



Determinação de cafeína em chá preto (*Camellia sinensis*) por métodos cromatográficos: CCD, CLAE-DAD e CG-EM

Anaclara Prasniewski¹ Leticia Magalhães de Aguiar² Tatiane Luiza Cadorin Oldoni³

07 abr. 2015

Resumo – O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo e preparada através da infusão de folhas e raízes de plantas. A planta *Camellia sinensis* (L.) Kutntze é cultivada em diversos países e comercializada principalmente na forma de chá preto, verde e oolong. Possui em sua composição diversas classes químicas, dentre as quais se destacam as xantinas. Atualmente existem diversas metodologias para determinação desta classe de compostos em extratos. Dentro deste contexto, os objetivos deste estudo foram extrair, identificar e quantificar cafeína em chá preto, utilizando três técnicas cromatográficas, a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). A extração foi realizada utilizando água e para a purificação do extrato utilizou-se o método de partição líquido-líquido com solvente orgânico. O extrato purificado foi primeiramente analisado utilizando a técnica CCD, com fase móvel composta por diclorometano e etanol (90:10 v/v) e fase estacionária sílica gel. Os fatores de retenção calculados para a amostra e padrão de cafeína foram 0,87 e 0,86 respectivamente, sendo este um indicativo da presença de cafeína no extrato. Para a quantificação desta xantina, o extrato foi analisado pela técnica CLAE-DAD utilizando como F.M metanol e água (30:70 v/v) e como F.E coluna C18-FR. O teor de cafeína quantificado foi 0,37% ± 0,050. Pela técnica de CG-EM também foi possível identificar cafeína no extrato por comparação dos tempos de retenção e padrão de fragmentação com padrão autêntico e biblioteca NIST.

Palavras-chave: cafeína. chá preto. extração. purificação. fragmentação.

1. INTRODUÇÃO

Pertencente ao grupo das xantinas, a cafeína identificada como 1,3,7-trimetilxantina é encontrada na natureza em mais de sessenta espécies vegetais (MAZZAFERA et al., 1996). Entre as espécies mais conhecidas estão as sementes de café (*Coffea arabica*)

e as folhas de chá preto (*Camellia sinenses* (L.) O. Kutntze) (GRAHAM, 1992), de erva-mate (*Ilex paraguayensis*) e em vegetais como cacau (*Theobroma cocoa*) e guaraná (*Paullinia cupana*) (BRENELLI, 2003).

A cafeína apresenta ação farmacológica variada

1 anaclaraprasniewski@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.



provocando, dentre outros efeitos, alterações no sistema nervoso central e sistema cardiovascular (DE MARIA et al., 2014), seu consumo deve ser moderado, pois em excesso pode levar à dependência. Seu teor em chás pode variar em função da espécie utilizada, idade das folhas, clima e condições de cultivo (BORTOLINI et al., 2010).

O chá preto é preparado a partir de folhas secas e trituradas, e os compostos presentes nestas folhas são muito importantes para o desenvolvimento de cor e sabor da bebida (MATSUBARA et al., 2006). Dentre os compostos fenólicos presentes, destacam-se as catequinas, que sofrem oxidação durante o processamento dando origem a teaflavinas e tearubiginas (GRAHAM, 1992; SILVA, et al., 2010) sendo estes os componentes que diferenciam o chá preto dos demais. Existem inúmeras técnicas para extração, purificação, identificação e quantificação da cafeína, dentre estes, os métodos cromatográficos destacam-se por serem considerados métodos seletivos e com elevada sensibilidade, permitindo a separação de compostos em misturas complexas (HOLLER, et al., 2009).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica simples e barata de separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada adsorvente retida sobre uma superfície plana (BRAGA, et al., 2006). Este processo de separação está fundamentado, principalmente no fenômeno de adsorção, onde as moléculas de um líquido (fase móvel) unem-se à superfície do adsorvente (fase estacionária – sólida) onde estará inserida a amostra, por ação da capilaridade a FM migrará através da FE sendo este processo denominado “eluição”. A interação da amostra com as fases será determinada pela distância de eluição da amostra (NETO, 2003).

