cafeína. Fonte: National Center for Biotechnology Information (2023) acessido a 13 de janeiro de 2023 (última modificação no site a 15/01/2023).

C - Mecanismo de ação da cafeína. Fonte: Gini Health (2019) em <https://www.honeybeebenefits.com/caffeine-health-risks/>, acessido a 09 de fevereiro de 2023.

Até à data, investigações sobre os danos que a cafeína é responsável por causar têm sido inconclusivas e, por vezes contraditórias, por exemplo, um estudo de 2017, no qual foram examinadas as relações entre o consumo de café e saúde, relatando-se que os benefícios superavam amplamente os danos. No entanto, noutros estudos a cafeína é vista como sendo prejudicial ao nosso corpo, já que se encontra associada a: complicações cardiovasculares, insónia, problemas dentários, ansiedade, incontinência, taquicardia e dor de estômago. Esses efeitos colaterais também podem ser responsáveis por criar outros problemas de saúde após anos de uso constante de cafeína (Rodda, S., *et al.* 2020; Van Beek, A. R., *et al.* 2019).

Entidades como a Organização Mundial de Saúde (OMS), Comité Científico para a Alimentação Humana (SCF) e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) não estabeleceram até à data um nível de ingestão admissível para a cafeína ou a Dose Diária Aceitável (ADI). Embora a cafeína seja um dos constituintes alimentares mais estudados estes limites ainda não foram determinados, mas a sua quantificação é um dado importante a ter em consideração (da Silva Gaspar, S., 2014).

É importante abordar também que os produtos descafeinados são aqueles que passam por um processo no qual é retirada parte da cafeína, pelo que continuam a conter cafeína, mas em quantidades mais limitadas e, em princípio serão uma boa alternativa para diminuir os efeitos adversos causados por este composto. Experimentalmente o descafeinado é obtido pela extração da cafeína de grãos de café verde com, por exemplo: água quente, solventes orgânicos ou com dióxido de carbono supercrítico. Os produtos descafeinados devem conter menos de 0,1% de cafeína (Naegele, E., 2013).

1.3.1 Legislação para Cafeína em produtos alimentares

Atualmente existe legislação para produtos alimentares que contenham cafeína, de acordo com o Regulamento (UE) N.º 1169/2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, está legislado no anexo III que certos géneros alimentícios devem incluir na sua rotulagem a menção de “Bebidas com elevado teor de cafeína ou géneros alimentícios com cafeína adicionada” se forem destinadas a ser consumidas e contenham cafeína numa porção superior a 150 mg/L, com exceção de café e chá, que o género alimentício inclui a menção de café ou chá.

Este tipo de bebidas devem apresentar a menção: “Elevado teor de cafeína. Não recomendado a crianças nem a grávidas ou lactantes” e deve constar no mesmo campo visual que a denominação da bebida, seguida de uma referência, entre parênteses e nos termos do artigo 13.º, n.º 1, do presente regulamento, ao teor de cafeína expresso em mg por 100 mL. Para outros géneros alimentícios que não sejam bebidas, mas em que seja adicionada cafeína para fins fisiológicos, devem conter a menção: “Contém cafeína. Não recomendado a crianças nem a grávida” que deve conter as mesmas características aplicadas à menção anterior e, no caso de serem suplementos alimentares, o teor de cafeína deve ser expresso em função da dose diária recomendada na rotulagem (Regulamento (UE) N.º 1169/2011).

A cafeína também pode ser usada como aromatizante, mas para tal existem restrições de utilização como substância aromatizante para diferentes tipos de gêneros alimentícios, no Regulamento (UE) N.º 872/2012 encontram-se os limites:

- Na categoria 1 (produtos lácteos e seus sucedâneos) — não mais de 70 mg/kg;
- Na categoria 3 (Sorvetes) — não mais de 70 mg/kg;
- Na categoria 5 (Produtos de confeitaria) — não mais de 100 mg/kg;
- Na categoria 14.1 (Bebidas não alcoólicas) — não mais de 150 mg/kg.

Uma vez que serão analisadas amostras de café, descafeinado e algumas bebidas não alcoólicas com café, como é o caso do chá preto, coca-cola, etc., estima-se que os valores de cafeína sejam 150 mg/L para os produtos com cafeína própria e para as bebidas com cafeína adicionada com função aromatizante, valores inferiores a 150 mg/kg.

1.3.2 Café solúvel

Para o desenvolvimento deste trabalho a norma ISO 20481:2008 foi usada como modelo experimental e comparativo, nos ensaios desenvolvidos. Na norma, são apresentados resultados para café solúvel do tipo: "regular freeze dried" e "regular agglomerated", pelo que existiu a necessidade da criação deste pequeno subcapítulo dedicado apenas à explicação das diferenças entre estes cafés.

Comercialmente, o café solúvel, também chamado de café em pó ou café instantâneo, é obtido a partir de grãos de café torrados, que são moídos e, extraídos com água quente sob condições de alta pressão para extrair compostos solúveis em água, como é o caso da cafeína. Este material solúvel, obtido da extração, é deixado a arrefecer e, por vezes, pode ser: centrifugado, concentrado por aquecimento e, seco para reduzir a humidade para aproximadamente um valor de 5%. Alternativamente, vapor/água e/ou óleo pode ser usado para humedecer novamente a superfície dos grânulos de café solúvel, seguido de um processo de secagem. Este processo é chamado de aglomeração (Ghirişan & Miclăuş, 2017).

Fabricantes de café usam diversas técnicas para melhorar a aparência e o sabor do seu produto final. Existem dois métodos disponíveis para a conversão do café líquido em café em pó: "spray-drying" (SD ou secagem por pulverização) e "freeze-drying" (FD ou secagem por congelação) ou liofilização. Na técnica de "spray-drying", o café no estado líquido é pulverizado numa atmosfera de ar quente, com auxílio de um spray dryer (ou pulverizador), no qual através da ação do calor a água presente nessa mistura líquida evapora e leva à produção de pequenos sedimentos de café. Já a técnica de "freeze-drying" ou liofilização, é usada com o intuito de ser usada em amostras mais sensíveis, neste método o café líquido concentrado

sofre um processo de congelamento na qual a água é transformada em cristais de gelo, que são posteriormente removidos na forma de vapor de água por sublimação a baixa pressão e temperatura (Ghirişan & Miclăuş, 2017).

Comparando estas duas técnicas de secagem, o "spray-drying" é uma secagem realizada a altas temperaturas, o que vai afetar algumas características do produto final, nomeadamente a textura e o sabor, no entanto, têm a grande vantagem de ter um custo reduzido e um tempo de secagem baixo, pelo que permite um maior rendimento económico. A liofilização proporciona a obtenção de um produto com as características mais próximas do original, obtendo-se um produto com uma menor perda de sabor e aroma, no entanto, é um processo mais dispendioso já que envolve mais custos de energia devido ao uso de baixas temperaturas e pressões (Ghirişan & Miclăuş, 2017).

Comercialmente, na rotulagem de cafés solúveis são encontradas duas denominações: café liofilizado e café aglomerado (Figura 1.2). O café liofilizado é aquele que foi obtido através do processo de "freeze-drying", descrito anteriormente, já o café aglomerado é obtido por "spray-dried", no qual depois da secagem, é adicionado pó e depois o café é submetido a uma segunda operação com vapor, que leva a uma agregação das partículas (Helena Coffee, 2022).



Figura 1.2 - Café solúvel aglomerado (A) e liofilizado (B). Fontes: <https://www.tatacoffee.com/instant-coffee> e <https://coffeebeanandbirds.com/blogs/news/our-wisdom-the-secret-behind-freezed-dried-coffee-lyophilized-coffee>. Acedido a 19 de abril de 2023.

1.4 O HPLC e a sua importância no contexto da análise de matrizes alimentares

A cromatografia é um método físico de separação, no qual os componentes da amostra distribuem-se entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel, que flui numa direção

definida (Nahar, L., *et al.* 2020). A fase estacionária caracteriza-se por ser um composto no estado sólido ou líquido (desde que, no caso de ser líquido, deve estar adsorvido a um sólido ou um gel) que habitualmente está empacotada numa coluna ou espalhada numa superfície; já a fase móvel pode ser, tanto um líquido, como um gás. Sendo que, os métodos cromatográficos baseiam-se assim no equilíbrio entre a fase móvel e a fase estacionária. (Mota, M., 2006). Nos últimos anos, as fases estacionárias usadas são, habitualmente, colunas empacotadas com sílica gel tratada quimicamente (HITACHI, 2012).

A técnica cromatográfica aplicada neste trabalho foi o HPLC, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, cujas siglas são referentes a "Hight Pressure Liquid Chromatography" ou "High performance liquid chromatography". Esta técnica é muito popular, moderna e versátil para a deteção de compostos não voláteis e moléculas termicamente instáveis a altas pressões (Nahar, L., *et al.* 2020).

O desenvolvimento desta técnica laboratorial remota ao início do século 20, com a descoberta do princípio básico por M.S. Tswett, que separou os corantes de um extrato vegetal com éter de petróleo (fase móvel) e carbonato de cálcio em pó (fase sólida). (HITACHI, 2012). Já na década de 1970 a cromatografia de fase reversa foi desenvolvida e em 1980, com o desenvolvimento de computadores e automatização de sistemas o uso do HPLC foi facilitado. Posteriormente esta metodologia cresceu rapidamente e, entre 1995 e 2001, cerca de 53% dos métodos analíticos diziam respeito ao uso desta técnica (Domingos, M. C. R., 2011).

O HPLC utiliza o fenómeno de eluição, ou seja, a separação de uma mistura com diferentes moléculas. Sendo que, a ordem de eluição e o grau de separação, vão depender da escolha das fases móvel e estacionária. Também é importante referir que cada molécula da amostra irá eluir a tempos diferentes, consoante a sua interação com a fase estacionária, por exemplo pode ficar retida na fase estacionária (coluna) se tiver afinidade para com ela (HITACHI, 2012).

A análise por HPLC baseia-se no princípio em que, nas mesmas condições de medição, o tempo entre a injeção de um componente na coluna e a eluição desse componente é aproximadamente constante, pelo que a determinação desse componente em diferentes amostras é possível, permitindo assim a realização de tanto análises qualitativas, como quantitativas (HITACHI, 2012). Nas indústrias alimentares o seu papel tem tido grande importância já que permite quantificar teores de compostos (aditivos, aromatizantes, entre outros) nas diferentes matrizes alimentares e, avaliar se a sua concentração está de acordo com a legislação em vigor.

1.5 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida pode ser classificada em diferentes tipos, tais como (Domingos, M. C. R., 2011; SPECANALITICA, 2011):

- **Cromatografia de adsorção:** neste tipo de cromatografia líquida, a separação dos componentes, de uma amostra, é baseada nas diferenças de afinidade destes para com a fase estacionária, existem interações entre o analito com a superfície do adsorvente provocando o seu movimento retardado em comparação com as moléculas do eluente. Solutos muito polares ficam retidos, não sendo cromatografados;
- **Cromatografia de troca iónica:** baseada nas diferentes cargas de compostos ionizados ou iónicos (catiões e aniões) com os iões presentes na matriz da fase estacionária;
- **Cromatografia de afinidade:** caracteriza-se pela interação entre um ligando e um soluto. O ligando pode ser geral ou específico respetivamente, ligando-se a grupos específicos em moléculas alvo ou ligando-se apenas a uma espécie: antigene ou anticorpo.
- **Cromatografia de exclusão molecular ou em gel:** a separação é baseada no tamanho e forma das moléculas. A fase estacionária é constituída por um material poroso, cujo tamanho do poro é controlado, pelo que, moléculas pequenas conseguem penetrar os poros, ficando assim, retidas e eluindo no final da corrida cromatográfica. Já as moléculas maiores não entram nos poros da fase estacionária eluindo em primeiro lugar;
- **Cromatografia quiral:** é utilizada para separar enantiómeros numa fase estacionária quiral. A separação é conseguida por ação de agentes derivatizantes formando-se diastereómeros;
- **Cromatografia de partição:** a separação baseia-se na diferente partição dos solutos entre duas fases líquidas e, ocorre com base nas diferenças de solubilidade dos solutos para a fase estacionária. Nesta, as espécies mais retidas têm maior afinidade (solubilidade) para a fase estacionária.

A técnica de HPLC é um método de cromatografia líquida de partição, esta pode ser dividida em (Domingos, M. C. R., 2011; SPECANALITICA, 2011):

- **Fase Normal (NP-HPLC):** A cromatografia de fase normal é caracterizada por uma fase estacionária polar (habitualmente sílica gel) e a fase móvel apolar (solvente orgânico).

Nesta técnica os compostos mais apolares eluem em primeiro lugar, sendo que os compostos polares são atraídos para a fase estacionária e acabam retidos nesta.

- **Fase Reversa (RP-HPLC):** A cromatografia de fase reversa ou inversa, tem uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar (normalmente uma mistura de solventes orgânicos e uma solução aquosa). Neste caso, as moléculas apolares ficam retidas na coluna, pelo que compostos mais polares tendem a eluir em primeiro lugar.

De acordo com Domingos, M. C. R. (2011), a cromatografia RP-HPLC é rápida, versátil e bastante reprodutível. Por esta razão, neste trabalho experimental foi usado este método cromatográfico, devido às vantagens anteriormente apresentadas, e por ser capaz de analisar compostos polares, como é o caso da molécula de cafeína (Figura 1.1. A).

1.6 Constituição do aparelho de HPLC

De uma forma geral, a amostra é injetada no injetor, entra no sistema e vai ser impulsionada pela bomba juntamente com o solvente (fase móvel) até à coluna (fase estacionária) onde ocorre a separação das moléculas da amostra, fazendo com que cheguem em diferentes tempos ao detetor. No final, o sinal obtido no detetor é transformado num cromatograma pelo software acoplado a este aparelho cromatográfico (Corte, A. B. P., 2021). O equipamento é assim constituído pelas seguintes partes presentes na Figura 1.3:

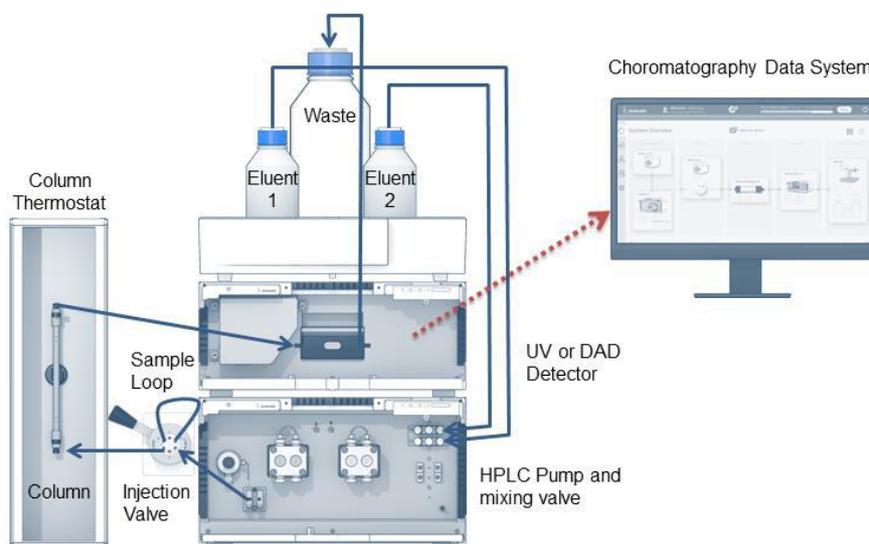


Figura 1.3 - Esquema representativo do equipamento de HPLC. Fonte: <https://www.dctech.com.br/problemas-na-bomba-no-injetor-ou-no-detector-hplc-como-identifica-los-e-resolve-los/>. Acedido a 2 de fevereiro de 2023.

1.6.1 Injetor

Os injetores podem tanto ser manuais, como automáticos (Figura 1.4).

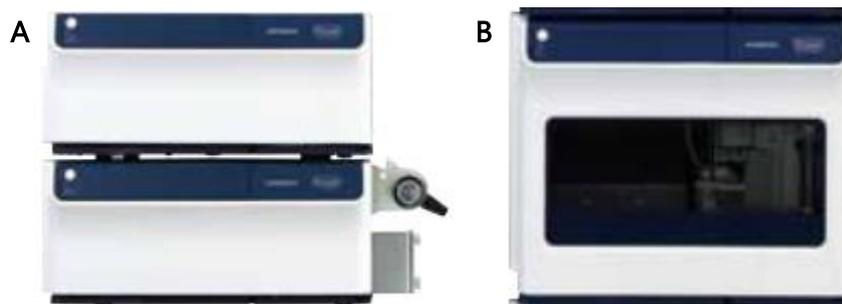


Figura 1.4 - Figura ilustrativa de um injetor manual (A) e injetor automático (B) de Hitachi High Performance Liquid Chromatograph. Fonte: HITACHI, 2012.

Nos injetores manuais, as injeções são feitas manualmente com o auxílio de microseringas. Desde o final dos anos 1970 que o injetor compacto é o mais usado para este propósito, este é constituído por uma válvula de seis portas e duas posições com um rotor, um loop (que pode ser alterado consoante o volume de amostra que se pretende analisar) e, uma porta de agulha de carregamento frontal, como podemos observar na Figura 1.5 (a). Em primeiro lugar injeta-se a amostra, com o auxílio da microseringa e, permitindo que toda a amostra seja transferida para o loop sob pressão atmosférica, posteriormente o rotor é girado manualmente por uma manivela, enquanto a ponta da agulha ainda está na entrada, e a amostra é entregue (Figura 1.5 (b) e (c)) (Steiner, F. *et al.*, 2019).

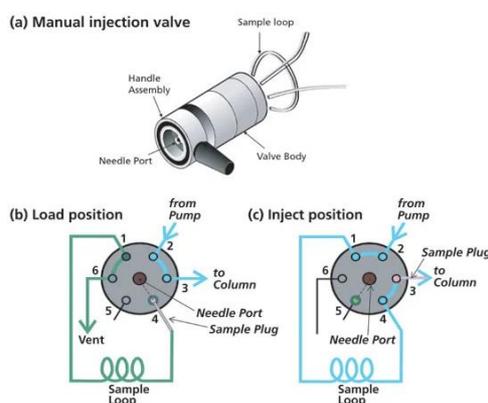


Figura 1.5 - Representação gráfica do injetor manual. Fonte: Steiner, F. *et al.*, 2019.

Já os injetores automáticos, tal como o nome indica, são dispositivos que automatizam a introdução de uma amostra na coluna de HPLC. Um amostrador automático de HPLC normalmente compreende um compartimento de armazenamento de amostra com um injetor, consistindo numa válvula, um dispositivo de dosagem ou medição de amostra e uma agulha

de amostragem móvel. O que gera resultados com grande precisão e confiabilidade a longo prazo (Steiner, F. *et al.*, 2019).

1.6.2 Bomba

As bombas de HPLC (Figura 1.6), muitas vezes denominadas de "solvent delivery system" (sistemas de entrega de solvente), são usadas para fornecer um fluxo de fase móvel para a coluna de HPLC (Shoykhet, K., *et al.*, 2019).

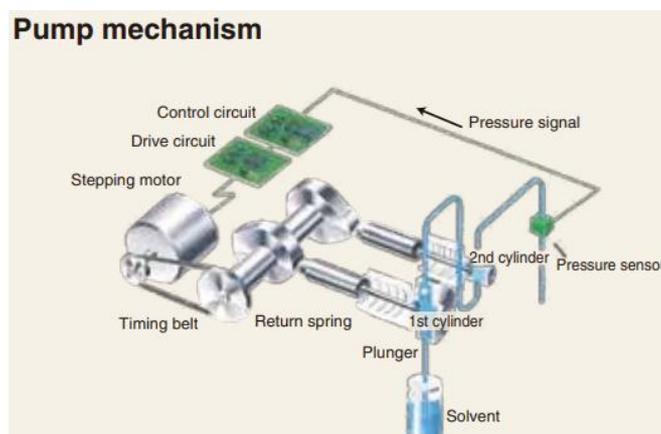


Figura 1.6 - Esquema representativo do mecanismo da bomba de HPLC. Fonte: HITACHI, 2012.

As bombas de alta pressão de um sistema de HPLC têm bastante influência no que diz respeito ao resultado cromatográfico, isto porque a precisão e a estabilidade a longo prazo da entrega do eluente, pela bomba, vão afetar o tempo de retenção e, com ele, a reprodutibilidade dos resultados obtidos nos cromatogramas (Kromidas, S., 2017) pelo que, garantir que a pressão se encontra constante ao longo da corrida cromatográfica é um passo importante para garantir resultados com reprodutibilidade.

1.6.3 Sistema de eluição

A eluição pode ser em gradiente, ou isocrática. Para os sistemas de eluição em gradiente, o tempo de análise é encurtado pelo uso de diferentes composições na fase móvel ao longo da corrida cromatográfica, podendo esta alteração ser feita continuamente ou gradualmente. Já nos sistemas de eluição isocrática a composição da fase móvel não é alterada, pelo que é usada a mesma composição durante a corrida (Macherey-Nagel, n.d.).

1.6.4 Coluna cromatográfica

As colunas cromatográficas vão conter a fase estacionária, que vai assim permitir a decomposição das amostras, e a seu conseqüente partilha com a fase móvel. A coluna a usar, dependerá da escolha da fase estacionária e da polaridade pretendida, se o objetivo for usar a técnica de RP-HPLC, é usada uma fase estacionária apolar/não polar, com uma coluna do tipo C8 (octilsilica), C18 (ODS ou Octadecilsilica) ou fenil. Se for usada a técnica de NP-HPLC, será necessária uma coluna polar do tipo ciano (CN), amina ou diol (Domingos, M. C. R., 2011; SPECANALITICA, 2011).

1.6.5 Pré-coluna

A pré-coluna é um dispositivo que se encontra antes da coluna cromatográfica com o intuito de saturar o eluente, impedindo assim o seu arrastamento pela coluna, e servindo ao mesmo tempo como um filtro a contaminantes e partículas. É importante referir que a pré-coluna deve ter as mesmas características que a fase estacionária usada (Domingos, M. C. R., 2011). Sendo que o uso deste tipo de equipamentos proporciona um aumento do tempo de vida das colunas, sem alteração dos resultados cromatográficos (Gonçalves, A. F. D. J., 2014).

1.6.6 Forno da coluna

O forno da coluna é necessário para manter a temperatura da fase estacionária constante. A temperatura é um parâmetro importante na separação e deve ser controlado para a obtenção de resultados reprodutíveis, já que alterações de temperatura na coluna afetam o grau de separação de diferentes amostras, o forno da coluna permite assim efetuar as análises a temperaturas constantes (HITACHI, 2012).

1.6.7 Detetores

Os detetores são usados para a deteção dos componentes eluídos da coluna, estes encontram-se associados habitualmente a dispositivos eletrónicos que detetam um sinal e enviam a um processador (Domingos, M. C. R., 2011). Os detetores de UV/UV-VIS são os mais usados, no entanto existem outros tipos como o "Diode Array Detector" (DAD), no qual é

possível obter simultaneamente dados de tempo, absorbância e comprimento de onda (HITACHI, 2012).

Mas podemos ter outros tipos de detetores, nomeadamente aqueles presentes na Tabela 1.1:

Tabela 1.1 - Tipos de detetores de cromatografia líquida. Fonte: HITACHI (n.d) (2).

Tipo de Detetor	Informações
UV	Nos detetores de UV, a fonte de luz é uma Lâmpada de Deutério (D2), estes são usados com a principal função de detetarem componentes com um comprimento de onda de absorção de, mais ou menos, 400 nm na região do ultravioleta.
UV-VIS	Os detetores de UV-Vis usam 2 Lâmpadas, uma de Deutério (D2) e outra de Tungsténio (W) que são usadas como fonte de luz, de acordo com o comprimento de onda escolhido, entre os 190 e os 380 nm. Este detetor é eficaz na deteção de compostos colorimétricos, já que tem cobertura na região da luz visível.
DAD	Nos detetores de DAD, matrizes de fotodíodos (dispositivos semicondutores) são usadas na unidade de deteção, que deteta a absorção na região UV para VIS. Enquanto um detetor de UV-VIS tem apenas uma secção de receção de luz do lado da amostra, um DAD tem várias matrizes de fotodíodos para obter informações numa ampla gama de comprimentos de onda ao mesmo tempo, sendo uma vantagem. A ideia é que os espetros sejam medidos em intervalos de 1 segundo, ou menos, durante a corrida cromatográfica por HPLC. Se o ensaio for realizado num comprimento de onda fixo, os componentes são identificados pelo seu tempo de retenção (tr).
Detetores de Fluorescência (Fluorescence (FL) detector)	Este tipo de detetores foram desenhados para detetar substâncias fluorescentes com alta sensibilidade, já que estas substâncias absorvem luz para atingir um certo nível de energia e depois emitem luz para retornar ao seu nível original. Tal substância tem comprimentos de onda específicos de luz que absorve (comprimentos de onda de excitação) e emite (comprimentos de onda de emissão).
Detetor de índice de refração diferencial (Differential refractive index (RI) detector)	Estes detetam a alteração no índice de refração, no entanto, componentes que não absorvem luz ultravioleta podem ser detetados apesar da sua baixa sensibilidade.
Detetor de Condutividade (Conductivity detector)	Neste tipo de detetores iões inorgânicos, e pequenas substâncias orgânicas, incluindo ácidos orgânicos e aminas, são detetados através da monitorização da sua condutividade. O detetor de condutividade é altamente sensível, mas muito suscetível ao efeito da variação de temperatura (uma mudança de 1°C na temperatura da solução causa uma mudança de aproximadamente 2% na condutividade elétrica). Vários métodos para evitar variações de temperatura foram desenvolvidos, como células de temperatura constante.

1.6.8 Sistema de aquisição e controlo

Os sistemas de aquisição e controlo fornecem registos dos dados analisados na corrida cromatográfica como cromatogramas, retas de calibração, etc., sendo adquiridos com o auxílio de um software acoplado ao aparelho de HPLC. Habitualmente a concentração de cada componente detetado é calculada a partir da área ou altura do pico correspondente nos cromatogramas, com o auxílio das retas de calibração (HITACHI, n.d. (1)).

