

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

PPGQ/UNICENTRO

MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ELETROANALÍTICA
PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELOS CULTIVADOS
COM RESÍDUOS DE CAFÉ**

THIELLEN WROBEL KULTZ

GUARAPUAVA/PARANÁ

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

PPGQ/UNICENTRO

MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ELETROANALÍTICA
PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELOS CULTIVADOS
COM RESÍDUOS DE CAFÉ**

THIELLEN WROBEL KULTZ

ORIENTADORA: DR (A). YOHANDRA REYES TORRES

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Química, Mestrado em Química Aplicada, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, para obtenção do grau de Mestre em Química.

GUARAPUAVA/PARANÁ

2017

*‘Porque Dele e
por Ele, e para ele,
são todas as coisas;
glória, pois, a ele
eternamente. Amém.’*

Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, o qual foi meu sustentador, meu provedor sempre. Agradeço por não ter permitido que eu desanimasse ou desistisse e também por nunca ter me abandonado em todos os dias árduos de trabalho durante o período de Mestrado.

Agradeço também aos meus pais Rosa e Valmir por todo o apoio, por todo incentivo, por aguentarem meus muitos momentos de pressão, de cansaço e de desabafo. Às marmitas entregues e aos almoços no laboratório, sou muito grata. A vocês eu dedico este trabalho. Também agradeço minha irmã pela paciência e pelo companheirismo de sempre! Amo vocês!

Ao meu namorado Filipe, eu agradeço pela compreensão e também pela paciência nos momentos em que o troquei por finais de semana intensos de trabalho no laboratório. Agradeço também pelos momentos que me permitiu chorar de cansaço em seu ombro. Amo você!

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Yohandra pela incansável dedicação que teve ao meu trabalho, pela amizade construída em todo esse tempo e também por me orientar, se importar comigo não só no âmbito profissional, mas pessoal também. Obrigada por não ter desistido de mim. Muito obrigada!

Agradeço a minha co-orientadora Prof. Dra. Andressa por todo apoio dado, por toda a força, por ter aceitado se dedicar a esse trabalho comigo, por ter me amparado quando eu pensava não haver mais solução. Agradeço por ter tido paciência comigo, por toda orientação, carinho e inteligência concedida a mim. Muito obrigada por tudo!

A Prof. Maria Lurdes por todas as dúvidas estatísticas sanadas durante a confecção do texto, por ter me ajudado na parte de validação, por ter me incentivado a continuar mediante tantos desafios.

A Gessica, por sempre me ajudar nos procedimentos e pelos momentos divertidos, engraçados e ruins que passamos no desenvolver do projeto. A Chris eu agradeço pela alegria contagiante de todos os dias, por também me ajudar em tudo, me tirando dúvidas, dando sugestões, enfim.

Agradeço a banca de avaliação dessa dissertação, Prof. Isabel e Prof. Sueli primeiramente pelo aceite em fazer parte desse momento único e também pelas correções, contribuições e dicas valiosas. Agradeço aos membros suplentes Prof. Elisa e Prof. Elizabete por aceitarem fazer parte de minha banca como suplentes.

À UNICENTRO, por toda a infraestrutura para o desenvolvimento desse projeto. À CAPES pela bolsa concedida e ao Programa de Pós-graduação em Química que foi essencial para que esse momento chegasse.

RESUMO

Os cogumelos são seres vivos pertencentes ao reino Fungi e possuem diversas finalidades na culinária, na ornamentação, na medicina, bem como para fins alucinógenos e venenosos também. Houve um aumento no interesse na produção e no consumo de cogumelos comestíveis, como o cogumelo *Pleurotus*. O cultivo desse cogumelo é realizado utilizando diversos extratos como cana de açúcar, farelo de trigo e resíduos como sementes e borras de café. A composição química dos cogumelos é influenciada pelo substrato em que é cultivado, onde pode ocorrer a absorção de compostos originalmente presentes no mesmo. Este estudo teve como foco o cogumelo *Pleurotus* e como objetivo principal a determinação de cafeína em cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* que tiveram presença de resíduos de café, no mínimo, em uma parte de seu cultivo. O presente trabalho apresenta o estudo de otimização de parâmetros das técnicas eletroanalíticas de voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria cíclica bem como a validação deste método para a determinação de cafeína em cogumelos *Pleurotus* cultivados com resíduos de café. Para confirmar a validação do método eletroanalítico de determinação foram avaliados os parâmetros linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão, os quais foram obtidos por meio de diferentes técnicas estatísticas. Os resultados indicaram que o método utilizado apresenta boa exatidão, devido às altas taxas de recuperação com médias de aproximadamente 107,09 %. O método é preciso quando avaliado em termos de repetitividade e precisão intermediária, com valores de 9,79 e 10,02 % respectivamente. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de 0,29 e 0,98 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, foram baixos, demonstrando dessa maneira a sensibilidade da técnica de voltametria de onda quadrada. Observa-se também a boa linearidade na faixa de concentrações de 0,91 a 10,3 $\mu\text{mol/L}$, com valores de $F_{\text{regressão}} (3563,26) > F_{\text{crítico}} (4,68)$, sem evidências de falta de ajuste ao modelo linear ($F_{\text{faj}} (0,85) < F_{\text{crítico}} (2,65)$, $p > 0,05$). Através do método validado, foi constatado que o cogumelo que apresentou nas etapas de cultivo e inóculo os resíduos de café apresentou concentrações de cafeína de aproximadamente 1,20 mg/g e o cogumelo que teve seu inóculo em palha de azevém e cultivo sobre semente de café apresentou concentrações de 0,7 mg/g. Portanto, ambas as amostras apresentaram teores significativos de cafeína, demonstrando assim que o cogumelo é capaz de absorver cafeína a partir do substrato de cultivo.

Palavras-chave: cafeína, voltametria de onda quadrada, cogumelos, validação.

ABSTRACT

The mushrooms are living organisms belonging to the Kingdom Fungi, and have several purposes in cooking, ornamentation, in medicine, as well as hallucinogenic and poisonous purposes too. There has been an increase in the interest in the production and consumption of edible mushrooms, such as the mushroom *Pleurotus*. The cultivation of this mushroom is performed using various extracts such as sugar cane, wheat bran and waste as seeds and coffee grounds. The chemical composition of the mushrooms is influenced by the substrate on which it is grown, where absorption may occur from compounds originally present in the same. This study had as its focus the mushroom *Pleurotus* and as main objective the determination of caffeine in edible mushrooms of the genus *Pleurotus* who had presence of residues of coffee, at least in a part of its cultivation. The present work presents the study of optimization of parameters of electroanalytical techniques of square wave voltammetry (VOQ) and cyclic voltammetry as well as validates. To confirm the validation of the method for determining electroanalytical were evaluated the parameters, linearity, limits of quantification and detection, precision and accuracy, which were obtained by using different statistical techniques. The results indicated that the method used presents good accuracy, due to low recovery rates with averages of approximately 107.9%. The method is precise when evaluated in terms of repeatability and intermediate precision, with values of 9,79 and 10,02 percent respectively. The limits of detection (LOD) and quantification (LQ) of 0.98 $\mu\text{mol/L}$ and 0.29, respectively, were low, demonstrating the sensitivity of the square wave voltammetry technique. There is also the good linearity in the range of concentrations of 0.91 to $\mu\text{mol/L}$ 10.3, with values of $F_{\text{regressão}}$ (3563.26) $> F_{\text{crítico}}$ (4.68), without evidence of lack of adjustment to the linear model (F_{faj} (0.85) $< F_{\text{crítico}}$ (2.65), $p > 0.05$). Through the validated method, it has been found that the mushroom that presented in steps of cultivation and coffee residues introduced inoculum concentrations of caffeine approximately 1.20 mg/g and the mushroom which had its inoculum in ryegrass and straw cultivation on coffee seed showed concentrations of 0.7 mg/g, so both samples showed significant levels of caffeine, thus demonstrating that the mushroom is able to absorb caffeine from the substrate.

Key words: caffeine, square wave voltammetry, mushrooms, validation.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE EQUAÇÕES.....	xv
1. CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	17
1.1. Introdução.....	18
1.1.1. Cogumelos	18
1.1.2. Cafeína.....	19
1.2. Objetivos.....	20
1.2.1. Objetivo Geral.....	20
1.2.2. Objetivos Específicos.....	21
1.3. Referências.....	21
2. CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O COGUMELO <i>PLEUROTUS</i>.....	23
2.1. Cogumelo <i>Pleurotus</i>	24
2.1.1. Classificação e Estrutura.....	24
2.1.1.1. Reino Fungi.....	24
2.1.1.2. Filo Basidiomycota.....	25
2.1.1.3. Classe Basidiomycetes.....	25
2.1.1.4. Cogumelos.....	26
2.1.1.5. Gênero <i>Pleurotus</i> e substratos de cultivo.....	30
2.2. Referências.....	33
3. CAPÍTULO 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CAFEÍNA E SEUS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO.....	37
3.1. Cafeína.....	38
3.1.1. Classificação.....	38
3.1.1.1. Metilxantinas.....	38
3.1.1.2. A molécula da Cafeína.....	39
3.1.1.3. Efeitos da Cafeína.....	40
3.1.1.4. Métodos de Determinação de Cafeína.....	41
3.1.2. Técnicas Voltamétricas Utilizadas.....	45

3.1.2.1. Voltametria Cíclica.....	45
3.1.2.2. Voltametria de Onda Quadrada.....	46
3.1.3. Validação de Métodos.....	47
3.1.3.1. Linearidade.....	47
3.1.3.2. Limites de Detecção (LD) de Quantificação (LQ).....	48
3.1.3.3. Precisão.....	48
3.1.3.4. Exatidão.....	49
3.2. Referências.....	49
4. CAPÍTULO 4. DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELOS PLEUROTUS UTILIZANDO A TÉCNICA DE VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA.....	53
4.1. Materiais e Métodos.....	54
4.1.1. Amostragem.....	54
4.1.2. Técnicas Utilizadas.....	55
4.1.2.1. Voltametria Cíclica.....	55
4.1.2.2. Voltametria de Onda Quadrada.....	55
4.1.3. Instrumentação.....	56
4.1.3.1. Potenciostato.....	56
4.1.3.2. Célula eletroquímica e conjunto de eletrodos.	56
4.1.4. Preparo das Amostras.....	57
4.1.5. Estudo do Efeito da Velocidade de Varredura	58
4.1.6. Otimização de Parâmetros da Técnica de Voltametria de Onda Quadrada para a determinação de cafeína	59
4.1.6.1. Eletrólito Suporte.....	59
4.1.6.2. Frequência de aplicação de pulsos de potencial (f).....	59
4.1.6.3. Amplitude (a).....	60
4.1.6.4. Incremento de Varredura (ΔE_s).....	60
4.1.6.5. Concentração Hidrogeniônica do meio.....	60
4.1.7. Validação de Técnicas Eletroanalíticas.....	61
4.1.7.1. Linearidade.....	61
4.1.7.2. Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ).....	61
4.1.7.3. Precisão.....	61
4.1.7.4. Exatidão.....	62
4.2. Resultados e Discussão.....	62
4.2.1. Voltametria Cíclica.....	63
4.2.2. Otimização de Parâmetros.....	64
4.2.2.1. Eletrólito Suporte.....	65
4.2.2.2. Estudo do Efeito da Concentração hidrogeniônica.....	65
4.2.2.3. Efeito da frequência de onda quadrada (f)	66
4.2.2.4. Efeito da Amplitude de Onda Quadrada (a).....	68
4.2.2.5. Efeito do Incremento de Varredura (ΔE_s).....	70
4.3. Validação do Método de Determinação de cafeína em amostras de cogumelo <i>Pleurotus</i> com auxílio da técnica de voltametria de onda quadrada.....	72

4.3.1. Linearidade.....	72
4.3.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	75
4.3.3. Precisão	75
4.3.4. Exatidão.....	77
4.4. Aplicação nas amostras.....	78
4.5. Referências.....	79
5. CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes estruturais de um fungo do filo Basidiomycota.....	27
Figura 2. Imagem do cogumelo-do-sol, também chamado de <i>Agaricus blazei</i>	28
Figura 3. Imagem do cogumelo <i>Agaricus bisporus</i> , mais conhecido como champignon de Paris.....	29
Figura 4. Imagem do cogumelo <i>Amanita muscaria</i>	30
Figura 5. Fórmula estrutural das moléculas de ácido ibotâmico e do muscimol.....	30
Figura 6. Imagem do cogumelo <i>Pleurotus</i> ou cogumelo ostra.....	31
Figura 7. Esqueleto representativo das xantinas e as principais metilxantinas: 1,3,7-trimetilxantina (cafeína), 3,7-dimetilxantina (teobromina) e 1,3-dimetilxantina (teofilina).....	39
Figura 8. Mecanismo proposto por Lourenção (2009) usando eletrodo de diamante dopado com boro.....	44
Figura 9. Fotos das amostras de cogumelo <i>Pleurotus</i>	55
Figura 10. Foto do eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro.(DDB).....	57
Figura 11. Fluxograma referente as etapas de extração de cafeína utilizando o metanol como solvente.....	58
Figura 12. Influência da variação da velocidade de varredura no aspecto geral dos voltamogramas para a cafeína sobre DDB, com valores de velocidade de varredura ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 1,0 tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).....	64
Figura 13. Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação da cafeína sobre DDB, para os eletrólitos suporte: solução de sulfato de sódio, tampão Britton Robinson, solução de fosfato de sódio ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$).....	65
Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada para oxidação da cafeína sobre DDB, em sulfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para pH 5,0, pH 1,0, pH 7,0, pH 8,0 e branco ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$).....	66