Enquanto a CCD é classificada como uma técnica planar, a CLAE é um tipo de cromatografia líquida que ocorre em colunas recheadas preenchidas com materiais previamente preparados e uma fase móvel líquida que é eluída sob altas pressões. Essa técnica é capaz de realizar separações e análises quantitativas

de uma grande variedade de compostos em diversos tipos de amostras (BRAGA, et al., 2006). Ela pode atuar na forma FASE REVERSA (quando a fase estacionária é apolar ou possui baixa polaridade) e em FASE NORMAL (quando a fase estacionária é polar). Sendo o modo fase reversa responsável pela maioria das aplicações atuais da técnica.

Apesar de a técnica de cromatografia gasosa também ser realizada em coluna, a principal diferença quando comparada com a cromatografia líquida é a utilização de fase móvel na forma gasosa, em função disso, as amostras a serem analisadas por essa técnica devem ser volatilizáveis e termicamente estáveis. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre FE (sólida ou líquida) e FM (gasosa). Essa técnica possui excelente resolução, tornando possível, muitas vezes análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra (BRAGA, et al., 2006).

Acoplada a técnica de CG tem-se atualmente a técnica de espectrometria de massas, muito utilizada para identificar os elementos presentes na amostra, caracterizando as moléculas pela relação massa/carga (m/z) de seus íons, podendo até mesmo discriminar a massa dos isótopos da molécula de interesse (HOLLER, et al., 2009).

Dentro deste contexto, este estudo teve como principais objetivos extrair, purificar, identificar e quantificar a cafeína presente em amostras de chá preto (*Cammelia sinensis* (L.) Kutntze), utilizando diferentes técnicas cromatográficas, CCD, CLAE-DAD e CG-EM.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração e purificação de cafeína a partir de amostras de chá preto

Amostras de chá preto de três lotes diferentes foram adquiridas no comércio local de Pato Branco-PR. Para a extração de cafeína foram pesados 3 g de amostra e adicionados 50 mL de água destilada. A mistura foi levada à ebulição em bico de bunsen e mantida por 10 min sob agitação constante. Na



sequência, o extrato foi resfriado e filtrado. Para a purificação do extrato obtido, foi utilizado o método de partição líquido-líquido com uma mistura de diclorometano e isopropanol (3:1 v/v). A extração foi realizada em funil de separação e repetida três vezes com adições de volumes de 10 mL em cada etapa. As frações orgânicas recolhidas foram combinadas e evaporadas para a realização das análises em CLAE e CG-EM. A extração foi realizada em triplicata.

2.2. Cromatografia de camada delgada (CCD)

Para o desenvolvimento da CCD foi utilizada placa cromatográfica de gel de sílica 60 com 0,2 mm de espessura e fluorescência em 240 nm. A fase móvel foi uma mistura de diclorometano/etanol 9:1 v/v. Para a aplicação das amostras e padrão de cafeína (1%) foram utilizados capilares de vidro. Na sequência foi realizado o desenvolvimento da cromatografia planar em cuba de vidro previamente saturada e após a eluição, as placas foram reveladas utilizando o revelador físico, luz ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm. Para a identificação da cafeína foram calculados os valores de retenção (R_f) para padrão e amostra utilizando a equação 1.

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela mancha}}{\text{distância percorrida pelo eluente}} \quad (1)$$

2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a análise utilizando a técnica CLAE o extrato foi concentrado eliminando-se completamente o solvente orgânico. Em seguida, o extrato foi dissolvido com 2 mL de metanol e diluído 20 vezes com o mesmo solvente utilizado como fase móvel e filtrado, para a eliminação de possíveis impurezas que poderiam interferir nos resultados, a amostra diluída foi filtrada diretamente em vial utilizando filtro de PTFE com 0,45 μm de poro e 22 mm de diâmetro. A fase móvel foi previamente desgaseificada com o auxílio de ultrassom e vácuo.

A análise foi realizada com equipamento CLAE Varian 920 LC operando em modo isocrático com fase móvel (FM) constituída de metanol e água ultra pura (30:70 v/v) e fase estacionária: coluna C_{18} fase reversa (250 mm; 4,6 mm; 0,5 μm), com detector de arranjo de diodos, operando em λ 272 nm e volume de injeção 10 μL , em fluxo de 1 mL min^{-1} com tempo de corrida total de 20 min e temperatura de coluna de 30 $^{\circ}\text{C}$.

