



Determinação de cafeína em chá preto (*Camellia sinensis*) por cromatografia líquida de alta eficiência

Cristiane de Moura¹ Barbara Arruda Nogueira² Rafaéla Candido Oliveira da Silva³
Ricardo Guz⁴ Tatiane Luiza Cadorn Oldoni⁵

07 abr. 2015

Resumo – A cafeína é um composto que ocorre naturalmente em muitos alimentos e bebidas consumidos diariamente, sendo encontrada em grande quantidade nas sementes de café (*Coffea* sp.) e nas folhas de chá (*Camellia sinensis*). Dentre as bebidas energéticas, o chá é uma das mais populares do mundo, devido a seu aroma e sabor agradáveis e também a seus efeitos sobre a saúde. Existe um crescente interesse em identificar as fontes e níveis de cafeína em alimentos e bebidas comercialmente disponíveis, como variedades de chá, pois os limites de tolerância para cafeína podem variar de acordo com o indivíduo que a ingere, deste modo, torna-se necessário o conhecimento da quantidade contida nestes produtos. Os objetivos deste estudo foram determinar o teor de cafeína em amostras de chá preto comerciais, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e avaliar a eficiência de dois diferentes métodos para a purificação da cafeína, extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (SPE). O método cromatográfico utilizado mostrou-se simples, econômico, exato e preciso para a determinação de cafeína em chá preto. O método de ELL foi mais eficiente, apresentando boa eficiência, seletividade e resolução. O método SPE não eliminou todos os interferentes, apresentando menor concentração de cafeína.

Palavras-chave: validação. SPE. extração.

1. INTRODUÇÃO

A cafeína é um alcaloide identificado como 1,3,7-trimetilxantina (Figura 1), pertencente a uma classe de compostos de ocorrência natural chamada xantina. Possivelmente, as xantinas são os estimulantes mais antigos conhecidos sendo que, neste contexto, a cafeína é um dos mais potentes (MARIA e

MOREIRA, 2007; BRENELLI, 2003).

A cafeína é um composto que ocorre naturalmente em muitos alimentos e bebidas consumidos diariamente, sendo encontrada em grande quantidade nas sementes de café (*Coffea* sp.) e nas folhas de chá (*Camellia sinensis*). Também pode ser encontrada em outros produtos vegetais, particularmente no cacau (*Theobroma cocoa*), no guaraná (*Paullinia cupana*) e

¹ tiane.moura@hotmail.com, UTFPR Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Brasil.

² UTFPR Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Brasil.

³ UTFPR Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Brasil.

⁴ UTFPR Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Brasil.

⁵ UTFPR Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Brasil.



na erva-mate (*Ilex paraguayensis*). A ingestão da cafeína data de muitos séculos e atualmente ela é a droga mais comumente ingerida em todo o mundo (MARIA; MOREIRA, 2007); (MELLO; KUNZLER; FARAH, 2007).

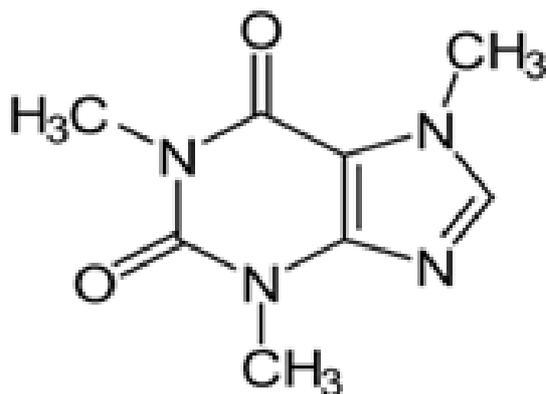


Figura 01 – Fórmula estrutural da cafeína (BRENELLI, 2003).

Esta substância exerce efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, músculos cardíacos, sistema respiratório, circulação sanguínea, liberação de adrenalina e secreção de ácido gástrico. Também é considerada como um diurético fraco e relaxante muscular (MELLO; KUNZLER; FARAH, 2007); (SOUSA et al., 2010). Aumenta a capacidade de alerta e melhora o desempenho de atividades que exijam atenção (MARIA, MOREIRA, 2007).

A cafeína é um dos principais ingredientes das bebidas energéticas, os quais são denominados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como “composto líquido pronto para consumo”, e são fiscalizados, dentre outros fatores, segundo o teor de cafeína, o qual não deve ultrapassar 350 mg/L (BRASIL, 1998).