Figura 15. Influência da variação da frequência da onda quadrada no aspecto geral dos voltamogramas da cafeína sobre HMDE, com valores de frequência ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 5,0, tampão sulfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).....	67
Figura 16. (A) Dependência da corrente de pico com a frequência para a cafeína sobre DDB. (B) Dependência da corrente de pico com a raiz da frequência para a cafeína sobre DDB.....	68
Figura 17. Influência da variação da amplitude da onda quadrada no aspecto geral dos voltamogramas da cafeína sobre DDB, com valores de amplitude ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 5,0, tampão sulfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).....	69
Figura 18. Dependência da corrente de pico vs a variação de amplitude da onda quadrada para a cafeína sobre DDB.....	69
Figura 19. Voltamogramas de onda quadrada para a cafeína sobre DDB, com valores de incremento ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 5,0, solução sulfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$	70
Figura 20. Efeito da variação do incremento de varredura sobre as correntes de pico para a cafeína sobre DDB.....	71
Figura 21. Voltamogramas referentes aos pontos da curva de calibração de cafeína, com concentrações de 0, 0,91, 1,81, 2,70, 3,58, 4,46, 5,33, 6,18, 7,03, 7,88, 8,71, 9,54 e $10,3 \text{ mol/L}$, em sequência conforme o crescimento da corrente de pico.....	74
Figura 22. Curva analítica obtida através da Regressão Linear no nível de confiança de 95% para determinação de Cafeína através da intensidade de corrente do pico de oxidação da cafeína.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas de Determinação de Cafeína e Pré-tratamento de amostras contendo cafeína.....	43
Tabela 2. Código representativo das Amostras de Cogumelo <i>Pleurotus</i>	54
Tabela 3. Resultados da análise da regressão linear no nível de 95% de confiança e teste de falta de ajuste para a curva de calibração da Cafeína.....	72
Tabela 4. Precisão intermediária e repetitividade para recuperações de cafeína.....	76
Tabela 5. Concentrações de cafeína encontradas nas amostras A, B e C.....	79

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DDB – diamante dopado com boro

Ag – Prata

AgCl – Cloreto de Prata

BR – Britton Robinson

mol/L ou mol.L⁻¹ – mol por litro (unidade de concentração)

f – frequência

pH – concentração hidrogeniônica

s⁻¹ – por segundo

Hz – hertz

mV – milivolts

a – amplitude

ΔE_s – incremento de varredura

V_s – versus

g – grama

mg/L – miligrama por litro

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

ANVISA – Agência Nacional da Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

mg – miligrama

kg – quilograma

nm – nanômetros

CCD – cromatografia de camada delgada

DIC – detector por ionização de chama

EM – espectrometria de massas
DAD – detector de arranjo de diodos
CG – cromatografia gasosa
UV – ultra-violeta
IR – índice de refração
VPD – voltametria de pulso diferencial
VOQ – voltametria de onda quadrada
DEALI – departamento de engenharia de alimentos
VC – voltametria cíclica
mV/s ou $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ – milivolts por segundo
 μL – microlitros
® - registrado
 cm^2 – centímetros quadrados
 $^{\circ}\text{C}$ – graus célcios
HFCVD – hot filament chemical vapor deposition
 CH_4 – metano
 H_2 – gás hidrogênio
 $\mu\text{mol/L}$ – micromol por litro
SWV – square wave voltametric
 mmol/L – milimol por litro

LISTA DE EQUAÇÕES

$$LD = \frac{3 \cdot s}{b}$$

Equação 1

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{b}$$

Equação 2

$$DPRr = \frac{Sr}{m\acute{e}dia} \times 100$$

Equação 3

$$DPRpi = \frac{Spi}{m\acute{e}dia} \times 100$$

Equação 4

$$\% REC = \frac{C1}{C2} \times 100$$

Equação 5

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

1.1.1. Cogumelos

Os cogumelos são organismos vivos que pertencem ao Reino Fungi, o qual engloba outros seres vivos como bolores e leveduras. Eles também são pertencentes ao Filo dos Basidiomycota, o qual agrupa organismos que possuem estrutura dividida em duas partes: o basidiocarpo e as hifas vegetativas (Tortora, 2004).

O basidiocarpo é a parte onde se encontram as moléculas e os nutrientes do cogumelo, além de ter a função de reprodução realizada por meio do espalhamento de esporos. A segunda parte são as hifas vegetativas, as quais possuem a função de nutrir o cogumelo. Tais hifas são responsáveis pela sucção de compostos do substrato de cultivo do cogumelo (Zanella, 2004).

Os cogumelos se alimentam da decomposição de outros seres vivos, ou seja, de restos de plantas e de animais. Por esse motivo, são chamados de ‘recicladores da natureza’. Eles são fungos do tipo carnosos, ou seja, que possuem a textura semelhante à textura de carne e possuem diversas finalidades, como a ornamentação, a fitoterapia, a culinária. Além disso, podem ser usados como venenos e drogas alucinógenas. (Hawksworth, 1995, Zanella, 2004).

Existem vários tipos de substratos de cultivo de cogumelo, sendo os mais utilizados, no caso dos cogumelos *Pleurotus*, os substratos chamados de lignocelulósicos. Esses substratos são resíduos vegetais formados com celulose e lignina, tais como bagaço de cana, palha de milho, palha e farelo de arroz, sabugo de milho, serragem de eucalipto, sementes e pó de café, entre outros (Bernardi, 2009; Figueró, 2011).

Os substratos usados no cultivo de cogumelos são os responsáveis por fornecer nutrientes para o crescimento e nutrição do corpo de frutificação (basidiocarpo). Devido a isso, é comum verificar a presença de constituintes químicos, inerentes dos substratos, no basidiocarpo dos cogumelos.

Neste trabalho o cogumelo *Pleurotus* foi cultivado em borra de café, cuja composição possui trigonelina, cafeína, ácidos clorogênicos, além do ácido fórmico e

catecol, previamente utilizada no preparo da bebida. Assim, quando utilizados resíduos de café é provável que moléculas bioativas presentes no mesmo, como cafeína, ácidos clorogênicos, dentre outros, possam ser absorvidas pelo cogumelo durante seu desenvolvimento, modificando a composição química do cogumelo que por sua vez pode afetar suas características nutracêuticas.

1.1.2. Cafeína

A cafeína é um alcaloide da classe das metilxantinas, assim como a teobromina e a teofilina. Ela é uma molécula orgânica, com três radicais metil ligados a três nitrogênios aromáticos. A cafeína atua como estimulante do sistema nervoso central e possui alguns efeitos que podem ser até mesmo maléficos para o organismo humano, como a insônia; síndrome da retirada e até mesmo o vício, cafeinismo (SIMÕES, 2004).

A cafeína quando ingerida em doses acima de 10-15 mg/kg resulta em efeitos tóxicos ao organismo humano. Ela pode ser encontrada em vários alimentos como chocolate, cacau, chás, refrigerantes a base de cola ou guaraná, café e outros; além de estar presente em fármacos associada com outros princípios ativos (Graham, 2001; Simões, 2004; Soares, 2010).

Atualmente, o interesse e apreciação por especiarias como o cogumelo têm crescido. Com isso, as pessoas visam não somente a descoberta de novos sabores, mas também a qualidade nutricional dos produtos ingeridos. Os cogumelos *Pleurotus* possuem grande facilidade de cultivo, o que muitas vezes leva os produtores a utilizarem substratos mais baratos para a nutrição dos mesmos.

Visto que nas embalagens, muitas vezes, o substrato escolhido não é mencionado e o interesse do consumidor permanece na informação nutricional do produto, é de extremo interesse a quantificação de substâncias como a cafeína.

Desta maneira, a determinação de cafeína em cogumelos visa verificar a viabilidade de uso de resíduos de café como substratos para o cultivo do cogumelo *Pleurotus* e informar o consumidor de cogumelos sobre a porcentagem ou a relação de massa que relate a quantidade desse alcaloide em certa massa de fungo.

Considerando que a ingestão de cafeína não se limita apenas ao consumo de café, mas também de refrigerantes e chocolates, faz-se necessário, portanto, o controle da ingestão devido aos malefícios causados pela cafeína. Neste trabalho, optou-se por fazer a determinação de cafeína em cogumelos *Pleurotus* por meio de técnicas eletroanalíticas, como as voltametrias cíclica e de onda quadrada.

A escolha da técnica eletroanalítica para a determinação de cafeína em cogumelos *Pleurotus* está relacionada à sua alta sensibilidade e a seu baixo custo de análise se comparada às técnicas de análise cromatográficas, como a CLAE. Estas duas características são importantes, por exemplo, para o controle de qualidade desses cogumelos ou de produtos dele derivados.

Em trabalhos similares anteriores, visando a determinação de cafeína por CLAE, foram obtidos valores de LD e LQ na ordem de 0,28 e 0,96 mg/L, respectivamente (RAMALHO, 2015). Esses valores são relativamente altos para os limites de detecção e quantificação que se deseja obter no atual trabalho.

O objeto de estudo deste trabalho é o cogumelo do gênero *Pleurotus*. Ele possui grande facilidade de cultivo, ou seja, pode ser cultivado em diversos substratos, além do custo de sua produção ser relativamente baixo. Os cogumelos *Pleurotus* possuem sabor agradável e são ricos em proteínas, carboidratos e fibras alimentares. Quando, em sua produção, são utilizados substratos diferentes, o sabor e a composição desses cogumelos variam (Furlani, 2005).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

Determinação eletroanalítica de cafeína em cogumelos *Pleurotus ostreatus* cultivados em substratos de café.

1.2.2. Objetivos específicos:

- Determinar o comportamento eletroquímico da cafeína e desenvolver uma metodologia para a quantificação desse alcaloide em amostras de cogumelo *Pleurotus* por meio das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.
- Validar o método eletroanalítico proposto para determinação de cafeína em extratos de cogumelos *Pleurotus* crescidos sobre borra de café, tendo como guia as normas da ANVISA, AOAC, INMETRO e outros órgãos regulamentadores.
- Aplicar o método eletroanalítico desenvolvido na determinação de cafeína em amostras de cogumelos *Pleurotus ostreatus* crescidos sobre borra de café.

1.3. Referências

- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Edition. 2012.
- BERNARDI, E.; DONINI, L. P.; MINOTTO, E., NASCIMENTO, J. S. **Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado.** *Bragantia*, Campinas, v. 68, n. 4, p.901-907, 2009.
- BRASIL, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. A ANVISA determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília. n. 889, 2 jun. 2003.
- FIGUEIRÓ, G. G., GRACIOLLI, L. A. **Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*.** *Ciência e Agrotecnologia*. v. 35, n. 5, 2011.
- FURLANI, R. P. Z. e GODOY, H.T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.
- HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M., SUTTON, B. C., PEGLER, D. N. *Ainsworth & Bisby's. Dictionary of the Fungi*, 8.ed. Cab International, Cambrigi, 1995.
- **INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE008 –Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 04, julho/2011.

- RAGUNATHAN, R., GURUSAMY, R. PALANISWAMY, M., SWAMINATHAN, K. **Cultivation of *Pleurotus spp.* on various agro-residues.** *Food Chemical*, v. 55, n. 2, p. 139-144, 1996.
- RAMALHO, A.N. **Cafeína em cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre resíduos de café.** 2015. 78f. Dissertação de Mestrado. UNICENTRO, Guarapuava, 2015.
- SIMÕES, C. M. O., GUERRA, M. P., [et. al.]. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.
- SOARES, A. C. R. P. **Metilxantinas.** *Webartigos.com, Saúde e Beleza*, 2010.
- TORTORA, Gerald J. **Microbiologia** / Berdell R. Funke, Christine L. Case; trad. Atual. Por Roberta Marchiori Martins. – 8.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ZANELLA, J. **O benefício dos cogumelos.** *Portal UNESP*, n. 193, p. 8-9, 2004.

CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O COGUMELO
PLEUROTUS

CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O COGUMELO *PLEUROTUS*

2.1. Cogumelo *Pleurotus*

2.1.1. Classificação e Estrutura

2.1.1.1. Reino Fungi

Os seres vivos ao redor do mundo são classificados quanto as suas características em cinco grandes reinos: Monera, Protista, Fungi, Plantae e Animale. O reino Fungi engloba seres eucariontes uni e multicelulares, tais como bolores, leveduras entre outros. A Micologia é a área da ciência que estuda os fungos e suas características. O reino Fungi engloba seres microscópicos, como é o caso das leveduras e seres macroscópicos, como as ‘orelhas de pau’ no tronco de árvores. Os fungos possuem três tipos de organização celular: filamentosa, carnuda e unicelular (Tortora, 2004).

A levedura é um exemplo de organização unicelular, sendo muito utilizada como fermento. Com relação à organização filamentosa, os bolores são um exemplo muito encontrado no dia-a-dia. A organização carnosa é encontrada principalmente em cogumelos, objeto de interesse desta pesquisa.

A principal fonte de alimentação dos fungos é por meio da decomposição da matéria orgânica de outros seres vivos, como plantas, frutos e até mesmo animais. Os fungos absorvem os nutrientes e as moléculas da matéria orgânica através de uma membrana plasmática que faz a sucção. O organismo do fungo é formado por um agrupamento de filamentos que tem a função de decompor o material sugado pela membrana plasmática (Carvalho, 2010).

Dentro do reino Fungi, existem ainda seis subgrupos denominados Filos. Dentre esses, os mais importantes são os *Zygomycota*, os *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Deuteromycota*. Neste primeiro filo, um fungo bem conhecido é o *Rhizopus stolonifer*, bolor que se desenvolve em pães e frutas. Como exemplo de fungo do filo *Zygomycota*, tem-se as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizadas como fermento. O filo *Basidiomycota* é constituído por cogumelos (como o *Pleurotus ostreatus*) muito encontrados no dia-a-dia. O filo *Deuteromycota* pode-se citar o gênero *Penicillium* (Raven, 2007).

Os fungos possuem inúmeras utilidades, independente da organização celular que possuem. Exemplos disso são a sua utilização na culinária, como os cogumelos que podem ser consumidos e o fermento que é utilizado para o crescimento de pães e bolos e a sua utilização na produção de drogas como álcool e penicilina (Furlani, 2007; Sallis, 2004).

Como exemplos de organismos do reino Fungi atuando em diferentes frentes, *Aspergillus niger* utilizado na produção de ácido cítrico para alimentos e bebidas, o fungo *C. oleophila* utilizado em plantações com a finalidade de prevenir o contato de outros fungos prejudiciais às plantas. Além disso, outro fungo chamado *Taxomyces* foi descoberto em 1993 como um fungo capaz de produzir uma substância utilizada no combate ao câncer, chamada taxol evitando que florestas de teixos fossem dizimadas nos Estados Unidos (Pinto, 2001; Tortora, 2004).

No entanto, dentre as 100 mil espécies de fungos descritas até o ano de 2004, cerca de 200 são conhecidas por causarem doenças em humanos e animais ou prejudicarem outros seres vivos. O fungo *Ceratocystis ulmi* é um fungo que bloqueia a circulação da seiva em árvores, provocando a morte das mesmas. *Cryphonectria parasitica* é outro exemplo de fungos que se tornam prejudiciais à vida de algumas espécies de plantas. Ele causa ferrugem em árvores do tipo castanheiras, levando-as à morte e a sua não propagação nos Estados Unidos durante anos (Robin, 2001; Tortora, 2004).

2.1.1.2. Filo *Basidiomycota*

O filo *Basidiomycota* é um subgrupo do Reino Fungi que engloba seres que contêm septos em seus poros, ou seja, paredes filamentosas que separam os poros de reprodução do fungo. Esse filo ainda é dividido em três classes: Basidiomycetes (como cogumelos: *Pleurotus ostreatus*), Teliomycetes (como as chamadas ferrugens, *Puccinia psidii*) e Ustomycetes (como os carvões, *Ustilago scitaminea*) (Tortora, 2004; Jinhans, 2003; Rago, 2007).

2.1.1.3. Classe Basidiomycetes

A classe dos Basidiomycetes é composta por seres vivos denominados basidiomicetos e é subdividida em dois grupos artificiais: os Hymenomycetes e os

Gasteromycetes. Sua principal característica é a produção dos chamados basidiósporos, esporos sexuados dos basidiomicetos.

Ambos os grupos são constituídos de cogumelos, sendo diferenciados principalmente pela localização dos basidiósporos, sendo no grupo dos Hymenomycetes localizados no badiocarpo dos cogumelos e no grupo dos Gasteromycetes, localizados em uma camada exposta do basidiocarpo.

Os basidiomicetos são encontrados em variados habitats, como em rochas, ao redor de árvores, nas águas e em solos. O crescimento dos cogumelos é favorecido pelas temperatura e umidade elevadas, podendo crescer em todas as épocas do ano e em diferentes lugares, principalmente quando a matéria orgânica é abundante. Alguns basidiomicetos são conhecidos como fungos que apodrecem a madeira, usando a celulose e a lignina, presente na madeira, como fonte de energia (alimentação) para as células. Além disso, os basidiomicetos produzem substâncias que possuem propriedades que impedem e até mesmo controlam o crescimento de outros seres vivos competidores ao seu redor. Da mesma maneira, algumas das substâncias que o basidiomiceto absorve do meio em que é cultivado favorecem o seu crescimento além de inibir a atuação prejudicial de alguns competidores (Silva, 2007).

2.1.1.4. Cogumelos

Os cogumelos são seres vivos pertencentes ao Reino Fungi, e ainda compõem o Filo Basidiomycota. Eles possuem sua estrutura dividida em duas partes, as hifas vegetativas e o basidioma (Figura 1). Além disso, o cogumelo é inteiramente composto por hifas, sendo diferenciadas pelas funções que desempenham. As hifas vegetativas localizam-se na parte subterrânea do cogumelo, sendo responsáveis pela fixação desse no substrato de cultivo e também pela sucção de componentes para a sobrevivência desse fungo. Através das hifas vegetativas, o cogumelo faz sua nutrição através do substrato que é cultivado (Tortora, 2004).

O basidioma é a parte que se assemelha muito a um guarda-chuva. É a parte externa do cogumelo, a que pode ser visualizada mais facilmente. O basidioma é responsável pelo espalhamento de esporos presentes na superfície do cogumelo, evento esse que gera a proliferação, reprodução do cogumelo. No basidioma também são encontrados a maior parte dos compostos constituintes do cogumelo (Tortora, 2004).

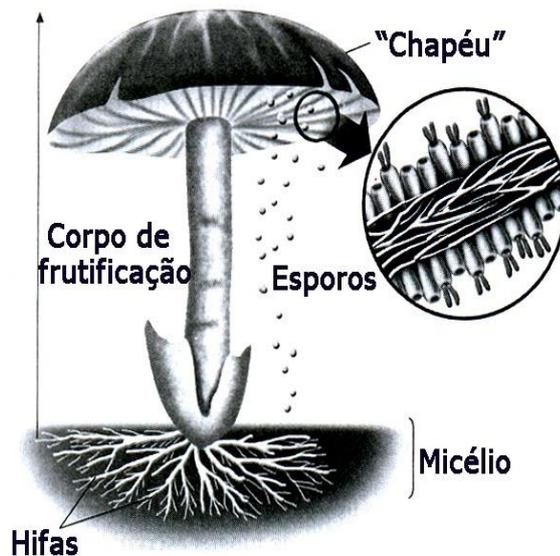


Figura 1. Partes estruturais de um fungo do filo Basidiomycota. (Disponível em: <https://djalmasantos.wordpress.com/2012/08/31/testes-sobre-fungos/>. Acesso em 07 de novembro de 2016.)

O cogumelo é um fungo de organização carnosa, ou seja, o agrupamento de suas hifas faz com que a textura se assemelhe bastante à textura da carne. Em geral, os cogumelos possuem inúmeras finalidades, podendo ser usados para a ornamentação, na culinária, na fitoterapia e como droga alucinógena. Em 2004, segundo especialistas, existiam cerca de 10 mil espécies de cogumelos ao redor do mundo, dos quais apenas 700 eram comestíveis, 50 eram tóxicos e entre 50 a 200 eram utilizados para fins medicinais (Zanella, 2004; Furlani, 2005).

Os cogumelos possuem uma importante função biológica, pois são os únicos seres vivos que conseguem digerir duas substâncias presentes em árvores: a lignina e a celulose. Considerando a ampla variedade de espécies e de utilidades do cogumelo, existem aqueles que são mais conhecidos, como é o caso do cogumelo *Agaricus blazei*, mais conhecido como cogumelo-do-sol (Zanella, 2004).

Esse cogumelo é muito utilizado na medicina preventiva e protetora, além de apresentar um importante papel coadjuvante no combate à hepatite C, pois é usado para o aumento do apetite, nutrindo as pessoas que tendem a perder peso por conta da doença. Além disso, atua diminuindo a dor e aliviando a fadiga das pessoas infectadas por alguns vírus (Zanella, 2004).

O cogumelo *Agaricus blazei* (Figura 2) quando utilizado em grandes concentrações, atua no combate ao câncer, como KANEKO et al. (2004) observaram em seu trabalho a estagnação de tumores em ratos, utilizando extratos orgânicos hexânicos de cogumelo-do-sol. Este cogumelo também é um importante fator no tratamento quimioterápico, eliminando alguns de seus efeitos colaterais (Zanella, 2004).



Figura 2. Imagem do cogumelo-do-sol, também chamado de *Agaricus blazei*. (Disponível em: <http://www.dhealthstore.com/agaricus-blazei.html>. Acesso em: 12 de novembro de 2016.)

Um cogumelo muito utilizado na culinária é o chamado Champignon de Paris, *Agaricus bisporus*. Ele é usado como especiaria adicional em molhos, saladas, pizzas, sopas e como complemento da carne em pratos de strogonoff. O Champignon de Paris possui alto valor nutricional, com elevado teor de fibras e proteínas e teores baixos de lipídeos (Furlani, 2007).

Complementando o uso deste cogumelo na culinária, Henriques (2008) em seu trabalho sobre a ação proteica de *Agaricus bisporus* (Figura 3), pode ser utilizado como complementação de proteínas. A complementação é justificada por meio da comparação entre a dieta à base de cogumelo e a dieta padrão de caseína, a qual possui maior teor de proteína que o cogumelo. Desta maneira, o cogumelo deve ser consumido com outras fontes de proteínas vegetais que forneçam o teor necessário.



Figura 3. Imagem do cogumelo *Agaricus bisporus*, mais conhecido como champignon de Paris. (Disponível em: <http://www.massimaalimentacao.com.br/tag/cogumelo/>. Acesso em: 12 de novembro de 2016).

A literatura relata ainda outros exemplos de cogumelos muito consumidos mundialmente como alimentos, como o shiitake (*Lentinula edodes*). Além da alimentação, esse cogumelo é conhecido também por seus compostos bioativos que são muito utilizados nas indústrias farmacológica e cosmetológica (Gaitán-Hernández, 2014).

Outro cogumelo bastante conhecido, cuja aparência encanta por suas cores vívidas, mas engana pelos malefícios causados por seu consumo, é o *Amanita muscaria*. Este cogumelo apresenta pontos esbranquiçados em uma superfície inteiramente vermelha, sendo muito apreciado por sua beleza. Também conhecido como Amanita mata-moscas, possui efeitos alucinógenos e psicoativos quando ingerido (Wartchow, 2013; Perez-Silva, 2008).

Amanita muscaria (Figura 4) possui duas substâncias que atuam como estimuladores de neurotransmissores do sistema nervoso central, e são consideradas alucinógenas: o ácido ibotênico e muscimol (Figura 5). Os primeiros sintomas da ingestão desse cogumelo são a euforia intensa, a falta de noção de tempo, a criação de alucinações e algumas alterações de humor significativas. Esse cogumelo é também considerado tóxico, porque quando ingerido em grandes quantidades, pode causar severas intoxicações levando até à morte (Vendramin, 2014; Wartchow, 2013).



Figura 4. Imagem do cogumelo *Amanita muscaria* (Disponível em: <http://biologiavida-oficial.blogspot.com.br/2014/02/agario-das-moscas-fly-agaric-amanita.html>. Acesso em: 13 de novembro de 2016).