Para o procedimento de quantificação foi realizada a padronização externa com padrão de cafeína em concentrações de 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

O cromatograma e o espectro de massas da cafeína foram obtidos pela injeção de 1 μL de amostra e padrão cafeína no equipamento Varian CG 410 e EM 210 no modo splitless. O gás de arraste utilizado foi Hélio 5.0 e a Fase estacionária uma DBS-5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano). A temperatura do injetor foi de 250 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura da coluna inicial de 80 $^{\circ}\text{C}$, com rampa de 30 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$. Para a análise de massa foi utilizado o analisador do tipo íon trap com fonte de ionização operando em 70 eV e a faixa de massa analisada foi de 40 a 600 (m/z).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cafeína (Figura 1) foi extraída com água destilada e na sequência a amostra foi purificada pelo método de partição líquido-líquido utilizando diclorometano. Moreira et al. (2014) concluiu que, entre os vários solventes testados para extração da cafeína, os que apresentaram maior recuperação foram soluções contendo mais de 50% de diclorometano ou solução com diclorometano puro. A cafeína apresenta maior afinidade pelo solvente orgânico (diclorometano) do que pelo solvente polar (água), desta forma, no funil de separação haverá uma mistura imiscível de duas fases, uma fase aquosa e outra (fase orgânica) contendo a cafeína. A diferença de densidade entre o solvente orgânico e a água, fará com que a fase orgânica se deposite na parte inferior do funil, assim,



o analito é purificado, tornando essa diferença de polaridade um facilitador no processo de purificação desta xantina.

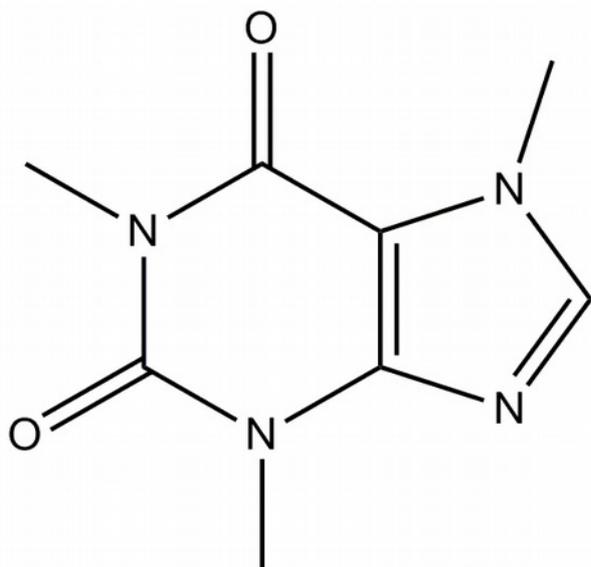


Figura 01 – Fórmula estrutural da cafeína.

3.1. Cromatografia de camada delgada (CCD)

Após as etapas de extração e purificação o extrato foi analisado utilizando a técnica de CCD. O princípio desta técnica está baseado no mecanismo de adsorção. Quando a fase móvel elui pela fase estacionária, por capilaridade, interage com as amostras e o padrão presentes na F.E. A separação irá ocorrer em função das diferentes interações que ocorrerão entre F.E, F.M e analitos. Em função da polaridade o analito apresentou maior afinidade com a F.M, pois, este é menos polar que a F.E, gerando um deslocamento característico dessa interação na eluição.

Utilizando a revelação física, radiação ultravioleta, foi possível a visualização das bandas formadas pela separação dos componentes na amostra e padrão (Figura 2), possibilitando a medida e cálculo dos fatores de retenção (Rf). Os Rfs calculados foram 0,87 e 0,86 para amostra e padrão de cafeína respectivamente com 1,45% de erro experimental. Esse valor elevado para o fator de retenção indica que o analito não foi fortemente adsorvido na superfície das partículas sólidas da F.E., mostrando maior

afinidade pela fase móvel. Essa diferença de interação pode ser explicada pelo fato da fase móvel ser mais apolar que a fase estacionária.

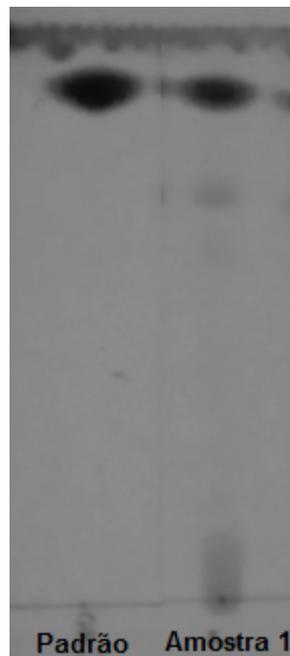


Figura 02 – Revelação CCD.