1.7 Boas práticas na utilização do HPLC

O HPLC é um dispositivo caro e cuja manutenção é dispendiosa, como tal foram aplicadas algumas regras básicas durante o uso deste aparelho (Macherey-Nagel., n.d.; Marquês, A. I., 2015; Costa, D., 2021)):

- Limpar sempre o equipamento quando se coloca a correr uma nova amostra;
- Fazer lavagens do sistema regulares e seguindo as recomendações do fabricante;
- Manter aditivos agressivos ou de precipitação longe da coluna (ex: sais, ácidos, polímeros);
- Manter o pH dentro dos limites para razões de seletividade;
- Não usar temperaturas mais elevadas que o necessário;
- Evitar pressões extremas ou repentinas e verificar a pressão da coluna, já que se a pressão for baixa pode indicar uma fuga no sistema e, por outro lado, se for detetada uma pressão elevada, pode existir uma obstrução no sistema;
- Filtrar as fases móveis com sistema de filtração a vácuo para remover partículas em suspensão (para sistemas convencionais com pressão até 600 Bar utiliza-se normalmente filtros com membrana de 0,45 μm), já que a filtração evita problemas de entupimento do sistema, para além de prolongar o tempo de vida dos equipamentos;
- Desgaseificar as fases móveis com banho de ultrassons, já que este processo evita e previne que haja bolhas de ar no cromatógrafo que possam afetar a reprodutibilidade dos resultados. Caso não seja efetuada a desgaseificação, bolhas de ar têm a possibilidade de alcançar o detetor e provocar oscilações na linha de base;
- Trocar regularmente as garrafas das fases móveis, mesmo sendo usada a mesma fase móvel regularmente e, em especial para fases móveis que têm uma percentagem elevada de água. Caso não seja trocada, a água começa a ficar turva e pode ocorrer o

desenvolvimento de bactérias e outros microrganismos que podem prejudicar a análise;

- Evitar o uso de água a 100%, para evitar o crescimento de microrganismos na coluna;
- Não usar o dispositivo se os reagentes estiverem vazios, e verificar periodicamente se têm os níveis necessários para a corrida cromatográfica, também não é aconselhável deixar as garrafas de fase móvel sem tampa para evitar contaminações e evaporação de solventes tóxicos e voláteis;
- Inspeccionar o sistema regularmente para fugas;
- Purgar o sistema com solvente orgânico no final do uso do aparelho e só depois desligá-lo, evitar deixar água na coluna, já que esta promove o desenvolvimento de microrganismos.

Estas regras devem ser respeitadas ao máximo para prolongar o tempo de vida dos aparelhos de HPLC.

1.8 Conceitos cromatográficos

Relativamente à demonstração cromatográfica, apresentam-se agora alguns conceitos teóricos. Na Figura 1.7, apresenta-se um esquema representativo de um cromatograma para ajudar na explicação desses conceitos.

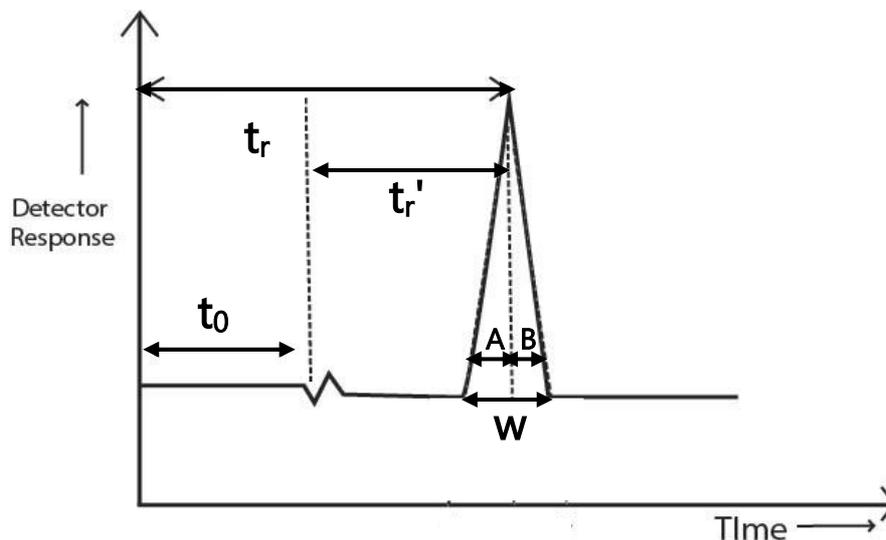


Figura 1.7 - Cromatograma ilustrativo. Adaptado de: Deepak (2013) em <https://lab-training.com/how-to-read-a-chromatogram/>. Acedido a 24 de janeiro de 2023.

Legenda, onde (Macherey-Nagel., n.d.):

- t_0 = tempo morto, é o tempo requerido para uma substância inerte para atravessar toda a coluna cromatográfica, isto permite identificar fugas e se o sistema está a trabalhar normalmente
- t_r' = tempo de retenção líquido, é o tempo que a amostra fica retida na fase estacionária
- t_r = tempo de retenção, corresponde ao tempo que é necessário para uma amostra migrar desde o início da coluna (pelo injetor) e o fim da coluna (no detetor)
- w = largura do pico
- A = medida da largura, à altura de 10% do pico, do extremo esquerdo até meio do pico
- B = medida da largura, à altura de 10% do pico, do meio até ao extremo direito do pico

Para além dos parâmetros apresentados na Figura 1.7, como o tempo de retenção, tempo morto, etc. É possível fazer a identificação de outros componentes como o fator de capacidade, k' que é obtido pela expressão 1.1 (Macherey-Nagel., n.d.):

1.1

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

O fator de capacidade é usado para ajudar a avaliar se um pico dará resultados reprodutíveis e lineares ao longo do tempo. Isto garante que pequenos erros na fase móvel não tenham grande impacto no tempo de retenção ou na resposta do pico (Waters, 2021).

A retenção seletiva ou fator de separação, α , descreve a habilidade de um sistema cromatográfico de discriminar dois compostos (ex.: composto 1 e 2), e é dada pela fórmula 1.2 (Macherey-Nagel., n.d.):

1.2

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

O número de pratos teóricos (N) caracteriza a qualidade de uma coluna cromatográfica e os seus fenómenos de transferência de massa. Já que valores elevados de N qualificam a nossa coluna para separar misturas complexas. Este parâmetro é de seguida apresentado em 1.3 (Macherey-Nagel., n.d.):

1.3

$$N = 16 \left(\frac{t_{r1}}{w} \right)^2$$

A altura do prato teórico, h , é o comprimento no qual o equilíbrio cromatográfico entre a fase estacionária e a fase móvel foi ajustado uma vez. Este parâmetro depende do tamanho da partícula, velocidade do fluxo, viscosidade da fase móvel e a capacidade de empacotamento. Sendo expressa em 1.4 (Macherey-Nagel., n.d.):

1.4

$$h = HEPT = \frac{L}{N}$$

Onde L é o comprimento da coluna e N é o número de pratos teóricos. Neste caso é desejado um número mais baixo possível para h, já que N é desejado que seja um valor elevado (Macherey-Nagel., n.d.).

A simetria dos picos será dada à distância de 10% da altura do pico, este parâmetro é dado pela expressão 1.5 (Macherey-Nagel., n.d.):

1.5

$$Simetria = \frac{B}{A}$$

Idealmente esta simetria deve ser igual a 1, já que é suposto $A=B$, no entanto alguns fenómenos podem levar a que ocorra valores superiores a 1, no qual B é superior a A, indicando que ocorre "peak tailing", um género de arrastamento final do pico. Se a simetria for inferior a 1, A será superior a B, e como tal dá-se um alargamento frontal no pico. Estes alargamentos

podem ocorrer simplesmente devido à saturação da coluna, ou ao uso de temperaturas no forno inadequadas para a coluna de sílica, o que pode provocar a sua degradação e levar a estes erros (Macherey-Nagel., n.d.).

1.9 Validação de Métodos e a sua importância no contexto da análise de matrizes alimentares

Para a validação de um método experimental existem várias regras que devem ser tidas em consideração para termos provas suficientes para indicar e verificar, que o método experimental cumpre os objetivos definidos. Estes objetivos podem variar dependendo do uso pretendido para o procedimento analítico em estudo e da tecnologia específica selecionada para tal (ICH, 2022).

A validação é um processo fundamental em laboratórios quando querem obter resultados credíveis e com qualidade (Relacre, 2000).

Os métodos de ensaio são os procedimentos técnicos definidos para a realização de um ensaio e, podem ser (Relacre, 2000):

- Métodos Normalizados: Este tipo de métodos de ensaio seguem uma norma que é reconhecida pela comunidade laboratorial nacional ou internacional;
- Métodos Internos: Referem-se métodos de ensaio que não seguem uma norma de ensaio, no entanto incluem-se métodos adaptados/modificados de conteúdo derivado de normas, mas não as seguindo na íntegra.

Estes métodos de ensaio estão sujeitos a diferentes manipulações pelo que, a acumulação de erros, tanto sistemáticos, como aleatórios, podem alterar o resultado de forma significativa, pelo que, a validação será um processo fundamental, especialmente para laboratórios, quando se pretende obter resultados credíveis e com qualidade (Relacre, 2000).

O método experimental em discussão nesta validação, teve por base a metodologia exposta na ISO 20481:2008, pelo que se trata de um método normalizado. É importante referir que a ISO é a Organização Internacional para a Normalização, que tal como o nome indica, é responsável por expor documentos que descrevam a melhor forma de realizar um determinado tipo de ensaio. Estas normalizações são internacionalmente avaliadas em concordância por vários especialistas internacionais (ISO, n.d.).

Segundo o Guia Relacre (2000) os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de metodologia a aplicar, habitualmente compreendem o estudo e conhecimento dos parâmetros seguintes: gama de trabalho/linearidade, limiares analíticos (de deteção e quantificação), sensibilidade, precisão e exatidão. Para análises qualitativas, o limite de quantificação, a precisão, a exatidão e a linearidade/gama de trabalho não serão importantes, apenas o limite de deteção, a seletividade/especificidade e a robustez serão pontos importantes na validação. No entanto, em análises quantitativas todos os parâmetros mencionados anteriormente serão importantes, no entanto, conforme referido anteriormente, cabe a cada laboratório definir quais os parâmetros a incluir no plano de validação (Relacre, 2000).

Este estudo de validação é realizado para um método normalizado, no entanto, os parâmetros descritos no Guia Relacre para a validação de métodos internos devem ser apresentados e estudados.

1.9.1 Seletividade/Especificidade

A seletividade será o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método, já que algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente podendo coeluir com a substância em estudo (Ribani, M. *et al.*, 2004).

A especificidade ou seletividade é a capacidade de um método identificar e conseguir distinguir um analito em particular, numa mistura complexa sem a interferência de outros componentes. Esta característica vai depender do método utilizado e do tipo de compostos a analisar (Relacre, 2000).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras, habitualmente faz-se uma comparação da matriz sem qualquer substância de interesse, com a mesma matriz, mas desta vez "contaminada" com a substância padrão, isto serve para verificar se nenhum interferente elui no tempo de retenção da substância de interesse (Ribani, M. *et al.*, 2004).

Assume-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar. Pelo que, o estudo de outras substâncias interferentes, eventualmente presentes na amostra é importante e para tal deve ser usado uma amostras complexa (multicompetente) (Relacre, 2000).

Para avaliar as interferências poder-se-á realizar um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. É importante referir

que as amostras devem ser analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade. Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e seletivo) quando na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100% (Relacre, 2000).

1.9.2 Quantificação

1.9.2.1 Curvas de calibração

Para as análises quantitativas, como é o caso do método experimental a desenvolver neste trabalho, é necessário a obtenção de um modelo de calibração adequado que nos relacione a resposta obtida pelo método, com a concentração, ou uma quantidade de substância conhecida (Relacre, 2000). A resposta pode ser demonstrada diretamente com o uso de uma substância padrão (por exemplo, por diluição de uma solução stock) (ICH, 2022).

A calibração processa-se do seguinte modo: são preparadas soluções padrão (com concentrações conhecidas do analito a dosear) que depois são analisadas no equipamento analítico nas mesmas condições em que se irão analisar as amostras em estudo. No final estabelece-se um gráfico de calibração (entre o sinal do equipamento em função da concentração conhecida) e determina-se a concentração do parâmetro nas amostras, com o uso desses dados (Relacre, 2000).

Algumas considerações importantes aquando da construção da curva de calibração: é desejável que esta seja efetuada quando haja uma qualquer análise de amostras, e devem existir critérios para aceitação das curvas de calibração relativos à linearidade e à estabilidade entre calibrações, definidos internamente. Quando não for efetuada a curva de calibração diária, para cada série de amostras, o Laboratório deve definir um processo para verificação da validade da curva usada, face a critérios de aceitação de desvios (ex.: evidenciar a sua estabilidade através de um histórico de curvas de calibração); O branco de calibração (solução com todos os reagentes, com exceção do analito a analisar) é muitas vezes diferente de zero e deve ser incluído na curva de calibração, quando aplicável (Relacre, 2000).

Neste trabalho será usado o método dos mínimos quadrados, no qual o eixo vertical (eixo y) irá representar a resposta instrumental do equipamento e, o eixo horizontal, (eixo x) representará as concentrações dos padrões, uma vez que se assume que os erros associados aos valores de x são desprezáveis face aos de y (Relacre, 2000). Os resultados dos testes devem

ser avaliados por métodos estatísticos apropriados (por exemplo, pelo cálculo da linha de regressão linear). Deste gráfico é obtido o coeficiente de correlação ou coeficiente de determinação (R^2), no qual quando (ICH, 2022; de Lima, L. K. R. *et al.*, 2022):

- $R^2 = 1$: Todos os pontos observados situam-se exatamente sobre a reta de regressão (ajuste perfeito), ou seja, as variações de y são 100% explicadas pela variação dos x 's através da função especificada, não havendo desvios em torno da função estimada;
- $R^2 = 0$: Conclui-se que as variações de y são exclusivamente aleatórias e a introdução das variáveis x 's no modelo não incorporará informação alguma sobre as variações de y , não sendo observada linearidade.

Para o estabelecimento deste tipo de procedimentos é aconselhado o uso mínimo de cinco concentrações padrão (ICH, 2022) e, aconselhados dez pontos distribuídos de igual modo na gama de concentrações (Relacre, 2000). No procedimento experimental em avaliação neste trabalho será realizada uma curva de calibração com padrões stock de cafeína para uma gama de concentrações elevadas (café regular/normal) e baixas (café descafeinado) com o uso de seis pontos de concentrações diferentes.

1.9.2.1.1 Gama de trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior de concentrações, da substância em estudo, usado para avaliar a precisão e exatidão do método (Fernandes, M. D. S., 2016; Ribani, M. *et al.*, 2004).

Segundo o guia relacre quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias, recomendando-se o uso da norma ISO 8466-1.

De acordo com a norma ISO 8466-1, para modelos de calibração lineares, são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações. Sendo que, devem ser analisados, o primeiro e o último padrão em 10 réplicas independentes (Relacre, 2000).

No teste de homogeneidade das variâncias, neste teste são determinadas as variâncias associadas ao primeiro (S_1^2) e último (S_{10}^2) padrão através das equações 1.6 e 1.7 (Relacre, 2000):

1.6

$$S_1^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

Na qual:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

Sendo que: i - o número do padrão; j - o número de repetição efetuadas para cada padrão; \bar{y} - média aritmética dos valores do sinal instrumental; y - valores do sinal instrumental.

As variâncias são estudadas para examinar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho, efetuando-se o cálculo do valor experimental (PG), pelo teste PG (Fernandes, M. D. S., 2016; Relacre, 2000) segundo a equação 1.8:

$$PG = \frac{S_i^2}{S_j^2}$$

Na qual: S_i^2 deverá ser o maior valor de variância calculada e S_j^2 o de menor variância.

Estes valores de PG são depois comparados com valores tabelados da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade e para um intervalo de confiança de 99% (Fernandes, M. D. S., 2016; Relacre, 2000).

Se for verificado que: $PG \leq F$, significa que existem variâncias não significativas e a gama de trabalho está bem ajustada, no caso de $PG > F$ existem diferenças significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas do primeiro e último padrão permitam obter $PG \leq F$ (Relacre, 2000).

1.9.2.1.2 Linearidade

A linearidade pode ser avaliada através da representação gráfica da função juntamente com a concentração do analito, a partir deste é obtida a reta de calibração (do tipo $y = mx + b$) e o coeficiente de correlação (R^2). Este teste de linearidade deve ser bem interpretado, pois os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade (Relacre, 2000).

No método dos mínimos quadrados, os coeficientes m e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($S_{y/x}$) da reta de regressão, este desvio padrão indica a dispersão em torno da curva de calibração e é dado pela fórmula 1.9 (Relacre, 2000) para N-2 graus de liberdade:

24

24

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + m * x_i)]^2}{N - 2}}$$

Na qual: $S_{y/x}$ - desvio padrão residual da reta de regressão; m - declive da reta; b - ordenada na origem; x_i - valores individuais de concentração; y_i - valores individuais do sinal instrumental; N - número de amostras ensaiadas.

Sendo que, a partir do declive (m) e da ordenada na origem (b) da reta de calibração, pode ser determinada a concentração do analito (x_0) na amostra através de **1.10**:

1.10

$$x_0 = \frac{y_0 - m}{b}$$

1.9.2.2 Limiares Analíticos do Método de Ensaio

1.9.2.2.1 Limite de Detecção

De acordo com o guia de validação de métodos analíticos da Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, o limite de deteção é o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato (Relacre, 2000).

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significará a ausência do analito a medir, no entanto pode afirmar-se que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente a estudar será inferior a um certo valor (Relacre, G., 2000).

Para o caso em que o método usado envolve a utilização de uma calibração linear este parâmetro é obtido pela seguinte equação **1.11**:

1.11

$$L. D. = \frac{[3,3 * S_{y/x}]}{m}$$

Na qual: L.D. - limite de deteção; $S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração (ver a equação **1.9**); m - declive da reta.

1.9.2.2.1 Limite de Quantificação

Já o limite de quantificação corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar o analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão com a menor concentração (excluindo o branco). Este limiar,

após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória. Através da passagem, em condições de precisão intermédia, de uma série de padrões internos, cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação é possível avaliar essa exatidão e precisão. O limite de quantificação (L.Q.) é usado frequentemente em relatórios de ensaio, pelo que a sua identificação e quantificação deve ser feita de forma clara (Relacre, G., 2000).

Quantitativamente, o L.Q., para um método que envolve a utilização de uma calibração linear, este é expresso pela equação 1.12 (Relacre, 2000):

1.12

$$L. Q. = \frac{[10 * S_{y/x}]}{m}$$

Onde: $S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração (ver a equação 1.9); m - declive da curva de calibração.

A atualização dos limites (de Detecção e Quantificação) deve ser efetuada sempre que ocorrem alterações de fatores de influência tais como analistas, reagentes, equipamento, ambiente, entre outros; ou sempre que se faz uma nova curva de calibração e, se utilize uma calibração linear, poderá ser feito um estudo ao longo do tempo e adotar como limites analíticos a média aritmética dos limites de deteção e de quantificação de uma série significativa de curvas de calibração, desde que se observe estabilidade nos valores de limiares obtidos.

1.9.2.3 Sensibilidade

A sensibilidade é uma característica que avalia a capacidade de um método distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Assim a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. Se a curva de calibração for linear, a sensibilidade deve ser constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da reta de calibração (Relacre, 2000).

1.9.3 Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É importante salientar que será mais realista estudar preferencialmente a

precisão sobre amostras, para minimizar efeitos de matriz. Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade (Relacre, G., 2000).

1.9.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições de repetibilidade (condições idênticas de medição), ou seja, é a diferença entre dois testes independentes usando o mesmo método experimental, e com material idêntico no mesmo laboratório, por um único operador num curto espaço temporal. Esta não deve exceder os limites de repetibilidade em mais de 5% dos casos, tendo uma repetibilidade de 95% (ISO 20481:2008; Relacre, G., 2000; Ribani, M. *et al.*, 2004).

Na prática aceitam-se resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se $|X_i - X_{i-1}| \leq r$. Caso a amplitude entre dois ensaio seja superior ao limite, dever-se-á, numa primeira fase, fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas, nomeadamente a norma ISO 5725-2 e ISO 5725-6 (Relacre, G., 2000).

Este parâmetro pode ser determinado através de ensaios interlaboratoriais ou a partir de ensaios efetuados no próprio laboratório. Quando é para quantificar a repetibilidade do método no próprio laboratório efetuam-se uma série de medições, superiores a 10 ($n \geq 10$), sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade (Relacre, 2000).

Define-se o limite de repetibilidade (r), para um nível de confiança de 95%, pela equação 1.13 seguinte (Relacre, 2000):

1.13

$$r = 1.96 * \sqrt{2} * S_{ri} = 2,8 * \sqrt{S_{ri}^2}$$

Onde: S_{ri} - desvio padrão de repetibilidade associados aos ensaios considerados.

Se a repetibilidade for determinada por um método interlaboratorial, a estimativa da variação (S_{ri}^2) pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w análises estudadas nas condições de repetibilidade, sendo que para cada nível de concentração i , é dada por 1.14 (Relacre, 2000):

1.14

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) * S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)}$$

Na qual: S_{ri}^2 - variância de repetibilidade associada aos resultados considerados para cada laboratório; S_{wi}^2 - variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório; $(n_{wi} - 1)$ - graus de liberdade da série de análises; p - número de laboratórios participantes.

Também pode ser obtido o coeficiente de Variação de Repetibilidade (CV_r), para cada nível de concentrações, expresso em percentagem e, dado pela fórmula 1.15 (Relacre, 2000):

1.15

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100$$

Onde: S_{ri} - desvio padrão de repetibilidade; e \bar{x} - média dos valores considerados.

Neste estudo a repetibilidade foi determinada por um método intralaboratorial, ou seja, dentro do mesmo laboratório, como tal o desvio padrão de repetibilidade foi calculado do seguinte modo, de acordo com um documento interno do CFPSA (CFPSA, n.d. (1)):

1.16

$$S_{ri} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}$$

Onde: S_{ri} - desvio padrão de repetibilidade/variância da repetibilidade associada aos resultados obtidos; x_i - valores considerados; \bar{x} - média dos valores considerados; n - nº de ensaios.

1.9.3.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes esta é avaliada por meio de um ensaio interlaboratorial, ou seja, para obtenção deste dado faz-se a diferença entre dois testes usando o mesmo método experimental, mas com diferentes equipamentos, operadores, em laboratórios diferentes e/ou em épocas diferentes (ISO 20481:2008; Relacre, G., 2000). De acordo com a ISO 20481:2008, o limite de reprodutibilidade não deve ser exceder os 5% dos casos, para termos uma reprodutibilidade de 95%.

Pelo que este parâmetro determinará o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc. (Ribani, M. *et al.*, 2004).

O limite de reprodutibilidade (R) é avaliado com a seguinte equação 1.17 (Relacre, 2000):

$$R = 1,96 * \sqrt{2} * S_{Ri} = 2,8 * \sqrt{S_{Ri}^2}$$

Onde: S_{ri} - desvio padrão de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório; S_{ri}^2 - variância de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório.

A reprodutibilidade de um método de análise é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais. Assim é enviada uma série de amostras aos laboratórios participantes, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra, o valor da variância associada à reprodutibilidade será calculado através de: $S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2$, sendo a variância da reprodutibilidade a soma da variância interlaboratorial (S_{Li}^2 - variância dos erros sistemáticos) e a variância de repetibilidade (S_{ri}^2 - variância dos erros aleatórios).

Neste estudo a reprodutibilidade foi determinada por um método intralaboratorial pelo que, o desvio padrão de reprodutibilidade foi calculado do seguinte modo, de acordo com um documento interno do CFPSA (CFPSA, n.d. (1)):

1.18

$$S_{Ri} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{(n - 1)}$$

Onde: S_{Ri} - desvio padrão de reprodutibilidade; x_i - valores considerados do operador 1; y_i - valores considerados do operador 2; n - nº de ensaios.

Também pode ser obtido o coeficiente de Variação de Reprodutibilidade (CV_R), expresso em percentagem, é dado pela fórmula 1.19 (Relacre, 2000):

1.19

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \times 100$$

Onde: S_{Ri} - desvio padrão de reprodutibilidade; e \bar{x} - média dos valores considerados.

As duas medidas de dispersão referidas anteriormente representam os extremos da variabilidade de um método de ensaio, sendo a repetibilidade uma medida de variabilidade mínima e, a reprodutibilidade uma medida de variabilidade máxima dos resultados. Entre estas médias extremas, existe uma situação intermédia (Relacre, 2000), que se designa por precisão intermédia, cuja denominação será descrita de seguida.

1.9.3.3 Precisão Intermédia

Dentro do parâmetro da precisão ainda temos a precisão intermédia que se refere à precisão avaliada, sobre a mesma amostra ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar, como por exemplo: o analista, os equipamentos e/ou os dias das análises. Isto para verificar que mesmo variando as condições da análise o método fornecerá os mesmos resultados. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, a mais aconselhável de usar (Fernandes, M. D. S., 2016; Relacre, G., 2000; Ribani, M. *et at.*, 2004).

Dependendo do ensaio e, do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para determinação e controlo desse parâmetro de qualidade, nomeadamente (Relacre, 2000):

- Cartas de Controlo de Amplitudes, que poderão ser aplicadas, entre outras, para réplicas, para duplicados, de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo;
- Através da expressão:

$$Si_0 = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Sendo: Si_0 - desvio padrão de precisão intermédia (ex: se $Si_{(T.O.)}$, significa que o tempo e os operadores foram diferentes); t - nº de amostras ensaiadas; n - nº de ensaios efetuados por amostra; j - nº da amostra (que vai de 1 a t amostras); k - nº do resultado obtido para a amostra j (que vai de 1 a n); y_{jk} - resultado individual (k) para a amostra j de 1 a t ; \bar{y}_j - representa a media aritmética dos resultados da amostra j de 1 a t .

Pelo que, a determinação da precisão intermédia é feita através da recolha de t valores, de n ensaios de amostras ou padrões e, segundo o Guia Relacre, é recomendado que o valor de " $t(n-1)$ " seja, pelo menos, igual a 15 (Relacre, 2000).

1.9.4 Exatidão

A exatidão é o método analítico que define a proximidade dos resultados obtidos, em relação ao valor verdadeiro, refere-se assim, ao parâmetro que verifica quão perto o valor

experimental se encontra do valor teórico ou aceitável. A exatidão é calculada em percentagem de recuperação pela fórmula apresentada em 1.20 (Perez, M. Â. F., 2010).

1.20

$$\text{Exatidão (Recuperação(\%))} = \frac{\text{Valor experimental}}{\text{Valor teórico}} \times 100$$

1.9.5 Robustez

O último parâmetro de validação trata-se da robustez, esta é usada para medir a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando está a ser executado (Relacre, 2000). Segundo Ribani, M. *et al.* (2004) em métodos analíticos com o uso de HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5^\circ \text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento.

