

PROPOSTA DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA EM CAFÉ CRU

THAÍS FAHL SILVA¹; TEREZINHA J. G. SALVA²; FANCIANE R. BARBOZA²

Nº 12162

RESUMO

No ciclo da biossíntese de cafeína (1,3,7-trimetilxantina) a teobromina (3,7-dimetilxantina) é o composto que a antecede. A ausência de cafeína nos cafés naturalmente sem cafeína implica acúmulo de teobromina no grão. Cafeína e teobromina têm vários efeitos fisiológicos em comum, de onde advém a importância de serem quantificadas em cafeeiros em processo de melhoramento com vistas a reduzido teor de cafeína. O objetivo desse trabalho foi estabelecer e validar uma metodologia para a quantificação de teobromina em grão de café cru. Inicialmente se definiu o método para extração e quantificação de teobromina no produto, e, então, se procedeu a sua validação mediante a determinação da linearidade das funções analítica e de calibração, da sensibilidade, da repetitividade e dos limites de detecção e de quantificação. A sensibilidade do método desenvolvido é elevada e igual a 66743 unidades de área/ $\mu\text{g/mL}$ de teobromina no extrato. A repetitividade das análises é excelente e o desvio entre as medidas é da ordem 1,6% para concentração da ordem de $2,44 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ no extrato; o limite de detecção de teobromina no extrato é igual a 0,0093 $\mu\text{g/mL}$ ou 0,0003 Volts e o limite de quantificação é igual a 0,03 $\mu\text{g/mL}$ ou 0,006 Volts. A linearidade da função analítica se estendeu de 0 a 5,30 $\mu\text{g/mL}$ para extrato diluído a 1:10. A linearidade da função de calibração se mostrou aplicável para o intervalo de 1 a 200 $\mu\text{g/mL}$.

¹ Bolsista CBP&D Café: Graduação em Ciências Biológicas, PUC, Campinas-SP.

² Orientadora: Pesquisadora, Centro de Café 'Acides Carvalho'/IAC, Campinas-SP, tsalva@iac.sp.gov.br

³ Colaboradora: Bolsista CBP&D Café, CCAA/C/IAC, Campinas-SP

ABSTRACT

In the biosynthesis of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), theobromine (3,7-dimethylxanthine) is the immediately anterior synthesized compound. It is supposed that in coffee plants with caffeine free seeds this last step of the biosynthesis cycle is not accomplished with theobromine accumulation. Caffeine and theobromine have many similar physiological effects that justify the interest in the quantification of these compounds in the grains. The aim of this work was to propose and validate a method for the quantification of theobromine in raw coffee grains. Firstly the methodology was defined and then the validation was performed through the linearity of analytical and calibration curves, sensitivity, repetibility and through the detection and quantification limits. The sensitivity of the method was high and equal to 66743 area units/ $\mu\text{g/mL}$ of theobromine in the extract. The repetibility was excellent and the standard deviation of around 1.6% for the concentration of around $2.44 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ in the extract; the detection limit in the extract was 0.0093 $\mu\text{g/mL}$ or 0.0003 Volts and the quantification limit in the extract was 0.03 $\mu\text{g/mL}$ or 0.006 Volts. The linearity of the analytical function ranged from 0 to 5.30 $\mu\text{g/mL}$ for the extract diluted to 1:10. The linearity of the calibration curve was excellent from 1 to 200 $\mu\text{g/mL}$.

INTRODUÇÃO

As metilxantinas de importância em café, chocolate, chá e certos tipos de refrigerantes de sabor cola são a cafeína, a teofilina e a teobromina. Esses compostos são rapidamente absorvidos pelo organismo após administração oral, parenteral e retal.

Existem evidências de que este grupo de compostos são antagonistas competitivos de receptores da adenosina, e em doses elevadas podem causar translocação de cálcio, inibição da fosfodiesterase e a liberação de neurotransmissores, especialmente a noradrenalina.

Dentre as três metilxantinas citadas, a teofilina é a que mais atua sobre o sistema nervoso central (SNC). Ela atua ainda sobre o metabolismo basal e eleva a síntese de suco gástrico.

Doses terapêuticas de cafeína aumentam a capacidade de trabalho do músculo cardíaco, além de causar vasodilatação periférica.