3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após a injeção do padrão cafeína no sistema cromatográfico foi observado um pico característico com um tempo de retenção de aproximadamente 7 minutos (Figura 3). O cromatograma gerado para o extrato (Figura 4) apresentou boa resolução e seletividade, comprovando a adequação do método aos objetivos do trabalho. Também foi observado pico cromatográfico com um tempo de retenção próximo ao padrão cafeína, indicando novamente a presença deste composto na amostra.

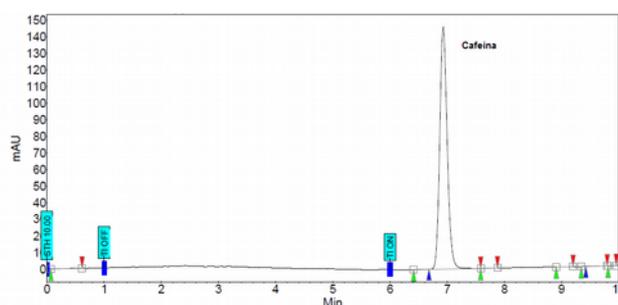


Figura 03 – Cromatograma do padrão cafeína obtido por CLAE.

Através da sobreposição dos cromatogramas do



padrão e do extrato de chá preto (Figura 5) foi comprovada a proximidade entre os tempos de retenção da amostra e padrão cafeína. Além da comparação do tempo de retenção, foi comparado o espectro de absorção do pico em estudo com aquele do padrão cafeína e da biblioteca do equipamento (*software Galaxie*) (Figura 6), resultando em uma similaridade igual a 99,7%, o que comprova a identificação deste composto no extrato de chá preto.

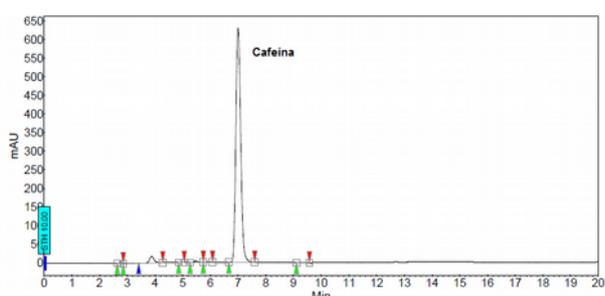


Figura 04 – Cromatograma extrato de chá preto obtido por CLAE.

Por se tratar de uma coluna de fase reversa a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária, isso fará com que a cafeína tenha mais afinidade com a F.E, resultando um tempo de retenção maior para que ocorra a separação.

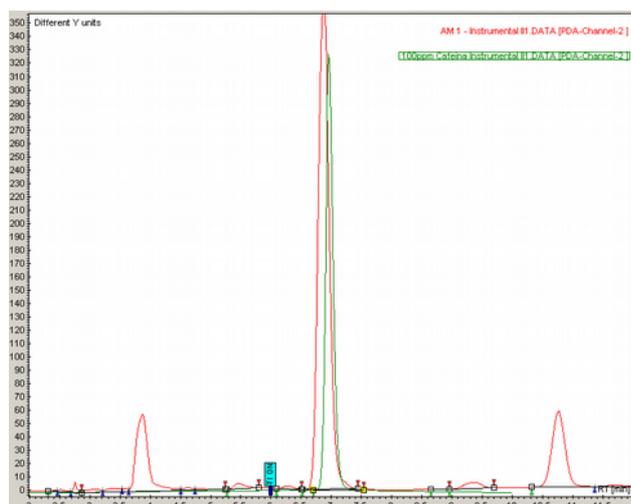


Figura 05 – Cromatogramas sobrepostos do extrato de chá preto e do padrão cafeína.

Para a quantificação da cafeína foi plotada a curva de calibração, obtendo-se assim a equação da reta ($y = 0,488x - 2,044$). A partir da equação gerada foi possível calcular as porcentagens de cafeína nas

amostras (Tabela 1).