Este parâmetro deve ser avaliado numa fase final, quando os restantes parâmetros já se encontrem em análise no processo de validação do método de ensaio (Relacre, 2000).

METODOLOGIA

2.1 CFPSA - Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar

O Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar (CFPSA) (Figura 2.1) foi criado a 24 de julho de 1984 através de um Protocolo celebrado entre o Instituto do Emprego e Formação Profissional, I.P. (IEFP, I.P.) e os seguintes outorgantes de natureza privada (CFPSA, n.d. (4)):

- ACIP – Associação do Comércio e da Indústria de Panificação, Pastelaria e Similares;
- ACCCLO – Associação dos Comerciantes de Carnes do Concelho de Lisboa e Outros;
- AIPAN – Associação dos Industriais de Panificação, Pastelaria e Similares do Norte;
- AHRESP – Associação da Hotelaria, Restauração e Similares de Portugal;
- ARTOGEL – Associação Portuguesa dos Geladeiros Artesanais (extinta em dez/2016);
- SITESE – Sindicato dos Trabalhadores do Setor de Serviços.



CENTRO DE FORMAÇÃO PROFISSIONAL PARA O SECTOR ALIMENTAR

Figura 2.1 - Logotipo do Centro de Formação Profissional para o Sector Alimentar. Fonte: <https://www.cfpsa.pt/>. Acedido a 2 de fevereiro de 2023.

O CFPSA é um organismo dotado de personalidade jurídica de direito público, sem fins lucrativos, com autonomia administrativa e financeira e património próprio, sendo gerido de

forma tripartida entre representantes do IEPF, I.P., associações empresariais e uma associação sindical. Atendendo ao seu Ato de Constituição, o CFPSA é um Centro Protocolar de Gestão Participada, com natureza jurídica de associação pública de carácter misto, público e privado. Tendo sede na Pontinha (Odivelas) e três Delegações: Porto, Coimbra e Albufeira (CFPSA, n.d. (4)).

Todo o trabalho apresentado nesta tese foi desenvolvido na sede do CFPSA da Pontinha, nos Laboratórios de Ensaios Químicos onde está presente o aparelho de HPLC.

Relativamente ao Laboratório de Ensaios (L.E.) este foi criado com o compromisso de garantir um serviço de qualidade na realização de análises a produtos alimentares e que se encontra acreditado pelo IPAC com o Certificado L0165 desde 1996, este garante ao cliente um serviço de Acompanhamento Permanente e de Alerta Rápido em caso de identificação de patogénicos. No L.E. são também realizadas análises microbiológicas a alimentos e superfícies, a água para consumo humano, a detergentes e desinfetantes e igualmente à qualidade do ar (CFPSA, n.d. (6)). Na parte da Química são realizadas prestações de serviços para a determinação do valor calórico, o que inclui análises à humidade, proteína, cloretos, entre outros, para a obtenção da Tabela Nutricional do produto em análise.

Ainda dentro do Laboratório de Ensaios, existe a produção integral de Álcool Gel (Solução Antisséptica de Base Alcoólica), segundo a formulação aprovada e recomendada pela OMS - Organização Mundial da Saúde. Tendo sido este, um dos produtos de Higiene e Segurança, mais necessários para a prevenção da proliferação da pandemia do COVID-19, Figura 2.2 (CFPSA, n.d. (2)).



Figura 2.2 - Fotografia ilustrativa do Álcool gel comercializado no CFPSA. Fonte: CFPSA (n.d. (2)). Acedido a 24 de maio de 2023.

Também existe a produção do produto: Veóleo, Figura 2.3, um teste colorimétrico de rápida utilização, fácil interpretação e com elevada fiabilidade dos resultados, concebido para ser realizado por qualquer operador do setor alimentar, que testa a qualidade de óleos de fritura. Desde a publicação da Portaria 1135/95, que na fritura de géneros alimentícios, as gorduras e óleos alimentares utilizados, não podem apresentar um teor de Compostos Polares Totais superior a 25%. Pelo mesmo Diploma é igualmente proibida a comercialização, por qualquer agente económico, de alimentos em cuja fritura tenham sido utilizados óleos nas condições referidas. Para preservar a Saúde Pública, cumprindo as normas de Higiene e Segurança Alimentar aplicáveis, o CFPSA criou este teste rápido que determina o nível de deterioração de um óleo alimentar utilizado para fritar alimentos (CFPSA, n.d. (3)).



Figura 2.3 - Esquema ilustrativo do teste rápido comercializado no CFPSA, Veóleo. Fonte: CFPSA (n.d. (3)). Acesso a 24 de maio de 2023.

O CFPSA também aposta na formação de profissionais nas diferentes áreas do setor alimentar, nomeadamente o centro QUALIFICA é especializado no aconselhamento e encaminhamento de candidatos para ofertas de educação e formação profissional ou para o processo de Reconhecimento, Validação e Certificação de Competências (RVCC). As saídas profissionais em que o Centro QUALIFICA do CFPSA desenvolve os seus processos de Certificação são as seguintes (CFPSA, n.d. (5)):

- Pasteleiro/a - Padeiro/a
- Técnico/a de Controlo de Qualidade Alimentar
- Operador/a de Preparação e Transformação de Produtos Cárneos
- Técnico/a de Cozinha/Pastelaria
- Empregado/a de Restaurante/Bar
- Cozinheiro/a
- Técnico/a de Restaurante/Bar

Sendo que a parte experimental do curso de Técnico/a de Controlo de Qualidade Alimentar é interligado com o L.E.

Todo o trabalho apresentado nesta tese foi desenvolvido nos laboratórios de análises físico-químicas do CFPSA, no qual se encontra o equipamento de HPLC. Na apresentação da metodologia experimental, como nos resultados e discussão, serão apresentadas duas secções:

1. Na primeira secção toda a metodologia e os resultados obtidos para o método de quantificação da cafeína.
2. Numa segunda secção, apenas na metodologia, o trabalho extra desenvolvido no Centro.

2.2 Metodologia Experimental

A fase inicial do trabalho desenvolvido nesta tese, passou pela familiarização com o equipamento de HPLC, através de corridas cromatográficas de um método desenvolvido por Marquês, A. I. (2015) para a "implementação, otimização e validação de um método analítico de quantificação de ácido benzóico em compotas e doces de fruta" no CFPSA. Foram realizadas várias experiências para a obtenção de curvas de calibração, etc., pelo que toda a metodologia e o trabalho experimental desenvolvido para tal, encontra-se exposto no Apêndice A.

No próximo ponto será apresentada toda a metodologia para a determinação do teor de cafeína em géneros alimentícios.

2.2.1 Método para a quantificação da cafeína

Para o desenvolvimento deste trabalho foi usada a norma ISO 20481:2008 que apresenta um método de referência para determinação do conteúdo de cafeína, com o uso da técnica de HPLC, em café (café verde, café torrado, café solúvel e descafeinado) e produtos contendo café (como chicória e preparados de cappuccino). Neste princípio é indicado que a cafeína será extraída das amostras com água a 90°C e, na presença de óxido de magnésio. Depois ocorre a filtração e o conteúdo em cafeína é determinado por HPLC numa coluna de RP-18, com eluição isocrática com deteção por UV a 272 nm.

2.2.1.1 O aparelho de HPLC

O aparelho de HPLC usado foi o da marca HITACHI High-tech GLOBAL e, encontra-se equipado com um detetor de UV (1410 UV detector), neste trabalho regulado para os 272 nm; uma bomba (1110 Pump) e um forno (1310 Column Oven) (Figura 2.4).

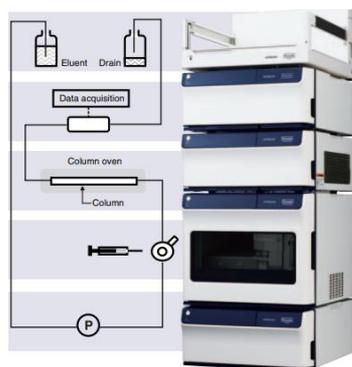


Figura 2.4 - HITACHI Hight-Tech GLOBAL. Fonte: HITACHI, 2012.

2.2.1.2 Software

O aparelho de HPLC usado neste projeto veio instalado com o aparelho e denomina-se de *Primaid System Manager*, "Chromatography Data Station Software (CDS)", é intitulado de intuitivo, de uso fácil e acessível; ótimo para experiências escolares, trabalhos de investigação e uso rotineiro por profissionais de laboratório (HITACHI, 2012).

2.2.1.3 Coluna cromatográfica

A coluna cromatográfica usada foi a Purospher STAR RP-18e da Merck Milipore constituída por uma fase C18 (base de sílica com cadeias alquílicas lineares com 18 carbonos) também conhecida como octadecil (ODS).

2.2.1.4 Fase móvel

Para a fase móvel polar foi usado Metanol próprio para HPLC (MeOH) (HiPerSolv CHROMANORM® ACS da VWR: Chemicals 85681.290) a 24%. Para tal foram transferidos 240 mL de metanol para um frasco volumétrico de 1L, adicionada água para HPLC, até perfazer a marcação. No final a solução foi filtrada por filtro de membrana de 0,45 µm e desgaseificada num banho de ultrassons.

2.2.1.5 Soluções Padrão de Cafeína

2.2.1.5.1 Solução Stock

O Padrão de Cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$; MW - 194,19 g/mol) foi adquirido em anidro puro da SIGMA-ALDRICH (C1778-1VL), deste foram pesadas aproximadamente 0,200 g para um balão volumétrico de 1L. Posteriormente foi adicionada água quente para HPLC até meio do balão, agitou-se a solução para dissolver o padrão de cafeína e, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. No final foi adicionada água para HPLC e a amostra foi guardada a +4°C durante 1

mês num frigorífico. Esta solução correspondia à concentração de 200 mg/L, conforme ilustrado na Figura 2.5.

2.2.1.5.2 Solução Padrão diluída para café normal

Para as amostras padrão de café foi usada a solução Stock de Cafeína, desta foram retirados 50 mL com o auxílio de uma pipeta volumétrica, de escorrimento total, para um balão de 250 mL. Posteriormente foi adicionada água para HPLC, agitou-se e usou-se a amostra diariamente, já que esta deve ser preparada todos os dias em que será utilizada. Esta solução correspondia à concentração de 40 mg/L, conforme ilustrado na Figura 2.6.

Para as restantes soluções padrão, prepararam-se diariamente, realizando-se diluições da solução Stock para atingir a concentração desejada.

2.2.1.5.3 Solução Padrão diluída para descafeinado

Para as amostras padrão de descafeinado foram retirados 5 mL com o auxílio de uma pipeta volumétrica, de escorrimento total, para um balão de 250 mL. Posteriormente foi adicionada água para HPLC, agitou-se e usou-se a amostra diariamente, já que esta deve ser preparada todos os dias em que será utilizada. Esta solução correspondia à concentração de 4 mg/L, conforme ilustrado na Figura 2.6.

2.2.1.6 Preparação das amostras

No procedimento experimental da ISO 20481:2008 é especificado o procedimento de preparação de amostras de café verde e torrado, assim como café solúvel e bebidas em pó. No entanto, como é dispendioso adquirir moinhos de café e café em grão, foi definido que as amostras a analisar seriam apenas de preparados em pó ou cafés solúveis. Já para o procedimento para o chá e bebidas, foi seguido o procedimento de Mariano (2018), que usa uma metodologia semelhante, com MgO para a quantificação de cafeína em bebidas.

2.2.1.6.1 Café Verde e Café Torrado

Para cafés em grão foi necessário triturar as amostras como auxílio de um moinho de café. Posteriormente o café triturado foi selecionado numa peneira de 630 µm. Foram pesadas 1 g das amostras trituradas e transferidas para um balão volumétrico de 250 mL.

2.2.1.6.2 Café Solúvel e bebidas em pó

Não foi necessário fazer qualquer procedimento de moagem. Foram pesadas 0,5 g das amostras e transferidas para um balão volumétrico de 250 mL (Figura 2.7).

2.2.1.6.3 Bebidas

As bebidas gaseificadas foram ao banho de ultrassons para desgaseificar e retirar todo o gás, aquelas que não tinham gás não necessitaram de qualquer preparação prévia. No final foram retirados 20 mL das amostras líquidas para um balão de 100 mL (Figura 2.8).

2.2.1.6.4 Chá

Uma saqueta de chá preto aromatizado com frutos vermelhos (1 saqueta = 1,8 g de chá) foi colocada em 200 mL de água a ferver segundo as instruções da embalagem e deixada em repouso durante 2 a 5 minutos. Dessa amostra foram retirados 50 mL para um balão volumétrico de 100 mL e seguido o passo seguinte da extração para o volume de 100 mL em vez de 250 mL (Figura 2.9).

2.2.1.7 Extração da cafeína

Preparadas as amostras no ponto 2.2.1.5, foram adicionados 5 g de Óxido de Magnésio (MgO de alta pureza da Merck 105867) e 200 mL de água para HPLC nos balões volumétricos de 250 mL anteriormente mencionados (conforme ilustrado na Figura 2.7). Os balões foram colocados num banho de água quente e, posteriormente esperou-se que a solução atingisse os 90°C; continuou-se a aquecer o balão no banho durante 20 min, sendo que a amostra foi agitada e mexida ocasionalmente. No final os balões foram deixados a arrefecer até atingirem a temperatura ambiente, quando o volume de água diminuiu foi adicionada água para perfazer o volume final.

Depois a amostra foi deixada em repouso para os sólidos sedimentarem; algumas amostras sofreram um processo de centrifugação, na Rotofix 32 A da Hettich, durante 10 min na velocidade máxima (40 RPM/RCF×100) por conterem muitas partículas, posteriormente do sobrenadante, foi retirada uma alíquota e filtrou-se com a membrana de 0,45 µm e os primeiros mililitros foram descartados (conforme ilustrado na Figura 2.10). Após este passo as amostras ficaram prontas para a leitura no aparelho de HPLC.

2.2.1.8 Parâmetros da análise por HPLC

Ligou-se o aparelho de HPLC e esperou-se que a linha de base adquirisse estabilidade, ou seja, que o fluxo da fase móvel e a pressão ficasse constante, deixando o aparelho em

funcionamento sem qualquer amostra durante cerca de 20 min. O aparelho foi colocado em funcionamento com as características expressas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Parâmetros para a corrida cromatográfica na deteção de cafeína em diferentes géneros alimentares.

Parâmetros	Condições
Modo de separação	Fase reversa
Composição Fase móvel	Metanol (24%)
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda de deteção	272 nm
Temperatura do forno da coluna	25°C
Temperatura das amostras	25°C
Tempo de corrida	20 min

2.2.1.9 Construção da reta de calibração

Com base nas indicações fornecidas pela ISO 20481, para a construção da reta de calibração devem ser criadas duas retas, em função das gamas de concentração:

- Reta para gama de compostos com café normal com os limites sugeridos entre 5 mg/L a 25 mg/L;
- Reta para gama de compostos com café descafeinado com os limites sugeridos entre 0,5 mg/L a 2,5 mg/L.

No entanto quando foram analisadas amostras de chá preto e café os valores da reta da gama alta caíram fora da curva, pelo que foi necessária ajustar o seu máximo de 25 mg/L para 200 mg/L, numa fase inicial.

2.2.1.10 Esquema representativo do procedimento experimental

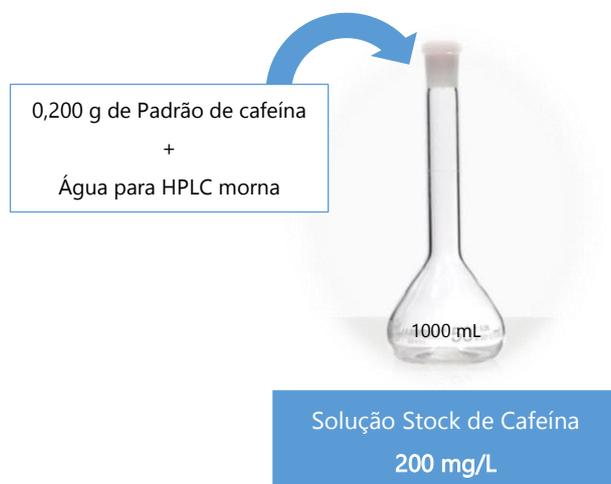


Figura 2.5 - Esquema representativo da preparação da amostra stock de cafeína.

2.2.1.10.1 Soluções Padrão de Cafeína

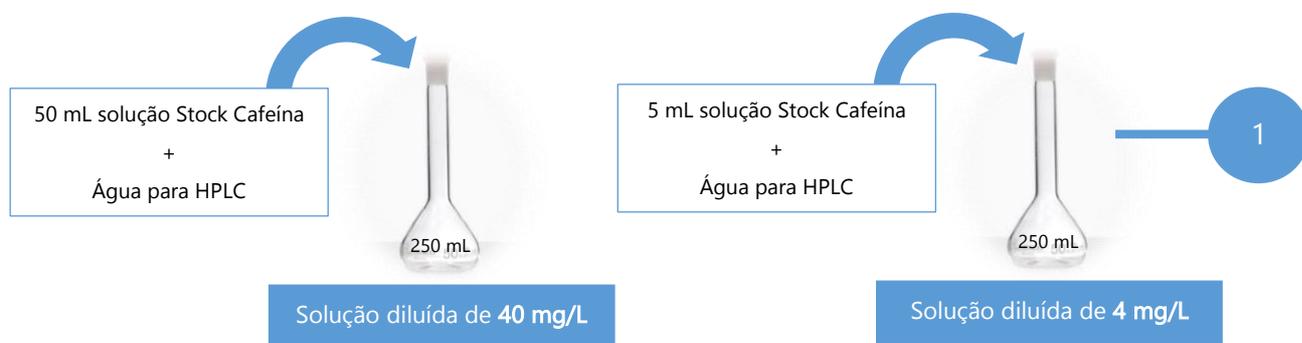


Figura 2.6 - Esquema representativo da preparação de algumas das amostras padrão para a cafeína. Continuação do processo no ponto 2.2.1.10.3.

2.2.1.10.2 Amostras

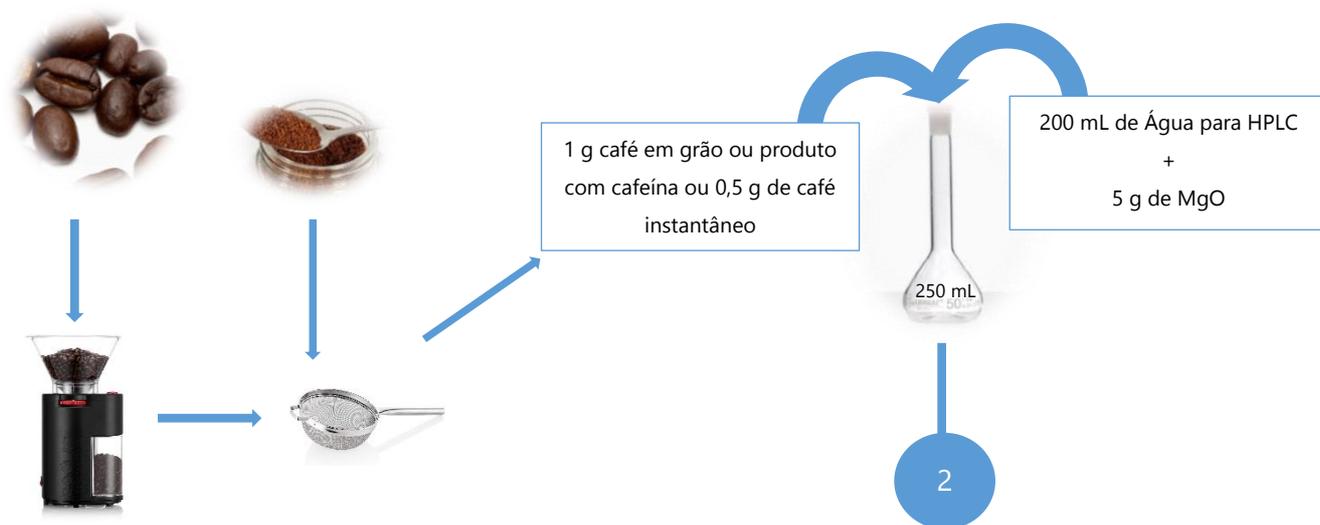


Figura 2.7 - Esquema representativo da preparação das amostras sólidas para quantificação por HPLC de acordo com ISO 20481:2008. Continuação do processo no ponto 2.2.1.10.3.

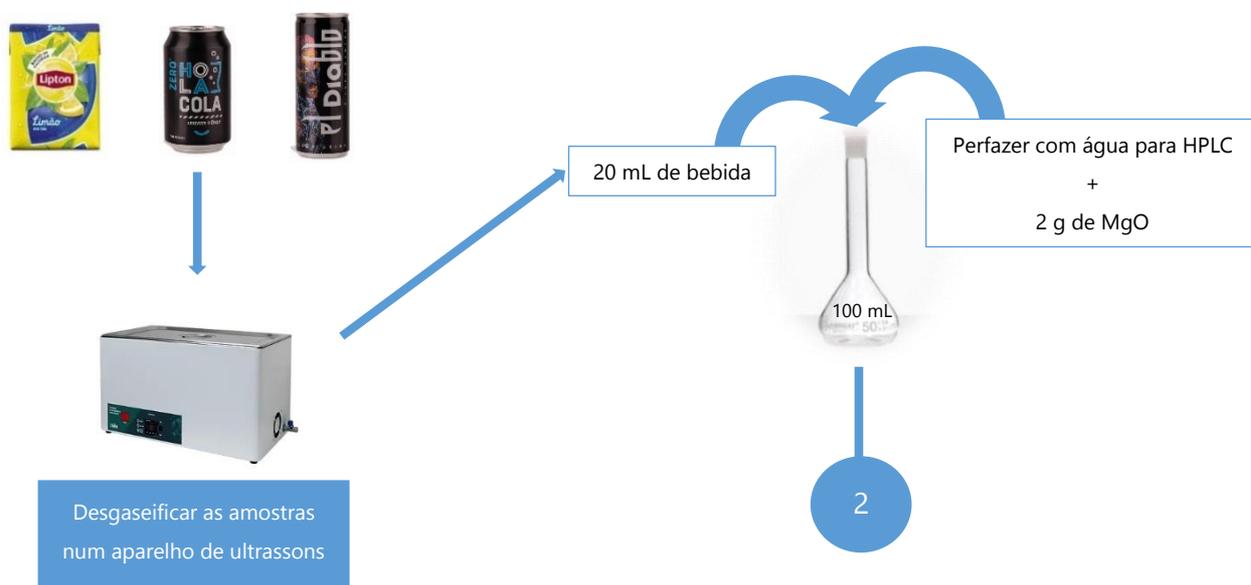


Figura 2.8 - Esquema representativo da preparação das amostras de bebidas para quantificação por HPLC. Continuação do processo no ponto 2.2.1.10.3.



Figura 2.9 - Esquema representativo da preparação da amostra de chá preto para quantificação por HPLC. Continuação do processo no ponto 2.2.1.10.3.

2.2.1.10.3 Quantificação do teor em Cafeína por HPLC

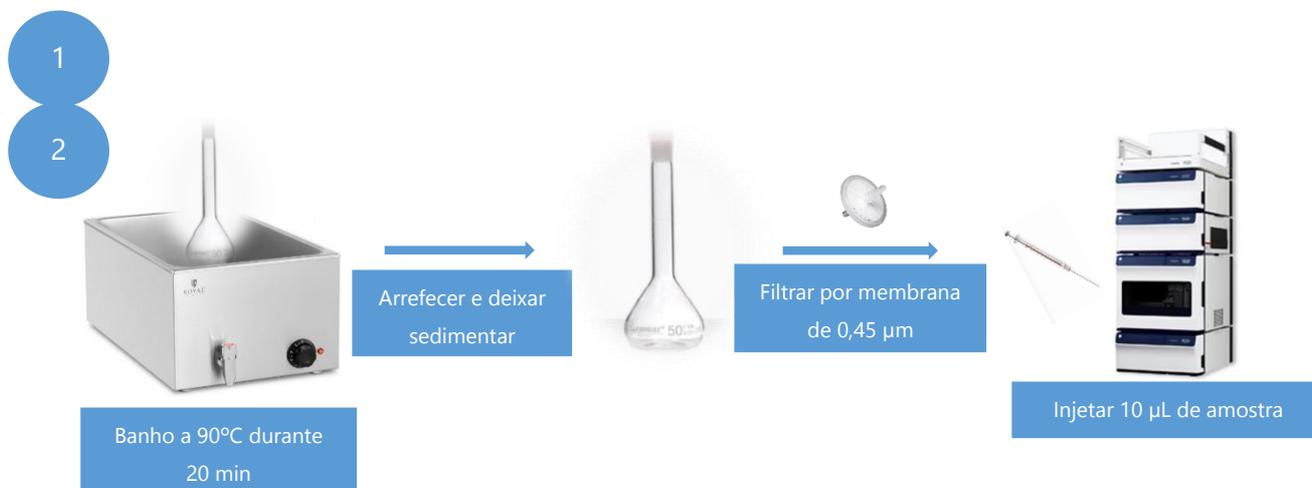


Figura 2.10 - Esquema representativo da preparação das diferentes soluções para quantificação dos teores de cafeína por HPLC.

2.3 Análises extra, fora do âmbito do trabalho para a tese

Ainda nos laboratórios do CFPSA foram realizadas diversas análises, fora do âmbito da acreditação, mas dentro da prestação de serviços, nomeadamente, quantificação do teor de Humidade (NP 1614 e NP 2966) a 35 amostras; determinação do teor de Cloretos (NP 1845), Proteína (NP 1612), Cinza (NP 1615), Açúcares totais (NP 1419) a 10 amostras para

determinação do valor energético ou análise nutricional. Foram realizadas diversas operações gerais de análise química assim como a preparação de soluções para tal. Foi ainda efetuada a determinação da matéria gorda (técnica de Gerber) usando a NP 469 e, o teor de matéria gorda livre pela NP 1224 e a matéria gorda total pela NP 1613.

Foram realizadas análises microbiológicas com o apoio das técnicas do laboratório, nomeadamente na análise a águas, análise de diversas zaragatoas para a determinação de mesófilos, enterecocos, estafilococos, entre outros microrganismos. Foi dado um contributo na preparação de meios de cultura, como: *Plate Count Agar* (PCA), *Baird Parker* (BP), *Agar Rosa de Bengala com Cloranfenicol* (RBC), *Agar Violet Red Bile Dextrose* (VRBD), *Agar triptona de soja* (TSA), entre outros, e, também no isolamento de estirpes de diversos tipos de microrganismos.