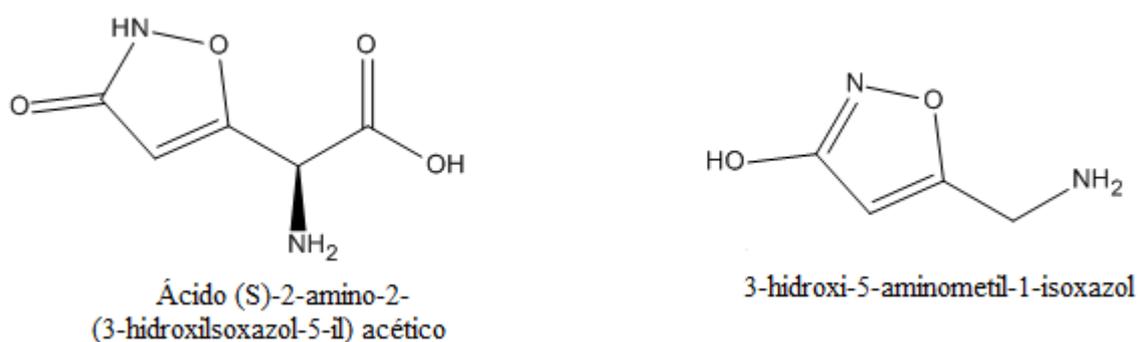


Figura 5. Fórmula estrutural das moléculas de ácido ibotâmico e do muscimol.

2.1.1.5. Gênero *Pleurotus* e substratos de cultivo

O gênero de cogumelos chamado *Pleurotus* (Figura 6) contempla uma ampla variedade de espécies de cogumelos comestíveis, cerca de 39 espécies eram conhecidas em 2007, segundo Ramirez (2007). Este cogumelo pode ser chamado de shimeji-preto ou também de cogumelo ostra, devido ao seu formato lembrar o formato de uma ostra. Os cogumelos ostras são cultivados ao redor do mundo em países como a Índia e em continentes como a Europa e a África e no sudeste da Ásia (Bernardi, 2009).



Figura 6. Imagem do cogumelo *Pleurotus* ou cogumelo ostra (Disponível em: http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html. Acesso em: 13 de novembro de 2016).

Esse gênero de cogumelo é muito apreciado pelas características nutricionais, mas também pela textura e sabor agradáveis. O gênero *Pleurotus* possui em sua constituição um alto teor de fibras, sendo um forte substituto da carne para pessoas vegetarianas e veganas. Em seu trabalho, Furlani (2005) investigou todas as espécies de cogumelos do gênero *Pleurotus*, encontrando na totalidade que a constituição proteica desses cogumelos continha aminoácidos essenciais na faixa de 42, 57 a 56, 38 %. O autor ainda menciona que a quantidade de carboidratos encontrados nos cogumelos analisados resultou na faixa de 6,69 a 7,59%, sem falar nas fibras alimentares que foram encontradas na faixa de 42,6 a 42,2% em base úmida. Essas variações encontradas são referentes às espécies diferentes.

Uma característica importante do cogumelo *Pleurotus* é a facilidade, rapidez e o baixo custo de sua produção. Para realizar o cultivo do cogumelo ostra é preciso pouco tempo de preparação e pouca tecnologia envolvida durante o processo. O baixo custo e a facilidade de cultivo do cogumelo são justificados pelo uso de substratos comuns, encontrados no dia-a-dia (Bernardi, 2009).

Substrato é a palavra que designa a fonte de nutrição do cogumelo, ou seja, em que meio o mesmo é cultivado. Bernardi (2009) menciona os substratos chamados de resíduos ligno-celulósicos, os quais permitem a fácil degradação da celulose e lignina. Como exemplo de substratos envolvidos no cultivo do cogumelo ostra tem-se palhas de cereais, cascas de frutas, folhas e caules de bananeiras, restos de papel, resíduos cítricos,

polpa de café, bagaço de cana, sabugo de milho, palha e farelo de arroz, serragem de eucalipto, cascas de coco (Regina, 2001; Pedra, 2006; Rampinelli, 2010; Dias, 2003; Bernardi, 2013)

Para complementação nutricional do cogumelo, em alguns casos, esses substratos são misturados a farelos e até mesmo ureia a fim de proporcionar esse enriquecimento nutricional. O substrato de produção do cogumelo, segundo Furlani (2005), é o principal fator de influência na composição química do mesmo (Donini, 2006).

Ragunathan (1995), em seu estudo sobre a composição química dos cogumelos do gênero *Pleurotus*, observou que alguns substratos utilizados favoreciam o crescimento de certas espécies de cogumelos, como a palha de arroz foi eficaz no crescimento do *Pleurotus sajor-caju*, a fibra de cocô mostrou influência no crescimento de *Pleurotus platypus* e o cogumelo *Pleurotus citrinopileatus* teve seu crescimento beneficiado quando o substrato foi cana-de-açúcar.

A espécie *Pleurotus florida* foi cultivada sobre seis substratos diferentes, sendo eles palha de trigo, palha de arroz, palha de feijão, folha de bananeira, palha de sorgo e sabugo de milho. Dentre estes, os substratos que favoreceram o crescimento do cogumelo e o desenvolvimento de seu corpo de frutificação foram a palha de arroz e a palha de feijão, cuja composição possui menor teor de hemicelulose, maior teor de cinzas, e com maior teor de P, K, Ca, Mg e Mn (Figueró, 2011).

Os substratos, além de favorecerem o crescimento de certas espécies de cogumelo, fornecem moléculas que modificam a composição química original destes. Furlani, em seu trabalho, relatou que muitas moléculas presentes no corpo de frutificação do cogumelo são provindas de seus substratos de cultivo. Apesar disso, ele conclui em seu artigo que a qualidade nutricional do cogumelo está vinculada aos teores de proteína, carboidratos e vitaminas que os cogumelos apresentam (Dias, 2003; Donini, 2005; Bernardi, 2008; Rios-Hurtado, 2003).

Ramirez (2007) usa em seu trabalho produtos naturais, no caso a polpa do café como substrato fonte de nutrientes para o cogumelo da espécie *Pleurotus sajor-caju*. O autor relata a identificação de cafeína no cogumelo como parte da incorporação de

nutrientes a partir da polpa de café utilizada. O cogumelo apresentou cafeína em sua constituição apenas após o cultivo em substrato que a continha.

Salmones (2005) identificou cafeína em três espécies de cogumelos do gênero *Pleurotus* também cultivados em polpa de café. O autor ainda relata a diminuição na concentração de cafeína nos substratos utilizados para o cultivo dessas espécies, o que é relacionado com o acúmulo de cafeína no corpo de frutificação do cogumelo em questão. De maneira similar, Fan (2006) relata também a mesma diminuição do teor de cafeína nos substratos utilizados durante o cultivo e o acúmulo de cafeína no corpo de frutificação dos cogumelos *Pleurotus*.

Devido ao grande interesse da sociedade atual no consumo de alimentos com menor teor de lipídeos como os cogumelos, e observando o uso de substratos como polpa e semente de café no cultivo dos mesmos, o atual projeto de mestrado visou analisar e quantificar a presença de metabólitos originalmente presentes no café e em seus derivados em cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* cultivados em resíduos de café.

2.2. Referências

- BERNARDI E.; DONINI, L. P.; MINOTTO, E., NASCIMENTO, J. S. **Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado.** *Bragantia*, Campinas, v. 68, n. 4, p.901-907, 2009.
- BERNARDI, E., MINOTTO, E., NASCIMENTO, J. S. **Evaluation of growth and production of *Pleurotus sp.* in sterilized substrates.** *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. v. 80, n. 3, p. 318-324, 2013.
- DIAS, E. S., KOSHIKUMO, E. M. S. SCHWAN, R.F., SILVA, R. **Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas.** *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*. v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.
- DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J.S. do. **Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.6, n.2, 2006.

- FAN, L., SOCCOL, A. T., PANDEY, A., VANDENBERGHE, L. P. S., COCCOL, C. R. **Effect of caffeine and tannins on cultivation of *Pleurotus* on coffee huscks.** *Brazilian Journal of Microbiology.* v. 37, p. 420-424, 2006.
- FIGUEIRÓ, G. G., GRACIOLLI, L. A. **Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*.** *Ciência e Agrotecnologia.* v. 35, n. 5, 2011.
- FURLANI, R. P. Z. e GODOY, H.T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz.* v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.
- FURLANI, R. P. Z., GODOY, H. T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos,* Campinas, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.
- GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; CORTÉS, N.; MATA, G. **Improvement od yield of the edible and medicinal mushroom *Lentinula edodes* on wheat straw by use of supplemented spawn.** *Brazilian Journal of Microbiology,* v. 42, n. 2, 2014.
- HENRIQUES, G. S.; SIMEONE, M. L. F.; AMAZONAS, M. A. L. A. **Avaliação *in vivo* da qualidade protéica do champignon do Brasil (*Agaricus brasiliensis* Wasser et al.).** *Revista de Nutrição,* v. 21, n. 5, 2008.
- JUNGHANS, D.T., ALFERNAS, A.C., MAFFIA, L.A. **Escala de notas para Quantificação da Ferrugem em *Eucalyptus*.** *Fitopatologia Brasileira,* v. 28, n.2, p. 184-188, 2003.
- KANEKO, R.; FONTANARI, L. M.; SANTOS, S. A.; Di STASI, L. C.; RODRIGUES FILHO, E.; EIRA, A. F. **Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice.** *Food and Chemical Toxicology,* v. 42, n. 6, p. 909-916, 2004.
- PEDRA, W. N. e MARINO, R. H. **Cultivo axênico de *Pleurotus spp.* em serragem da casca de coco (*cocos nucifera linn.*) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo.** *Arquivos do Instituto Biológico.* São Paulo. v. 73, n. 2, p. 219-225, 2006.
- PÉREZ-SILVA, E., ESQUEDA, M., HERRERA, T. **Toxic macromycetes of Sonora, Mexico.** *Revista Mexicana de Micologia,* v. 28, 2008.

- RAGO, A.M., CASAGRANDE, M.V., MASSOLA, N.S.J. **Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminae* no Estado de São Paulo.** *Summa Phytopathol*, v.35, n.2, p. 93-97, 2009.
- RAGUNATHAN, R., GURUSAMY, R. PALANISWAMY, M., SWAMINATHAN, K. **Cultivation of *Pleurotus sp.* on various agro-residues.** *Food Chemical*, v. 55, n. 2, p. 139-144, 1996.
- RAMIREZ, I. J. N., ANGARITA, C. C., ZULUAGA, H. J. O. **Incorporación de cafeína en el hongo *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café.** *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, p. 72-74, 2007.
- RAMPINELLI, J. R., SILVEIRA, M. L. L., GERN, R. M. M., FURLAN, S. A., NINOW, J. L., WISBECK, E. **Valor nutricional de *Pleurostus djamor* cultivado em palha de bananeira.** *Alimentos e Nutrição*, Araraquara. v. 21, n. 2, p. 197-202, 2010.
- REGINA, M. **Cinética do crescimento MICELIANO DE *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto.** Botucatu, SP, 2001. 85p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agronômicas – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
- RIOS-HURTADO A., TORRES-TORRES G., MEDINA-TIVAS, M.A. **Caracterización bromatológica de la seta (*Pleurotus sajor-caju*) producida em cuatro sustratos orgánicos.** *Alimentaria*, v. 349, p. 85-89, 2003.
- SALMONES, D., MATA, G., WALISZEWSKJ, K. N. **Comparative culturing of *Pleurotus spp.* on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation.** *Bioresouce Technology*, v. 96, n. 5, p. 537-544, 2005.
- SILVA, M. R. C. **Substâncias Bioativas em fungos basidiomicetos.** Monografia do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Belo Horizonte, MG, 2007. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- TORTORA, Gerald J. **Microbiologia** / Berdell R. Funke, Christine L. Case; trad. Atual. Por Roberta Marchiori Martins. – 8.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2004.
- VENDRAMIN, A., BRVAR, M. ***Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* poisoning: Two syndromes.** *Toxicon*, v. 90, p. 269-272, 2014.

- WARTCHOW, F., MAIA, L.C., CAVALCANTI, M.A.Q. **Estudos taxonômicos de *Amanita muscaria* (L.) Lam (Amanitaceae, Agaricomycetes) e sua taxa infraspecific no Brasil.** *Acta Botânica Brasilica*, v.27, n.1, 2013.

- ZANELLA, J. **O benefício dos cogumelos.** *Portal UNESP*, n. 193, p. 8-9, 2004.

**CAPÍTULO 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CAFEÍNA E SEUS
MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO**

CAPÍTULO 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CAFEÍNA E SEUS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO

3.1. Cafeína

3.1.1. Classificação

3.1.1.1. Metilxantinas

A cafeína é uma molécula classificada como sendo um alcaloide, ou seja, um composto orgânico nitrogenado derivado de plantas. Os alcaloides são farmacologicamente ativos, desempenhando funções e efeitos terapêuticos no organismo. Além disso, a cafeína pertence à classe das metilxantinas, que são pseudoalcaloides que atuam diretamente como estimuladores do sistema nervoso central. As metilxantinas são facilmente encontradas em bebidas como chá, café, refrigerantes contendo guaraná ou cola e em alguns alimentos como cacau, chocolate e folhagem de algumas plantas (Simões, 2004).

