

## VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA EM GRÃO CRU DE CAFÉ <sup>1</sup>

Valeria Bittencourt de Lima <sup>2</sup>; Terezinha de Jesus Garcia Salva <sup>3</sup>; Franciane Rueda Barboza <sup>4</sup>;  
Cleide de Moura Casante Zago <sup>5</sup>; Bárbara Silvestre Zanini <sup>6</sup>

1. Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café
2. Bolsista Consórcio Pesquisa Café (CPG), IAC, Campinas – SP, [valeriabittencourtlima@gmail.com](mailto:valeriabittencourtlima@gmail.com)
3. Pesquisador Científico IAC, Campinas- SP, [tsalva@iac.sp.gov.br](mailto:tsalva@iac.sp.gov.br)
4. Bolsista Consórcio Pesquisa Café(DCI.4), IAC, Campinas – SP, [francianerb@yahoo.com.br](mailto:francianerb@yahoo.com.br)
5. Bolsista Consórcio Pesquisa Café (DCI.1), IAC, Campinas – SP, [cleidecasante@gmail.com](mailto:cleidecasante@gmail.com)
6. Bolsista Consórcio Pesquisa Café (CPT), IAC, Campinas – SP, [barbara.silvestrezanini@gmail.com](mailto:barbara.silvestrezanini@gmail.com)

**RESUMO:** Embora a literatura apresente várias metodologias de quantificação de teobromina individual ou conjuntamente com outras substâncias, nos nossos trabalhos de pesquisa procuramos estabelecer condições para a sua extração de café e quantificação em HPLC adequadas para as condições de trabalho disponíveis. Foram avaliadas extrações com água em duas proporções volume:massa de café e com solução de metanol a 70%. Os experimentos foram realizados a 60°C e a 80°C. Neste trabalho se apresentam os resultados da avaliação da metodologia incluindo a extração e a análise em HPLC, mediante a eficiência de extração e a avaliação da curva de calibração, da curva analítica, da linearidade, da precisão, do limite de detecção e do limite de quantificação. Os resultados revelaram grande linearidade na relação entre a área do pico cromatográfico e a concentração de teobromina na amostra e na solução padrão, excelente precisão, baixo limite de detecção e limite de quantificação inferior ao encontrado nas matrizes a serem analisadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** teobromina, validação, café, precisão, limite de quantificação.

## VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHODOLOGY FOR THE THEOBROMINE QUANTIFICATION IN RAW COFFEE

**ABSTRACT:** Although literature presents several methodologies for the quantification of theobromine, individually or in combination with other substances, we seek to establish conditions for its extraction from coffee and quantification using HPLC for the laboratory available working conditions. Extractions in water in two proportions volume:coffee mass and in 70% methanol solution, at 60°C and 80°C, were evaluated. This work presents the results of the methodology evaluation, including extraction and the HPLC analysis, through the evaluation of the extraction efficiency, calibration curve, analytical curve, linearity, precision, detection limit and quantification limit. The results showed a high linearity regarding the relationship between the area of the chromatographic peak and the concentration of theobromine in the sample and in the standard solutions, high precision, low detection limit and quantification limit lower than that in the matrices to be analyzed.

**KEY WORDS:** theobromine, validation, coffee, precision, quantification limit.

## INTRODUÇÃO

A validação de metodologias analíticas fornece informações que permitem atestar que ela atende aos requisitos para os quais foi desenvolvida ou adaptada. Ela é indispensável no desenvolvimento de novas metodologias, e, também, fortemente indicada nas suas implantações e adaptações pretendidas. Os parâmetros empregados na validação incluem a exatidão, a precisão, a robustez, a linearidade, a faixa de trabalho, o limite de detecção, o limite de quantificação e a especificidade. Nem todas as análises laboratoriais requerem a avaliação de todos esses parâmetros para a sua validação, e Huber (2011) apresenta um quadro orientativo para parâmetros a avaliar em análises qualitativas e quantitativas. Para a metodologia de quantificação cromatográfica de teobromina na faixa de concentração esperada a orientação é de que a validação estabeleça o limite de quantificação e a faixa de trabalho, bem como forneça informações sobre a linearidade, a precisão, a especificidade e a robustez do método. O objetivo desse trabalho foi validar a metodologia de quantificação de teobromina em grãos de café cru com concentrações variando entre 0,02 e 1.3% (bs).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Reagentes** – padrão de teobromina 99,0% (Sigma Aldrich), metanol grau HPLC (JTBaker) e água ultra pura 18,2 MΩ.

**Condições de Extração** – Amostras de grãos de café cru moídos à granulometria inferior a 0,5 mm em moinho refrigerado da marca Foss Tecator foram empregadas nessas análises. Foram experimentadas extrações empregando 100 mg de café cru moído em 10 e 50 mL de água e em 5 mL de metanol a 70%, a 60° e 80°C, durante 30 e 60 minutos (Clifford et al., 1985).