Foi dado um contributo também no processo de montagem do Veóleo, um produto produzido nos laboratórios do CFPSA, na Pontinha, sendo este um teste rápido colorimétrico para a avaliação da qualidade dos óleos de fritura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método para a determinação de Cafeína

Visto o objetivo desta tese tratar-se da validação e implementação de um método cromatográfico para a determinação do teor de cafeína em diversos gêneros alimentícios, foi usado o Guia Relacre N°13 como requisitos a ter em consideração nas análises de validação e, para o procedimento experimental foi usada parte da metodologia expressa na ISO 20481:2008 e, em Mariano (2018) conforme expresso no ponto da metodologia.

É importante lembrar que os padrões de cafeína foram preparados diariamente a partir de uma solução stock de 200 mg/L e, que essa solução era alterada de mês a mês já que a norma assim o indicava.

3.1.1 Resultados da Validação do Método

3.1.1.1 Especificidade/Seletividade

Conforme introduzido o parâmetro da especificidade/seletividade era a capacidade de um método identificar um analito em particular, numa mistura complexa sem interferência de outros componentes, o que se verificou ao longo deste trabalho, o pico da cafeína era distinguível de qualquer outro interferente, aparecendo isolado (ex: amostra de cappuccino descafeinado expresso na Figura 3.1).

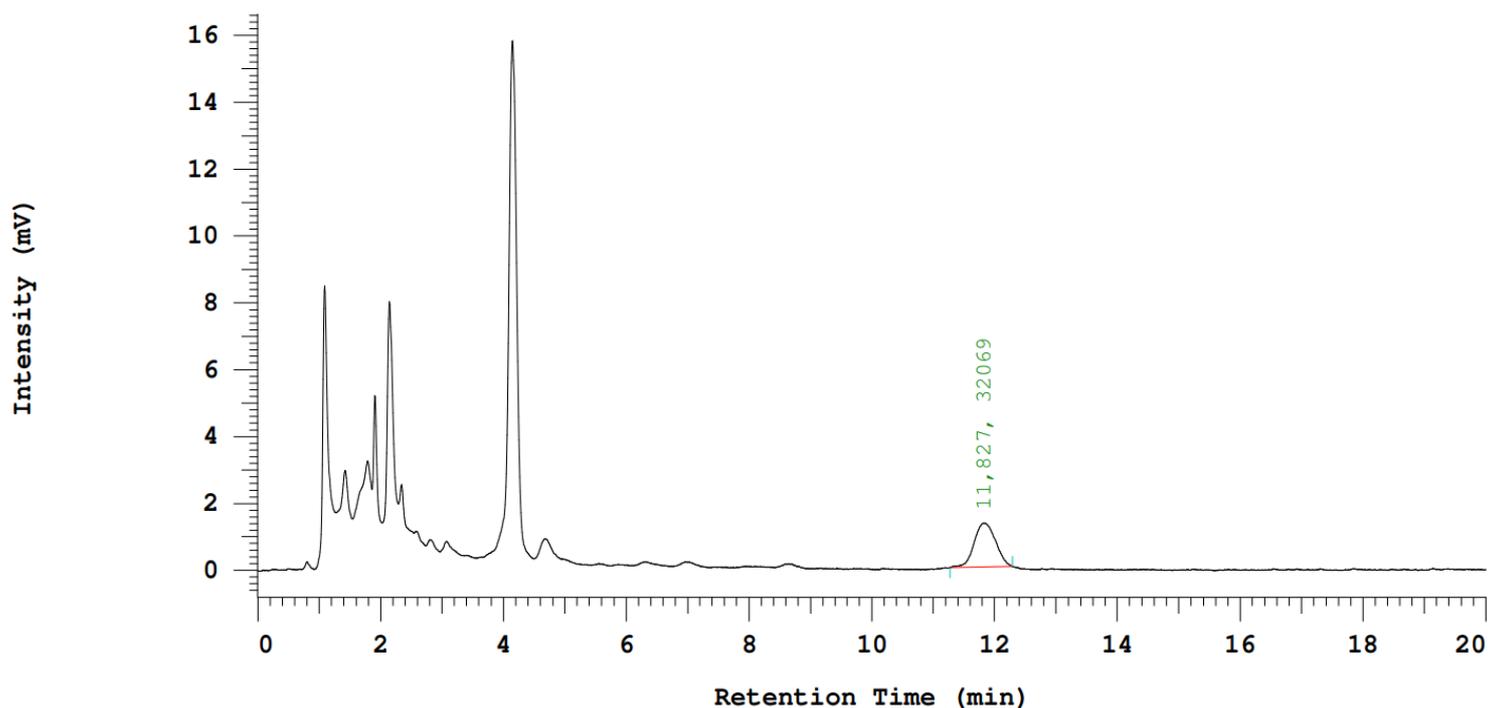


Figura 3.1 - Cromatograma obtido para a amostra de cappuccino descafeinado, com o pico de cafeína identificado sem a interferência de outros componentes, com $t_r=11,827$.

3.1.1.2 Quantificação

3.1.1.2.1 Linearidade/Curvas de calibração, Limites de Detecção e Quantificação e Sensibilidade

Para o estudo da linearidade foram construídas duas retas de calibração, uma para a gama de trabalho alta e outra para a gama baixa. A norma ISO 20481:2008 sugere que a gama alta esteja compreendida entre os 5 e os 25 mg/L e, a gama baixa nos 0,5 a 2,5 mg/L. No entanto, verificou-se experimentalmente que algumas amostras analisadas saiam fora do intervalo proposto, de 5 a 25 mg/L, como tal a gama de concentrações alta foi estendida dos 5 aos 160 mg/L, já que segundo Huber, L. (2007) a gama de concentrações deve abranger o intervalo de 80 a 120% da concentração esperada na amostra ou amostras onde o método será utilizado.

Sendo assim, foram desenvolvidos os seguintes padrões para a alta gama:

- 0 mg/L
- 5 mg/L
- 10 mg/L

- 20 mg/L
- 40 mg/L
- 80 mg/L
- 160 mg/L
- 200 mg/L

Estes padrões foram obtidos a partir do padrão de 200 mg/L, que continham aproximadamente 200 mg de padrão de cafeína. É importante referir que numa fase inicial o padrão de 200 mg/L foi tido em consideração como o padrão mais elevado e, depois dos resultados obtidos para o teste de homogeneidade este foi substituído pelo de 160 mg/L.

Através da análise destes padrões no equipamento de HPLC, segundo as condições cromatográficas expressas na Tabela 2.1, foram obtidos os resultados presentes na Tabela 3.1:

Tabela 3.1 - Resultados obtidos para o sinal dado pelo equipamento de HPLC para os respetivos padrões de cafeína da gama alta (com a concentração conhecida de 5, 10, 20, 40, 80 e 160 mg/L), com a apresentação do seu tempo de retenção e respetivos limites de quantificação e deteção.

Data da Análise	Padrão	Área	Concentração cafeína (mg/L)	tr
04/07/2023	5	170446	4,6028	11,780
04/07/2023	10	412593	10,3260	11,767
04/07/2023	20	811377	19,7513	11,720
04/07/2023	40	1635744	39,2353	11,700
04/07/2023	80	3434908	81,7586	11,680
04/07/2023	160	6717955	159,3537	11,633

Obtidos estes dados, foi possível representá-los graficamente na Figura 3.2.

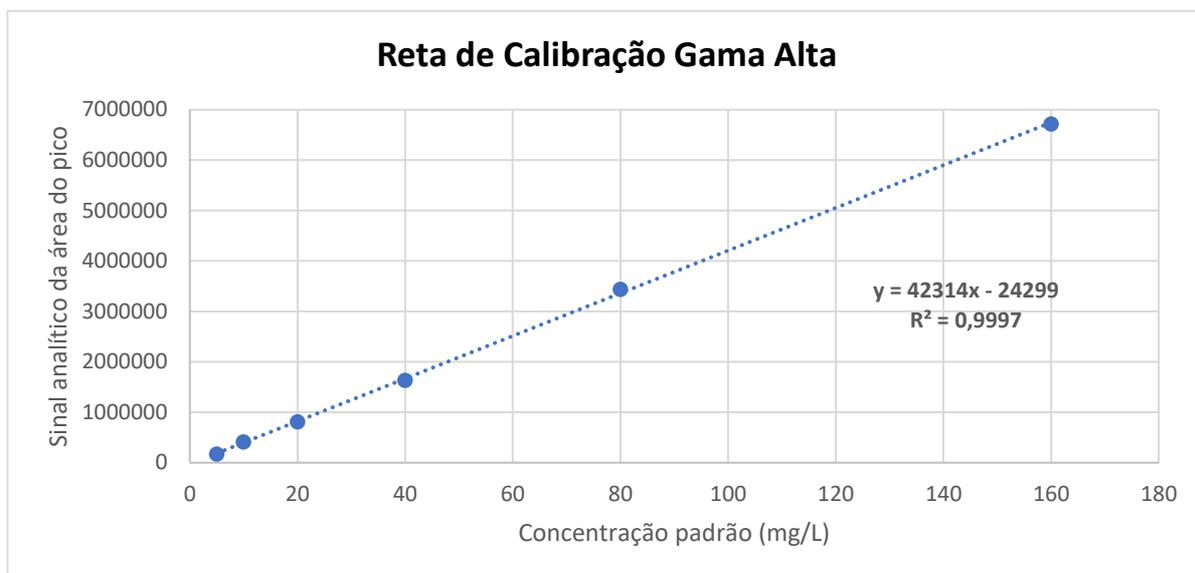


Figura 3.2 - Representação esquemática da reta de calibração ($y = 42314x - 24299$) para a gama de concentrações elevadas, entre 5 e 160 mg/L.

A representação gráfica permitiu obter a reta de calibração seguinte:

3.1

$$[\text{Área pico}] = 42314 [C_{\text{amostra}}] - 24299$$

A sensibilidade foi então determinada pelo declive da reta, sendo esta igual a: 42314.

Segundo o guia relacre (2000), em análise química, dependendo dos critérios internos do laboratório e do próprio método analítico, as curvas de calibração, geralmente, devem ter valores de coeficiente de correlação superiores a 0,995 para ser considerada uma boa análise. Como se pode observar na Figura 3.2, obteve-se um coeficiente de correlação de 0,999, sendo superior a 0,995 e, indicando uma boa correlação entre os resultados.

Já para a gama baixa de concentrações foram desenvolvidos quatro padrões dentro da gama sugerida na norma:

- 0,5 mg/L
- 1 mg/L
- 2 mg/L
- 2,5 mg/L

Para esta gama foram obtidos os resultados expressos na Tabela 3.2:

Tabela 3.2 - Resultados obtidos para o sinal dado pelo equipamento de HPLC para os respectivos padrões de cafeína da gama baixa (com a concentração conhecida de 0,5; 1; 2 e 2,5 mg/L), com a apresentação do seu tempo de retenção e respetivos limites de quantificação e deteção.

Data da Análise	Padrão	Área	Concentração cafeína (mg/L)	tr
27/02/2023	0,5	15847	0,53	12,853
27/02/2023	1,0	31305	0,95	12,780
27/02/2023	2,0	70930	2,03	12,687
27/02/2023	2,5	88116	2,49	12,673
Limite de Quantificação (mg/L)			0,455	
Limite de Deteção (mg/L)			0,150	

E tal como na gama de trabalho alta, os dados foram expressos posteriormente no gráfico da Figura 3.3.

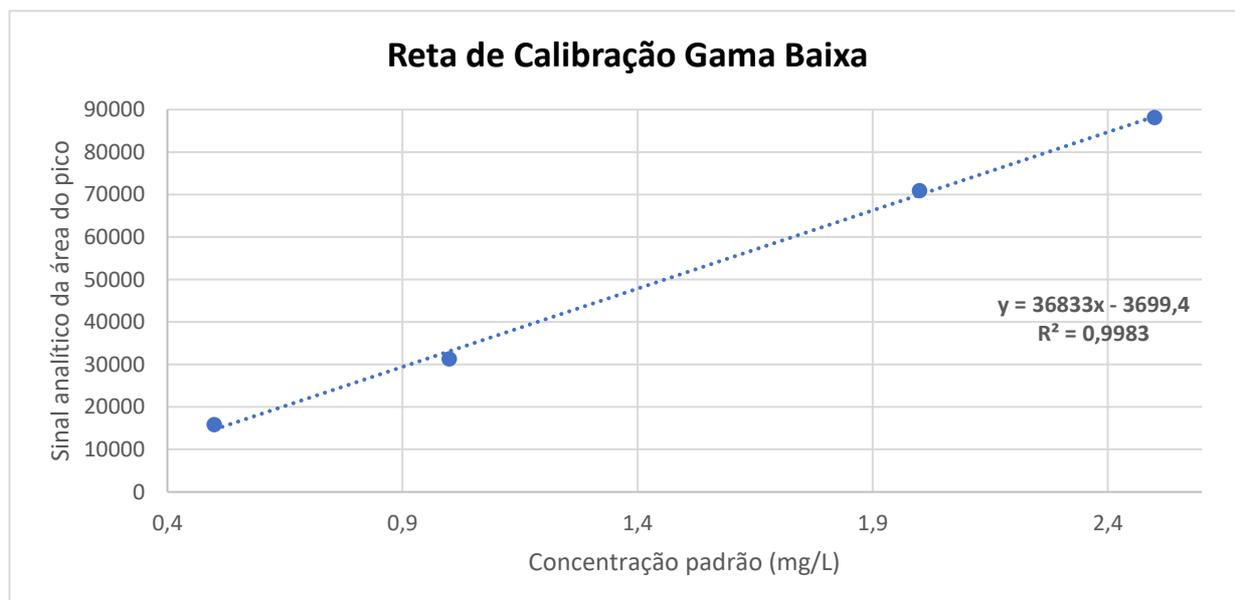


Figura 3.3 - Representação esquemática dos valores obtidos nos cromatogramas para os padrões da gama baixa de cafeína e a respetiva apresentação da reta de calibração ($y = 36833x - 3699,4$).

Tendo sido obtida a equação seguinte:

3.2

$$[\text{Área pico}] = 36833 [C_{\text{amostra}}] - 3699,4$$

A partir desta foi possível concluir que a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual a 36833.

Ambas as figuras demonstraram que era possível obter a linearidade nos resultados, no entanto para verificar se a gama de trabalho era adequada foi realizado o teste de

homogeneidade para determinar a existência de diferenças de variâncias significativas. Relativamente à linearidade em si, de acordo com a obtenção dos resultados positivos e do coeficiente de correlação (R^2) ter dado valores satisfatórios, concluiu-se que esta metodologia foi eficaz na obtenção de uma correlação entre os resultados obtidos e a concentração para os padrões de cafeína.

Relativamente aos limites, foi obtido LD = 0,150 mg/L e LQ = 0,455 mg/L, verificando-se que o limite de deteção, tal como foi introduzido, se encontrava abaixo do padrão mais baixo usado, o de 0,5 mg/L.

Linearidade/Gama de trabalho

Conforme apresentado anteriormente verificou-se que o valor de R^2 era satisfatório e que se encontrava compreendido nos valores pretendidos para apresentar uma forte correlação. No entanto, esses resultados só nos dão a correlação entre a concentração e os resultados obtidos, mas não garantias de resultados satisfatórios em termos de linearidade, como tal essa deverá ser avaliada por outra metodologia (Harris D. C., 2007). Pelo que, na fase seguinte foi verificada se a gama de trabalho usada seria adequada, procedendo-se à realização do teste de homogeneidade para os padrões extremos da reta de calibração, o padrão 200 e o padrão 5 mg/L, através da passagem consecutiva de 10 repetições.

Os resultados obtidos para o teste de homogeneidade encontram-se expressos no Apêndice A, na Tabela 4.3. Observa-se nessa tabela que o valor do teste PG obtido foi 6,90 (através do uso das equações 1.6 e 1.8, descritas na introdução na secção da validação de métodos). Esse valor foi comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, ao nível de confiança de 99%, e com n-1 graus de liberdade (neste caso 9), sendo o valor tabelado 5,35 (valor retirado da Tabela 4.6 do Apêndice A). Como tal pode concluir-se que $PG > F$, pelo que, de acordo com o Guia Relacre, conclui-se que as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao 1º e último padrão permitam obter $PG \leq F$, pelo que a gama de concentrações alta foi reduzida para o padrão seguinte, 160 mg/L.

Procedeu-se à realização do teste de homogeneidade para o padrão 160 mg/L, estando apresentados os resultados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Teste de homogeneidade aos padrões da gama alta, 160mg/L e 5mg/L, com a respetiva média de áreas, tempo de retenção (tr) e concentração em mg/L (a partir da equação $y = 35439x + 9824,5$); variâncias associadas ao primeiro (S_1^2) e último (S_{10}^2) padrão e o respetivo valor de PG e o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher.

Nº réplica	Padrão 160 mg/L			Padrão 5 mg/L		
	Área	tr	Concentração (mg/L)	Área	tr	Concentração (mg/L)
1	6640237	13,527	187,09	218671	13,920	5,89
2	6263734	13,527	176,47	185033	13,933	4,94
3	6420727	13,647	180,90	193613	13,960	5,19
4	6498058	13,740	183,08	192507	14,033	5,15
5	6538951	13,700	184,24	203758	14,087	5,47
6	6687521	13,687	188,43	189312	14,020	5,06
7	6596853	13,640	185,87	175888	13,947	4,69
8	6485870	13,580	182,74	168386	13,647	4,47
9	6408204	13,793	180,55	197661	13,607	5,30
10	6706677	13,807	188,97	481437	13,573	13,31
Média	6524683,20	13,66	183,83	220626,60	13,87	5,95
S ²	15,31			6,84		
PG	2,24					
F	5,35					

Observou-se que a reta de calibração estaria ajustada corretamente, e sem variâncias significativas, com o padrão de 160 mg/L, pelo que a gama de concentrações elevadas foi diminuída dos 200 mg/L para os 160 mg/L, já que se obteve $PG \leq F$, neste caso $2,24 \leq 5,35$. É de notar que os valores das concentrações encontram-se ligeiramente acima dos expectável, nomeadamente na repetição 10 do padrão 5, no entanto como os resultados foram satisfatórios o valor não foi descartado.

O mesmo teste de homogeneidade foi também realizado para a gama de trabalho baixa e verificou-se, através dos dados apresentados na Tabela 3.4, que a diferença entre as variâncias relativas do padrão de 0,5 mg/L e o padrão de 2,5 mg/L permitiram obter $PG \leq F$, já que foi obtido $5,06 \leq 5,35$.

Tabela 3.4 - Teste de homogeneidade aos padrões da gama baixa 2,5mg/L e 0,5 mg/L, com a respetiva média de áreas, tempo de retenção (tr) e concentração em mg/L (a partir da equação apresentada em 3.2); variâncias associadas ao primeiro (S_1^2) e último (S_{10}^2) padrão e o respetivo valor de PG e o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher.

Nº réplica	Padrão 2,5 mg/L			Padrão 0,5 mg/L		
	Área	tr	Concentração (mg/L)	Área	tr	Concentração (mg/L)
1	103146	13,767	2,90	15762	13,113	0,53
2	92937	13,700	2,62	12440	13,213	0,44
3	101814	13,753	2,86	11722	13,293	0,42
4	99490	13,700	2,80	16540	13,213	0,55
5	102376	13,887	2,88	19562	13,280	0,63
6	86473	13,820	2,45	26734	13,340	0,83
7	126040	14,060	3,44	15830	13,387	0,53
8	93923	14,033	2,65	15950	13,400	0,53
9	93339	13,927	2,63	12151	13,427	0,43
10	95123	13,720	2,68	15341	13,533	0,52
Média	99166,10	13,84	2,79	15203,20	13,32	0,54
S ²	0,072			0,014		
PG	5,06					
F	5,35					

3.1.1.3 Precisão

Relativamente ao estudo da precisão, na norma ISO 20481:2008 é apresentada uma tabela de um estudo interlaboratorial (o qual contou com a presença de 16 laboratórios) sobre limites de repetibilidade e reprodutibilidade, na validação do teor de cafeína em produtos com café. Esses dados encontram-se expostos na Tabela 3.5. e, para o café são apresentados valores para dois tipos de cafés solúveis: café liofilizado e café aglomerado.

Para os ensaios de precisão foi usado experimentalmente a amostra de café instantâneo de uma marca branca (Figura 3.4), este produto não apresentava na sua rotulagem qualquer tipo de informação sobre o processo de secagem, mas dadas as características visíveis foi considerado que se trataria de um café aglomerado, portanto para comparação com os resultados obtidos experimentalmente, foram usados os dados do teste interlaboratorial ao café solúvel aglomerado.

Tabela 3.5 - Dados do teste interlaboratorial de precisão para a determinação de cafeína em café liofilizado e café aglomerado. Fonte: ISO 20481:2008.

Parâmetro	Café Solúvel	
	Liofilizado (Regular Freeze Dried)	Aglomerado (Regular Agglomerated)
Nº de laboratórios participantes	16	16
Média %(m/m)	2,21	3,19
Desvio Padrão de Repetibilidade, s_r	0,018	0,030
Limite de Repetibilidade, $r = 2,8 \times s_r$	0,050	0,085
Coefficiente de variação de repetibilidade (CV) %	0,7	1,0
Desvio Padrão de Reprodutibilidade, s_R	0,083	0,133
Limite de Reprodutibilidade, $R = 2,8 \times s_R$	0,23	0,372
Coefficiente de variação de reprodutibilidade (CV) %	3,3	4,2

3.1.1.3.1 Repetibilidade

Para começar o estudo da precisão foi realizado o teste de repetibilidade, seguindo as indicações fornecidas na norma, a qual indicava: usando a mesma metodologia, num único laboratório, num curto espaço de tempo, realizando-se a análise por um só operador (ISO 20481:2008), e segundo o Guia Relacre (2000) devem ser realizadas 10 injeções da mesma amostra sucessivamente.

É importante referir que se verificou que o primeiro teste de repetibilidade realizado não permitiu obter os resultados pretendidos, tendo-se verificado instabilidade na concentração do teor de cafeína nas análises realizadas, como tal foram realizados diversos procedimentos experimentais, até que se concluiu que a forma mais eficaz seria realizar lavagens sucessivas com água (na microseringa) entre as injeções da mesma amostra. Se após este passo, os resultados continuassem instáveis verificou-se que uma pequena lavagem de 10 minutos entre as injeções, ajudava a eliminar alguns resíduos de cafeína retidos na coluna cromatográfica. Após este procedimento foram obtidos os valores presentes na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Estudo da Repetibilidade para a amostra de Café Solúvel (para n=10), com obtenção da média do teor de cafeína em %(m/m) e respectivos: desvio padrão de repetibilidade (s_r), limite de repetibilidade (r) e coeficiente de variação da repetibilidade (CV_r). Sendo as observações efetuadas no dia 06/07/2023. As concentrações em mg/L, foram determinadas com a reta do dia 04/07/2023: $y = 42314x - 24299$ e, para a determinação de Wc (g/100g): as concentrações e áreas dos padrões usados no dia, de acordo com a equação 3.3.

Café Solúvel	Área	[mg/L]	Wc (g/100g)	Diferença de Wc com Média em valor absoluto
1	2697289	64,325	3,032	0,034
2	2775563	66,175	3,120	0,054
3	2783070	66,352	3,129	0,062
4	2672501	63,739	3,004	0,062
5	2738958	65,310	3,079	0,013
6	2675403	63,808	3,008	0,059
7	2783020	66,351	3,129	0,062
8	2814721	67,100	3,164	0,098
9	2669215	63,661	3,001	0,066
10	2720460	64,873	3,058	0,008
Média	-	-	3,073	0,052
s_r				0,030
r				0,083
CV_r				0,969

3.1.1.3.2 Reprodutibilidade

Já a reprodutibilidade foi avaliada, usando a mesma metodologia, 10 injeções da mesma amostra, no mesmo laboratório, num curto espaço de tempo, no entanto a análise terá sido realizada por dois operadores diferentes. Na norma é sugerido que a reprodutibilidade seja realizada usando o mesmo procedimento em laboratórios diferentes, com diferentes operadores e, equipamento diferentes. No entanto, uma vez que um dos objetivos deste trabalho é a implementação e validação do método no CFPSA, um ensaio interlaboratorial não será de toda a primeira prioridade e, uma vez que no laboratório de química atualmente existe apenas 1 equipamento de HPLC, os testes são determinativos para esse mesmo e, como tal, não é de interesse prioritário analisar a reprodutibilidade noutro equipamento. Os resultados para este teste encontram-se na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Estudo da Reprodutibilidade para a amostra de Café Solúvel (para n=10), com obtenção da média do teor de cafeína em %(m/m) e respetivos: desvio padrão de reprodutibilidade (s_R), limite de reprodutibilidade (R) e coeficiente de variação da reprodutibilidade (CV_R). Sendo as observações efetuadas no dia 04/07/2023 e 05/07/2023. As concentrações, em mg/L, foram determinadas com a reta do dia 04/07/2023: $y = 42314x - 24299$ e, para a determinação de Wc (g/100g): as concentrações e áreas dos padrões usados no dia, de acordo com a equação 3.3.

Café Solúvel		Área	[mg/L]	Wc (g/100g)	Diferença de Wc (Operador 1 - Operador 2) em valor absoluto
1	Operador 1	2669215	63,661	3,130	0,119
	Operador 2	2567864	61,266	3,011	
2	Operador 1	2610486	62,273	3,061	0,134
	Operador 2	2724958	64,979	3,195	
3	Operador 1	2518112	60,090	2,953	0,178
	Operador 2	2669657	63,672	3,131	
4	Operador 1	2574612	61,425	3,019	0,012
	Operador 2	2584557	61,661	3,031	
5	Operador 1	2529845	60,367	2,967	0,106
	Operador 2	2620210	62,503	3,073	
6	Operador 1	2720460	64,873	3,190	0,145
	Operador 2	2844278	67,799	3,335	
7	Operador 1	2764328	65,909	3,242	0,030
	Operador 2	2738774	65,305	3,212	
8	Operador 1	2569488	61,304	3,013	0,119
	Operador 2	2670907	63,701	3,132	
9	Operador 1	2804114	66,850	3,288	0,153
	Operador 2	2673558	63,764	3,135	
10	Operador 1	2669023	63,657	3,130	0,092
	Operador 2	2590513	61,801	3,038	
Média		-	-	3,114	0,110
s_R					0,132
R					0,364
CV_R					4,221

Analisando os dados de uma maneira geral e começando com as concentrações médias obtidas para a quantidade de cafeína presente na amostra de Café Solúvel, observou-se que a média de concentrações no ensaio da repetibilidade era 3,073 g/100 g e, no ensaio de reprodutibilidade observou-se que a mesma amostra teria 3,114 g/100 g, o teor de cafeína não terá sido extremamente díspar, no entanto, esta diferença deve-se, ao facto de ter sido operado o

aparelho por pessoas diferentes, o que aumenta a variabilidade dos resultados (tendo sido expectável os valores superiores para a reprodutibilidade), para além disso, o ensaio de repetibilidade e reprodutibilidade, foram realizados em diferentes dias e, conseqüentemente estes fatores serão também influenciadores, já que conforme descrito por Bartlett, J. W., & Frost, C. (2008) a reprodutibilidade vai referir-se à variação nas medições feitas sob condições variáveis (dias, operadores, instrumentos, etc), o que implicará uma variação de resultados superior.