Alguns autores divergem quanto à classificação das metilxantinas dentro do grupo dos alcaloides. Existem duas vias de entendimento para os autores, a primeira defende as metilxantinas como sendo alcaloides, devido a possuírem grande atividade biológica, distribuição restrita e a presença de nitrogênios heterocíclicos. A segunda via de entendimento fica restrita à definição de Elderfield (Korolkovas, 2008), na qual os alcaloides são substâncias nitrogenadas que possuem caráter básico. Sendo assim, pela segunda via, as metilxantinas seriam classificadas como pseudoalcaloides, visto que tem sua origem de bases púricas e apresentarem caráter anfótero (Simões, 2004).

As metilxantinas mais conhecidas e mais abundantes no planeta terra são a cafeína, a teofilina e a teobromina. A cafeína é mais encontrada em fontes vegetais e a teofilina é mais encontrada por síntese total. Considerando o caráter anfótero das metilxantinas, a teofilina e a teobromina possuem bases nitrogenadas, mas seu caráter é ácido, no entanto, a cafeína que também é nitrogenada, forma sais ácidos em pH muito baixo (Simões, 2004, Moraes, 2003, Korolkovas, 2008).

Sobre sua estrutura, as metilxantinas são originadas a partir de bases púricas, apresentando assim nitrogênios heterocíclicos em seus dois anéis. As metilxantinas

(Figura 7) diferem entre si apenas quanto ao número de radicais metila substituídos e as devidas posições em um mesmo esqueleto.

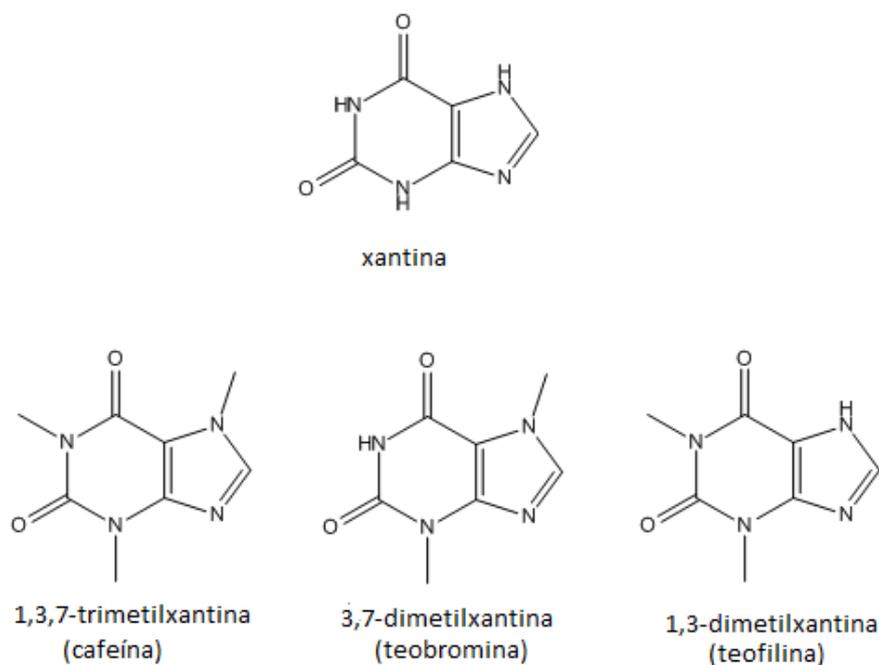


Figura 7. Fórmula estrutural das xantinas e as principais metilxantinas: 1,3,7-trimetilxantina (cafeína), 3,7-dimetilxantina (teobromina) e 1,3-dimetilxantina (teofilina).

As metilxantinas são encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde o clima favorece a produção de plantas que contém essas moléculas, sendo que ao redor do mundo existem cerca de 60 espécies vegetais que contém essas moléculas.

3.1.1.2. A molécula da Cafeína

A cafeína é uma xantina contendo três radicais metilas, localizados nos nitrogênios 1, 3 e 7 da mesma. Em sua forma pura, ela é encontrada na forma de um pó branco brilhante e cristalino. Possui ponto de fusão na temperatura de 238°C e massa molar de 194,19 g. Quando a cafeína é ingerida como um sólido, em sua forma pura, possui sabor amargo.

É amplamente utilizada como fármaco antigripal e como inibidor de apetite. Nesses medicamentos, principalmente antigripais, ela é associada ao ácido acetilsalicílico, ao paracetamol, à codeína e à diidroergotamina. Quando isolada, ela é

utilizada como fármaco no combate ao sono, à enxaqueca e à depressão respiratória (Simões, 2004; De Maria, 2007; Pacheco, 2007; Soares, 2010).

A cafeína aparece, também, na forma injetável, mas seu uso tem sido questionável considerando seus malefícios. Além disso pode ser comercializada em farmácias de manipulação e por meio da internet. A cafeína também pode ser encontrada em algumas drogas vegetais, como cola (*Cola acuminata*) que apresenta concentrações de cafeína de 1 a 2,5 % (Simões, 2004).

O cacau (*Theobroma cacao L.*) apresenta cafeína após o processo de torrefação, indicando assim que o mesmo não exerce influência sobre a quantidade de cafeína. Os teores encontram-se em 0,3 %, sementes de guaraná com teores de 2,5 a 5,0 %. Em cafés, o teor de cafeína varia de acordo com a espécie e a variedade de cafés encontrada (Simões, 2004).

3.1.1.3. Efeitos da Cafeína

A cafeína é o alcaloide mais ingerido e também o que possui maior atividade biológica. O seu alto consumo é justificado por meio de seu preço acessível, bem como pela facilidade em ser encontrados em alimentos de uso diário. Ela é um potente estimulante do sistema nervoso central.

Além disso, seus efeitos no organismo humano são os mais variados, podendo afetar também o sistema cardiovascular. A cafeína pode causar distúrbios que vão desde o aumento da capacidade de alerta até a redução da fadiga. Não somente benefícios, como o aumento da atenção e concentração, mas quando ingerida em excesso também pode trazer malefícios à saúde humana (De Maria, 2007).

A cafeína exerce efeitos ergogênicos durante exercícios de longa duração na dosagem de até 5mg/kg. O Comitê Olímpico Internacional considera a cafeína como *doping*, quando a sua dosagem ultrapassa a concentração urinária de 12 mg/L. Segundo Higa (2008), a cafeína é considerada como fator de risco para incontinência urinária em mulheres em grandes quantidades. Tfouni (2007) relata que o consumo diário do pó de guaraná resulta em sintomas como a ansiedade, alguns tremores, inquietação, irritabilidade e perda de apetite (Braga, 2000).

Nóbrega (2011) mostra que a ingestão de três xícaras de café promove não somente o fim da hipertensão após o exercício, mas também uma resposta hipertensiva a valores na base de um órgão. Em seu trabalho, Franco (2012), comprovou que a suplementação com cafeína feita em ratos diminuiu a força a fratura óssea, bem como reduziu a espessura e o peso do fêmur, aumentando a excreção de cálcio na urina.

Sobreiro (2005) comenta que a ingestão de seis ou mais xícaras de café aumentam a mobilidade espermática. Dorrian (2011) relatou em seu trabalho que enfermeiras e parteiras australianas utilizam a cafeína como inibidora do sono em dias de muito trabalho levando a compensação do sono.

Alguns efeitos indesejáveis do consumo excessivo de cafeína podem ser identificados a partir da ingestão de 1,0 g de cafeína, tais como dores de cabeça, nervosismo, excitação, cansaço e alterações cognitivas. A partir do consumo diário de 600 mg de cafeína, a pessoa pode apresentar sintomas de cafeinismo, síndrome decorrente do uso abusivo de cafeína.

Isso acarreta em distúrbios do sono, cansaço e ansiedade uma xícara contendo 175 mL de café, possui aproximadamente cerca de 85 a 115 mg de cafeína, dependendo do tipo de café e de seu processamento. Um refrigerante de cola contendo 350 mL, possui cerca de 50 mg de cafeína (Simões, 2004).

A quantificação da cafeína é importante devido ao consumo excessivo de alimentos e medicamentos que a contém. Atualmente, com a vida corrida que se leva e a necessidade de substâncias que nos permitam ter mais foco e menos sono, o interesse pelo café e, conseqüentemente, pela cafeína vem crescendo. Devido aos grandes malefícios que a cafeína pode causar, quando em excesso no nosso organismo, a quantificação da cafeína é necessária para que a dosagem diária seja controlada por meio do consumo dos alimentos que contém a cafeína.

3.1.1.4. Métodos de Determinação de Cafeína

O método de extração da cafeína relatado na literatura é muito variável, isso por que a cafeína é uma molécula com dois anéis e nitrogênios heterocíclicos. A cafeína possui pKa próximo a 8,5 e caráter básico, devido aos nitrogênios presentes na estrutura. Em valores de pKa mais baixos, onde a concentração hidrogeniônica é maior,

é mais fácil a protonação da cafeína e, por consequência, a sua retirada da matriz em que está.

Os métodos de extração da cafeína estão diretamente ligados às técnicas de análise e determinação da molécula. Essas técnicas encontradas para a determinação da cafeína possuem uma ampla variedade, alternando desde as mais clássicas, como a gravimetria, até as mais sofisticadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência.

A primeira técnica utilizada para a determinação de cafeína foi a técnica clássica chamada gravimetria, método utilizado durante vários anos pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a determinação de cafeína em sementes de café, acompanhada de uma extração utilizando água ou etanol, limpeza do filtrado com óxido de magnésio e extração subsequente com clorofórmio (De Maria, 2007).

Em seu trabalho sobre a composição do café e da palha de *Coffea arabica*, Martins (2008), usando a extração com ácido sulfúrico, água quente e clorofórmio, juntamente com a técnica de gravimetria, encontrou valores de 0,81 % na palha e 3,85 % de cafeína no café.

A espectrofotometria com raios aplicados na região do ultravioleta é também outra técnica bastante utilizada na determinação de cafeína. Esse método consiste na absorção por uma molécula de radiação eletromagnética aplicada na região de comprimento de onda correspondente aos raios ultravioleta. Como a cafeína absorve radiação nessa região, a espectrofotometria pode ser utilizada para a sua quantificação.

No ano de 1930, Holiday, relatou a faixa de absorção da cafeína entre os comprimentos de onda de 270 a 275 nm. Amaral-Mello (2011), utilizando melhores recursos devido ao aprimoramento da tecnologia, foi preciso e afirmou que existe uma separação mais eficiente do pico de absorção da cafeína no comprimento de onda de 274 nm, o que é confirmado também em outros trabalhos (Sousa, 2011; Delarozza, 2014).

Contudo, o método espectrofotométrico não pode ser absolutamente conclusivo quanto às análises de amostras. Isso ocorre porque outros interferentes podem absorver a radiação no mesmo comprimento de onda da cafeína. A fim de evitar a resposta mascarada por outros interferentes, é necessário o uso de técnicas de separação como a cromatografia.

A cromatografia que utiliza materiais com menor custo e que não necessita de alta tecnologia é a cromatografia em camada delgada (CCD). Ela consiste em um método de separação de componentes de uma mistura sólido-líquido em que a fase móvel (solvente + amostra) passa para a fase estacionária (coluna). Priersch (2011), em seu trabalho de determinação de cafeína, através da técnica de CCD, em cápsulas de chá verde revelou a presença de cafeína e também de outra metilxantina, a teobromina.

Além da cromatografia de camada delgada, existem outras técnicas cromatográficas mais sofisticadas como a cromatografia gasosa, com detectores de ionização em chamas (DIC) ou acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Prasniewski (2015) utilizou a técnica CG-EM na determinação de cafeína, além da CCD e também da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

A cromatografia líquida de alta eficiência é muito relatada na determinação de cafeína. A Tabela 1. mostra algumas referências encontradas sobre a determinação de cafeína em diferentes matrizes, utilizando essa técnica de determinação com detector de arranjo de diodos, usando diferentes fases estacionárias e móveis.

Tabela 1. Técnicas de Determinação de Cafeína e Pré-tratamento de amostras contendo cafeína.

Autor - Data	Técnica de Determinação da Cafeína	Pré-tratamento para amostras
Aragão, 2009	CLAE-UV, 273 nm, coluna RP-18, fase móvel: água/etanol/ácido acético (75:24:1) % v/v/v.	Infusões com água fervente
Aquino, 2004	CLAE-UV, 285 nm, coluna CH-18, fase móvel: acetonitrila/água (20:80) % v/v.	Alíquotas filtradas, sendo as mais concentradas diluídas em água.
Alves, 2002	CLAE-UV, 273 nm, coluna Inertsil ODS-3, fase móvel: ácido acético 1% : acetonitrila (95:5, v/v).	Método aplicado por apud Schormüller (1970).