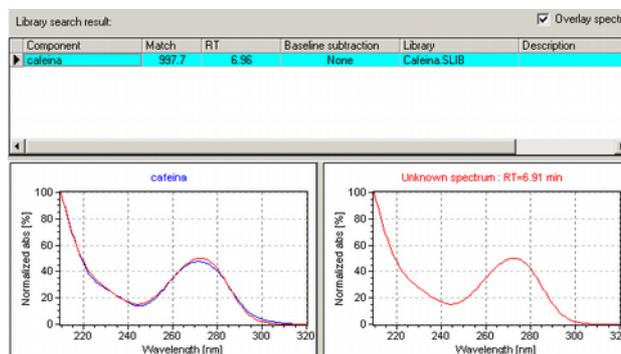


Figura 06 – Absorção característica do padrão cafeína. Varredura realizada entre 210 e 350nm.

Tabela 01 – Porcentagem e desvio padrão de cafeína em Chá preto.

Amostras de chá	Massa (g)	Área da amostra (mAu.min)	% de cafeína
Amostra 1	3,0016	127,1	0,35%
Amostra 2	3,0022	115,1	0,32%
Amostra 3	3,0083	158,5	0,44%
Média			0,37
Desvio padrão (σ)			0,050

Os teores de cafeína nas amostras variaram de 0,35 - 0,44 g . 100 g⁻¹ (0,37 ± 0,050%) Brenelli (2003), quantificou a cafeína em folhas de chá preto obtendo teores iguais a 2,1% de cafeína, porém, a procedência da amostra utilizada em seus estudos diferencia de amostras industrializadas, explicando a diferença de concentrações obtidas. Segundo Bortolini et al. (2010) a quantidade obtida de cafeína na análise foi de 2,99 ± 0,01% em chá preto e também Alves et al. (2002) quantificou quantidades de 2,405%, 2,612% e 2,450%. Observa-se que os resultados apresentaram diferenças significativas entre si, isso pode estar relacionado a alguns fatores como o local de cultivo, época de colheita e a localização da folha da planta (BRENELLI, 2003).

3.3. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG- EM)

Avaliando os cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia gasosa, observa-se que o pico correspondente à cafeína, tanto para o padrão quanto para os extratos apresentou tempo de retenção de aproximadamente 7,5 min (Figuras 7 e 8). Os



cromatogramas apresentaram boa resolução e seletividade e não houve sobreposição de picos, indicando novamente a completa separação dos componentes da amostra, além de indicar eficiência do procedimento de extração e purificação do analito de interesse.

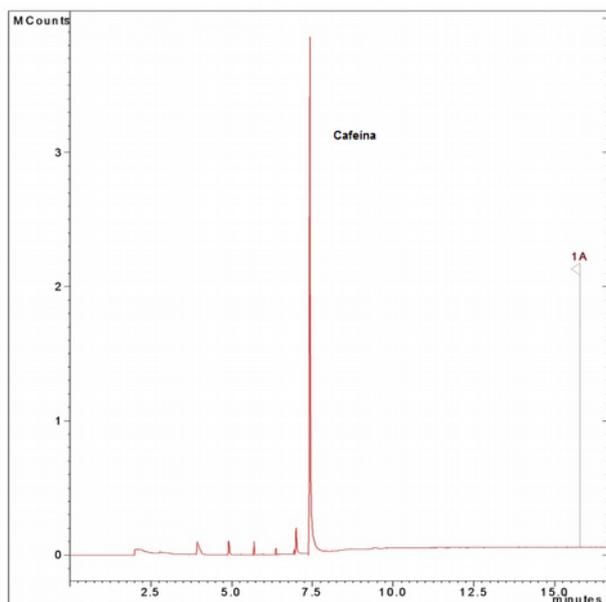


Figura 07 – Cromatograma do Padrão cafeína (CG).

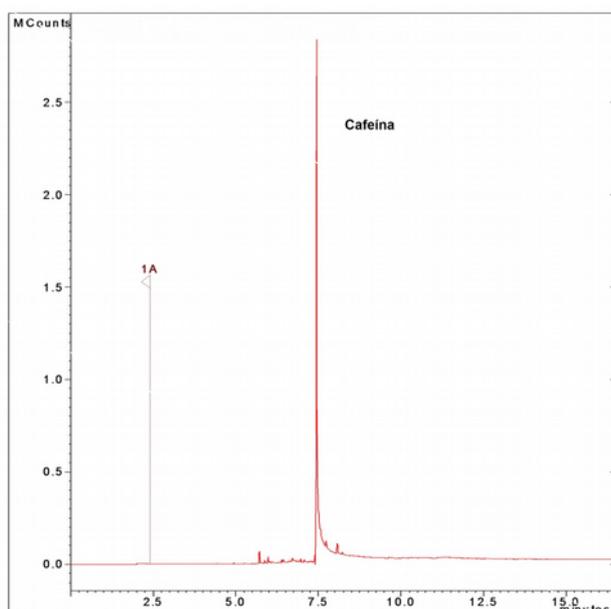


Figura 08 – Cromatograma extrato de chá preto (CG).