Dentre as bebidas energéticas, o chá é uma das mais populares do mundo, devido a seu aroma e sabor agradáveis e também a seus efeitos sobre a saúde. A teobromina, teofilina e cafeína são alcaloides da família das metilxantinas, um dos principais grupos constituintes das folhas de chá, sendo a cafeína o mais comum dentre os três.

Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que 80% da população mundial utilizam plantas

medicinais com finalidade terapêutica. O chá (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze- Theaceae) obtido por infusão é a forma mais popular de uso, contribuindo para a prevenção e o tratamento de doenças pela presença de compostos biologicamente ativos, como os polifenóis (PEREIRA et al., 2009).

Os chás de *Camellia sinensis* podem ser classificados em três tipos básicos: preto, verde e oolong, diferenciando-se pelo beneficiamento das folhas. Para o preparo do chá preto, as folhas são fermentadas. Para o preparo do chá verde, as folhas são apenas escaldadas e fervidas para garantir a preservação da cor (NISHIYAMA et al., 2010).

As folhas de *Camellia sinensis* contêm proteínas (15 a 20%), glicídios (5%), ácido ascórbico, vitaminas do complexo B e bases púricas, especialmente cafeína (2 a 4%), polifenóis (30%), monossídeos de flavonóis e flavonas, catequina, epicatequina e galato de epicatequina, além de taninos condensados e hidrolisáveis (PEREIRA et al., 2009).

A composição do chá varia com a espécie, a estação do ano, o clima, a idade da folha, clima (umidade, temperatura, latitude) e condições de cultivo, e a variedade do chá, além disso, as propriedades funcionais são devidas ao seu conteúdo em polifenólicos (NISHIYAMA et al., 2010); (BRARETO; BRAGAGNOLO, 2002).

Os maiores produtores de *Camellia sinensis* são a China e a Índia e os chás provenientes desses países já foram objeto de muitos estudos. O cultivo do chá verde é hoje, entretanto, realizado em diversos países em praticamente todos os continentes. No Brasil o cultivo é restrito ao Vale do Ribeira, em São Paulo, onde a maior parte da colheita é utilizada para a produção de chá preto.

No Ocidente o mais consumido é o chá preto, embora o consumo do chá verde venha crescendo, devido principalmente à divulgação de suas propriedades funcionais (NISHIYAMA et al., 2010). Estudos têm demonstrado que o chá brasileiro apresenta maior quantidade de compostos fenólicos quando comparado com chás de outros países e tal fato é



atribuído às características do clima e do solo (SAITO et al., 2006).

Existe um crescente interesse em identificar as fontes e níveis de cafeína em alimentos e bebidas comercialmente disponíveis, como variedades de chá, pois os limites de tolerância para cafeína podem variar de acordo com o indivíduo que a ingere, deste modo, torna-se necessário o conhecimento da quantidade contida nestes produtos.

Diversos métodos analíticos têm sido utilizados para determinação e quantificação de metilxantinas, como a cafeína, sendo a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a técnica mais comumente usada na separação e quantificação destas substâncias (ARAGÃO et al., 2009).

O desenvolvimento de um método analítico ou a aplicação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência em usos em rotina, denominado validação (ARAGÃO et al., 2009). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera que “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2003).

Os objetivos deste estudo foram determinar a composição de cafeína em amostras de chá preto comerciais, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, validar a metodologia cromatográfica, através dos parâmetros de linearidade, precisão, especificidade, percentual de recuperação, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e avaliar a eficiência de dois diferentes métodos para a extração da cafeína, a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (SPE).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

A amostra de chá preto avaliada neste estudo foi adquirida em comércio local da cidade de Pato Branco - PR. O chá (em sachet) era composto por

folhas e talos de chá preto (*Camellia sinensis*).

2.2. Extração da cafeína

Para a ELL, foi realizado conforme Brenelli (2003) com modificações, inicialmente foram pesados 3 g de chá preto comercial e adicionados 1 g de carbonato de cálcio (CaCO_3) e 50 mL de água destilada. A mistura foi aquecida até a ebulição e mantida em aquecimento, sob agitação contínua, por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, o extrato foi filtrado com auxílio de pressão reduzida. Para purificação da amostra, foi realizada a extração líquido-líquido e extração em fase sólida, ambas em triplicata.

Extração líquido-líquido (ELL)

Ao filtrado foram adicionados 1 g de cloreto de sódio (NaCl) e a solução transferida para um funil de separação sendo acrescentados, em duas etapas, 10 mL de diclorometano e coletando-se a fase orgânica. À fase orgânica foi adicionado 1 g de MgSO_4 anidro para remoção da água.