Pode também especular-se que a concentração tenha diminuído devido a fatores como, reações de oxidação, isto porque a amostra terá sido retirada da refrigeração a +4°C (como dita a norma) e deixada a arrefecer até à temperatura ambiente todas as vezes que foi usada nos ensaios. Segundo um estudo de Marques, J. M. S. D. S. (2011), no qual foram estudadas as propriedades que sofrem alterações no processo de envelhecimento de um café torrado comercial, ao longo da sua vida de prateleira, constatou-se que existia um aumento dos teores de humidade no café, enquanto algumas propriedades como a cafeína continuariam aproximadamente constantes, mas o resultado mais marcante foram os efeitos no flavour, com um aumento do chamado sabor a "ranço" e, sendo evidentes os efeitos das reações de oxidação (Ferrão, J., 2009). Pelo que a pequena variação na concentração de cafeína não será, de todo, um problema.

Para facilitar agora a comparação dos limites de repetibilidade e reprodutibilidade obtidos experimentalmente, com os da ISO 20418:2008, foi criada a Tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Comparação dos resultados experimentais com os da ISO 20481:2008 e, apresentação do desvio absoluto dos resultados obtidos experimentalmente, com os presentes na ISO. *Nota: este valor corresponde à média dos valores da repetibilidade e reprodutibilidade em g/100 g.

Parâmetro	Café Solúvel		
	Resultado Experimental de Café solúvel Marca Branca	Café aglomerado ISO 20481:2008	Desvio
Média %(m/m)	3,09*	3,19	0,10
Desvio Padrão de Repetibilidade, s_r	0,030	0,030	0
Limite de Repetibilidade, $r = 2,8 \times s_r$	0,083	0,085	0,002
Coefficiente de variação de repetibilidade (CV) %	1,0	1,0	0
Desvio Padrão de Reprodutibilidade, s_R	0,132	0,133	0,001
Limite de Reprodutibilidade, $R = 2,8 \times s_R$	0,364	0,372	0,008
Coefficiente de variação de reprodutibilidade (CV) %	4,2	4,2	0

Na pág. 6 da ISO 20481:2008, é feito um aviso de que estes valores do teste interlaboratorial (Tabela 3.5), podem não ser aplicados a matrizes e concentrações diferentes, e como se verificou na Tabela 3.8, os dados não foram exatamente iguais, no entanto, alguns foram muito próximos, nomeadamente a média do teor de cafeína, que diferiu em 0,10, sendo que o valor experimental foi 3,09 e o da norma era de 3,19.

Os limites de repetibilidade (calculado com auxílio da equação 1.13), conforme introduzido não deviam exceder os 5%, para que a probabilidade de repetibilidade seja de 95%, observou-se que experimentalmente o limite obtido era de 0,083, ligeiramente inferior ao valor da norma, de 0,085, concluindo-se que não terá sido ultrapassado o valor proposto pela ISO. Observou-se também que o Coeficiente de Variação de repetibilidade experimentalmente foi de aproximadamente 1,0, igual ao valor da norma (1,0). Relativamente à reprodutibilidade, experimentalmente obteve-se um valor de 0,364 para o limite deste parâmetro (calculado com auxílio da equação 1.17), com um desvio de 0,008 relativamente aos 0,372 obtido no ensaio interlaboratorial.

Finalizada a análise a todos os resultados podemos concluir que os resultados obtidos foram ligeiramente inferiores aos apresentados na ISO 20418:2008, o que indica que foram obtidos resultados precisos e, o método poderá assim ser implementado no laboratório de análises físico-químicas do CFPSA. Era expectável a obtenção de valores inferiores aos da norma dado que, nos ensaios interlaboratorial foram tidos em consideração mais fatores de variabilidade, nomeadamente equipamentos e laboratórios diferentes.

3.1.2 Cálculo do conteúdo de cafeína em cada amostra

Depois deste trabalho inicial, de implementação e validação no qual se determinou que os padrões de cafeína usados tinham um correto funcionamento e, que a gama de trabalho estava ajustada no intervalo pretendido para não existir variabilidade, passou-se à quantificação dos teores de cafeína em diferentes géneros alimentícios.

Na ISO 20481:2008 é especificada a realização de análises a café verde, café torrado, cafés solúveis e misturas de bebidas com café. Para facilitar custos de análises, neste trabalho foram selecionadas apenas amostras de café solúvel, misturas de bebidas com café, e ainda formam feitas análises a bebidas com vestígios de cafeína (tais como bebidas energéticas, etc). Sendo assim, foram selecionados os produtos seguintes apresentados na Figura 3.4.



Figura 3.4 - Imagens representativas dos géneros alimentícios analisados e obtidos em supermercado: Chá preto aromatizado com frutos vermelhos da marca Pingo Doce (1); Chicória com café da marca Bellarom (2); Café instantâneo da marca Branca (3); Cappuccino descafeinado da marca Nescafé (4); Ice Tea de limão da marca Lipton (5); Coca-Cola da marca Branca (6); Bebida Energética da marca Branca (7).

De acordo com as informações fornecidas nos rótulos destas embalagens (Tabela 3.9), foi possível realizar uma estimativa das amostras que apresentariam uma maior percentagem de café, estimou-se que seria: Café instantâneo > Chá preto > Chicória e café > Cappuccino descafeinado \cong Bebida energética > Coca-cola > Ice Tea.

Estimou-se que o café solúvel/instantâneo tivesse o teor de cafeína mais elevado, seguido do chá preto já que segundo fontes citadas em Nour, V. et al. (2010) o teor de cafeína relatado nestes géneros alimentícios varia significativamente, para uma chávena de café instantâneo, o conteúdo em cafeína encontrava-se entre 46,7 e 67,6 mg e, para o chá, uma saqueta numa chávena teria entre 30,2 e 67,4 mg de cafeína. Seguiu-se depois a chicória com café por apresentar ainda uma percentagem elevada de café e, de seguida teríamos o cappuccino descafeinado e a bebida energética. Estas duas bebidas poderiam apresentar valores semelhantes tendo em conta que nas bebidas energéticas, dependendo da quantidade de

caféina que é colocada como aromatizante neste tipo de produto refrigerado, podemos ter valores superiores aos de um descafeinado, já que no estudo de Nour, V. *et al.* (2010) observou-se que a bebida energética da marca Mem apresentava um teor de 16,82 mg/100 mL e a bebida energética da Red Bull apresentava 33,45 mg de caféina/100 mL de produto. Já bebidas descafeinadas podiam ter concentrações entre os 38 mg/100 mL e os 879 mg/100 mL, segundo Farahdiba, A. N., *et al.* (2023) e, estas concentrações também poderão variar dependendo da temperatura usada no processo da extração da caféina.

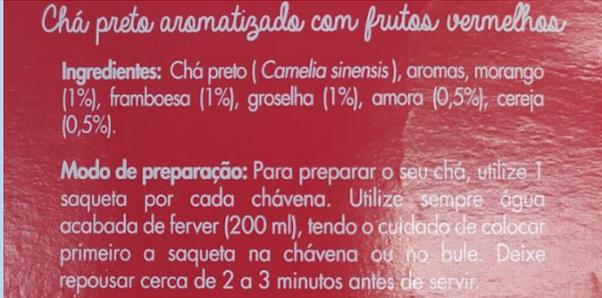
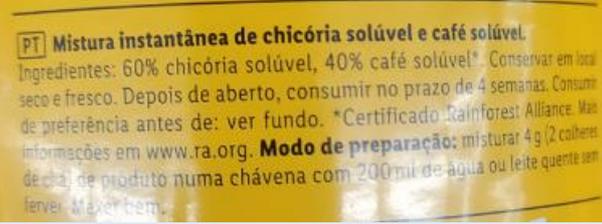
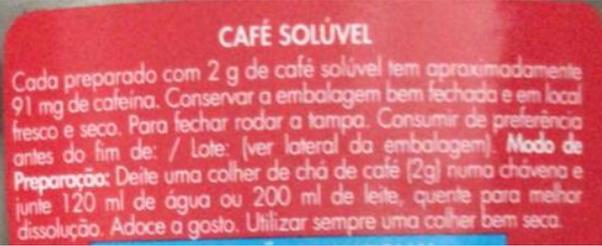
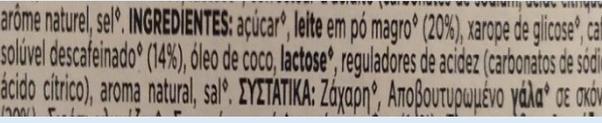
Relativamente à Coca-cola e ao Ice Tea, segundo valores apresentados no site da DECO proteste (Figura 3.5), verificou-se que a Coca-cola teria cerca de 29 mg de caféina/330 mL e o Ice Tea teria 20 mg/330 mL (DECO PROTESTE, 2021).

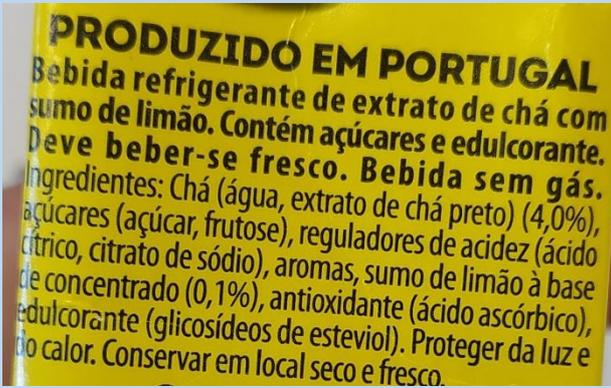
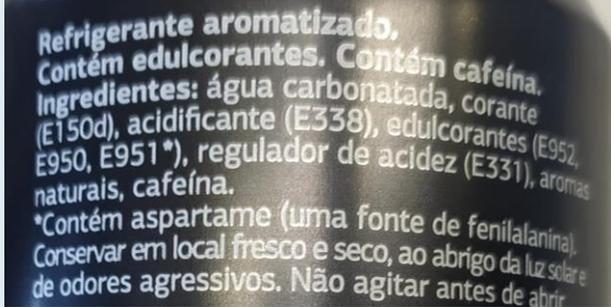
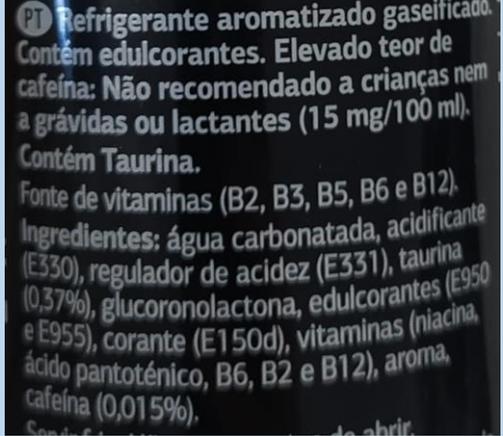
É importante referir que algumas destas referências apresentam valores médios, de estimativas, e não é dito qual a metodologia aplicada para a determinação do teor de caféina nos géneros alimentícios, pelo que se forem consideradas diferentes metodologias, que o HPLC, será provável que se obtenham algumas discrepâncias nos resultados a obter, já que o estudo de Wanyika, H. N., *et al.* (2010) para a determinação dos teores de caféina em chás e cafés, verificou que os teores de caféina obtidos pelo método espectrofotométrico UV/Vis eram superiores aqueles obtidos pelo uso do HPLC.



Figura 3.5 - Teores de caféina em diferentes tipos de géneros alimentícios. Fonte: DECO PROTESTE, 2021. Acedido a 27 de março de 2023.

Tabela 3.9 - Compilação dos rótulos dos diferentes produtos analisados, com indicação da listagem de ingredientes, algumas informações relevantes e as imagens do rótulo.

Produto	Ingredientes	Notas importante do Rótulo	Imagem Rótulo
Chá Preto aromatizado com frutos vermelhos	Chá preto (<i>Camelia sinensis</i>), aromas, morango (1%), framboesa (1%), groselha (1%), amora (0,5%), cereja (0,5%).	Modo de preparação: Utilizar 1 saqueta para 200 mL de água a ferver, deixar repousar durante 2 a 3 minutos antes de servir.	
Mistura instantânea de chicória solúvel e café solúvel	60% chicória solúvel, 40% café solúvel.	Modo de preparação: Misturar 4 g numa chávena com 200 mL de água ou leite quente e mexer bem.	
Café instantâneo	Café solúvel.	Cada preparado com 2g de café solúvel tem aproximadamente 91 mg de cafeína. Modo de preparação: Deite uma colher de chá de café (2g) numa chávena e junte 120 mL de água ou 200 mL de leite quente.	
Cappuccino descafeinado	Açúcar, leite em pó magro (20%), xarope de glicose, café solúvel descafeinado (14%), óleo de coco, lactose, reguladores de acidez (carbonatos de sódio, ácido cítrico), aroma natural, sal.	Modo de preparação: Misturar 1 saqueta para 150 mL de água quente e mexa bem durante 20 segundos.	

<p>Bebida refrigerante de extrato de chá com sumo de limão (Ice Tea)</p>	<p>Chá (água, extrato de chá preto) (4,0%), açúcares (açúcar, frutose), reguladores de acidez (ácido cítrico, citrato de sódio), aromas, sumo de limão à base de concentrado (0,1%), antioxidante (ácido ascórbico), edulcorante (glicosídeos de esteviol).</p>		
<p>Refrigerante aromatizado (Coca-cola)</p>	<p>Água carbonizada, corante (E150d), acidificante (E338), edulcorantes (E952, E950, E951), regulador de acidez (E331), aromas naturais, cafeína.</p>	<p>Contem cafeína.</p>	
<p>Refrigerante aromatizado gaseificado (Bebida energética)</p>	<p>Água carbonatada, acidificante (E330), regulador de acidez (E331), taurina (0,37%), glucoronolactona, edulcorantes (E950 e E955), corante (E150d), vitaminas (niacina, ácido pantoténico, B6, B2 e B12), aroma, cafeína (0,015%).</p>	<p>Elevado teor de cafeína. Não recomendado a crianças, nem a grávidas ou lactantes (15 mg/100 mL). Contem taurina.</p>	

Conforme introduzido, no Regulamento (UE) N.º 1169/2011, bebidas que não sejam chá ou café, se forem destinadas a ser consumidas e contenham cafeína numa porção superior a 150 mg/L, devem apresentar a menção: “Elevado teor de cafeína. Não recomendado a crianças nem a grávidas ou lactantes” e deve constar no mesmo campo visual que a denominação da bebida, seguida de uma referência, entre parênteses e nos termos do artigo 13.º, n.º 1, do presente regulamento, o teor de cafeína expresso em mg por 100 mL, o que se verificou para a rotulagem da bebida energética da marca Dia, que apresentava no rótulo a indicação de 15

mg/100 mL. Ainda o rótulo do café solúvel apresentou também uma estimativa dos teores de cafeína, afirmando que em média, 2 g de amostra contêm 91 mg de cafeína, e como tal este valor também foi tido em consideração na comparação com os resultados experimentais.

Posteriormente à análise da rotulagem as amostras foram tratadas, conforme descrito no procedimento experimental e representado na Figura 3.6, com MgO, tendo-se formado inicialmente um precipitado de óxido de magnésio, e após filtração nos filtros de membrana de 0,45 μm as amostras ficaram prontas para a corrida cromatográfica.

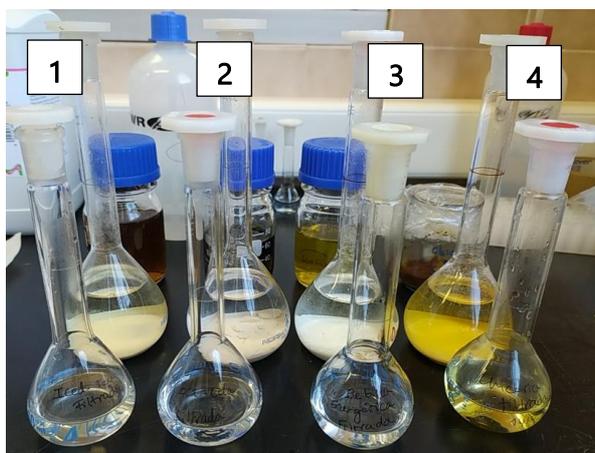


Figura 3.6 - Amostras de bebidas: Ice Tea (1), Coca-Cola (2), Bebida Energética (3) e Chicória com Café (4). No plano mais distante na sua forma original, no meio com o precipitado de óxido de zinco e no plano frontal após a filtração com os filtros de membrana de 0,45 μm .

Analisadas as amostras de géneros alimentícios foram obtidos os cromatogramas de Chá preto, Café e Chicória, Café Solúvel, Cappuccino descafeinado, Ice Tea, Coca-cola e Bebida Energética. Estes cromatogramas estão expostos na Figura 3.7, Figura 3.8, Figura 3.9, Figura 3.10, Figura 3.11, Figura 3.12 e Figura 3.13.

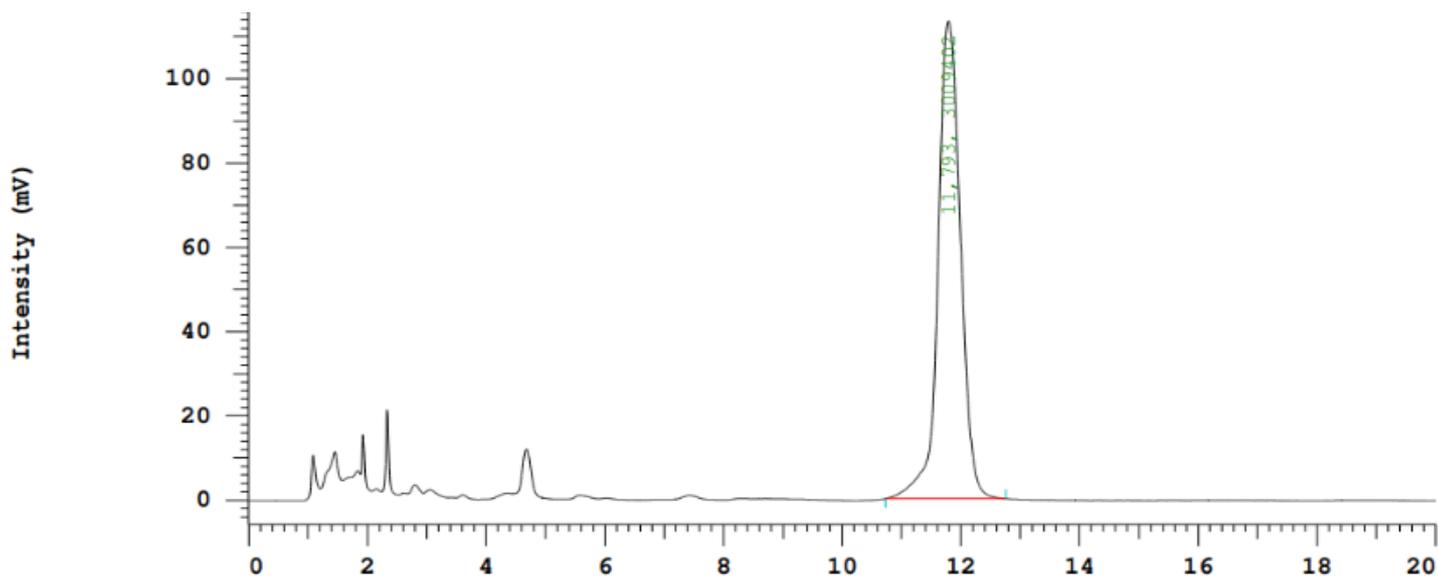


Figura 3.7 - Cromatograma obtido para Chá Preto com $t_r = 11,793$.

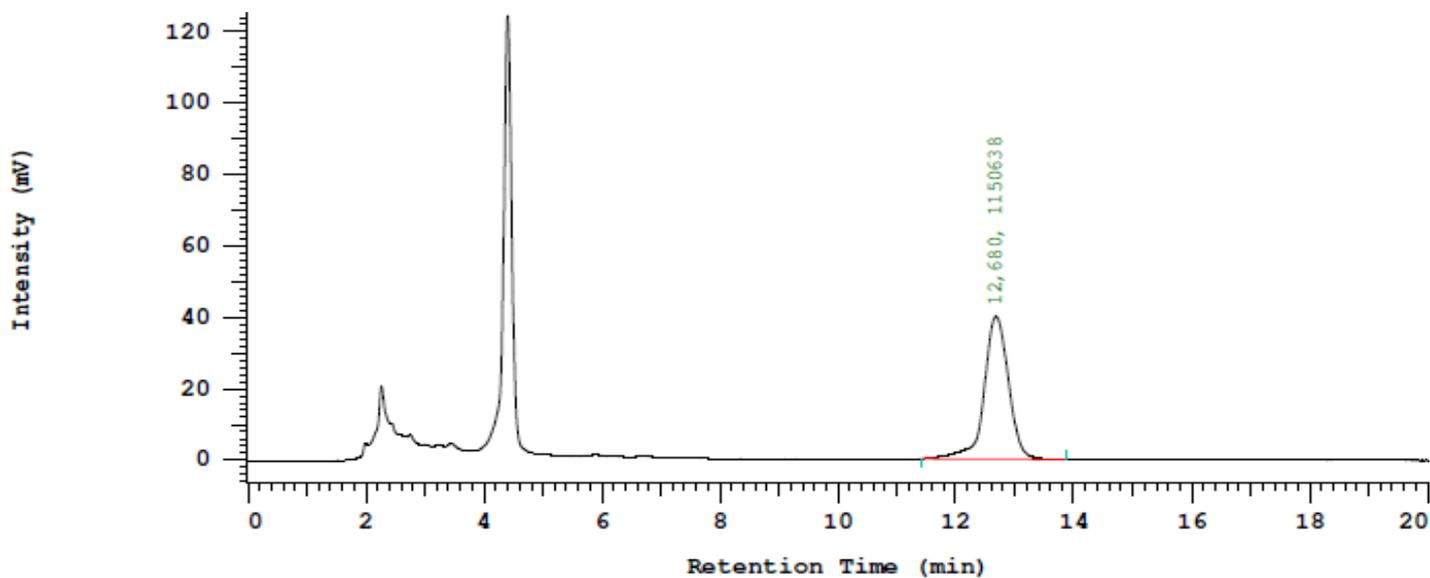


Figura 3.8 - Cromatograma obtido para Chicória e Café com $t_r = 12,680$.

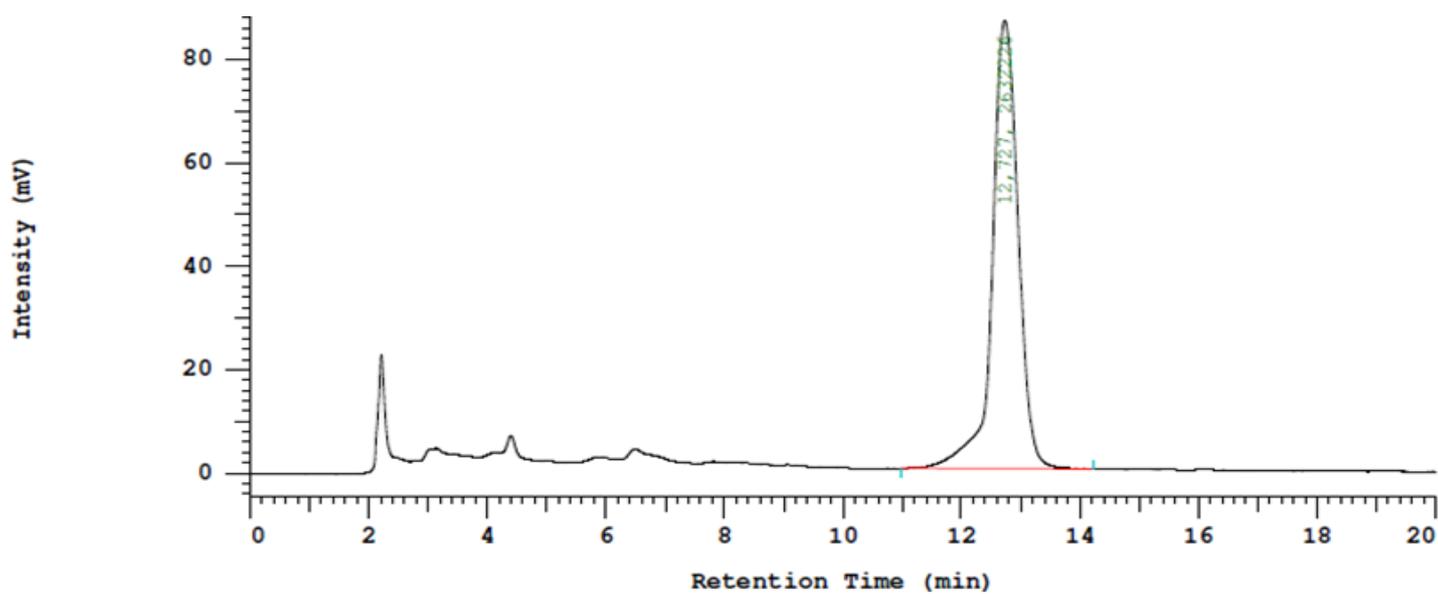


Figura 3.9 - Cromatograma obtido para Café solúvel com $t_r = 12,727$.