**Soluções padrão de teobromina** - foram feitas diluições a partir de uma solução estoque a 400 ug/mL de teobromina para a obtenção de soluções com concentrações iguais a 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 20; 32; 80; 100; 140; 160 e 200 ug/mL para a definição da curva de calibração. O parâmetro empregado para a definição das condições mais adequadas para a extração da teobromina do grão de café cru foi a área do pico correspondente à teobromina no extrato obtido, considerando-se como condição adequada a que resultou na maior concentração medida.

**Quantificação da teobromina** - as análises foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) usando coluna de fase reversa C18 Shim pack CLC-ODS e pré-coluna Shim pack CLC G-ODS, ambas da marca Shimadzu. A eluição foi isocrática com fase móvel composta de Metanol:Água MilliQ:Ácido acético glacial (20 : 79,5 : 0,5 - pH 2,5) a 30°C. Os extratos metanólicos foram diluídos a 1:10, a menos que a concentração inicialmente quantificada ficasse abaixo do limite de quantificação. O branco das análises foi preparado empregando a metodologia definida para a extração, porém na ausência de amostra de café. A validação parcial do método análise em HPLC foram feitas mediante a avaliação da curva de calibração e da curva analítica, da precisão, do limite de detecção e do limite de quantificação, conforme a orientação descrita em Huber (2011).

**Precisão** - A precisão do método de análise em HPLC foi avaliada pela repetibilidade, expressa pelo desvio padrão relativo calculado para 6 medidas de concentração da teobromina na mesma amostra de café, obtidas pelo mesmo analista no mesmo dia (Huber, 2011).

**Curva de Calibração** - foi obtida pela relação entre as áreas dos picos cromatográficos das soluções padrão de teobromina de concentração conhecida (Huber,2011).

**Curva analítica** - foi determinada segundo metodologia AOAC (apêndice D, 2002). Para tanto, estabeleceu-se a relação entre a área do pico da teobromina e a concentração da substância em extratos de café sem diluição e em soluções diluídas a 1:5 ; 1:10 ; 1:15 e a 1:20.

**Limite de Detecção** - Foi definido como o desvio padrão dos valores dos pontos de intersecção das curvas analíticas com o eixo Y (Huber, 2011).

**Limite de quantificação** - foi definido como a área igual a 10 vezes a área correspondente à do limite de detecção (Huber 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desvio padrão relativo calculado para a quantificação de teobromina em café foi igual a 1,65%. De acordo com Huber (2011) e a metodologia AOAC (2016), o desvio padrão relativo de medidas feitas em alimentos depende da matriz, da concentração do analito, da performance do equipamento e da metodologia analítica utilizada e quanto menor a concentração do analito maior será o desvio padrão relativo, podendo ficar entre 2 e mais de 20%.

Nas condições analíticas empregadas, 2,44 ug/mL foi a concentração quantificada na amostra com teor de teobromina da ordem de 10 vezes menor do que a concentração encontrada em mutantes. Para esta grandeza de concentração, o valor de desvio padrão relativo normalmente encontrado é igual a 11%. Para concentrações 10 vezes maiores do analito a precisão normalmente é da ordem de 7,3% (Hubert, 2011). Com base nessas informações conclui-se que a precisão da análise é bastante satisfatória.

Tanto a curva de calibração obtida com a teobromina pura quanto a curva analítica obtida com diluições do extrato metanólico de café cru resultaram em retas com elevados valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A curva de calibração obtida considerando as concentrações de teobromina entre 0,0 e 200 ug/mL foi uma reta de equação  $\text{Área do pico cromatográfico} = 67.107 \times \text{concentração} + 54.547$ , com  $R^2 = 0,9991$ , em que a concentração é expressa em ug/mL. Com essa performance de função de calibração considerou-se que existe linearidade nessa ampla faixa de concentração de teobromina. A curva analítica se mostrou igualmente linear e é representada pela equação  $\text{Área do pico cromatográfico} = 83.627 \times \text{concentração} + 4.890$ , com  $R^2$  igual a 0,991.

O limite de detecção da análise é a área igual a 6.632 (0,021ug/mL) e o limite de quantificação é correspondente à área de 66.320 (0,2ug/mL). Cafés arábicas apresentam teor de teobromina no extrato metanólico (diluído a 1:10) do grão cru da ordem de 0,5 ug/mL (5 ug/mL na solução sem diluição), enquanto o mutante com reduzido teor de cafeína no grão cru possui 24 ug/mL (240 ug/mL na solução sem diluição). Portanto o limite de detecção igual a 0,2 ug/mL é adequado para a análise em questão.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos para as avaliações da repetibilidade, da linearidade e dos limites de detecção e de quantificação revelaram que a metodologia avaliada tem precisão e limites de detecção e de quantificação adequados para a quantificação de teobromina em grãos de café cru.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AOAC Official Methods of Analysis of the AOAC (2002), Appendice D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis.
- AOAC Official Methods of Analysis of the AOAC (2016) - Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.
- CLIFFORD, M. N; OHIOKPEHAI O; DE MENEZES H.. The influence of extraction method and analytical method on the chlorogenic acid content of green coffee beans. In: 11<sup>o</sup> Colloque, Lomé, ASIC 1985, p. 252-262.
- HUBER, L. (2011) in: <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/> consultado em 05/07/2019