Finalmente o extrato foi filtrado e todo o solvente eliminado por evaporação. As amostras foram solubilizadas utilizando 2 mL de metanol:água (30:70) e na seqüência foram realizadas diluições de 20 e 50 vezes. Como última etapa, as amostras foram filtradas em *vials* utilizando unidade filtrante PTFE com 0,45 μm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata (BRENELLI, 2003)

Extração em fase sólida (SPE)

Para extração SPE foi realizada conforme Cardoso (2011) com modificações. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi aplicada ao cartucho SPE C_{18} , pré-condicionado com metanol (2 mL) e água destilada (2 mL). O cartucho foi lavado com água (2 x 2 mL), e em seguida o extrato foi eluído com metanol (2 x 500 μL). Na seqüência as amostras foram filtradas utilizando unidade filtrante PTFE 0,45 μm de poro, e acondicionadas em *vials*.



2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Preparação da curva de calibração utilizando o padrão cafeína

Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), primeiramente foi realizada a preparação da curva de calibração, com seis pontos de concentrações para o padrão cafeína, a partir de uma solução estoque de concentração $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram preparados pontos com concentrações que variaram de 10 a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada utilizando um equipamento Varian 920 LC equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) operando em 272 nm. A coluna analítica utilizada era de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) Varian, mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol (solvente B) e água (solvente A) em uma proporção de 30:70 v/v operando em modo isocrático em fluxo de 1 ml.min^{-1} por um tempo total de 20 minutos, o volume de injeção foi de 10 μL e os espectros foram obtidos pelo *Software Galaxie*.

2.4. Validação da metodologia analítica CLAE-DAD

Para garantir a confiabilidade do método analítico utilizado na identificação e quantificação da cafeína, alguns parâmetros de validação foram testados, como linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão.

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em obter respostas diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma designada faixa de aplicação (ICH, 1995). A equação da reta ($y = ax + b$) é a fórmula matemática que relaciona as duas variáveis, concentração e a resposta, sendo indicado no mínimo a injeção de seis pontos em duplicata para garantir a confiabilidade dos

resultados. A linearidade é determinada através dos resultados de regressão linear de uma curva analítica, sendo o valor de 0,9 o mínimo permitido para aceitar a linearidade e quanto mais próximo a 1, mais linear é o método (VAZ et al., 2014).

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD representa a mais baixa concentração do analito em análise na relação ingrediente ativo, ou seja, matriz que pode ser detectada com certa confiabilidade empregando determinado procedimento experimental. O LD é determinado por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes. Porém o LQ expressa a mais baixa concentração que pode ser identificada e quantificada em certa matriz com determinado limite de confiabilidade, geralmente entre 95 e 99% (SCHARTZ e KRULL, 1998; ICH, 1995; INMETRO, 2003).

O LD e LQ são expressos como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser gravadas. Essa metodologia é uma excelente regra a ser seguida, contudo não se deve esquecer que a determinação do LQ significa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão estabelecidas (RIBANI et al., 2004).

Precisão e coeficiente de variação (CV)

A precisão é a determinação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de mesma amostra (ICH, 1995). Esta é considerada em três níveis: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos numa série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, é geralmente expresso como desvio padrão ou desvio padrão relativo (CV). Usualmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV de 1 a 2%. Porém em análises de traços ou impurezas é aceitável CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (HUBER, 1998).



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Curva Padrão e validação do método

Para a quantificação da cafeína foi utilizado o método de calibração externa com a injeção de 6 pontos do padrão cafeína em concentrações que variaram de 10 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabela 1) em triplicata. A partir das áreas dos picos e concentrações do padrão foi plotada a curva de calibração, obtendo-se a equação da reta $y = 0,3466x + 0,8058$, e o R quadrático de 0,9947. A partir desses resultados foi possível determinar a sensibilidade do método, expresso pelo coeficiente angular (inclinação da curva de calibração) de 0,3466.

Com o objetivo de avaliar a precisão do método foi calculado o coeficiente de variação (CV) para a curva de calibração (Tabela 1). O método é considerado preciso em termos de repetibilidade se o coeficiente de variação for inferior a 15% (BUENO, 2000). Foi observado, para todos os pontos da curva de calibração, um CV inferior a 15%. O ponto 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou a maior precisão com um CV calculado menor que 2%.

Tabela 01 – Parâmetros de validação.