A teobromina é uma substância normalmente encontrada no fruto do Theobroma e, está normalmente presente no chocolate. Ela pode ser usada para o tratamento de edema, ataques de angina sífilítica e angina degenerativa bem como

vasodilatador, que auxilia na liberação da urina e estimulação do coração. Ela causa menor impacto no SNC do que a cafeína e a teofilina. Mesmo que a teobromina não seja uma substância que leve ao vício, foi incriminada como causadora do vício em chocolate, já que o chocolate afeta os níveis de serotonina. A teobromina pode ter efeitos colaterais como: insônia, tremores, inquietude, ansiedade, perda de apetite, náuseas e vômitos.

Biossíntese da Teobromina

A biossíntese da teobromina e, também, da cafeína e da teofilina, tem início com a oxidação do ácido inosínico pela enzima 5-fosfato desidrogenase, dando origem ao ácido xantílico. Na sequência, o ácido xantílico é metilado pela ação da enzima metil-transferase, formando, então, 3-metilxantina. Sob ação de diferentes enzimas, a 3 metil-xantina poderá dar origem à teobromina, quando metilada no N7 (3,7 dimetil-xantina) ou à teofilina, quando metilada no N1 (1,3 metil-xantina). Por metilação, tanto a teobromina (no N1), quanto a teofilina (no N7) poderão se transformar em cafeína

A teobromina, e a subsequente formação de 3-metilxantina, pode ter origem também na metabolização da cafeína.

Validação de metodologia de análises químicas.

A validação de um método analítico é feita com o objetivo de se obter resultados através de um método confiável. Não existe um modelo pronto para sistemas de validação. Ela é feita mediante a escolha dos parâmetros que satisfazem as exigências do laboratório,.

A literatura apresenta vários parâmetros para validação de metodologias, incluindo repetitividade, reprodutividade, seletividade, recuperação e linearidade.

O INMETRO define como parâmetros de validação: Especificidade/Seletividade, Linearidade, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Sensibilidade (inclinação da curva), Exatidão e tendência (bias), Precisão, compreendendo a Repetitividade, a Precisão Intermediária e a Reprodutibilidade, Robustez e Incerteza de medição.

A ANVISA define como parâmetros de validação: Especificidade/Seletividade, Intervalos da curva de calibração, Linearidade, Curva de Calibração, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Exatidão, Precisão, compreendendo Repetibilidade (precisão intra-corrida), Precisão intermediária (precisão inter-corrida), Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) e Robustez.

Resumidamente, Leite (2002) e Ribani et al. (2004) definem esses parâmetros da seguinte forma:

Repetitividade é um dos parâmetros de avaliação da precisão. Ela se refere aos resultados de várias análises da mesma amostra pelo mesmo método, equipamentos e analista.

Reprodutividade refere-se aos resultados de análises da mesma amostra, pelo mesmo método, quando a análise é efetuada por outros analistas em outros laboratórios.

Seletividade é o mesmo que especificidade, sendo sensibilidade o nome dado pela IUPAC e, por isso, o termo preferido. Ela avalia o grau de interferência, de espécies, como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes na amostra.

Fator de Recuperação é definido como a fração do analito adicionado à matriz que é quantificada pelo método a ser validado

Linearidade é a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito da amostra.

Limite de Detecção é a menor quantidade do analito que pode ser detectado.

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão sob as condições do método.

Precisão avalia a dispersão dos resultados entre análises de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões. Quanto mais próximos estiverem os resultados, maior será a precisão.

Robustez mede a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações como, por exemplo, da temperatura, do gás de arraste, pH e fase móvel.

Botoli et al.(2004) apresentam os parâmetros disponíveis para validação de metodologias de análises cromatográficas e eletroforéticas, que incluem: Seletividade, Linearidade e faixa de aplicação, Padronização externa, Padronização interna, Superposição de matriz, Adição de padrão, Precisão, Repetitividade, Precisão intermediária, Reprodutibilidade, Exatidão, Recuperação, Limite de Detecção (LD) Limite de Quantificação (LQ), Robustez.

A validação de metodologias analíticas somente deve ser efetuada após se ter definido o método a ser empregado. Com essa premissa, primeiramente estabeleceu-se a metodologia que na sequência foi validada segundo a linearidade da função de

calibração e da função analítica, do limite de detecção, do limite de quantificação, da sensibilidade e da repetitividade.