Marcucci, 2013	CLAE-UV, 272 nm, coluna ODS 1, gradiente linear de ácido acético 5% (A) e acetonitrila (B).	Diluição em ácido acético (5%), na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹ .
Camargo e Toledo, 1998	CLAE-UV, 254 nm, coluna C18 fase reversa, fase móvel isocrática metanol:água (25:75 v/v).	Extração por Madison, Kozarek & Damo (1976), com método de limpeza de Li, Berger & Hartland (1990)

Embora as vantagens da análise cromatográfica sejam evidentes em relação à seletividade e excelentes limites de detecção, a técnica exige metodologias de preparação da amostra com a utilização de uma quantidade não desprezível de solventes tóxicos, além de um maior tempo de preparo da amostra. Desta forma, é importante o desenvolvimento de novas metodologias para a quantificação de compostos de interesse, como a cafeína. Neste aspecto, destacam-se as técnicas de eletroanálise, quais surgem como alternativa a fim de diminuir o tempo e o custo das análises, possibilitando a obtenção de limites de detecção dentro do esperado.

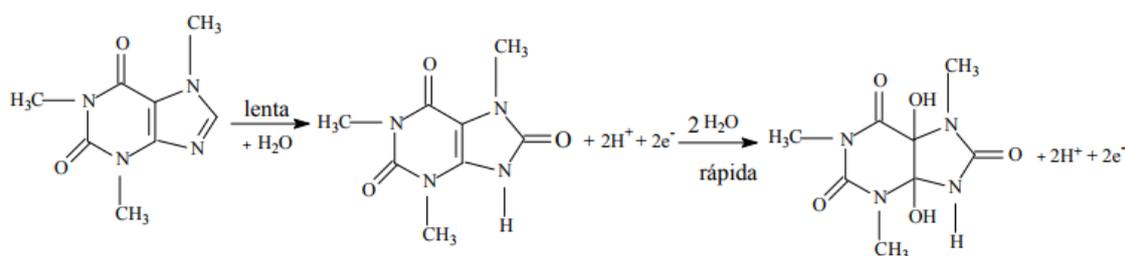


Figura 8. Mecanismo proposto por Lourenção (2009) usando eletrodo de diamante dopado com boro.

A cafeína apresenta potencial de oxidação, devido à sua estrutura orgânica, como pode ser observado na Figura 8, mecanismo de oxidação proposto por Lourenção (2009). Em razão disso, as técnicas eletroanalíticas mais aplicadas à molécula de cafeína são a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ). As técnicas voltamétricas de pulso consistem na aplicação de pulsos de potencial, bem como na determinação de corrente logo após a aplicação desses pulsos de potencial.

A voltametria de pulso diferencial foi utilizada na determinação simultânea de cafeína, ácido ascórbico e paracetamol em formulações de medicamentos, usando um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e como eletrólito suporte uma solução de ácido perclórico com concentração de 0,1 mol/L (Lau, 1989; De Maria, 2007).

Usando como eletrólito suporte o ácido perclórico (0,1 mol/L) e eletrodo de trabalho, o eletrodo de ouro, Braga (2006) utilizou a técnica de voltametria cíclica para a determinação de cafeína em produtos farmacêuticos encontrando como limite de detecção $9,92 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Oliveira (2016) usou a técnica de voltametria de pulso diferencial para determinar cafeína utilizando eletrodos FTO's (óxido de estanho dopado com flúor) modificados encontrando limites de detecção e de quantificação de 0,052 e 0,17 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

Usando a voltametria de onda quadrada de redissolução anódica, Ly (2004) utilizou o eletrodo comercial de carbono grafite para determinar cafeína em amostras de chá, usando como eletrólito suporte o tampão fosfato com pH 9,2.

Alencar (2015) em sua pesquisa sobre a determinação simultânea de ácido acetilsalicílico, cafeína e paracetamol utilizou como eletrólito suporte uma solução de ácido sulfúrico (0,1 mol/L) e a técnica escolhida foi amperometria de múltiplos pulsos e o eletrodo de trabalho foi uma placa de filme de diamante dopado com boro (DDB).

Lourenção (2009) em seu trabalho de determinação simultânea de paracetamol, cafeína e ácido ascórbico em formulações farmacêuticas utilizou o eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho, a técnica de voltametria de pulso diferencial e o eletrólito suporte de tampão acetato com pH 4,5.

A aplicação de técnicas eletroanalíticas na quantificação de cafeína em amostras de alimentos tem sido realizada de forma discreta e poucos trabalhos têm sido encontrados na literatura sobre este tema. Neste sentido, optou-se por fazer a determinação de cafeína em cogumelos do gênero *Pleurotus*, buscando menores limites de quantificação e detecção para essa determinação.

3.1.2. Técnicas Voltamétricas Utilizadas

3.1.2.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica baseada em duas varreduras de potencial, a direta e a inversa. Após a primeira varredura, a direção do potencial é invertida e a segunda varredura é completada. Durante as duas varreduras de potencial, a corrente elétrica é medida. Uma vantagem da técnica de voltametria cíclica é que o produto da reação redox que ocorreu na primeira varredura é avaliado novamente na segunda varredura.

A voltametria cíclica não é demasiadamente empregada para a análise quantitativa, uma vez que apresenta baixa sensibilidade. Contudo, é uma técnica valiosa no estudo e na avaliação do comportamento eletroquímico de compostos de interesse. Desta forma, por meio da variação da velocidade de varredura na VC, é possível promover um estudo acerca do mecanismo de reação redox juntamente com seus produtos de reação e produtos intermediários, estimando assim, o número de elétrons envolvidos no processo eletroquímico.

Outras aplicações da voltametria cíclica são a análise dos potenciais de pico das moléculas investigadas, a avaliação cinética das reações redox e a investigação da reatividade química das moléculas. Os potenciais em que a direção da varredura é invertida são chamados potenciais de inversão. Esses potenciais são escolhidos com base na oxidação ou redução da molécula investigada (Skoog, 2006).

3.1.2.2. Voltametria de Onda Quadrada

A técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis e os limites de detecção obtidos podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas (De Souza, 2003).

A VOQ é baseada na medida de corrente elétrica em função do potencial resultante de uma sequência de variação de potencial em forma de onda, onde a variação crescente de potencial é aplicada através de uma ‘escada de potencial’ gerando dessa maneira um pico simétrico correspondente ao processo redox sofrido pelo analito. Adicionalmente, a possibilidade de obter correntes de pico definidas em contraponto com velocidades altas de varredura, resultando assim numa maior sensibilidade da técnica, é a principal vantagem do uso da técnica de voltametria de onda quadrada.

Para o cálculo da velocidade da varredura na voltametria de onda quadrada, são avaliados dois parâmetros da técnica: a frequência (f) e o incremento (ΔE_s). Quando essa técnica é aplicada, os tempos experimentais de análise são relativamente curtos e podem ser obtidos com as frequências moderadas (De Souza, 2003; Skoog, 2006).

3.1.3. Validação de Métodos

A validação de um método de determinação é a avaliação de sua eficiência quanto ao objetivo pretendido. Para que essa avaliação ocorra, é necessária a análise e verificação de alguns parâmetros da validação. Os parâmetros são avaliados para garantir a confiabilidade do método proposto.

Um estudo de validação é necessário devido ao surgimento de novos métodos analíticos de determinação e também à garantia de que o método proposto é confiável e os resultados fornecidos pelo mesmo, evitando perdas de recursos, muitas vezes, irreparáveis. Devido a esses motivos, deve-se avaliar os parâmetros e certificar-se de que estão dentro das regulamentações estabelecidas e recomendadas, proporcionando assim resultados coerentes (Ribani, 2004; Aragão, 2009).

Dois tipos de validação são relatados no trabalho de Ribani, a validação no laboratório e a validação completa. A validação no laboratório é o tipo de validação em que todas as etapas são avaliadas e realizadas dentro de um laboratório apenas. A validação completa consiste em um estudo entre laboratórios em que são usados métodos analíticos oficiais para a aplicação de interesse.

Para que um determinado procedimento experimental seja avaliado é necessário o estudo de alguns parâmetros, cujas diretrizes são regulamentadas por agências como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Nutricional (INMETRO, 2011). Essas duas agências são as que fazem a regulamentação de métodos analíticos de todo o Brasil.

3.1.3.1. Linearidade

A linearidade é avaliada com o objetivo de verificar a capacidade que um determinado método de determinação possui em obter respostas analíticas que sejam diretamente proporcionais a concentração de analito em uma determinada amostra. A

expressão matemática $y = ax + b$ é utilizada para descrever a relação entre a concentração de analito e a resposta analítica.

Os valores de a e b são determinados através de um conjunto de dados experimentais, os quais são submetidos à técnica de regressão linear. Para isso, uma curva de calibração deve ser construída com no mínimo 5 concentrações distintas crescentes a fim de formarem uma base de dados, à qual é submetida a análise estatística a fim de determinar o coeficiente de correlação, bem como os valores de interseção com o eixo Y, do coeficiente angular, entre outros fatores avaliados (Ribani, 2004; Aragão, 2009).

3.1.3.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor concentração do analito de interesse que a técnica utilizada na determinação pode detectar, mas não necessariamente quantificar. O limite de quantificação, de maneira similar, é a menor quantidade que a técnica de determinação utilizada pode quantificar com precisão e exatidão (Ribani, 2004).

Existem três maneiras de realizar os cálculos dos limites de detecção e de quantificação: o método visual, o método com relação no sinal resíduos e o método avaliando os parâmetros da curva de calibração. O método escolhido para determinar os valores de LD e LQ para o atual estudo foi o de avaliação dos parâmetros da curva de calibração (Ribani, 2004).

3.1.3.3. Precisão

A precisão é outro parâmetro avaliado no estudo de validação de um método analítico. Ela avalia a proximidade que os resultados de uma mesma amostra possuem entre si. A precisão pode ser avaliada em três diferentes níveis: a repetitividade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade.

O estudo da repetitividade se refere à avaliação da proximidade dos resultados obtidos em um único dia de análise, mantendo condições controladas. A reprodutibilidade é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, ou seja, contando com uma avaliação interlaboratorial. A precisão intermediária é utilizada para comparar resultados obtidos para uma única amostra durante o período de dias consecutivos em um mesmo laboratório (Aragão, 2009).

3.1.3.4. Exatidão

O parâmetro da validação denominado exatidão tem como objetivo a comparação entre resultados obtidos e determinados através de ensaios experimentais e um valor teórico de referência. A avaliação desse parâmetro pode ser realizada de três maneiras diferentes: o método de adição-padrão, os ensaios de recuperação e até mesmo a comparação entre os métodos.

O método de adição-padrão consiste em sucessivas adições de alíquotas de amostras com concentrações conhecidas sobre a solução contendo uma concentração de amostra cuja concentração é desconhecida, objetivando conhecer a concentração desta. Esse método geralmente é utilizado quando não são encontradas amostras com a mesma matriz, mas livres do analito de interesse.

3.2. Referências

- ALENCAR, L.M. **Determinação rápida e simultânea de paracetamol, ácido acetilsalicílico e cafeína em medicamentos empregando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção por amperometria de múltiplos pulsos.** 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Grande Dourados. Dourados, 2015.
- ALVES, A.B. **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.
- AMARAL-MELLO, M. R. P. **Estudo comparativo de métodos para extração de cafeína em cafés descafeinados.** In. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. Águas de Lindoia, 2007. Anais. Embrapa Café, 2007.
- AQUINO, F.W.B. e AMORIM, A. G. N. **Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: Validação de Metodologias.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 32-38, 2004.
- ARAGÃO, N. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise – um exemplo de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida (CLAE) e os princípios da**

‘Química Verde’ na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova*, v. 32, n. 39, p. 2476-2481, 2009.

- BRAGA, C. L., e ALVES, M. P. **A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de endurance.** *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 8, n. 3. p. 33-37, 2000.

- BRAGA, O.C. **Determinação de cafeína em produto farmacêutico por voltametria cíclica com eletrodo de ouro.** 22 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Santa Catarina. Florianópolis, 2006

- CAMARGO M.C.R. e TOLEDO M.C.F. **Teor de Cafeína em cafés brasileiros.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 4, 1998.

- De MARIA, C. A. B. e MOREIRA, R.F.A. **Cafeína: revisão sobre os métodos de análise.** *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

- DELAROZA, F. e RAKOCEVIC, M. **Spectroscopic and Chromatographic Fingerprint Analysis of Composition Variations in Coffea arabica Leaves Subject to Different Light Conditions and Plant Phenophases.** *Journal of the Brazilian Chemical Society.*, p. 1-10, 2014.

- DORRIAN J., PATERSON, J., DAWSON, D., PINCOMBE, J., ROGERS, A. E. **Sleep, stress and compensatory behaviors in Australian nurses and midwives.** *Revista Saúde Pública.* v. 45, n. 5, 2011.