Concentração de cafeína ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Média	Precisão	Coefficiente de Variação (%)
10	4,70	0,56	12,03
20	8,00	1,12	14,05
60	21,70	1,87	8,63
80	30,35	3,90	12,85
100	39,70	2,08	5,23
200	69,25	1,23	1,76

Os resultados para sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), obtidos, estão apresentados na Tabela 2. Os LD e LQ calculados revelam uma boa detectabilidade do método na determinação de cafeína nas amostras em estudo.

Tabela 02 – Parâmetros de validação.

LD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Sensibilidade
0,330	1,100	0,347

3.2. Identificação da cafeína

A cafeína foi extraída conforme item 2.2 e na

seqüência, os extratos foram purificados utilizando dois métodos distintos: ELL e SPE. Os extratos purificados foram então injetados no sistema cromatográfico e a partir dos cromatogramas obtidos (Figuras 3 e 4) foi possível identificar a cafeína por comparação do tempo de retenção (aproximadamente 7 minutos) e espectro de absorção com o padrão cafeína (Figuras 5 e 6). O espectro de absorção das amostras foi ainda comparado com a biblioteca do equipamento (software Galaxie), resultando em uma similaridade igual a 99,7% (Figura 6), o que comprova a identidade deste composto nos extratos purificados de chá preto.

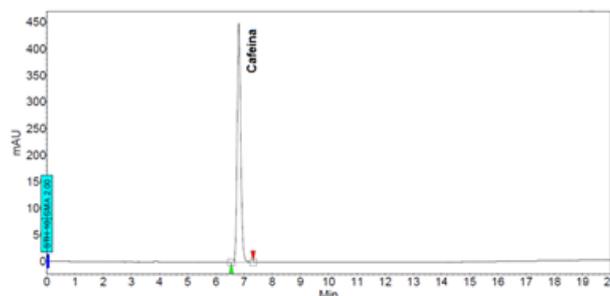


Figura 03 – Cromatograma obtido para o extrato de chá preto purificado pelo procedimento líquido-líquido.

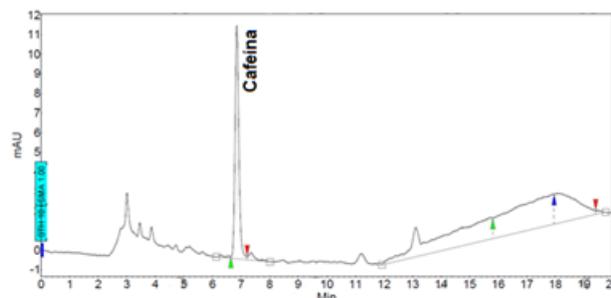


Figura 04 – Cromatograma obtido para o extrato de chá preto purificado pelo procedimento de extração em fase sólida.

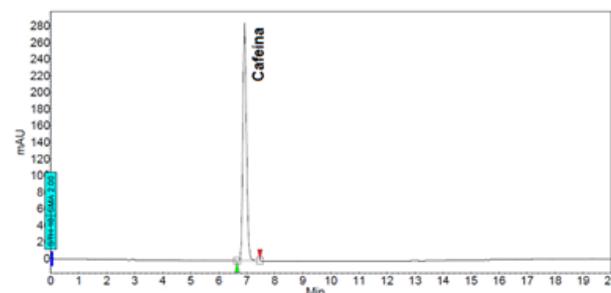


Figura 05 – Cromatograma obtido com padrão de cafeína 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Foi possível concluir que a ELL foi mais eficiente na



extração da cafeína que a SPE. No cromatograma da ELL (Figura 3) é observado apenas um pico, referente à cafeína, indicando que os demais interferentes foram removidos durante o procedimento de purificação resultando em um cromatograma com boa eficiência, seletividade e resolução.

A partir do cromatograma referente à SPE (Figura 4) é possível ver uma oscilação da linha base mais intensa que a ELL, isso ocorreu devido à baixa concentração de cafeína neste extrato, fazendo com que a intensidade do pico fosse baixa e picos referentes a interferentes aparecessem no cromatograma. Entretanto, o pico referente a cafeína está bem delimitado, com uma boa resolução.