MATERIAL E MÉTODOS

O método de análise se baseou na extração da teobromina em solução de metanol a 70% seguida de centrifugação e análise em HPLC. Na análise cromatográfica, empregou-se coluna C₁₈ Shim-pack CLC-ODS (M) de 4,6 x 250 mm (Shimadzu) com pré-coluna Shim-pack CLC G-ODS (4). Empregou-se sistema com Shimadzu detector UV-VIS, injetor automático, forno, bomba, válvula quaternária e controlador; a fase móvel foi metanol:ácido acético:água (30:05:69,5 v/v/v) e a vazão 1 mL/min. As concentrações de teobromina foram calculadas com base nos tempos de retenção e das áreas da amostra e dos picos da solução padrão.

1- Precisão (Repetitividade)

A metodologia foi repetida para 6 concentração de teobromina no extrato. A partir dos resultados obtidos foram calculados o Coeficiente de Variação e o Intervalo de Confiança para a concentração do composto no grão de café cru.

2- Linearidade

2.a Linearidade da função de calibração – foi verificada para o intervalo de concentração de teobromina compreendido entre 0,5 e 200 µg/mL, empregando soluções-padrão do composto. As soluções foram preparadas em triplicata.

2.b Linearidade da função analítica – foi verificada para o intervalo de concentração de teobromina na matriz café arábica no intervalo compreendido entre 0 e 5,297 µg/mL, a partir de diluições 1:5, 1:10, 1:15 e 1:20 de um mesmo extrato. A área da concentração “zero” foi considerada a área do branco de reagentes, que consistiu na aplicação do método sem a adição da matriz café. O cromatograma dessa amostra foi considerado o *background noise*.

3- Limite de Detecção

O limite de detecção foi calculado a partir do desvio padrão de múltiplos brancos e da inclinação da curva analítica sendo igual a 3 vezes a relação entre esses valores (eq. 1) (Chan, 2008).

$$LD = 3 \cdot \sigma / S \quad (\text{eq. 1})$$

onde σ é o desvio padrão do branco, que no estudo foi o branco de reagentes e, S é a inclinação da curva ou função analítica.

4-Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi calculado a partir do desvio padrão de múltiplos brancos e da inclinação da curva analítica, sendo considerado igual a 20 vezes a relação entre os valores (Chan, 2008) (eq. 2).

$$LQ = 10 \cdot \sigma / S \quad (\text{eq. 2})$$

onde σ é o desvio padrão do branco e S é a inclinação da curva ou função analítica.

5- Sensibilidade

A sensibilidade do método foi considerada igual à inclinação da curva analítica, segundo apresentado por Huber (2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da Tabela 1 revelaram que o método de extração empregando metanol durante 1 hora a 60 °C (método número 2), que é também empregado para a quantificação de cafeína, trigonelina e 5 cafeoilquinico, pode ser usado também para extrair a teobromina.

TABELA 1. Resultados obtidos para o teor de teobromina no grão de café cru em diferentes condições de extração

Teste	Condições de Extração	Teobromina (%b.s)
1	100 mg café/50 ml H ₂ O/60 °C/1h	0,124
2	100 mg café/5 ml Metanol 70%/60 °C/1h	0,230
3	100 mg café/50 ml H ₂ O/60 °C/30 min	0,156
4	100 mg café/10 ml H ₂ O/60 °C/30 min	0,177
5	100 mg café/10 ml H ₂ O/60 °C/1 h	0,172
6	100 mg café/5 ml Metanol 70%/60 °C/30 min.	0,221
7	100 mg café/50 ml H ₂ O/80 °C/30 min	0,211
8	100 mg café/50 ml H ₂ O/80 °C/80°C/30 min	0,222
9	100 mg café/10 ml H ₂ O/80 °C/30 min	0,230
10	100 mg café/5 ml Metanol 70%/80°C/30 min	0,209