Com a técnica de espectrometria de massas, foi possível identificar com maior confiabilidade a cafeína

nas amostras. Foi realizada a comparação do padrão de fragmentação do padrão de cafeína e dos extratos com os da biblioteca NIST. A introdução da amostra no espectrômetro de massas é realizada a partir do cromatógrafo a gás, desta forma, os compostos previamente separados são introduzidos no sistema e ocorre a análise individual destes, o que garante maior pureza dos espectros gerados.

O espectro do padrão (Figura 9) apresentou 60% de probabilidade de ser cafeína quando comparado à biblioteca NIST. O espectro obtido a partir da fragmentação do analito cafeína a partir do extrato de chá preto (Figura 10) também foi submetido à comparação com a biblioteca NIST, o que permitiu a comparação com o banco de dados. Avaliando as Figuras 9 e 10, foi possível encontrar fragmentações com mesmo sinal de razão m/z para o padrão cafeína e o extrato. Nos espectros o pico do íon molecular e pico base foram identificados como um sinal intenso (característico para o grupo amina) com valor m/z de 194.

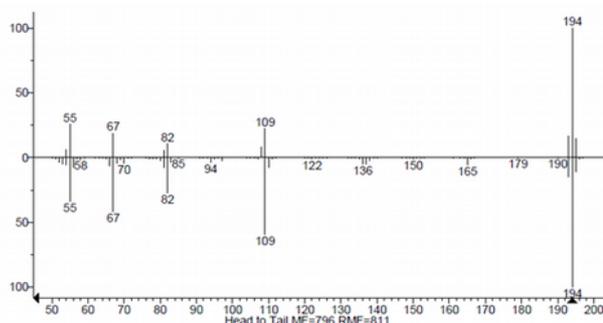


Figura 09 – Espectro de massas padrão cafeína.

Na Figura 10, indica-se para cada principal fragmento observado no espectro de massas a provável parte da molécula responsável pelo sinal. O sinal $m/z = 109$ é atribuído a perda do fragmento $C_3H_3NO_2$ do íon molecular de cafeína $[C_7H_{10}N_4O_2]^+$. Na sequência o sinal $m/z = 82$ atribui-se a perda do fragmento CHN , do sinal $m/z = 109$ $[C_5H_7N_3]^+$. Para $m/z = 67$ relaciona a perda do fragmento CH_3 do sinal $m/z = 82$ $[C_4H_6N_2]^+$, e na obtenção do sinal $m/z = 55$ $[C_2H_3N_2]^+$ têm-se a perda do fragmento C do sinal $m/z = 67$ $[C_3H_3N_2]^+$.

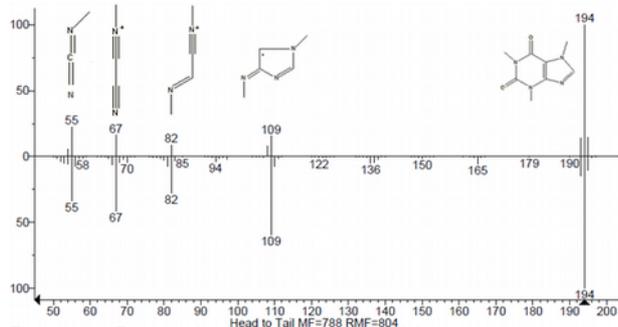


Figura 10 – Espectro de massas do extrato de chá preto.

As três técnicas aplicadas para determinação de cafeína foram eficientes, pois em todas foi possível identificar a xantina. Mesmo possuindo um baixo custo e rapidez, a CCD foi a técnica que apresentou maiores limitações, se restringindo apenas a identificação, para quantificação ela apresenta baixa precisão. Na CLAE-DAD a alta resolução do equipamento possibilitou o reconhecimento de cafeína com maior confiabilidade, além de permitir a quantificação da mesma. Já para CG-EM a amostra também pode ser identificada com alta resolução nos cromatogramas e o espectro de massas complementou a análise de identificação, apresentando a fragmentação da molécula. Contudo CLAE-DAD e CG-EM apresentam equipamentos de alto custo e manutenção, muitas vezes tornando a análise inviável

e ainda CG-EM se restringe a amostras voláteis e termicamente estáveis.