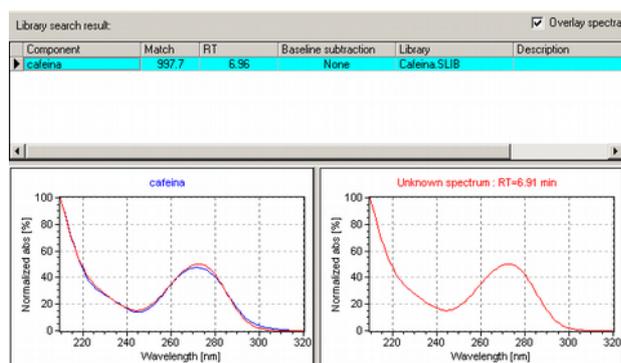


Figura 6 - Comparação do espectro de absorção do padrão cafeína e extrato de chá preto

Figura 06 – Cromatograma Comparação do espectro de absorção do padrão cafeína e extrato de chá preto.

Ambas as técnicas são muito utilizadas na identificação e quantificação de compostos isolados, porém a SPE pode apresentar algumas desvantagens em relação a ELL, como o tempo elevado de análise, alto custo do cartucho além de serem utilizados apenas uma vez e também a baixa reprodutibilidade. Outro importante aspecto é a dificuldade de selecionar o solvente adequado para a dessorção do analito, como pode ter ocorrido em relação a baixa quantificação na extração da cafeína (JARDIM, 2010).

3.3. Quantificação da cafeína em chá preto

O teor de cafeína quantificado pela técnica SPE foi de $5,98 \text{ mg} \cdot 100^{-1}$ de chá, enquanto que a ELL a concentração de cafeína foi de $217,18 \text{ mg} \cdot 100^{-1}$ de

chá. Pelo teste t, é possível afirmar a diferença significativa entre as amostras, sendo a ELL a mais eficiente.

Analizando as duas metodologias de purificação, pode-se verificar uma maior eficiência na purificação da amostra no método ELL, uma vez que, um único pico foi observado na CLAE. Na técnica SPE pode ter ocorrido a adsorção da cafeína pelas partículas sólidas da coluna, o que diminuiu a concentração de cafeína e aumentou consideravelmente a interferência de analitos indesejáveis para esta análise.

Tabela 03 – Concentração de cafeína em chá preto.

Extrações	Concentração de cafeína (mg.100g ⁻¹ de chá)
SPE	$5,98 \pm 0,89^a$
Líquido - líquido	$271,18 \pm 8,7^b$

*Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras.

Alves e Bragagnolo (2002) encontraram concentrações de cafeína em chá preto, cujos valores variam de $2,41$ a $2,61 \text{ g} \cdot 100^{-1}$. Valores variando de $0,76$ a $1,74 \text{ g} \cdot 100^{-1}$, foram obtidos por Camargo et al., (1999) em chá preto.

Wang et al. (2011), utilizaram o método de extração assistida por microondas dinâmico (DMAE) acoplado em linha com limpeza para determinação da cafeína em chás, encontraram concentração de $70,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, para o chá preto. Rahim et al. (2014) utilizaram o mesmo método de extração que Wang et al. (2011) para determinação da cafeína em chás, e encontraram uma concentração média de $64,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ para o chá preto.

4. CONCLUSÃO

O método cromatográfico utilizado mostrou-se simples, econômico, exato e preciso para a determinação de cafeína em chá preto. O método de purificação ELL foi mais eficiente, apresentando bons resultados quanto a eficiência, seletividade e resolução. O método de extração líquido-sólido não eliminou todos os interferentes, apresentando baixa concentração de cafeína.

A validação deve garantir que o método atenda às



exigências das aplicações analíticas, no presente estudo os parâmetros avaliados como precisão, coeficiente de variação, LD, LQ e sensibilidade demonstraram a eficiência do método e a confiabilidade dos resultados obtidos.

Agradecimento

Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos (PPGTP), Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Central de Análises e ao professor Marcio Barreto Rodrigues pelo apoio prestado na realização deste trabalho.

Determination of caffeine in black tea (*Camellia sinensis*) for high performance liquid chromatography

Abstract – Caffeine is a compound that occurs naturally in many foods and drinks that we consume daily, found in large quantities in the seeds of coffee (*Coffea* sp.) and tea leaves (*Camellia sinensis*). Among energy drinks, tea is one of the most popular in the world due to its pleasant aroma and taste, and also their effects on health. There is a growing interest in identifying the sources and levels of caffeine in foods and beverages commercially available, such as tea varieties, as the tolerance limits for caffeine may vary according to the individual who ingests thus becomes necessary to knowledge of the amount contained in these products. The objectives of this study were to determine the composition of caffeine in samples of commercial black tea, using High Performance Liquid Chromatography and assessing the effectiveness of two different methods for extraction of caffeine, liquid-liquid extraction (ELL) and solid phase extraction (SPE). The chromatographic method proved to be simple, economical, accurate and precise for the determination of caffeine in black tea. The method ELL was more efficient, having a good efficiency, good selectivity and good resolution. The SPE method does not eliminate all interfering, and low concentration of caffeine.