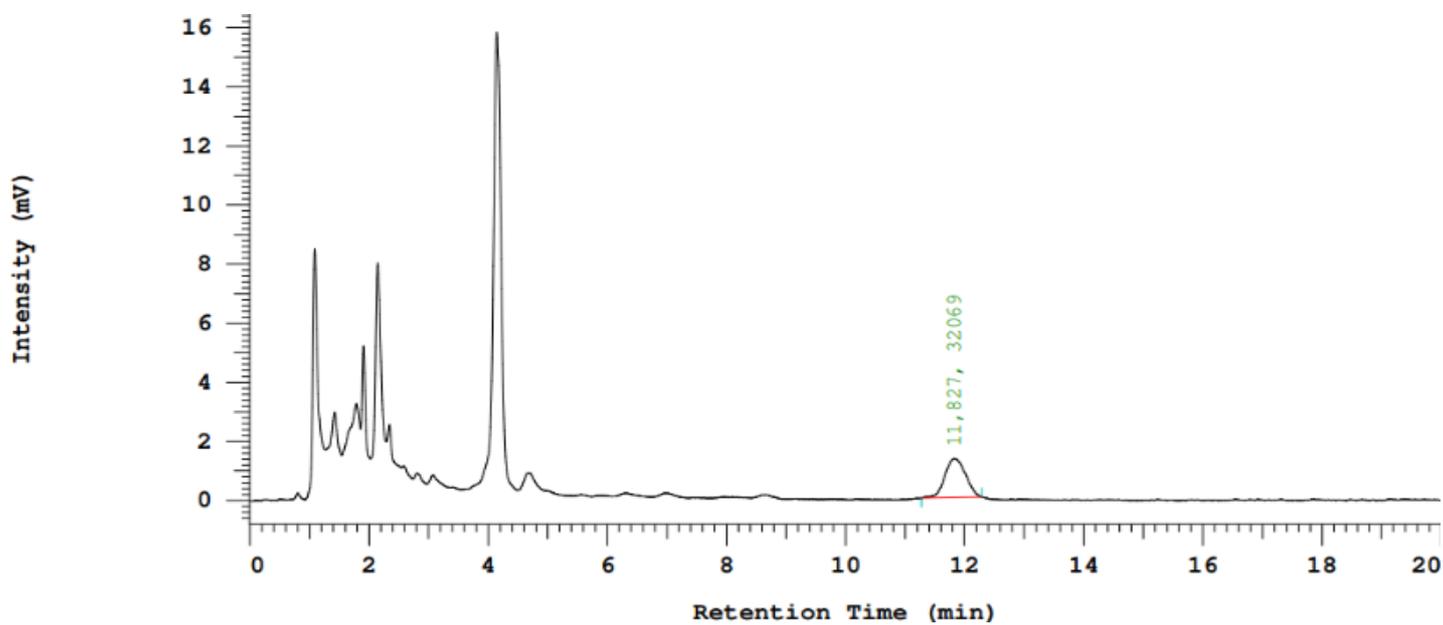


Figura 3.10 - Cromatograma obtido para Cappuccino descafeinado com $t_r = 11,827$.

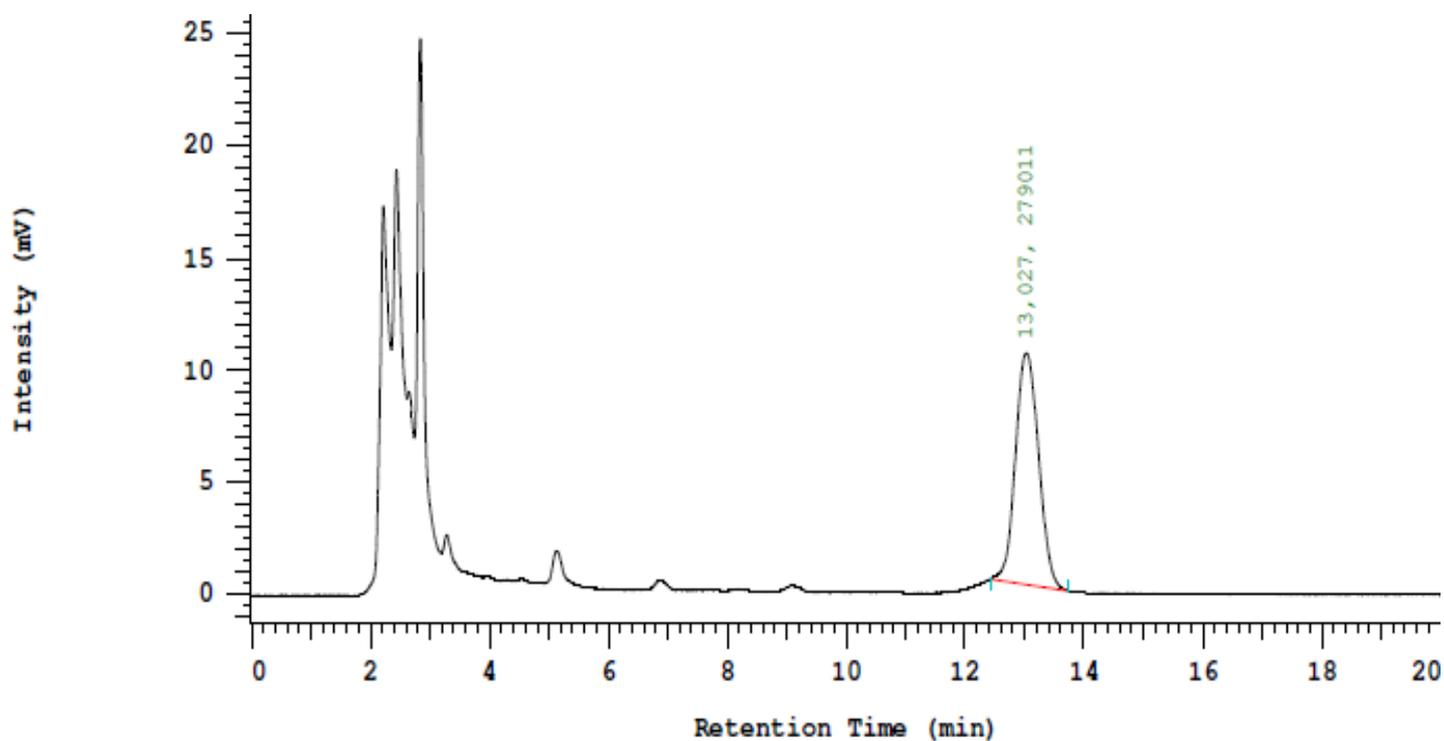


Figura 3.11 - Cromatograma obtido para Iced-Tea com $t_r = 13,027$.

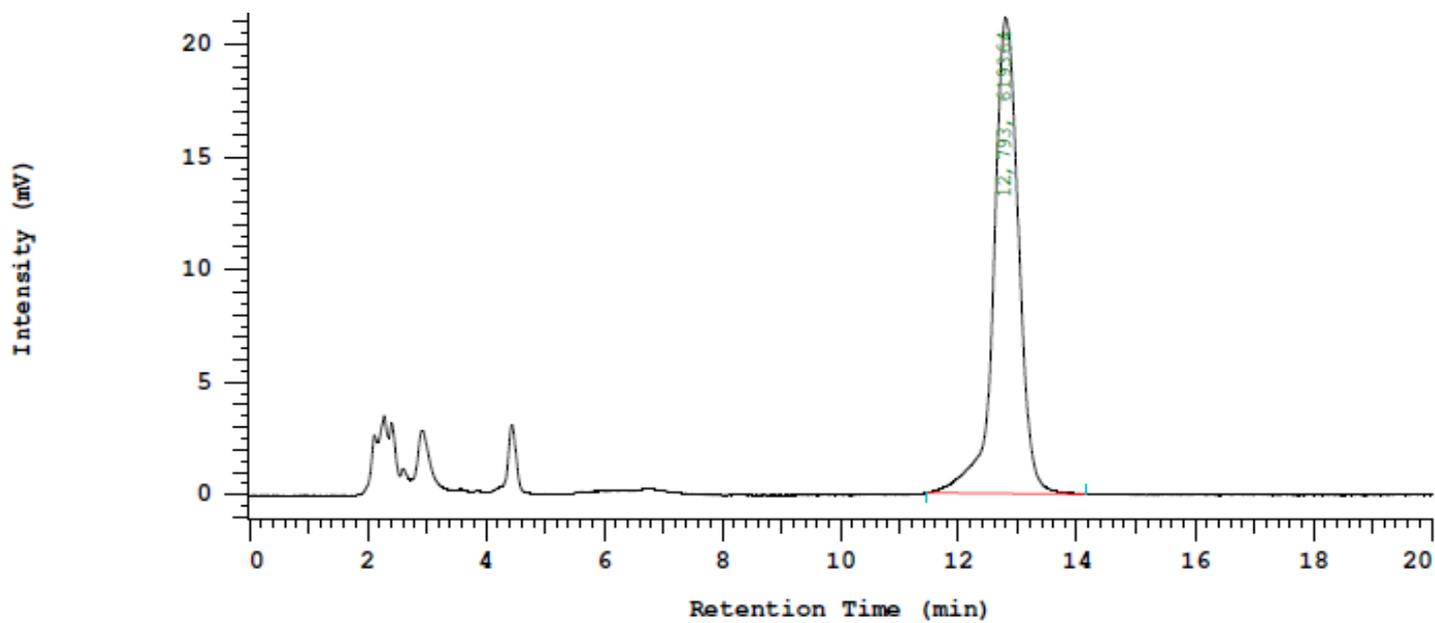


Figura 3.12 - Cromatograma obtido para Coca-Cola com $t_r = 12,793$.

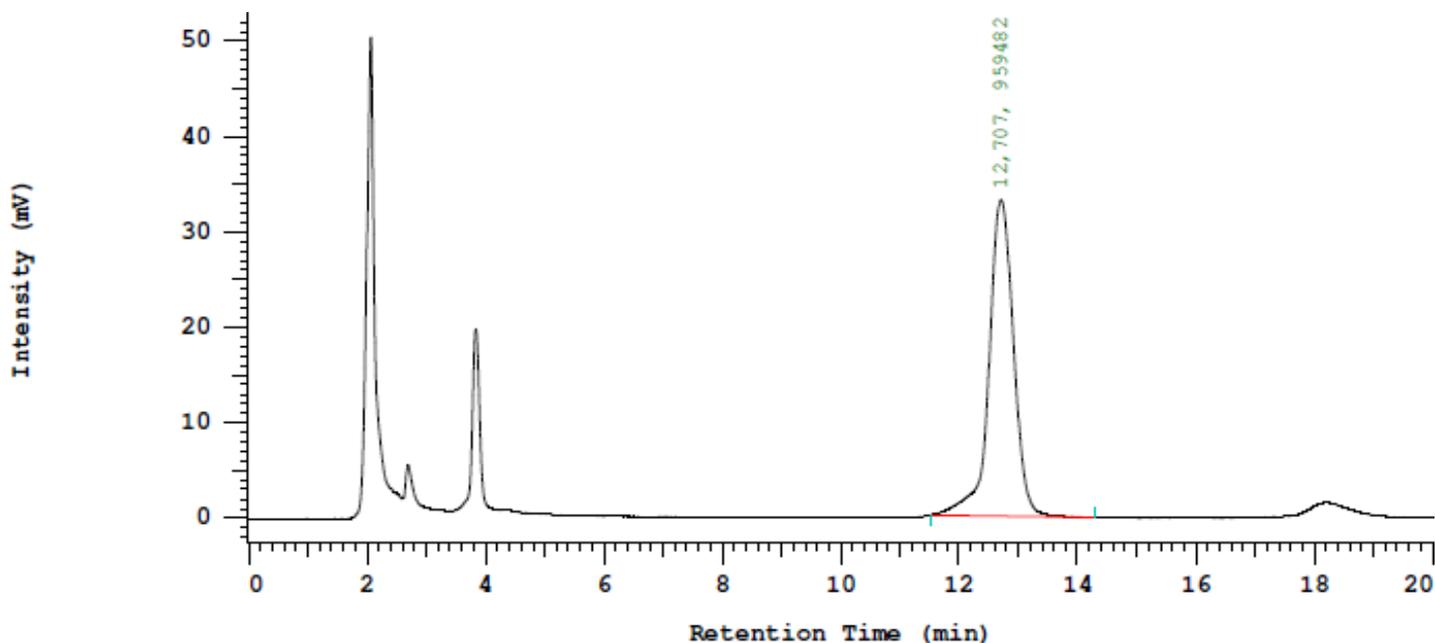


Figura 3.13 - Cromatograma obtido para Bebida Energética com $t_r = 12,707$.

Como se pode observar nos cromatogramas, a separação e obtenção da cafeína foi obtida com boa qualidade, verificando-se que o pico deste composto estaria abrangido na zona entre os 11 e os 13 min.

O tempo de retenção não foi constante em todas as corridas cromatográficas, e de acordo com o Guia de Resolução de problemas da Sigma-Aldrich®, as causas principais são: fugas; alterações na composição da fase móvel (na qual pequenas alterações levam a grandes mudanças nos tempos de retenção); ar preso na bomba (levam a um aumento e diminuição aleatória dos tempos de retenção); flutuações na temperatura da coluna; sobrecarga da coluna (os tempos de retenção tendem a diminuir); amostra com solvente incompatível com a fase móvel; qualquer tipo de problema com a coluna (com o passar do tempo, a coluna "envelhece" podendo levar a tempos de retenção inferiores).

A coluna usada neste estudo já apresentava alguns anos, no entanto não se especula ser esta a causa da alteração dos tempos de retenção dado que foi sempre possível obter os t_r próximos dos valores obtidos no padrão lido antes de qualquer amostra ser colocada para análise. É relevante referir que nem todas as corridas cromatográficas foram realizadas no mesmo dia e, para além disso, verificou-se que era difícil obter uma pressão aproximadamente

igual, isto porque a válvula da bomba tinha de ser fechada manualmente. Por norma a pressão encontrou-se entre os 350 e os 377, mas foram raras as vezes em que foi possível obter exatamente a mesma pressão em dias diferentes. No entanto, os resultados obtidos não foram drasticamente diferentes e como tal foram tidos em consideração.

Para o cálculo do conteúdo de cafeína das amostras, w_c , a norma ISO 20481:2008 indica a seguinte equação 3.3:

3.3

$$w_c = \frac{A_s \rho_{st} V \times 100}{A_{st} m_s} = \frac{A_s \rho_{st} \times 25}{A_{st} m_s}$$

Onde:

A_{st} = é a Área, em unidades arbitrárias, do pico de cafeína detetado pelo HPLC na solução padrão de cafeína.

A_s = é a Área, em unidades arbitrárias, do pico de cafeína detetado pelo HPLC na solução de uma amostra em estudo.

m_s = é a massa, em gramas, da porção teste.

V = é o volume, em litros, exato da solução padrão de cafeína.

ρ_{st} = é a concentração mássica, e gramas por litro, da solução padrão de cafeína.

A equação anterior foi usada para a determinação do teor de cafeína em amostras de café, cappuccino descafeinado e chicória com café. Esta fórmula tem em conta a massa de amostra usada para o estudo da solução, isto é aplicável nas amostras sólidas e em pó, no entanto para as bebidas não se mostrou uma opção viável, pelo que nesses casos foi tida em consideração as retas obtidas para o estudo da linearidade com o auxílio dos padrões de cafeína. Os cálculos foram exemplificados para uma amostra sólida de café instantâneo, e para uma amostra líquida, de Coca-cola e Chá preto e encontram-se expostos no Apêndice A.

É relevante referir que foram realizadas várias corridas cromatográficas de uma mesma amostra, para obtenção de valores médios e desvios padrão para o teor de cafeína, cujos resultados estão presentes na Tabela 4.4 e Tabela 4.5 do Apêndice A. Os resultados simplificados para as 7 amostras, encontram-se agora na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Resultados para a análise a diferentes amostras da gama alta: chá preto aromatizado com frutos vermelhos e café instantâneo, com a determinação da respetiva concentração (mg/L) com o auxílio das retas de 15/03/2023: $y = 35439x + 9824,5$; 03/04/2023: $y = 41490x - 42730$; 09/05/2023: $y = 37488x - 57613$; e 16/05/2023: $y = 35114x - 6540,7$, o conteúdo de cafeína nas nossas amostras, wc (g cafeína/100 g ou 100 mL de amostra) e a concentração de cafeína com o auxílio da concentração obtida pela reta de calibração e respetiva média.

Concentração de Cafeína	Café	Chá Preto	Chicória Café	Cappuccino descafeinado	Bebida Energética	Coca-cola	Ice Tea
Média (g/100g ou 100 mL)	3,324	1,737	1,685	0,051	0,014	0,009	0,004
Desvio Padrão	0,209	0,278	0,112	0,011	0,0004	0,0002	0,0003

A partir dos dados anteriores foram criadas as representações gráficas dos teores de cafeína, em g de cafeína por 100 g ou 100 mL de produto, para facilitar a visualização destes resultados (Figura 3.14).

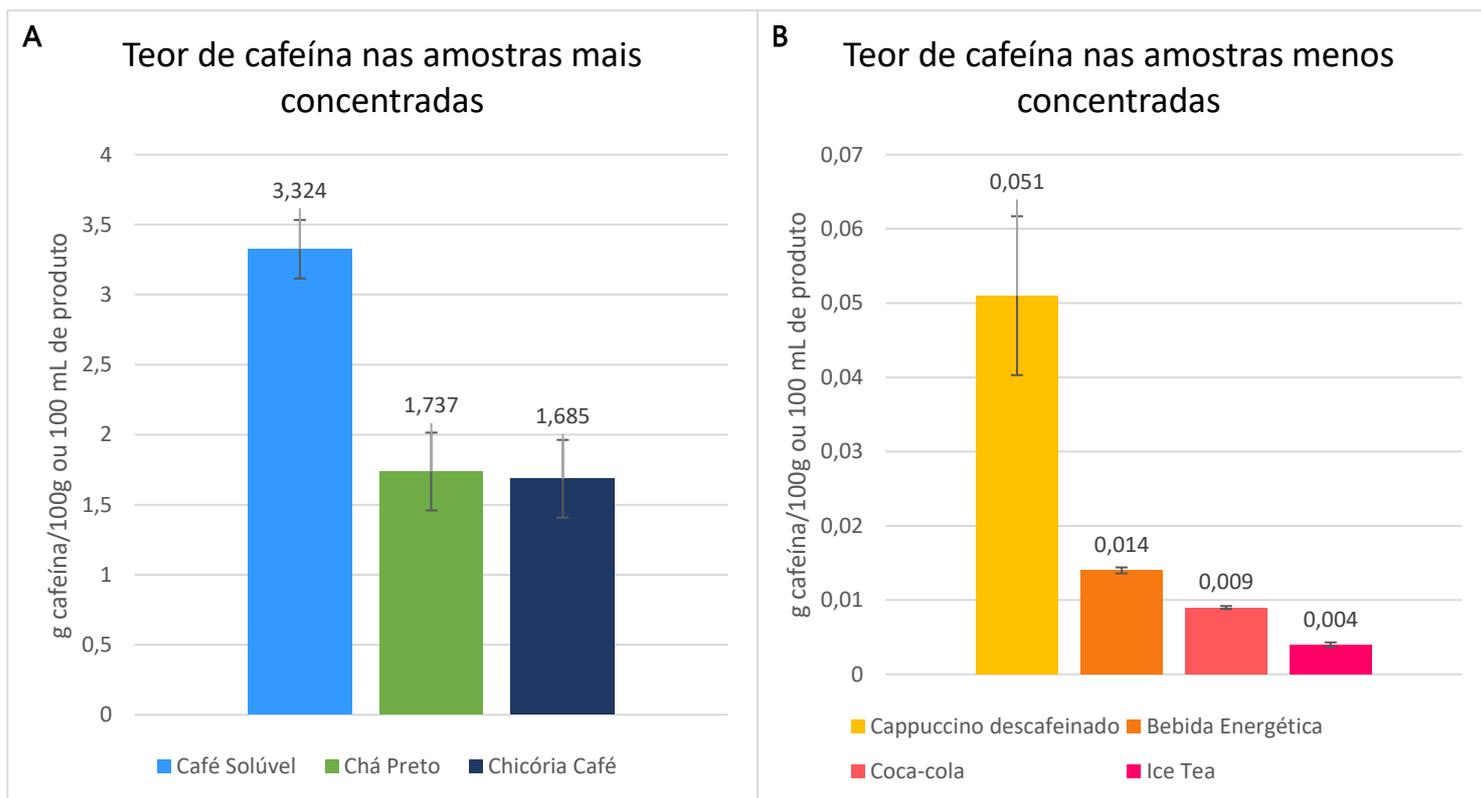


Figura 3.14 - Representação gráfica dos resultados obtidos para o teor de cafeína nas diferentes amostras de géneros alimentícios analisadas para as amostras que apresentaram valores superiores: o café instantâneo, o chá preto e a chicória café (A) e para as amostras que apresentaram baixos valores de cafeína: o Cappuccino Descafeinado, a Bebida energética, a Coca-cola e o Ice Tea (B).

Verificou-se, conforme esperado, que o café instantâneo/solúvel era o que apresentava o teor de cafeína superior, seguindo-se o chá preto, a mistura de chicória e café, cappuccino descafeinado, bebida energética, coca-cola e ice tea.

Estes resultados foram posteriormente comparados com valores de referência de artigos científicos, assim como os valores presentes na ISO 20481:2008, para verificação científica dos dados experimentais. Estes valores foram compilados na Tabela 3.11.

Tabela 3.11 - Comparação dos valores experimentais com dados de referência de diversas fontes, dos teores de cafeína de mg por 100 mL ou 100 g de produto.

^aISO 20481:2008; ^bReis, R. J. P. (2015); ^cIbekwe, N. N., *et al.* (2022); ^d40% do valor de ISO 20481:2008; ^e40% do valor de Reis, R. J. P. (2015); ^fNour, V. *et al.* (2010); ^gAbd-Rabboh, H. S. *et al.* (2022); ^hHackett, J., *et al.* (2008).

Amostra	Valor experimental (mg/100 g ou 100 mL)	Valores literatura (mg/100 g ou 100 mL)	Concentração no rótulo (mg/100 g ou 100 mL)
Café instantâneo	3324	3190 ^a ; 3750 ^b	4550
Chá preto	1737	1225 - 2176 ^c	-
Chicória Café	1685	1276 ^d ; 1516 ^e ; 2450 ^a	-
Bebida Energética	14	17 - 40 ^f	15
Cola	9	10 - 14 ^f	-
Ice Tea	4	1 - 7 ^g	-
Descafeinado	51	28 - 49 ^h ; 72 - 109 ^a ; 75 ^b	-

Para o café solúvel foi obtido o valor experimental de 3324 ± 209 mg/100 g de produto, sendo que na rotulagem deste era indicado que cada preparado com 2 g de café solúvel teria aproximadamente 91 mg de cafeína, pelo que nas ordens em análise, o produto teria aproximadamente 4550 mg de cafeína por 100 g de café. Já a ISO 20481:2008 indica-nos valores na ordem das 3190 mg de cafeína por 100 g de produto, valor este mais próximo do observado experimentalmente. Ainda no trabalho desenvolvido por Reis, R. J. P. (2015), no qual foi usado o procedimento descrito na ISO 20481:2008, o café solúvel teria valores médios de 3,75 g/100 g, o que equivale a 3750 mg/100 g. Sabe-se que os teores de cafeína vão variar dependendo do país de origem do café analisado, da espécie de café usado, do seu estado de torra, da sua origem geográfica e do seu processo de produção (Trovo, R. S., 2017; Burdan, F. 2015), pelo que estas diferenças observadas nos resultados serão previsíveis.

Relativamente aos dados obtidos experimentalmente para o chá preto observou-se que existiam cerca de 1737 ± 278 mg de cafeína por 100g de chá. Um estudo de Ibekwe, N., *et al.* (2022), determinou pela técnica de HPLC, que diferentes as amostras analisadas de chá

preto continham valores de cafeína compreendidos entre os 12,21 e 21,76 mg/g, correspondendo a 1221 e 2176 mg/100 g, pelo que, os valores obtidos experimentalmente encontram-se dentro da gama dos valores destes autores, que usaram uma metodologia semelhante. Explicam ainda que as variações no teor de cafeína do chá preto devem-se às variações geográficas de onde é proveniente *Camellia sinensis* (chá preto), assim como do manejo da cultura, as épocas de colheita e o processamento que sofre. Ainda indicam que a quantidade de cafeína extraída dos chás também pode depender do método de preparação, ou seja, do tempo da chamada infusão, o que também terá sido demonstrado no trabalho de Nascimento, M. L. (2014). É importante referir que neste trabalho experimental foram usadas as considerações expressas na rotulagem para preparar a amostra (Tabela 3.9), sendo que 1 saqueta foi colocada em 200 mL de água a ferver, e posteriormente a solução terá sido deixada a repousar durante 2 a 3 minutos e no fim analisada.

A Chicória (*Cichorium intybus*) é uma erva também conhecida como "endívia belga" que pertence à família *Asteraceae*. As raízes secas da chicória são geralmente usadas como substitutas do café, já que o seu cultivo pode ser realizado em qualquer parte do mundo, tornando o "café" de chicória mais acessível. Além disso, o sabor "café" da chicória é catalogado como amargo e levemente adocicado com notas de caramelo lembrando o sabor do café com a particularidade de ausência de cafeína (Pons Marquès, J., 2021). Uma vez que esta planta não apresenta cafeína será expectável que, numa mistura com café e chicória os teores de cafeína sejam inferiores do que numa solução com apenas café.

A bebida de chicória e café revelou-se ser de difícil comparação, com valores da literatura. Uma vez que se sabe que a rotulagem deste produto indica que tem presente 60% de chicória e 40% café solúvel expectava-se encontrar dados para tal, mas não foram adquiridos resultados bibliográficos com estas proporções. No entanto, a ISO 20481:2008 enuncia valores para uma bebida solúvel de chicória e café, sem a menção da percentagem de café, mas cujo teor médio de cafeína se encontra nas 2450 mg/100 g, o valor obtido experimentalmente terá sido inferior a este, apresentando-se na ordem das 1685 ± 112 mg de cafeína por 100 g de produto. Não podendo fazer uma comparação concreta, não é de todo disparatado assumir que o valor para a chicória poderá ser 40% do valor referido para o café solúvel (devido à chicória não apresentar naturalmente cafeína) portanto tendo o café solúvel uma concentração de 3190 mg/100 g pela ISO 20481:2008, 40% deste valor será 1276 mg/100 g, já para o estudo de Reis, R. J. P. (2015) teremos 1516 mg/100 g (40% de 3750 mg/100 g), valores estes mais

próximos do resultado obtido experimentalmente. No entanto, tal como referido anterior as disparidades nestes resultados podem ser explicadas por fatores como o tipo de café usado, já que dependendo do café solúvel em estudo, o teor de cafeína será diferente, pois os cafés mais consumidos e produzidos (café da espécie Arabica e Robusta) diferem no seu conteúdo em cafeína, sendo que a espécie Robusta contém mais cafeína que a espécie Arabica (Olechno, E., *et al.* 2021).