Na Figura 1 tem-se um cromatograma com identificação do pico de teobromina

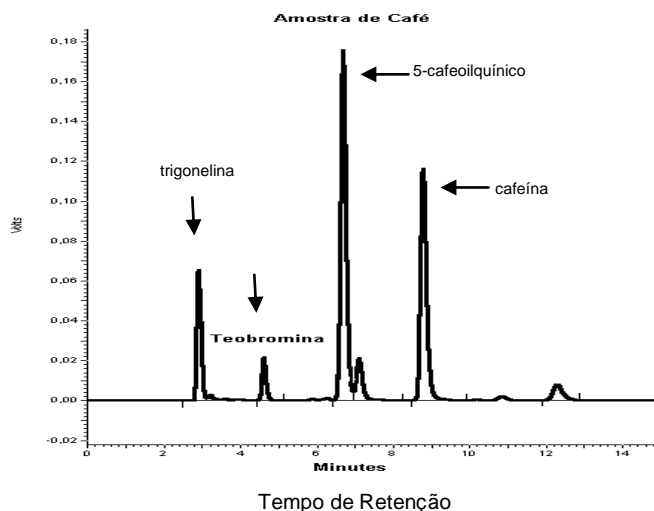


FIGURA 1 Cromatograma típico de um extrato metanólico de café cru analisado pela metodologia proposta

Repetitividade

De acordo com Chan (2008), uma maneira de se determinar a repetitividade é através do desvio padrão relativo (RSD) e do intervalo de confiança de 6 repetições de análise de uma mesma amostra. Usando esse método, a precisão é 1,6459% e intervalo de confiança 0,0018 (Tabela 2).

De acordo com Huber (2011), o valor de Desvio Padrão Relativo igual a 1,6459% indica que a repetitividade excelente.

TABELA 2- Valores calculados para o Coeficiente de Variação e Intervalo de Confiança da determinação da concentração de teobromina

Número da Repetição	Teobromina* ppm	Média ppm	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)	Intervalo de Confiança
1	2,424	2,436	0,061	1,6459	0,0018
2	2,412				
3	2,430				
4	2,521				
5	2,484				
6	2,346				

*no extrato

3- Linearidade

3.a. Linearidade da função calibração

A linearidade da função de calibração foi confirmada para toda a faixa de concentração testada, compreendida entre 0 e 200 µg/mL (ppm). A equação da função de calibração obtida foi: $y=67049x+46761$ $R^2=0,9991$, que representa a reta média da Figura 2.

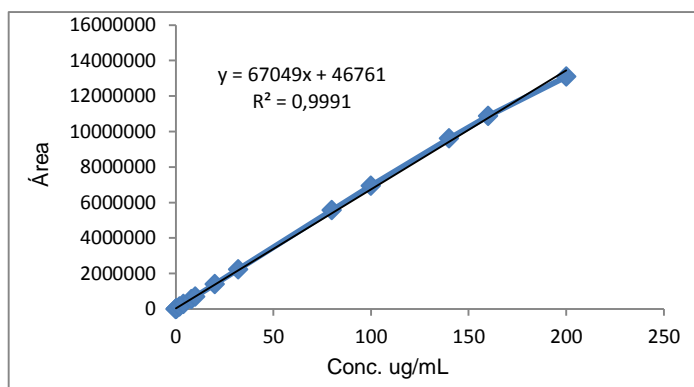


FIGURA 2 Curva de calibração de solução padrão de teobromina

3b. Linearidade da função analítica

A linearidade da curva analítica (ou função analítica) foi confirmada para toda a faixa de concentração testada, ou seja, entre 0 e 5,297 µg/mL (diluições 1:5, 1:10, 1:15 e 1:20) e a equação que a representa é $Y=66743x - 11 \cdot 10^{-6}$ $R^2=1$ (Fig.3)

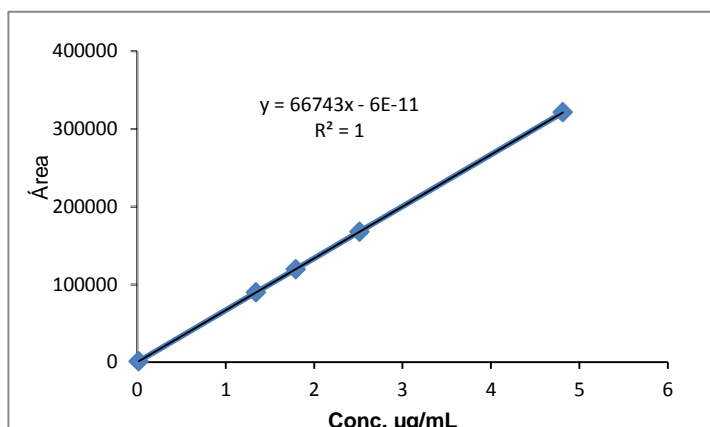


FIGURA 3 Curva analítica para a concentração de teobromina em grão de café

4- Limite de Detecção

Os resultados para as áreas dos brancos de reagentes são mostradas na Tabela 3.