- FRANCO, F. S. C., COSTA, N. M. B., OLIVEIRA, T. T., GOMES, G. J., SILVA, K. A., NATALI, A. J. **Efeitos da suplementação com creatina e cafeína sobre a força de fratura óssea em ratos submetidos a exercício de saltos verticais.** *Revista de Educação Física – UEM*, v. 23, n. 1, 2012.

- HIGA, R., LOPES, M. H. B., REIS M. J. **Fatores de risco para incontinência urinária na mulher.** *Revista da Escola de Enfermagem da USP.* v. 42, n. 1, 2008.

- HOLIDAY, E. R. **The characteristic absorption of ultra-violet radiation by certain purines.** *Biochemical Journal.* v. 24, n. 3, p. 619-625, 1930.

- KOROLKOVAS, A. e BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica.** Tradução ampliada e atualizada por Andrejus Korolkovas. – [reimpr.] - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 792, 2008.

- LAU, O., LUK, S., CHEUNG, Y. **Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy carbon electrode.** *Analyst*, v. 114, p. 1047-1051, 1989.
- LOURENÇÃO, B.C. **Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro.** 2009. 139 p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2009.
- LY, S.Y., JUNG, Y.S., KIM, M.H., HAN, I.K., JUNG, W.W., KIM, H.S. **Determination of Caffeine using a Simple Grafite Pencil Electrode with Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry.** *Microchimica Acta*, v.146, p. 207-213, 2004.
- MARCUCCI, C. T., BENASSI, M. de T. **Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros.** *Química Nova*, v.36, n.24, 2013.
- MARTINS, C. M. ; AQUINO, F. J. T. . **Estudo da composição química e da atividade antioxidante de cafés (*Coffea arábica*) e de suas palhas provenientes do cerrado.** In: VIII ENCONTRO INTERNO XII SEMINARIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2008, Uberlândia. Universidade necessária utopias +distopias, 2008.
- MORAES, M. L. L., MICKE, G.A. FUJIYA N. M., TAVARES, M. F. M. **Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar.** *Revista Analytica*. n. 5, p. 44-50, 2003.
- MULLER, E., JORK, H.. **Analysis of cola beverages containing aspartame, using hydrophobic chromatography on Fractogel TSK.** *Journal Deutsche Lebensm-Rundsch.* v. 86, n. 8, p. 243-247, 1990.
- NÓBREGA, T. K. S., MOURA, J. S. J., ALVES, N.F., SANTOS, A. C., SILVA, A. S. **A ingestão de café abole a hipotensão induzida por exercício aeróbico: um estudo piloto.** *Revista da Educação Física – UEM*, v. 22, n. 4, 2011.
- NOGUEIRA, T. **Determinação de cafeína e identificação de adulterações no café empregando a eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato.** São Paulo, 2006. 76p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química - Universidade de São Paulo.

- OLIVEIRA, R.; PISSETTI, F.L.; LUCHO, A.M.S. **Eletrodos de FTO modificados por eletrodeposição direta de ouro: produção, caracterização e aplicação como sensoreletrorquímico.** *Química Nova*, v.39, n. 2, p. 146-155, 2016.
- PACHECO, A. H. R. N., BARREIROS, N. S. R., SANTOS, I. S., KAC, G. **Consumo de cafeína entre gestantes e a prevalência do baixo peso ao nascer e da prematuridade: uma revisão sistemática.** *Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro*. v. 23, n. 12. p. 2807-2819, 2007.
- PRASNIEWSKI, A., AGUIAR, L.M., OLDONI, T.L.C. **Determinação de cafeína em chá-preto (*Camellia sinensis*) por métodos cromatográficos: CCD, CLAE-DAD e CG-EM.** *Synergismus scyentifica UTFPR*, v.10, n.1, p. 108-115, 2015.
- PRIETSCH, R. da F. **Determinação de cafeína em cápsulas de chá-verde através da cromatografia em Camada Delgada.** *Revista Átomo*, v. 11, n. 1, 2011.
- SIMÕES, C. M. O., GUERRA, M. P., [et. al.]. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.
- SOARES, A. C. R. P. **Metilxantinas.** *Webartigos.com, Saúde e Beleza*, 2010.
- SOBREIRO, B. P., LUCON, A. M., PASQUALOTTO, F. F., HALLAK, J., ATHAYDE, K. S., ARAP, S. **Semen analysis in fertile patients undergoing vasectomy: reference values and variations according to age, length of sexual abstinence, seasonality, smoking habits e caffeine intake.** *São Paulo Medical Journal*. v. 123, n. 4, 2005.
- SOUSA, S. A. **Dissolution test of herbal medicines containing *Paullinia cupana*: validation of methods for quantification and of dissolution.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n.2, 2011.
- TFOUNI, S. A. V., CAMARGO, M. C. R., VITORINO, S. H. P., MENEGÁRIO, T. F., TOLEDO, M. C. F. **Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta.** *Revista de Nutrição*. v. 20, n. 1, 2007.

**CAPÍTULO 4. DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELOS
PLEUROTUS UTILIZANDO A TÉCNICA DE VOLTAMETRIA DE ONDA
QUADRADA**

CAPÍTULO 4. DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM COGUMELOS *PLEUROTUS* UTILIZANDO A TÉCNICA DE VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Amostragem

Para a realização desse trabalho, três amostras distintas de cogumelo foram cedidas pela Profa. Dra. Herta Dalla Santa, do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEALI), da UNICENTRO localizada em Guarapuava. As amostras de cogumelos recebidas são a totalidade dos basidiocarpos de cogumelos *Pleurotus* cultivados sobre diferentes resíduos.

Os mesmos foram liofilizados, triturados e fragmentados em minúsculos pedaços, possuindo assim o aspecto de farelo (Figura 9). As amostras foram armazenadas em frascos de vidro à temperatura ambiente. As amostras de cogumelo foram classificadas segundo os substratos utilizados para o cultivo (Tabela 2).

Tabela 2. Código representativo das Amostras de Cogumelo *Pleurotus*.

Amostra	Cultivo/Substratos Utilizados
Cogumelo A – Trigo + Trigo	Amostra cultivada por 25 dias e inoculada por 45 dias apenas em sementes de trigo.
Cogumelo B – Trigo + Café	Amostra cultivada por 25 dias sobre palha de trigo e inoculada por 45 dias em borra de café.
Cogumelo C – Café + Café	Amostra cultivada por 25 dias sobre semente de café e inoculada por 45 dias em borra de café.

A amostra A é cultivada apenas em trigo, ou seja, em nenhuma parte do processo de cultivo o cogumelo teve contato com borras de café. A amostra B foi cultivada em trigo e inoculada em resíduos de café, com isso espera-se encontrar na amostra indícios de cafeína. A amostra C quando cultivada teve em duas partes do processo o uso de resíduos de café, espera-se, portanto, que a concentração de cafeína seja maior que da amostra B.



Figura 9. Fotos das amostras de cogumelo *Pleurotus*.

4.1.2. Técnicas Utilizadas

4.1.2.1. Voltametria Cíclica

A técnica de voltametria cíclica foi empregada para o estudo da reação de oxidação eletroquímica da cafeína sobre a superfície do eletrodo de diamante dopado com boro. A técnica foi empregada por meio da variação da velocidade de varredura na faixa de 10 a 200 mV/s.

Os parâmetros fixados para esse estudo foram potencial de início da varredura em 0,85 V, potencial final com valor 1,45 V e potencial de reversão da varredura com valor 0,85 V além do incremento de varredura ser fixado no valor de 4 mV. O eletrólito suporte usado para essa avaliação foi a solução de sulfato de sódio 0,1 M com pH 5,0. A concentração de cafeína dentro da cela eletroquímica foi de aproximadamente $1,3 \cdot 10^{-2}$ M. Os critérios avaliados utilizando a técnica de voltametria cíclica possuem a finalidade de avaliar a reversibilidade da reação e o comportamento eletroquímico da cafeína.

4.1.2.2. Voltametria de Onda Quadrada

A técnica de voltametria de onda quadrada foi utilizada, nesse trabalho, para o estudo de oxidação eletroquímica da cafeína e para a quantificação de cafeína em cogumelos *Pleurotus*. Por meio dessa técnica, uma metodologia analítica foi desenvolvida para a quantificação da cafeína. Para a determinação da cafeína em amostras de cogumelo, uma curva de trabalho foi construída, obtendo-se valores de LD, LQ, desvio padrão e sensibilidade.

Adicionalmente, foi também avaliada a recuperação da cafeína nas amostras de cogumelo, com massa de 0,2 g, enriquecidas com 200 µL de uma solução padrão de 1000 mg/L, obtendo, portanto, a concentração de 1,0 mg/g de cogumelo ou 20 mg/L de extrato em um balão volumétrico de 10 mL. As medidas voltamétricas utilizadas para a quantificação de cafeína em cogumelos *Pleurotus* foram realizadas nas condições experimentais otimizadas sobre o eletrodo diamante dopado com boro (DDB).

Os parâmetros da técnica variados foram o incremento de varredura, a amplitude de potencial e a frequência de aplicação dos pulsos de potencial, além disso o eletrólito suporte e pH do meio, todos foram otimizados utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.

4.1.3. Instrumentação

4.1.3.1. Potenciostato

As determinações eletroanalíticas foram realizadas no potenciostato da marca Microautolab®, dotado com o software GPES, sendo que aos dados experimentais foram aplicados tratamento fazendo uso do software OriginLab.

4.1.3.2. Célula eletroquímica e conjunto de eletrodos

Para a realização dos experimentos e determinações, foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro Pyrex®, com capacidade para 40 mL. A mesma foi equipada com uma tampa de Teflon® e composta por um conjunto com três eletrodos. O eletrodo de trabalho utilizado foi um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB), com área superficial média de 0,62 cm²; o contra-eletrodo foi um eletrodo de platina com área superficial média de 3,0 cm², e por fim, o eletrodo de referência de Ag/AgCl em KCl 3,0 mol/L.

O eletrodo diamante dopado com boro (Figura 9), utilizado como eletrodo de trabalho, possui uma ampla janela eletroquímica e também grande resistência a meios agressivos. Além disso, o DDB quando comparado a eletrodos como carbono vítreo e grafite pirolítico, apresenta vantagens como a alta estabilidade e a geração elétrica de radicais hidroxila (forte agente oxidante) o que faz com que esse material seja amplamente utilizado na oxidação de compostos orgânicos aromáticos (Pedrosa, 2003; Batista, 2011).



Figura 10. Foto do eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro (DDB).

O eletrodo de trabalho diamante dopado com boro utilizado para este trabalho foi cedido pelo Sr. Werner Haenni do Centro Suíço de Eletrônica e de Microtécnica, localizado em Neuchâtel na Suíça. A síntese desse eletrodo foi realizada por meio da técnica de HF CVD (Hot Filament Chemical Vapor Deposition), com a temperatura de filamento compreendida na faixa entre 2440 e 2560 °C, com fase gasosa formada por metano (CH_4) com excesso de gás hidrogênio (H_2), sendo o gás de dopagem o trimetil-boro (4500-5000 ppm).

Um pré-tratamento foi necessário para a utilização e limpeza do eletrodo. Esse tratamento consistiu na aplicação de um potencial de 3,0 V durante 60 segundos, para a remoção do filme hidrofóbico do eletrodo. Logo após a remoção do filme, um potencial de -3,0 V foi aplicado também pelo tempo de 60 segundos com a finalidade de melhorar a resposta voltamétrica do eletrodo (Suffredini, 2004).

4.1.4. Preparo das Amostras

Os extratos relativos às 0,2 g de amostras foram preparados a partir da extração elaborada por Kultz (2014) e Ramalho (2015) em trabalhos semelhantes com cogumelos *Pleurotus*. Essa extração foi escolhida devido a um planejamento fatorial 2^2 realizado, tendo como variáveis o tempo de sonicação no aparelho de Ultrassom (10 ou 20 minutos) e o volume de solvente extrator, no caso HCl 0,1 M (1,0 ou 2,0 mL), utilizado durante o procedimento de extração.

A melhor condição obtida e otimizada através de erros experimentais foi a de extração com 6,0 mL de metanol, sendo levada ao ultrassom por 20 minutos e a centrífuga pelo tempo de 10 minutos. Após isso, ocorreu a separação do sobrenadante e a secagem ao natural durante 3 dias.

A extração utilizada foi dividida em algumas etapas, descritas no fluxograma da Figura 11.