Nour, V. *et al.* (2010) realizaram o estudo da determinação de cafeína em diferentes tipos de bebidas no mercado romeno, com o uso da técnica de HPLC. Para bebidas energéticas concluíram que os conteúdos de cafeína variavam entre os 16,82 e os 39,48 mg/100 mL, tendo assim uma média de 30,96 mg/100 mL. A concentração obtida experimentalmente para este tipo de bebidas encontrou-se nos $14,0 \pm 0,4$ mg/100 mL e, segundo a Tabela 3.9, o produto continha 15 mg/100 mL, portanto um valor muito próximo da rotulagem e dentro dos valores deste estudo, tratando-se assim de uma análise satisfatória. Já as bebidas gaseificadas, como as Coca-colas light, normal e Pepsi, apresentavam uma média de 12,33 mg/100 mL de cafeína, sendo esta de resultados compreendidos entre os 9,79 e os 14,38 mg/100 mL, estas variações são explicadas pelo facto de terem sido analisadas bebidas de diferentes marcas. Comparando os valores bibliográficos, com os valores obtidos experimentalmente de $9,0 \pm 0,2$ mg/100 mL verificou-se que a coca-cola também se encontrava próximo dos valores expectáveis.

Outra investigação citada por Abd-Rabboh, H. S. *et al.* (2022) indica que as concentrações de cafeína em bebidas de ice tea se encontram nos valores de 13 a 68 mg/L, ou seja, 1,3 a 6,8 mg/100 mL. Experimentalmente foram obtidos resultados na ordem das $4,0 \pm 0,3$ mg/100 mL, valor este que se encontra dentro da gama de valores bibliográficos.

Experimentalmente para o cappuccino descafeinado, o teor de cafeína encontrou-se na ordem dos 51 ± 11 mg/100 g. Um estudo de Hackett, J., *et al.* (2008) onde foram estudadas 10 amostras de produtos descafeinados por HPLC, chegou à conclusão de que os teores de cafeína se encontravam na ordem dos 28 a 49 mg/100 g, colocando o valor experimental obtido muito próximo destes valores. Ainda a ISO 20481:2008 indicou valores na ordem dos 72 e 109 mg/100 g, valores estes superiores mas concordantes com o trabalho de Reis, R. J. P. (2015), que apresenta valores médios de 75 mg/100 g e usa a mesma metodologia, sendo estes resultados superiores aos obtidos neste trabalho. Conforme mencionado anteriormente os teores de cafeína vão depender do tipo de café (da sua origem, estado de torra, etc.) (Trovo, R. S., 2017; Burdan, F. 2015) e, o mesmo se inclui para o café descafeinado, como tal a observação destas discrepâncias entre diferentes estudos será provável e expectável.

Repare-se que alguns dos resultados obtidos encontraram ligeiramente abaixo dos valores bibliográficos, uma causa possível desta disparidade pode dever-se à temperatura usada para a extração da cafeína. Segundo a norma, o conteúdo de cafeína deve ser extraído num banho a 90°C durante 20 min, com agitação ocasional, no qual, o interior da solução deverá atingir os 90°C. Neste trabalho a amostra foi deixada no banho durante 30 min, já que, de acordo com outros procedimentos realizados no mesmo banho, foi indicado que as amostras demoram cerca de 10 min até atingirem a temperatura desejada. A questão será se para este procedimento experimental, dadas as amostras a analisar e os reagentes usados, a amostra atinge a temperatura passados os 10 min.

Olechno, E., *et al.* (2021) indica que a temperatura da água pode ter um impacto significativo no teor de cafeína, pelo simples facto desta molécula ser moderadamente solúvel aos 20°C e atingir o seu máximo de solubilidade aos 100°C, pelo que uma diminuição na temperatura da água, segundo o autor, presume-se que retardará a extração de cafeína numa bebida. Uma vez que não se sabe ao certo quando é que as amostras terão atingido os 90°C a concentração de cafeína poderá ter valores superior ou inferiores aos dados bibliográficos, no entanto como a disparidade não foi elevada, considerou-se o ensaio viável, ainda assim para futuros testes aconselha-se o uso de um termómetro dentro das amostras para verificar se estas atingem os 90°C.

Para retirar quais quer tipo de dúvidas sobre os teores de cafeína, deverá ainda ser adquirida uma amostra de referência para verificar em primeiro lugar, se todo o procedimento foi realizado corretamente e, em segundo lugar para confirmar se as concentrações que estão a ser obtidas pelo equipamento de HPLC são fiáveis e próximas dos valores padronizados.

Além disso, o uso de outros métodos analíticos poderá ser benéfico para a confirmação dos resultados, tais como: a espectrometria de massa (MS), espectrofotometria de UV-Vis (com base no uso do comprimento de onda da cafeína – 272 nm), cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-MS), cromatografia gasosa (CG), espectroscopia de infravermelho (IV) e, ainda métodos eletroquímicos como sensores voltamétricos, potenciométricos, amperimétricos e piezoelétricos (De Maria, C. A., & Moreira, R. F. 2007; Švorc, L. 2013). Os métodos espectrais são frequentemente utilizados nos laboratórios analíticos, por serem de fácil aquisição, no entanto, têm como grande desvantagem a necessidade de uma preparação de amostra, que muitas vezes é um processo demorado e complicado, já os métodos eletroquímicos oferecem vantagens práticas, incluindo simplicidade de operação, sensibilidade, baixo custo do

instrumento e menos sensibilidade aos efeitos de matriz em comparação com métodos espectrais (Švorc, Ľ. 2013). Tendencialmente estas técnicas tendem a ser menos dispendiosas e igualmente sensíveis para a quantificação da cafeína, e com a vantagem de pouparem tempo ao operador, isto especialmente para a técnica por espectrofotometria (Garg, A. K., 2021). Ainda assim o HPLC tem a grande vantagem de possibilitar a automatização do processo (com o uso de um injetor automático) é ainda um processo altamente preciso, no entanto ainda assim caro, com a necessidade de pré-tratamento e muitas vezes complexo para analistas com menores qualificações (Rezk, N. L., *et al.* 2018).

CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido tinha como principal objetivo a implementação e validação de um método para a determinação de cafeína, com o uso da técnica cromatográfica de HPLC, com posterior aplicação em géneros alimentícios. Dados os resultados satisfatórios na gama de trabalho entre os 0,5 e os 160 mg/L verificou-se que este método tinha um limite de deteção de 0,150 mg/L e de quantificação de 0,455 mg/L e, limites de repetibilidade e reprodutibilidade semelhantes aos da ISO 20481:2008, de respetivamente 0,083 e 0,364, não excedendo os 5%, permitindo-se garantir que a repetibilidade e a reprodutibilidade fossem de 95%. Pelo que se conclui que ocorreu a validação eficaz deste método.

Na análise aos produtos com cafeína, verificou-se que o café solúvel apresentou os níveis superiores, na ordem das 3324 ± 209 mg de cafeína por 100 g de café (produto), seguindo-se o chá preto com 1737 ± 278 mg/100 g, depois chicória e café com 1685 ± 112 mg/100 g, Bebida Energética com $14,0 \pm 0,4$ mg/100 mL, Cappuccino Descafeinado com 51 ± 11 mg/100 g, Coca-cola com $9,0 \pm 0,2$ mg/100 mL e Ice Tea com $4,0 \pm 0,3$ mg/100 mL. Os resultados obtidos encontraram-se dentro dos valores descritos nas referências bibliográficas e dentro das indicações do Regulamento (UE) N.º 1169/2011. No entanto, aconselha-se para futuros ensaios que, o CFPSA, realize a monitorização da temperatura na extração da cafeína e, que invista em "amostras cegas" para garantir a credibilidade dos resultados (através da comparação dos seus resultados com os do fornecedor da amostra).

O trabalho desenvolvido vai ainda permitir, que os formandos do curso de técnico de controlo de qualidade do CFPSA, beneficiem de conhecimentos sólidos sobre esta metodologia cromatográfica bastante usada em laboratórios de controlo de qualidade (o HPLC) e permitirá a aquisição de conhecimentos sobre a extração e o doseamento do teor de cafeína, em diferentes géneros alimentícios.

BIBLIOGRAFIA

Abd-Rabboh, H. S., E. Amr, A. E. G., Almehezia, A. A., Naglah, A. M., & H. Kamel, A. (2022). *New Potentiometric Screen-Printed Platforms Modified with Reduced Graphene Oxide and Based on Man-Made Imprinted Receptors for Caffeine Assessment*. *Polymers*, 14(10), 1942. DOI: 10.3390/polym14101942.

ASAE (n.d.) (1). *Aditivos Alimentares. Conservantes*. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Acedido a 30 de janeiro de 2023. url: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/conservantes.aspx>.

ASAE (n.d.) (2). *Aditivos Alimentares. Corantes*. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Acedido a 30 de janeiro de 2023. url: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/corantes.aspx>.

Alkhamaisah, S. I., Younes, K. M., Gaipov, A., & Aljofan, M. (2019). *Development and validation of a simple and sensitive HPLC method for the determination of liquid form of therapeutic substances*. *Electronic Journal of General Medicine*, 16(6). DOI: 10.29333/ejgm/112271.

Bartlett, J. W., & Frost, C. (2008). *Reliability, repeatability and reproducibility: analysis of measurement errors in continuous variables*. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 31(4), 466-475. DOI: 10.1002/uog.5256.

Burdan, F. (2015). *Chapter 22 - Caffeine in coffee*. In *Coffee in health and disease prevention*. Academic Press. 201-207. DOI: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00022-X.

Campelo, D. C. T. (2020). *Certificação de um Laboratório de Ensaio Balísticos*. Dissertação de Mestrado em Ciências e Técnicas Laboratoriais Forenses. Instituto Universitário de Ciências da Saúde.

CFPSA (n.d.) (1). *Gestão da Qualidade. Capítulo 6 - Métodos de Ensaio*. Centro de Formação Profissional para o Setor Alimentar. Documento interno do CFPSA. Acedido a 17 de julho de 2023.

CFPSA (n.d.) (2). *Produtos. ÁLCOOL GEL CFPSA*. Acedido a 10 de abril de 2023. url: <https://www.cfpsa.pt/article/ns-alcoolgel.html>.

CFPSA (n.d.) (3). *Produtos. VEÓLEO*. Acedido a 10 de abril de 2023. url: https://www.cfpsa.pt/article/ns-veoleo.html?parent=104&banner_id=167.

CFPSA (n.d.) (4). *O QUE SOMOS*. Acedido a 30 de janeiro de 2023. url: <https://www.cfpsa.pt/article/ns-o-que-somos.html?parent=109>.

CFPSA (n.d.) (5). *QUALIFICA*. Acedido a 30 de janeiro de 2023. url: https://www.cfpsa.pt/article/ns-centro_qualifica.html.

CFPSA (n.d.) (6). *Serviços. Análises Laboratoriais*. Acedido a 30 de janeiro de 2023. <https://www.cfpsa.pt/article/ns-analise-laboratorial.html?parent=108>.

Corte, A. B. P. (2021). *Troubleshooting em HPLC: uma abordagem sobre problemas comuns vivenciados no laboratório*. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção de grau de Bacharel em Química, Universidade Federal de São Carlos.

Costa, D. (2021). *Cuidados a ter na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*. MADRAL SCIENTIA. Serviços para Laboratórios. Acedido a 18 de abril de 2023. url: <https://blog.madral.pt/9-cuidados-a-ter-na-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-hplc>.

De Maria, C. A., & Moreira, R. F. (2007). *Analytical methods for caffeine*. *Química Nova*, 30, 99-105. DOI: 10.1590/S0100-40422007000100021.

da Silva Gaspar, S. (2014). *Avaliação do risco da exposição a substâncias estimulantes (caféina, taurina e glucuronolactona) em adolescentes do distrito de Lisboa*. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Universidade de Coimbra.

de Lima, L. K. R., da Silva Alves, D. A. N., Gonçalves, D. N., Ribeiro, M. L. F., Cordeiro, L. R., Goldfarb, M. C., ... & Roges, D. L. (2022). *Formação em matemática na UPE: perfilando o curso de licenciatura do campus Garanhuns, Nazaré da Mata e Petrolina mediante a utilização da análise de regressão linear simples*. Research, Society and Development, 11(10). DOI: 10.33448/rsd-v11i10.32893.

DECO PROTEST. (2021). *Caféina: 2 chávenas de chá equivalem a 1 bica*. Acedido a 14 de março de 2023. url: <https://www.deco.proteste.pt/eletrodomesticos/maquinas-cafe/noticias/cafeina-2-chavenas-cha-equivalem-1-bica>.

Decreto-Lei n.º 140/2004. (2004). *Aprova a reestruturação do Instituto Português da Qualidade, IP*. Diário da República n.º 134/2004, Série I-A de 2004-06-08, 3614 - 3619.

Deepack (2013). *How to Read a Chromatogram*. Lab-training.com by Auriga Research Private Limited. Acedido a 30 de janeiro de 2023. url: <https://lab-training.com/how-to-read-a-chromatogram/>.

Domingos, M. C. R. (2011). *Validação de um método de HPLC para análise de conteúdo em comprimidos*. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Química, Universidade de Aveiro.

Farahdiba, A. N., Bastian, F., Tawali, A. B., Laga, A., & Hasizah, A. (2023). *Levels of caffeine, total solution, and pH of coffee boiled water during decaffeination of robusta coffee*. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2596, N.º. 1). AIP Publishing.

Ferrão, J. (2009) *O CAFÉ, A bebida negra dos sonhos claros*. Lisboa, Chaves Ferreira. Publicações. Citado por Marques, J. M. S. D. S. (2011). *Transformações físico-químicas e sensoriais durante o envelhecimento de café torrado em grão*. Dissertação de Mestrado para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.cita

Fernandes, M. D. S. (2016). *Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em cereais e café no Laboratório da SGS Portugal*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Fisone, G., Borgkvist, A., & Usiello, A. (2004). *Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61, 857-872. DOI: 10.1007/s00018-003-3269-3.

Garg, A. K. (2021). *Quantitative Analysis of Caffeine in the Green Tea, Black Tea and Soft Drink Using UV-Visible Spectrophotometer*. Indian Journal of Science and Technology, 14(37), 2860-2864. DOI: 10.17485/IJST/v14i37.2241.

Ghirişan, A. D. I. N. A., & Miclăuş, V. A. S. I. L. E. (2017). *Comparative study of spray-drying and freeze-drying on the soluble coffee properties*. Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia, 62(4), 309-316. DOI: 10.24193/subbchem.2017.4.26.

Gonçalves, A. F. D. J. (2014). *Desenvolvimento e validação de métodos analíticos por HPLC de uma formulação para aplicação tópica*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Hackett, J., Telepchak, M. J., & Coyer, M. J. (2008). *Analysis of total caffeine and other xanthines in specialty coffees using mixed mode solid-phase extraction and liquid chromatography-diode-array detection after microwave digestion*. Journal of analytical toxicology, 32(8), 695-701. DOI:10.1093/jat/32.8.695.

Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis*. 7^a ed., Nova Iorque: W. H. Freeman and Company. Citado por: Henriques, C. D. (2020). *Implementação e Validação de Metodologias Analíticas*. Relatório de Estágio do mestrado de Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Acedido a 21 de abril de 2023. url: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/132070/2/442000.pdf>.

Helena Coffee (2021). *What is Agglomerated Instant Coffee? Agglomerating Instant Coffee Process and Manufacturer*. Acedido a 10 de abril de 2023. url: https://helenacoffee.vn/what-is-agglomerated-instant-coffee-agglomerating-instant-coffee-process-and-manufacturer/#What_is_Agglomerated_Instant_Coffee.

Huber, L. (2007). *Validation of Analytical Methods, in Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Informa Healthcare: Nova Iorque. 125-154. Citado por Henriques, C. D. (2020). *Implementação e Validação de Metodologias Analíticas*. Relatório de Estágio do mestrado de Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Acedido a 21 de abril de 2023. url: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/132070/2/442000.pdf>.

HITACHI (2012). *Primaide*, Hitachi High Performance Liquid Chromatograph, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan. url: https://www.hitachi-hightech.com/file/us/pdf/library/literature/Primaide_Brochure-HTB-E092.pdf.

HITACHI (n.d.) (1). *Principle and System Configuration of HPLC*. Acedido a 17 de abril de 2023. url: <https://www.hitachi-hightech.com/global/en/knowledge/analytical-systems/hplc/hplc-basics/course3.html>.

HITACHI (n.d.) (2). *Principle and Feature of Various Detection Methods*. Acedido a 18 de abril de 2023. url: <https://www.hitachi-hightech.com/global/en/knowledge/analytical-systems/hplc/hplc-basics/course7.html>.

IBES (2021). *Entenda a diferença entre Certificação e Acreditação*. Instituto Brasileiro para Excelência em Saúde. Grupo IBES International e Be Solutions. Acedido a 3 de fevereiro de 2023. url: <https://www.ibes.med.br/entenda-a-diferenca-entre-certificacao-e-acreditacao/>.

Ibekwe, N. N., Mamora, A. M., Okoye, M., Adelokun, T. A., & Adigwe, O. P. (2022). *Physicochemical properties of teas sold in Abuja, Nigeria, and evaluation of their caffeine content using HPLC*. *Journal of Pharmacy & Bioresources*, 19(1), 33-42. DOI: 10.4314/jpb.v19i1.5.

ICH (2022). *ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical*. Holanda, Amesterdão, EU: European Medicines Agency. url: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf.

ISO (n.d.). *Standards. ISO standards are internationally agreed by experts*. Acedido a 31 de janeiro de 2023. url: <https://www.iso.org/standards.html>.

ISO 20481 (2008). *Coffee and coffee products - Determination of the caffeine content using high performance liquid chromatography (HPLC) - Reference method*. Suíça: International Standard.

Kromidas, S. (2017). *The HPLC expert II: Find and optimize the benefits of your HPLC/UHPLC*. John Wiley & Sons. 303-305. DOI: 10.1002/9783527694945.

Lourenço, J. M. (2021). *The NOVAthesis LATEX Template User's Manual*. NOVA University Lisbon. url: https://github.com/joaomlourenco/novathesis_word/raw/master/novathesis_word-FINAL-EN.pdf.

Macherey-Nagel (n.d.). *Reversed Phase HPLC. Application Guide*. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG. Germany. Documento interno do CFPSA. Acedido a 30 de janeiro de 2023.

Mariano, R. S. (2018). *Determinação de cafeína em bebidas estimulantes por cromatografia líquida e espectrofotometria UV-Vis*. Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II, da Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Marques, J. M. S. D. S. (2011). *Transformações físico-químicas e sensoriais durante o envelhecimento de café torrado em grão*. Dissertação de Mestrado para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Marquês, A. I., (2015). *Implementação, otimização e validação de um método analítico de quantificação de ácido benzóico em compotas e doces de fruta*. Centro de Formação para o Sector Alimentar. Laboratório de Ensaios. Documento interno do CFPSA. Acedido a 30 de janeiro de 2023.

Mota, M., Teixeira, J. A., Yelshin, A., & Cortez, S. (2006). *Novas técnicas cromatográficas*. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Campus de Gualtar, Braga. url: http://repositorium.uminho.pt/bitstream/1822/5804/1/EQ4-Mota_et_al%5B1%5D.pdf.

Naegele E. (2013). *Determination of Caffeine in Coffee Products According to DIN 20481*, Food Testing & Agriculture – Food Authenticity. Agilent Technologies. url: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-2851EN.pdf>.

Nahar, L., Onder, A., & Sarker, S. D. (2020). *A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019)*. *Phytochemical Analysis*, 31(4), 413-457.

Nascimento, M. L. (2014). *Doseamento de cafeína e análise sensorial de chá preto (Camellia sinensis) preparado com diferentes condições de extração*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Gastronómicas. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

National Center for Biotechnology Information (2023) 1. PubChem Compound Summary for CID 2519, *Caffeine*. Acedido a 30 de janeiro de 2023. url: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>.

National Center for Biotechnology Information (2023) 2. PubChem Compound Summary for CID 60961, *Adenosine*. Acedido a 30 de janeiro de 2023. url: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Adenosine>.

Nour, V., Trandafir, I., & Ionica, M. E. (2010). *Chromatographic determination of caffeine contents in soft and energy drinks available on the Romanian market*. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 11, 351-358.

Olechno, E., Puścion-Jakubik, A., Zujko, M. E., & Socha, K. (2021). *Influence of various factors on caffeine content in coffee brews*. *Foods*, 10(6), 1208.

Perez, M. Â. F. (2010). *Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante*. Instituto de Tecnologia de Alimentos. *Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens*, 22(3), 1-9.

Pokhrel, P., Shrestha, S., Rijal, S. K., & Rai, K. P. (2016). *A simple HPLC Method for the Determination of Caffeine Content in Tea and Coffee*. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 9, 74-78.

Pons Marquès, J. (2021). *HPLC-UV and HPLC-FLD Fingerprinting for the Detection and Quantitation of Adulterations in the Prevention of Coffee Frauds*. Trabalho de Conclusão do Curso

de Química. Departamento de Engenharia Química e Química Analítica da Universidade de Barcelona. url: <http://hdl.handle.net/2445/175405>.

Regulamento (UE) N.º 872/2012, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 1 de outubro de 2012, que adota a lista das substâncias aromatizantes prevista no Regulamento (CE) n.º 2232/96 do Parlamento Europeu e do Conselho, inclui essa lista no anexo I do Regulamento (CE) n.º 1334/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga o Regulamento (CE) n.º 1565/2000 e a Decisão 1999/217/CE Texto relevante para efeitos do EEE. Jornal Oficial da União Europeia. L 267/1, pp. 153.

Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Diretivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.º 608/2004 da Comissão.

Reis, R. J. P. (2015). *Aplicação de técnicas cromatográficas à informação nutricional*. Relatório de estágio de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Relacre, G. (2000). 13, *Validação de Métodos Internos de ensaio em análise química*. Lisboa: Relacre.

Rezk, N. L., Ahmed, S., Iqbal, M., Rezk, O. A., & Ahmed, A. M. (2018). *Comparative evaluation of caffeine content in Arabian coffee with other caffeine beverages*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 12(2), 19-26.

Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., & Melo, L. F. C. (2004). *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química nova, 27, 771-780. DOI: 10.1590/S0100-40422004000500017.

Rodda, S., Booth, N., McKean, J., Chung, A., Park, J. J., & Ware, P. (2020). *Mechanisms for the reduction of caffeine consumption: What, how and why*. Drug and Alcohol Dependence, 212, 108024. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2020.108024.

Shoykhet, K., Broeckhoven, K., & Dong, M. W. (2019). *Modern HPLC pumps: perspectives, principles, and practices*. LC GC North America, 37(6), 374-384.

Sigma-Aldrich® (2009). *HPLC Troubleshooting Guide. How to identify, isolate, and correct the most common HPLC problems*. Bulletin-826E. Acedido a 03 de maio de 2023. url: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/128/929/4497.pdf>

Soares, F. (2019). *Caffeine: The science behind coffee*. Mind the GRAPH. Cactus Communications. Acedido a 30 de janeiro de 2023. url: <https://mindthegraph.com/blog/caffeine/>.

SPECANALITICA (2011). *Curso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*. SPECANALITICA, equipamentos científicos, Lda. Carcavelos. Documento interno do CFPSA. Acedido a 02 de fevereiro de 2023.

Steiner, F., Paul, C., & Dong, M. (2019). *HPLC autosamplers: Perspectives, principles, and practices*. LCGC North America, 37(8), 514-529. Acedido a 6 de fevereiro de 2023. url: <https://www.chromatographyonline.com/view/hplc-autosamplers-perspectives-principles-and-practices>.

Švorc, Ľ. (2013). *Determination of caffeine: a comprehensive review on electrochemical methods*. International Journal of Electrochemical Science, 8(4), 5755-5773.

Temple, J. L., Bernard, C., Lipshultz, S. E., Czachor, J. D., Westphal, J. A., & Mestre, M. A. (2017). *The safety of ingested caffeine: a comprehensive review*. Frontiers in psychiatry, 8, 80. Citado por Rodda, S., Booth, N., McKean, J., Chung, A., Park, J. J., & Ware, P. (2020). *Mechanisms for the reduction of caffeine consumption: What, how and why*. Drug and Alcohol Dependence, 212, 108024.

Trovo, R. S. (2017). *Análise de cafeína em café por voltametria cíclica e com eléctrodos compostos de grafite, óxidos de metal e resina epoxílica*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Bragança.

Van Beek, A. R., Weier, M. E., Williams, K. R., Abraham, S. P., & Gillum, D. R. (2019). *College Students' Caffeine Intake Habits and Their Perception of Its Effects*. Journal of Education and Development, 3(2), 42. DOI: 10.20849/jed.v3i2.607.

Wanyika, H. N., Gatebe, E. G., Gitu, L. M., Ngumba, E. K., & Maritim, C. W. (2010). *Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market*. African journal of food science, 4(6), 353-358.

Waters (2021). *What is the role and importance of determining the capacity factor of a peak in chromatography*. Acedido a 09 de fevereiro de 2023. Waters Knowledge Base. url: https://support.waters.com/KB_Chem/Columns/WKB48191_What_is_the_use_and_importance_of_getting_the_capacity_factor_of_a_peak_in_chromatography.

WHO (n.d.). World Health Organization. Citado por Perez, M. Â. F. (2010). *Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante*. Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens, 22(3), 1-9.

4.1 Apêndice ácido Benzóico

Metodologia para a quantificação do ácido benzóico

De 2011 a 2015 Marquês, A. I. realizou a "implementação, otimização e validação de um método analítico de quantificação de ácido benzóico em compotas e doces de fruta" (Marquês, A. I., 2015) no CFPSA. O estudo concluiu que as condições ótimas para quantificar o conteúdo em ácido benzóico dá-se usando uma coluna de RP-18.

Fase Móvel

Para a fase móvel polar foi usado Metanol próprio para HPLC (MeOH) (HiPerSolv CHROMANORM® ACS da VWR: Chemicals 85681.290) e uma solução de Tampão de Acetato de Amônio a pH 4,40. Para tal, foram transferidas 3,8538 g de Acetato de Amônia (AcNH₄ 0,05M) (HiPerSolv CHROMANORM® ACS da VWR: Chemicals 153164R) para um frasco volumétrico de 1L, e adicionada água para HPLC até perfazer a marcação.