Sendo o desvio padrão dos brancos igual a 208,6632 e o coeficiente angular da curva analítica igual a 66743, de acordo com a equação 1, o valor do limite de detecção é igual a 0,0093 µg/ml.

Em termos práticos de avaliação dos cromatogramas enquanto a amostra está em análise, é mais interessante empregar como limite de detecção aquela definida por Huber (2008), que é a quantidade injetada que resulta num pico de altura igual a pelo menos 2 ou 3 vezes a altura do ruído da linha de base, neste caso igual a 0,0003 Volt. A Figura 4 é o cromatograma da segunda injeção do branco de reagentes.

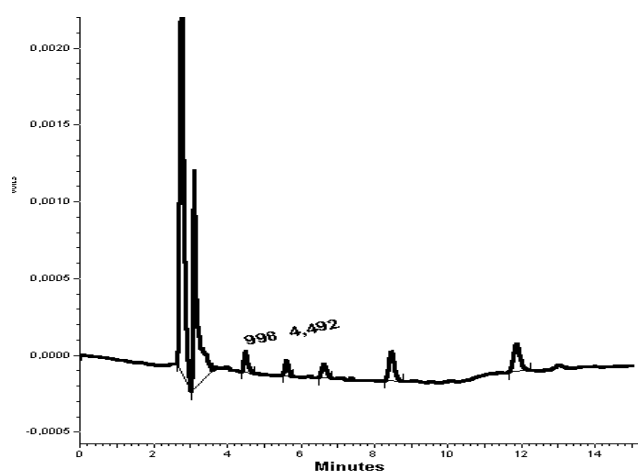


FIGURA 4. Cromatograma típico de branco de reagentes

Um dos fatores que podem ter contribuído para a diferença das áreas dos brancos é o momento em que a amostra foi analisada. A injeção 2 foi feita logo após a limpeza da coluna com metanol a 70%, e as outras duas injeções foram feitas na sequência de uma série de análises.

TABELA 3 Resultados relativos à análise do branco de reagentes em triplicata.

Replicata	Teobromina	Área	Média (área)	DesvPad
1	extração	1018		
2	injeção	998	1128,33	208,66
3	injeção	1369		

4- Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação é a menor quantidade de analito na matriz que pode ser quantificada com precisão aceitável. Normalmente, é a concentração que dá altura de pico 10 a 20 vezes maior do que a do ruído (Huber, 2011).

Segundo Chan (2008), o Limite de Quantificação é determinado comparando sinais de amostras de concentração conhecida com o sinal de branco, e é a quantidade que resulta em 10 vezes o sinal do ruído do *background noise*. Ainda, de acordo o autor, o Limite de Quantificação pode ser calculado como $10 \times \text{desvpad}$ do branco/inclinação da curva analítica, conforme a equação 2. Portanto, o valor é igual a 0,031 µg/ml.

5- Sensibilidade

Huber (2011) definiu que a Sensibilidade é a capacidade do método discriminar pequenas diferenças de concentração do analito, sendo igual ao coeficiente angular da curva analítica. Por essa definição a sensibilidade do método é de 66743 unidades de área/unidade de concentração de teobromina na amostra. Por essa definição, quanto maior o valor numérico da sensibilidade mais sensível será o método, ou seja, maior será a diferença entre as áreas de duas concentrações diferentes quaisquer.

CONCLUSÃO

O método definido validado tem ótima performance para quantificação de teobromina em amostras de grão de café cru e ademais há forte indicação de que possa ser empregado para quantificação simultânea de teobromina, trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico e cafeína.

AGRADECIMENTOS

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pela Bolsa
Ao IAC pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chan, C. C. **Pharmaceutical Manufacturing Handbook**: Cap. 8,pg. 727-742, 2008.
Huber, L. <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx> 10/11/2011.
Leite, F. **Validação em Análise Química**. Ed. Átomo, 2002
Ribani,,M. et al. **Quím. Nova** 27(5):771-789, 2004