4. CONCLUSÃO

Compreendendo a importância do estudo da cafeína e sabendo da existência de diferentes técnicas disponíveis para a sua determinação, é importante definir quais as vantagens, desvantagens e limitações de cada técnica. A metodologia utilizada para a extração e purificação de cafeína foi eficiente, visto que, as análises de CCD, CLAE, CG-EM foram capazes de determinar a presença de cafeína em chá preto, além de possibilitar a separação, identificação e quantificação desta metilxantina nas amostras. A CG-EM possibilitou a identificação de cafeína de duas formas distintas, comparação do tempo de retenção e padrão de fragmentação pelo espectro de massas, sendo assim, considerada a técnica com melhor desempenho para a identificação no comparativo com as demais.

Agradecimento

Departamento de Química (DAQUI), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e Central de análises.

Determination of caffeine in black tea (*Camellia sinensis*) for chromatographic methods: TLC, HPLC-DAD and GC-MS

Abstract – Tea is one of the most consumed beverages in the world and prepared by infusion of leaves and roots of plants. The *Camellia sinensis* (L.) Kuntze plant grown in many countries and commercialized mainly in the form of black tea, green and oolong. Has in its composition different chemical classes, among them xanthines. Currently there are several methodology for determination of this class of compounds in extracts. The aimed of this study were to extract, identify and quantify caffeine in black tea using three chromatographic techniques, Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Extraction was performed using water and the extract was purified using liquid-liquid partitioning method with an organic solvent. The purified extract was first analyzed using TLC technique with a mobile phase consisting of dichloromethane and ethanol (90:10 v/v) and silica gel in stationary phase. The retention factors calculated for the sample and standard caffeine were 0.87 and 0.86 respectively, which is indicative of the presence of caffeine in the extract. To quantify this xanthine, the extract was analyzed by HPLC-DAD technique using as MP methanol and water (30:70 v/v) and FR-C18 column. The caffeine content was $0.37\% \pm 0.050$. For GC-MS technique was also possible to identify caffeine in the extract by comparing the



retention time and fragmentation standard with authentic standard and NIST library.

Keywords: caffeine. black tea. extraction. purifying. fragmentation.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e Cafeína em Chás por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 38, n. 2, p. 237–243, 2002.
- BORTOLINI, K; SICKA, P; FOPPA T. - Determinação do teor da cafeína em bebidas estimulantes. **Revista saúde**, v. 4, n. 2, 2010.
- BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; COLLINS, C. H.; **Fundamentos de Cromatografia**. p. 205 e 273; Campinas: Editora da Unicamp, 2006.
- BRENELLI, E. C. S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes – uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Revista Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 136-138, 2003.
- DE MARIA, C. A. B; MOREIRA, R. F. A... Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 99-105, 2014.
- GRAHAM, H, N. Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry. **Preventive medicine**, v. 21, p. 334–350, 1992.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. p. 295, 296 e 776, 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teafloavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, n. 2, p. 401–407, 2006.
- MAZZAFERA, P.; YAMAOKA-YANO, D. M.; VITÓRIA, A. P. Para que serve a cafeína em plantas?. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 1, p. 67–74, 1996.
- MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S.. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em Coffea arabica. **Química Nova**. v. 37, n.1, p. 39–43, 2014.
- NETO, F. R. de A; **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. p. 30, Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- SILVA, S. R. S; OLIVEIRA, T. T; NAGEM, T. J. - Uso do chá preto (*Camellia sinensis*) no controle do diabetes mellitus. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 133–142, 2010.

Correspondência:

Anaclara Prasniewski

anaclaraprasniewski@hotmail.com, UTFPR Câmpus Pato Branco, Pato Branco, Brasil.

Recebido: 30/07/2014

Aprovado: 07/04/2015

Como citar: PRASNIEWSKI, Anaclara; AGUIAR, Leticia Magalhães de; OLDONI, Tatiane Luiza Cadorin. (NBR 6023) Determinação de cafeína em chá preto (*Camellia sinensis*) por métodos cromatográficos: CCD, CLAE-DAD e CG-EM. **Syn. Scy. UTFPR**, Pato Branco, v. 10, n. 1, p. 108–115, 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.