Soluções Padrão de Ácido Benzóico

Solução Stock

O Padrão de Ácido Benzóico (C₆H₅COOH) foi adquirido pela Sigma-Aldrich 47849, deste foram pesadas 0,032 g para um balão volumétrico de 200 mL. Posteriormente foi adicionado metanol para HPLC. No final foi adicionada água para HPLC e a amostra foi guardada num frigorífico. Esta solução correspondia à amostra com concentração de 160 mg/L.

Soluções Padrão

Para as amostras padrão foi usada a solução padrão obtida no ponto anterior, e desta foram feitas diluições sucessivas com metanol, pelo que foram retirados sucessivamente 25

mL com o auxílio de uma pipeta volumétrica, de escorrimento total, para um balão de 50 mL. Posteriormente foi adicionada água para HPLC até perfazer a marca, agitou-se e guardou-se a solução no frigorífico. Estas soluções correspondiam às concentrações de 80, 40, 20, 10 e 5 mg/L.

Preparação de doces de fruta, compotas e marmeladas

Foram pesadas 2 g de amostra e transferidas para um goblé 25 mL, no qual, de seguida foram adicionados 20 mL de metanol. A mistura foi tapada por um vidro de relógio e colocada sobre agitação durante 1h. Passado esse tempo, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e perfeito o volume com metanol. Posteriormente a mistura foi centrifugada, na Rotofix 32 A da Hettich, durante 10 min na velocidade máxima (40 RPM/RCF×100).

No final o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma seringa e filtrou-se com a membrana de poro 0,45 µm. Após este passo as amostras ficaram prontas para a leitura no aparelho de HPLC.

Adição de padrão a amostras

No trabalho experimental realizado foi selecionada a amostra de doce de alperce e, desta foram realizadas duas manipulações.

Na primeira manipulação foi usado o filtrado obtido no ponto anterior, retirando-se 10 mL deste e adicionados num balão volumétrico de 20 mL, o qual foi perfeito com 10 mL da solução padrão de 160 mg/mL.

Na segunda manipulação foram seguidos os passos do ponto 4.1.1.3, no entanto em vez de se usar metanol para a extração do ácido benzóico, no goblé e no balão volumétrico de 25 mL, foi usada a solução padrão de 80 mg/mL.

Resultados para o método do Ácido Benzóico

O primeiro método desenvolvido no aparelho de HPLC trata-se da determinação do ácido benzoico.

Esta tese começou pela análise deste método para verificar se o aparelho se encontrava em condições e para me familiarizar com todo o procedimento para a aplicação de amostras.

Em primeiro lugar realizei a curva de calibração com os padrões de ácido benzoico sendo que foram feitos 6 padrões:

- 5 mg/L
- 10 mg/L
- 20 mg/L

- 40 mg/L
- 80 mg/L
- 160 mg/L

Com estes dados foi obtido o gráfico (Figura 4.1) para a determinação da reta de calibração do tipo $y = mx + b$ (4.1), com os valores:

4.1

$$[\text{Área pico}] = 52110 [C_{\text{amostra}}] - 1169$$

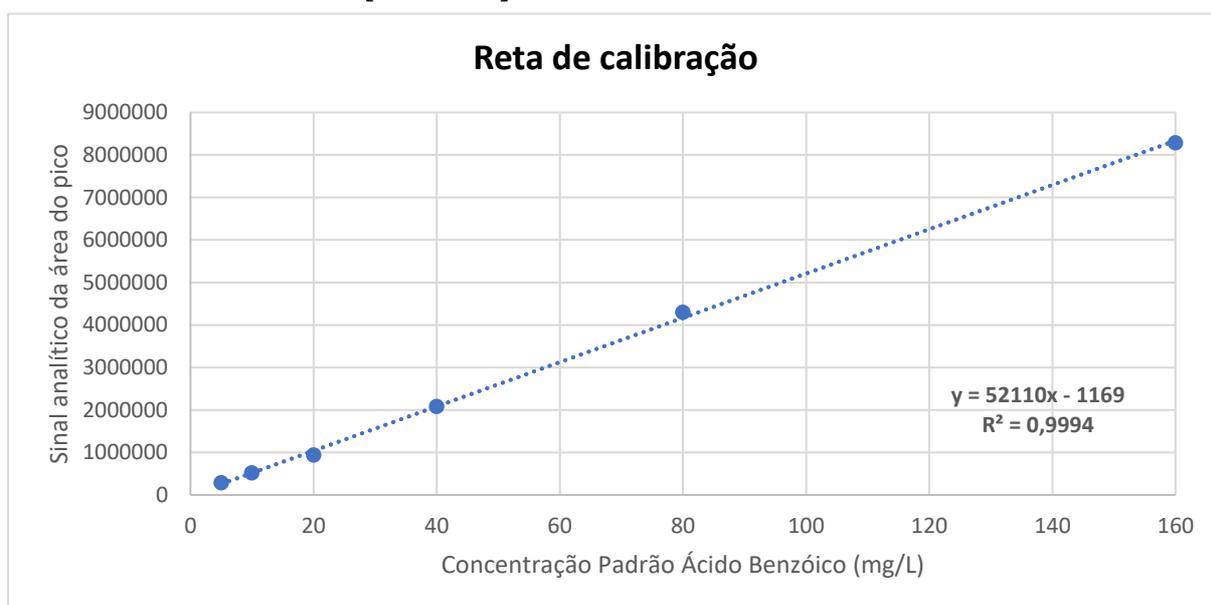


Figura 4.1 - Reta de calibração obtida pelos padrões 5, 10, 20, 40, 80 e 160 mg/L de ácido benzóico. Obtenção dos valores para a curva de calibração exposta em 4.1.

Para os padrões foram obtidas as áreas seguintes:

Tabela 4.1 - Resultados obtidos para os cromatogramas dos padrões 5, 10, 20, 40, 80 e 160 mg/L de ácido benzóico, e o respetivo desvio padrão, como o auxílio da curva de calibração exposta na equação 4.1.

Padrão (mg/L)	Área do Pico	Tempo de Retenção (t_r)	Concentração de ácido benzóico no padrão (mg/L)
5	284347	9,410	5,48
10	520982	9,926	10,02
20	939685	9,432	18,06
40	2083042	9,392	40,00
80	4294940	9,399	82,44
160	8284659	9,423	159,01

De acordo com a Tabela 4.1, foi verificado que as concentrações das amostras se encontravam dentro dos valores expectáveis.

Posteriormente passou-se para a quantificação deste conservante em doces de fruta, nomeadamente foram realizadas análises a um doce de alperce (adquirido num hipermercado) para verificar a presença de ácido benzóico.

Em primeiro lugar foi analisado o doce de alperce sem qualquer manipulação, depois numa segunda fase o filtrado dessa quantificação foi manipulado pela adição do padrão de 160 a 50% do volume, pelo que esta amostra teria, em princípio, uma concentração padrão próxima ou superior ao padrão de 80 mg/mL. No final o doce foi manipulado diretamente com o padrão de 80 mg/mL para observar se ocorreria a recuperação da concentração desse padrão. Os resultados encontram-se expostos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Resultados obtidos para o teor em ácido benzóico para o doce de alperce e, as respetivas manipulações, com o respetivo cálculo da concentração de ácido benzóico, como o auxílio da curva de calibração exposta na equação 4.1, média e desvio padrão.

Amostra	Área do Pico	Concentração de ácido benzóico (mg/L)
Doce Alperce	148635	2,87
Doce Alperce	114175	2,21
Doce Alperce	93198	1,81
Doce Alperce	43293	0,85
Doce Alperce	84065	1,64
Média		1,88
Desvio padrão		0,67
Diluição 1/2 (Doce Alperce + padrão 160)	3283520	63,03
Diluição 1/2 (Doce Alperce + padrão 160)	3274350	62,86
Diluição 1/2 (Doce Alperce + padrão 160)	3376965	64,83
Média		63,57
Desvio Padrão		0,89
Doce Alperce + padrão 80	3930662	75,45
Doce Alperce + padrão 80	4352040	83,54
Doce Alperce + padrão 80	4221676	81,04
Média		80,01
Desvio Padrão		3,38

Os resultados obtidos demonstraram que o doce de alperce continha concentrações baixas de ácido benzóico, na ordem dos $1,88 \pm 0,67$ mg/L, e para as amostras manipuladas as

taxas de recuperação obtidas foram favoráveis, permitindo concluir que o método de extração foi adequado para a quantificação do conservante.

É importante referir que nestas análises não foram realizados ensaios suficientes para a determinação de coeficientes de variação, limites de repetibilidade, limites de quantificação e deteção, entre outros, pelo que a consequente validação não foi determinada já que foram analisadas menos de 10 amostras (como é sugerido pelo Guia Relacre (2000)). Pelo que este primeiro estudo foi meramente para determinar se o aparelho de HPLC estaria a funcionar corretamente e se, o método implementado pelo laboratório estaria bem validado.

4.2 Apêndice Cafeína

No teste de Homogeneidade para avaliação da gama de trabalho, foi efetuada a repetição de 10 injeções consecutivas dos padrões extremos da gama, o mais alto de 200 mg/L e o mais baixo de 5 mg/L. E posteriormente conforme mencionado na introdução, foi feita a comparação dos valores da razão das variâncias dos padrões, com o valor da distribuição F de Snedecor/Fisher. Tendo-se observado que na Tabela 4.3 o valor de PG era superior ao de F e, com tal a gama de trabalho teve de ser reduzida.

Tabela 4.3 - Teste de homogeneidade aos padrões da gama alta, 200mg/L e 5mg/L, com a respetiva média de áreas, tempo de retenção (tr) e concentração em mg/L (a partir da equação $y = 35439x + 9824,5$); variâncias associadas ao primeiro (S_1^2) e último (S_{10}^2) padrão e o respetivo valor de PG e o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher.

Nº réplica	Padrão 200 mg/L			Padrão 5 mg/L		
	Área	tr	Concentração (mg/L)	Área	tr	Concentração (mg/L)
1	6722976	12,26	189,43	218671	13,95	4,47
2	7021118	12,26	205,07	185033	13,57	5,89
3	6809754	12,17	197,84	193613	13,92	4,94
4	7030586	12,07	191,88	192507	13,93	5,19
5	7277473	12,06	198,11	203758	13,96	5,15
6	7228131	12,06	203,68	189312	14,03	5,47
7	7109756	12,08	200,34	175888	14,09	5,06
8	7061352	12,11	198,98	168386	14,02	4,69
9	7525171	12,11	212,06	197661	13,65	5,30
10	7360803	12,11	207,43	481437	13,61	13,31
Média	7114712,00	12,13	200,48	220626,60	13,87	5,95
S^2	47,20			6,84		
PG	6,90					
F	5,35					

Para a determinação dos teores de cafeína nos géneros alimentícios analisados foram realizados os cálculos seguintes:

- **Café instantâneo**

[Mistura em solução aquosa] = 0,2089 g café/100 mL de solução, pelo que para 1L teremos

[solução] = 2,089 g/L

[obtida pelo cálculo experimental] = 75,7463 mg/L = 0,0757463 g/L

Pelo que:

$$\begin{array}{l} 2,089 \text{ g amostra} \quad \text{_____} \quad 0,0757463 \text{ g de cafeína} \\ 100 \text{ g amostra} \quad \text{_____} \quad x \text{ g de cafeína} \end{array}$$

$$x = \frac{100 \times 0,0757463}{2,089} \cong 3,63 \text{ g cafeína/100 g de amostra}$$

O café solúvel tem a indicação na rotulagem de que, em 2 g de produto temos aproximadamente 91 mg de cafeína, pelo que por 100 g de produto teremos:

$$\begin{array}{l} 2 \text{ g amostra} \quad \text{_____} \quad 91 \text{ mg de cafeína} \\ 100 \text{ g amostra} \quad \text{_____} \quad x \text{ mg de cafeína} \end{array}$$

$$x = \frac{100 \times 91}{2} = 4550 \text{ mg cafeína/100 g de amostra} = 4,55 \text{ g cafeína/100 g}$$

- **Coca-cola**

$V_{\text{inicial}} = 20 \text{ mL}$

[obtida pelo cálculo experimental] = 17,1997 mg/L = 0,0171997 g/L

Pelo que:

$$\begin{array}{l} 0,0171997 \text{ g cafeína} \quad \text{_____} \quad 1000 \text{ mL de solução} \\ x \text{ g cafeína} \quad \text{_____} \quad 100 \text{ mL de solução} \end{array}$$

$$x = \frac{100 \times 0,0171997}{1000} \cong 0,0017 \text{ g cafeína/20 mL}$$

$$\begin{array}{l} 0,0017 \text{ g cafeína} \quad \text{_____} \quad 20 \text{ mL de solução} \\ x \text{ g cafeína} \quad \text{_____} \quad 100 \text{ mL de solução} \end{array}$$

$$x = \frac{100 \times 0,0017}{20} \cong 0,0085 \text{ g cafeína/100 mL de amostra} = 8,5 \text{ mg/100 mL}$$

- **Chá-preto**

Para a infusão feita foi usada 1 saqueta de chá que contém 1,8 g de chá, para 200 mL de água quente, pelo que temos: [Mistura em solução aquosa] = 9 g/L

$$\begin{array}{l} 1,8 \text{ g chá} \quad \text{_____} \quad 200 \text{ mL} \\ x \text{ g chá} \quad \text{_____} \quad 1000 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = \frac{1000 \times 1,8}{200} \cong 9 \text{ g/L}$$

Uma vez que, desta solução, foram retirados 50 mL de amostra para um balão de 100 mL, podemos determinar a concentração final desta amostra:

$$\begin{aligned} [\text{inicial}] \times v_i &= [\text{final}] \times v_f \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow 9 \times 50 &= [\text{final}] \times 100 \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow [\text{final}] &= \frac{9 \times 50}{100} = 4,5 \text{ g/L} \end{aligned}$$

[obtida pelo cálculo experimental] = 86,4737 mg/L = 0,0864737 g/L

Pelo que:

$$\begin{array}{l} 4,5 \text{ g amostra} \quad \text{_____} \quad 0,0864737 \text{ g de cafeína} \\ 100 \text{ g amostra} \quad \text{_____} \quad x \text{ g de cafeína} \end{array}$$

$$x = \frac{100 \times 0,0864737}{4,5} = 1,922 \text{ g cafeína/100 mL de amostra}$$

Para as restantes amostras os cálculos efetuados foram semelhantes aos anteriores e, os resultados encontram-se expostos nas Tabela 4.4 e Tabela 4.5.

Tabela 4.4 - Resultados obtidos para a determinação dos teores de cafeína para as amostras de Bebida energética, Cappuccino descafeinado, Ice Tea e Coca-cola e, respectivos padrões analisados. Uso das retas de 15/03: $y = 35439x + 9824,5$; 09/05: $y = 37488x - 57613$; e 16/05: $y = 35114x - 6540,7$.

Data	Tipo de amostra	Massa (g) / Volume (mL)	Balão	Área	Concentração (mg/L)	tr	Wc (g/100g)	Pela reta	Média	Desvio Padrão
09/05/2023	20	-	10	754759	21,6702	12,327	-			
09/05/2023	Bebida energética	20	100	1000046	28,2133	12,340	-	0,014	0,014	0,0004
09/05/2023	Bebida energética	20	100	959200	27,1237	12,340	-	0,014		
09/05/2023	Bebida energética	20	100	1004924	28,3434	12,333	-	0,014		
15/03/2023	Bebida Energética	20	100	959482	26,7970	12,707	-	0,013		
11/05/2023	0,5	-	10	14084	0,5874	12,727	-			
11/05/2023	Cappuccino Descafeinado	0,2000	100	30705	1,0607	12,700	0,055	0,053	0,051	0,0107
11/05/2023	Cappuccino Descafeinado	0,2000	100	30894	1,0661	12,707	0,055	0,053		
11/05/2023	Cappuccino Descafeinado	0,2000	100	34089	1,1571	12,700	0,028	0,058		
03/03/2023	Cappuccino Descafeinado	0,2000	100	36840	0,8998	11,827	0,063	0,045		
11/05/2023	Ice Tea	20	100	256621	8,3823	12,673	-	0,004	0,004	0,0003
11/05/2023	Ice Tea	20	100	267906	8,6833	12,673	-	0,004		
11/05/2023	Ice Tea	20	100	276743	8,9190	12,667	-	0,004		
15/03/2023	Ice Tea	20	100	279011	7,5958	13,027	-	0,004		
11/05/2023	Coca-cola	20	100	605659	17,6929	12,653	-	0,009	0,009	0,0002
11/05/2023	Coca-cola	20	100	612257	17,8689	12,653	-	0,009		
11/05/2023	Coca-cola	20	100	585829	17,1639	12,687	-	0,009		
15/03/2023	Coca-Cola	20	100	619364	17,1997	12,793	-	0,009		

Tabela 4.5 - Resultados obtidos para a determinação dos teores de cafeína para as amostras de Chicória + Café, Chá preto e Café. as concentrações foram obtidas com o uso das retas de 15/03: $y = 35439x + 9824,5$; 03/04: $y = 41490x - 42730$; e 09/05: $y = 37488x - 57613$.

Data	Tipo de amostra	Massa (g) / Volume (mL)	Balão	Área	Concentração (mg/L)	tr	Wc (g/100g)	Pela reta	Média	Desvio Padrão
16/05/2023	Chicória + Café	0,2084	100	1190990	33,3067	12,773	1,770	1,598	1,685	0,112
16/05/2023	Chicória + Café	0,2084	100	1240323	34,6227	12,68	1,844	1,661		
16/05/2023	Chicória + Café	0,2084	100	1142993	32,0264	12,493	1,699	1,537		
15/03/2023	Chicória + Café	0,2084	100	1150638	32,1909	12,68	1,338	1,545		
16/05/2023	Chá preto	50	100	2175216	59,5612	12,453	-	1,324	1,737	0,278
16/05/2023	Chá preto	50	100	3092507	84,0301	12,393	-	1,867		
16/05/2023	Chá preto	50	100	3041675	82,6741	12,347	-	1,837		
03/03/2023	Chá preto	50	100	3074365	86,4737	11,793	-	1,922		
03/03/2023	Café	0,2089	100	2694196	75,74625	11,813	3,548	3,626	3,324	0,209
03/04/2023	Café	0,2089	100	2632226	64,47231	12,727	3,318	3,086		
03/04/2023	Café	0,2089	100	2601555	63,73307	12,287	3,279	3,051		
03/04/2023	Café	0,2089	100	2747779	67,25739	12,512	3,464	3,220		

Para o método da determinação do teor de cafeína foram realizados os ensaios de validação para os padrões e amostras que continham cafeína. Para o teste de homogeneidade foi necessário o uso da tabela de Distribuição de Fisher/Snedecor presente na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Tabela de distribuição de Fisher-Snedecor para um intervalo de confiança de 99%. Fonte: <http://wiki.icmc.usp.br/images/f/f2/2011-TabelaFSnedecor.pdf>. Acedido a 13 de março de 2023.

Distribuição de Fisher-Snedecor – Valores de f_c tais que $P(F \geq f_c) = 0,01$, com $F_{V1,V2}$.

GL	V1																			
V2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	4052.2	4999.3	5403.5	5624.3	5764.0	5859.0	5928.3	5981.0	6022.4	6055.9	6083.4	6106.7	6125.8	6143.0	6157.0	6208.7	6286.4	6313.0	6339.5	6352.6
2	98.502	99.000	99.164	99.251	99.302	99.331	99.357	99.375	99.390	99.397	99.408	99.419	99.422	99.426	99.433	99.448	99.477	99.484	99.491	99.495
3	34.116	30.816	29.457	28.710	28.237	27.911	27.671	27.489	27.345	27.228	27.132	27.052	26.983	26.924	26.872	26.690	26.411	26.316	26.221	26.173
4	21.198	18.000	16.694	15.977	15.522	15.207	14.976	14.799	14.659	14.546	14.452	14.374	14.306	14.249	14.198	14.019	13.745	13.652	13.558	13.511
5	16.258	13.274	12.060	11.392	10.967	10.672	10.456	10.289	10.158	10.051	9.963	9.888	9.825	9.770	9.722	9.553	9.291	9.202	9.112	9.066
6	13.745	10.925	9.780	9.148	8.746	8.466	8.260	8.102	7.976	7.874	7.790	7.718	7.657	7.605	7.559	7.396	7.143	7.057	6.969	6.925
7	12.246	9.547	8.451	7.847	7.460	7.191	6.993	6.840	6.719	6.620	6.538	6.469	6.410	6.359	6.314	6.155	5.908	5.824	5.737	5.694
8	11.259	8.649	7.591	7.006	6.632	6.371	6.178	6.029	5.911	5.814	5.734	5.667	5.609	5.559	5.515	5.359	5.116	5.032	4.946	4.903
9	10.562	8.022	6.992	6.422	6.057	5.802	5.613	5.467	5.351	5.257	5.178	5.111	5.055	5.005	4.962	4.808	4.567	4.483	4.398	4.354
10	10.044	7.559	6.552	5.994	5.636	5.386	5.200	5.057	4.942	4.849	4.772	4.706	4.650	4.601	4.558	4.405	4.165	4.082	3.996	3.953
11	9.646	7.206	6.217	5.668	5.316	5.069	4.886	4.744	4.632	4.539	4.462	4.397	4.342	4.293	4.251	4.099	3.860	3.776	3.690	3.647
12	9.330	6.927	5.953	5.412	5.064	4.821	4.640	4.499	4.388	4.296	4.220	4.155	4.100	4.052	4.010	3.858	3.619	3.535	3.449	3.405
13	9.074	6.701	5.739	5.205	4.862	4.620	4.441	4.302	4.191	4.100	4.025	3.960	3.905	3.857	3.815	3.665	3.425	3.341	3.255	3.210
14	8.862	6.515	5.564	5.035	4.695	4.456	4.278	4.140	4.030	3.939	3.864	3.800	3.745	3.698	3.656	3.505	3.266	3.181	3.094	3.050
15	8.683	6.359	5.417	4.893	4.556	4.318	4.142	4.004	3.895	3.805	3.730	3.666	3.612	3.564	3.522	3.372	3.132	3.047	2.960	2.914
16	8.531	6.226	5.292	4.773	4.437	4.202	4.026	3.890	3.780	3.691	3.616	3.553	3.498	3.451	3.409	3.259	3.018	2.933	2.845	2.799
17	8.400	6.112	5.185	4.669	4.336	4.101	3.927	3.791	3.682	3.593	3.518	3.455	3.401	3.353	3.312	3.162	2.920	2.835	2.746	2.700
18	8.285	6.013	5.092	4.579	4.248	4.015	3.841	3.705	3.597	3.508	3.434	3.371	3.316	3.269	3.227	3.077	2.835	2.749	2.660	2.613
19	8.185	5.926	5.010	4.500	4.171	3.939	3.765	3.631	3.523	3.434	3.360	3.297	3.242	3.195	3.153	3.003	2.761	2.674	2.584	2.537
20	8.096	5.849	4.938	4.431	4.103	3.871	3.699	3.564	3.457	3.368	3.294	3.231	3.177	3.130	3.088	2.938	2.696	2.608	2.517	2.470
21	8.017	5.780	4.874	4.369	4.042	3.812	3.640	3.506	3.398	3.310	3.236	3.173	3.119	3.072	3.030	2.880	2.638	2.548	2.457	2.409
22	7.945	5.719	4.817	4.313	3.988	3.758	3.587	3.453	3.346	3.258	3.184	3.121	3.067	3.019	2.978	2.827	2.585	2.495	2.403	2.355
23	7.881	5.664	4.765	4.264	3.939	3.710	3.539	3.406	3.299	3.211	3.137	3.074	3.020	2.973	2.931	2.780	2.538	2.447	2.354	2.306
24	7.823	5.614	4.718	4.218	3.895	3.667	3.496	3.363	3.256	3.168	3.094	3.032	2.977	2.930	2.889	2.738	2.496	2.403	2.310	2.261
25	7.770	5.568	4.675	4.177	3.855	3.627	3.457	3.324	3.217	3.129	3.056	2.993	2.939	2.892	2.850	2.699	2.457	2.364	2.270	2.220
26	7.721	5.526	4.637	4.140	3.818	3.591	3.421	3.288	3.182	3.094	3.021	2.958	2.904	2.857	2.815	2.664	2.421	2.327	2.233	2.183
27	7.677	5.488	4.601	4.106	3.785	3.558	3.388	3.256	3.149	3.062	2.988	2.926	2.872	2.824	2.783	2.632	2.389	2.294	2.199	2.148
28	7.636	5.453	4.568	4.074	3.754	3.528	3.358	3.226	3.120	3.032	2.959	2.896	2.842	2.795	2.753	2.602	2.359	2.263	2.167	2.117
29	7.598	5.420	4.538	4.045	3.725	3.499	3.330	3.198	3.092	3.005	2.931	2.868	2.814	2.767	2.726	2.574	2.331	2.234	2.138	2.087
30	7.562	5.390	4.510	4.018	3.699	3.473	3.305	3.173	3.067	2.979	2.906	2.843	2.789	2.742	2.700	2.549	2.299	2.202	2.111	2.060
40	7.314	5.178	4.313	3.828	3.514	3.291	3.124	2.993	2.888	2.801	2.727	2.665	2.611	2.563	2.522	2.369	2.114	2.019	1.917	1.862
50	7.171	5.057	4.199	3.720	3.408	3.186	3.020	2.890	2.785	2.698	2.625	2.563	2.508	2.461	2.419	2.265	2.007	1.909	1.803	1.745
60	7.077	4.977	4.126	3.649	3.339	3.119	2.953	2.823	2.718	2.632	2.559	2.496	2.442	2.394	2.352	2.198	1.936	1.836	1.726	1.666
80	6.963	4.881	4.036	3.563	3.255	3.036	2.871	2.742	2.637	2.551	2.478	2.415	2.361	2.313	2.271	2.115	1.849	1.746	1.630	1.566
100	6.895	4.824	3.984	3.513	3.206	2.988	2.823	2.694	2.590	2.503	2.430	2.368	2.313	2.265	2.223	2.067	1.797	1.692	1.572	1.504
120	6.851	4.787	3.949	3.480	3.174	2.956	2.792	2.663	2.559	2.472	2.399	2.336	2.282	2.234	2.191	2.035	1.763	1.656	1.533	1.462
240	6.742	4.695	3.864	3.398	3.094	2.878	2.714	2.586	2.482	2.395	2.322	2.260	2.205	2.157	2.114	1.956	1.677	1.565	1.432	1.351



2023

FILIPA PIRES

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM DIFERENTES
GÊNEROS ALIMENTÍCIOS, COM O USO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)