Keywords: validation. SPE. extraction.

REFERÊNCIAS

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

ALVES, S. T. et al. Metodologia para Análise Simultânea de Ácido Nicotínico, Trigonelina, Ácido Clorogênico e Cafeína em Café Torrado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, v. 29, n. 6, 2006.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise – Um Experimento de Fácil Aplicação Utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e os Princípios da “Química Verde” na Determinação de Metilxantinas em Bebidas. **Química Nova**. v. 32, n. 9, 2009.

BARRETO, A. A.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**. v. 38, n. 2, abr./jun., 2002.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); **Resolução RE nº 899, de 29/05/2003**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acessado em: 18 NOV. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RE nº 899, 19 de março de 2002**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 de Maio de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); **Portaria n. 868, de 3 de novembro de 1998**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0c524f8047457b1987f5d73fbc4c6735/PORTARIA_868_1998.pdf?MOD=AJPERES> Acessado em: 02 jun. 2014.

BRENELLI, E. C. S. A Extração de Cafeína em Bebidas Estimulantes – Uma Nova Abordagem para um Experimento Clássico em Química Orgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 1, Niterói,



2003.

BUENO, P. C. P. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus globulus* e seus produtos**: planta desidratada, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

CAMARGO, M. C. R. DE; TOLEDO, M. C. F. HPLC determination of caffeine in tea, chocolate products and carbonated beverages. **Journal Science Food Agriculture**, v. 79, p. 1861–1864, 1999.

CARDOSO, L. V. **Otimização e validação de método empregando SPE e LC-APCI-MS/MS para determinação de fármacos em água de superfície e de abastecimento público**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química). Escola de química e alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2011.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova** v. 30, n. 1, São Paulo, 2007.

FIGUEIREDO, T. M. P. **Validação de métodos analíticos**: Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar. 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Coimbra. 2012.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia. **DOQ-CGCRE-008 – Revisão 1**. Orientações sobre validação de Métodos de Ensaio Químicos, 2003.

JARDIM, I. C. S. F. **Extração em Fase Sólida**: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica*. v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

MELLO, D.; KUNZLER, D. K.; FARAH, M. A. Cafeína E Seu Efeito Ergogênico. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 2, p. 30–37, São Paulo, mar./abr. 2007.

NISHIYAMA, M. F. et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos

e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30 (Supl.1): 191–196, maio 2010.

PEREIRA, A. V. et al. Determinação de Compostos Fenólicos em Amostras Comerciais de Chás verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Acta Scientiarum**. Health Sciences. v. 31, n. 2, p. 119–124, Maringá, 2009.

RAHIM, A. A.; NOFRIZAL, S.; BAHRUDDIN SAAD. Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. **Food Chemistry**. v. 147, p. 262–268, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004.

SAITO, S. T.; WELZEL, A.; SUYENAGA, E. S.; BUENO, F. A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 394–400. Campinas, 2006.

SCWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Tecnologia Farmacêutica**. v. 2, n. 3, p. 12–20, 1998.

SOUSA, S. A. et al. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacologia**. p. 866–870, dez. 2010.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

Validation of Analytical Procedures: Methodology. **ICH Harmonised Tripartite Guideline**. International Conference on Harmonisation (ICH), 1995.

WANG, H.; CHEN, L.; XU, Y.; ZENG, Q.; ZHANG, X.; ZHAO, Q.; DING, L. Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with clean-up for determination of caffeine in tea. **Food Science and Technology**. v. 44. p. 1490–1495, 2011.



Correspondência:

Cristiane De Moura

tiane.moura@hotmail.com, UTFPR Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Brasil.

Recebido: 30/07/2014

Aprovado: 07/04/2015

Como citar: MOURA, Cristiane de; NOGUEIRA, Barbara Arruda; SILVA, Rafaéla Candido Oliveira da; GUZ, (NBR 6023) Ricardo; OLDONI, Tatiane Luiza Cadorin. Determinação de cafeína em chá preto (*Camellia sinensis*) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Syn. Scy. UTFPR**, Pato Branco, v. 10, n. 1, p. 99–107, jan./mar. 2015. ISSN 2316-4689 (Eletrônico). Artigos convidados da SIMTEQ 2014, Pato Branco-PR. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/synscy>>. Acesso em: DD mmm. AAAA.

DOI: “em processo de registro”

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.