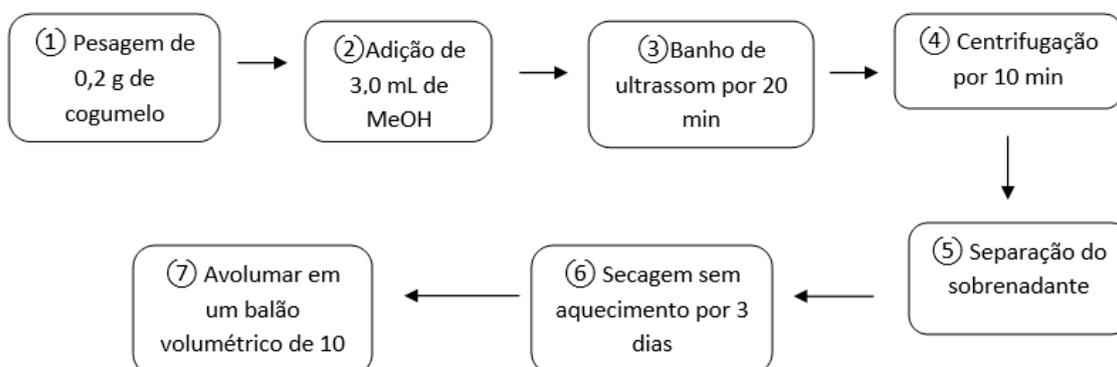


Figura 11. Fluxograma referente as etapas de extração de cafeína utilizando metanol como solvente.

Para a determinação eletroanalítica, a extração das amostras seguiu o procedimento proposto e elucidado no fluxograma apresentado na Figura 10. As três amostras fornecidas foram pesadas em porções de 0,2 g cada, e em duplicatas, sendo a elas, aplicado o procedimento de extração acima descrito..

4.1.5. Estudo do efeito da Velocidade de Varredura

Para o estudo da velocidade de varredura, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica. O estudo da velocidade de varredura foi realizado pela necessidade do estudo do processo de oxidação da molécula de cafeína. Além disso, esse estudo é relevante para a investigação da reatividade da molécula de cafeína.

Devido a isso, foram testadas 9 velocidades de varredura distintas, com valores de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 130, 150, 200 mV/s, com parâmetros fixos de incremento de varredura de 4 mV e como eletrólito suporte a solução de sulfato de sódio na concentração 0,1 mol/L e pH 5,0, otimizado em ensaios fazendo uso da técnica eletroanalítica de voltametria de onda quadrada (Agostinho, 2004).

Os potenciais utilizados para esse estudo da velocidade de varredura foram definidos com base em ensaios preliminares e por meio da revisão de literatura. Sendo assim, como potencial inicial de partida, fixou-se o valor de 0,85 V, como potencial de inversão, fixou-se o valor de 1,65 V e como potencial de retorno, fixou-se o mesmo valor inicial de 0,85 V.

4.1.6. Otimização de Parâmetros da Técnica de Voltametria de Onda Quadrada para a determinação de cafeína

A otimização de parâmetros foi realizada com finalidade de escolher os parâmetros que contribuem para o aumento da resposta analítica e que resultam em uma determinação mais precisa de cafeína. Para isso, foram avaliados e variados os seguintes parâmetros: eletrólito suporte, frequência de aplicação de pulsos de potencial (f), amplitude de potencial (a), incremento de varredura (ΔE_s) e concentração hidrogeniônica do meio (pH).

4.1.6.1. Eletrólito Suporte

A otimização do eletrólito suporte foi realizada adicionando 1,60 mL de uma solução de cafeína de 500 mg/L em diferentes eletrólitos suportes. A concentração de cafeína na cela, contendo 20,0 mL de eletrólito suporte foi de $1,30 \cdot 10^{-2}$ mol/L.

Os eletrólitos escolhidos para essa variação foram: solução fosfato de sódio, solução de sulfato de sódio e o tampão Britton-Robinson. Todas as soluções foram testadas levando em consideração o pH 1,0. Para essa análise, o incremento de varredura foi fixado em 2,0 mV, a frequência foi fixada em 100 Hz e a amplitude em 40 mV.

4.1.6.2. Frequência de aplicação de pulsos de potencial (f)

A frequência de onda quadrada é um parâmetro relativo a técnica escolhida para a determinação de cafeína, a voltametria de onda quadrada. A variação de frequência de aplicação dos pulsos de potencial revela informações importantes a respeito do grau de reversibilidade do processo de oxidação, do número de elétrons envolvidos durante o processo (no caso de sistemas reversíveis) e o valor de αn (para sistemas irreversíveis).

Para a avaliação da frequência de aplicação de pulsos de potencial, variou-se a frequência dentro da faixa de 10 a 250 Hz, deixando fixos os valores de pH em 1,0, amplitude em 0,04 V e incremento em 2 mV. O tampão utilizado para a realizada dessa otimização foi uma solução de sulfato de sódio na concentração de 0,1 M. Para a escolha do melhor valor de frequência, uma quantidade de 1,60 mL de solução padrão de cafeína na concentração de 500 mg/L foi adicionada à 30 mL de tampão sulfato,

resultando em uma concentração de $1,30 \cdot 10^{-2}$ mol/L de cafeína dentro da cela eletroquímica.

4.1.6.3. Amplitude (a)

A amplitude foi avaliada segundo a variação na faixa de 0,01 e 0,07 mV. Para isso, foram fixados os valores dos demais parâmetros em 100 Hz para a frequência, 0,04 V para incremento de varredura e pH em 1,0. Para essas medidas, o eletrólito suporte utilizado foi uma solução de sulfato de sódio na concentração de 0,1 M com ajuste de pH feito com solução de HCl na concentração de 0,1 M.

Para a avaliação do melhor valor de amplitude da técnica de voltametria de onda quadrada, foi adicionado à 30 mL de solução de sulfato de sódio, o volume de 1,60 mL da solução padrão de cafeína na concentração de 500 mg/L, ocasionando a uma concentração de $1,30 \cdot 10^{-2}$ mol/L.

4.1.6.4. Incremento de Varredura (ΔE_s)

O incremento de varredura foi avaliado por meio da variação na faixa de 2 a 10 mV, deixando fixo a amplitude no valor de 0,4 V, a frequência no valor de 100 Hz e o pH no valor de 1,0. O eletrólito suporte utilizado para a variação desse parâmetro foi uma solução de sulfato de sódio na concentração de 0,1 mol/L.

Para comparação entre as respostas obtidas pela variação do incremento de varredura foi feita com a adição de 1,60 mL de uma solução padrão de cafeína na concentração de 500 mg/L, obtendo como concentração da célula eletroquímica $1,30 \cdot 10^{-2}$ mol/L.

4.1.6.5. Concentração Hidrogeniônica do meio

A variação da concentração hidrogeniônica do meio foi avaliada segundo 4 soluções distintas com valores de pH de 1,0, 5,0, 7,0 e 8,0. As soluções foram preparadas com base em uma solução padrão de sulfato de sódio na concentração de 0,1 mol/L, com ajustes de pH por meio de soluções de HCl e NaOH, ambas na concentração de 0,1 mol/L.

Para a variação da concentração hidrogeniônica, os demais parâmetros tiveram seus valores fixados em 0,4 V para a amplitude, 0,04 V para o incremento de varredura

e a frequência em 100 Hz, utilizando o eletrólito suporte de uma solução de sulfato de sódio na concentração de 0,1 mol/L.

4.1.7. Validação de Técnicas Eletroanalíticas

Os parâmetros a serem avaliados são linearidade, precisão, exatidão e limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A maneira como cada um dos parâmetros será avaliada, bem como seus respectivos resultados levou em consideração as duas agências regulamentadoras ANVISA (2003) e INMETRO (2011). A validação se faz necessária para garantir que o método seja repetido sem maiores problemas.

4.1.7.1. Linearidade

Para análise da linearidade no atual trabalho, uma curva de calibração contendo 13 pontos com concentrações na faixa de 0 a 10,3 µmol/L de cafeína. Esse procedimento foi realizado através do método de adição-padrão com ensaios em duplicata. Aos dados coletados, foi aplicada a regressão linear e o teste de falta de ajuste no intervalo de confiança de 95%.

4.1.7.2. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para o desenvolvimento dos cálculos para os LD e LQ para a cafeína, foi utilizada a curva de calibração pela qual fez-se o estudo de linearidade com faixa de concentração de 0 a 10,3 µmol/L. A curva foi realizada levando em consideração o método de adição-padrão. Os cálculos de LD e LQ tiveram como variáveis o desvio-padrão do intercepto da curva de calibração estudada (s) e a inclinação (b) desta mesma. As fórmulas relativas aos cálculos são descritas a seguir:

$$LD = \frac{3 \cdot s}{b} \qquad LQ = \frac{10 \cdot s}{b}$$

(Equação 1 e 2)

4.1.7.3. Precisão

O estudo da precisão para este trabalho consistiu em análises de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas em dois dias consecutivos com três porções de cogumelo A de massa de 0,2 g, as quais

foram extraídas e analisadas através do método de adição-padrão. As amostras foram enriquecidas com 20 mg/L de cafeína.

Como análise da precisão, calculou-se o desvio padrão relativo (%), tanto para a precisão intermediária quanto para a repetitividade, através das Equações 3 e 4.

$$DPRr = \frac{Sr}{m\u00e9dia} \times 100$$

$$DPRpi = \frac{Spi}{m\u00e9dia} \times 100$$

(Equações 3 e 4)

Onde DPRr é o desvio padrão relativo para a repetitividade e Sr é o desvio padrão para repetitividade. De forma similar, DPRpi é o desvio padrão relativo para a precisão intermediária e Spi o desvio padrão para a precisão intermediária.

4.1.7.4. Exatidão

Para esse teste foram realizadas curvas de concentração através do método de adição-padrão com uma solução padrão de concentração 20 mg/L de cafeína e com o extrato de cogumelo enriquecido com 20 mg/L de cafeína. Para o extrato utilizado, foram pesadas 3 porções com massa de 0,2 g de cogumelo A e enriquecidas com 200 μ L de uma solução de 1000 mg/L de cafeína.

A recuperação foi calculada por meio da Equação 5, sendo a concentração teórica previamente determinada pelo método cromatográfico CLAE com detector UV.

$$\% REC = \frac{C1}{C2} \times 100$$

(Equação 5)

Sendo, C1 = concentração experimental calculada e C2 = concentração teórica esperada.

4.2. Resultados e Discussão

O estudo da reação de oxidação eletroquímica da cafeína foi iniciado por meio da análise voltamétrica sobre o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). Para a

determinação de cafeína em cogumelos do gênero *Pleurotus*, foram utilizadas duas técnicas, a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de onda quadrada (VOQ).

A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para a investigação da variação da velocidade de varredura. Inicialmente, o estudo de velocidade de varredura, bem como a otimização de parâmetros relativos a essas técnicas experimentais foram realizados.

Com a finalidade de se obter as melhores e mais adequadas condições experimentais na determinação de cafeína, os parâmetros como o eletrólito suporte utilizado, a frequência de aplicação dos pulsos, a amplitude, o incremento de varredura e a concentração hidrogeniônica do meio foram otimizados com auxílio da técnica de voltametria de onda quadrada.

Por meio da avaliação e otimização dos parâmetros, pode-se determinar o grau de reversibilidade da reação e o comportamento eletroquímico da molécula de cafeína.

4.2.1. Voltametria Cíclica

O estudo da reação de oxidação da molécula da cafeína possui como experimentos iniciais a exploração da variação da velocidade de varredura. Os voltamogramas cíclicos em função da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 200 mV/s, referentes ao estudo da eletroatividade da molécula de cafeína, podem ser observados na Figura 11.

Pode-se observar que a molécula da cafeína apresentou um pico de oxidação com características de processo irreversível. Isso é justificado pela ausência de pico reverso, durante a segunda varredura (inversa). O pico de oxidação da cafeína foi observado na região de 1,45 V vs. Ag/AgCl.

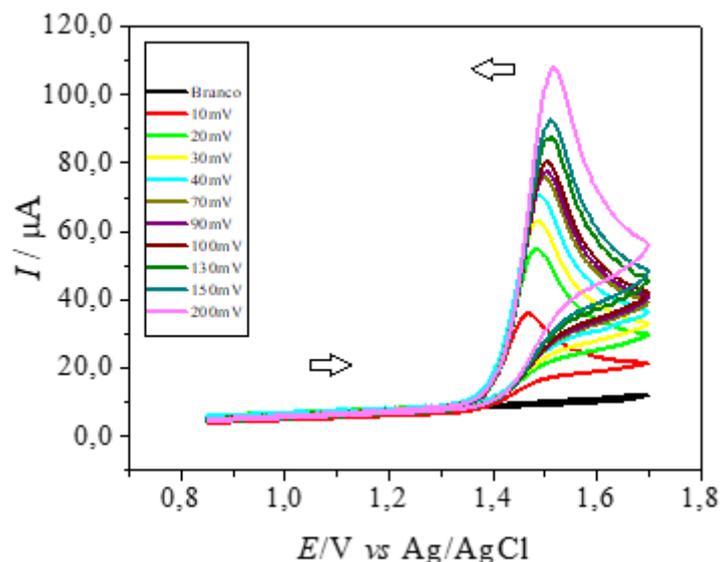


Figura 12. Influência da variação da velocidade de varredura no aspecto geral dos voltamogramas para a cafeína sobre DDB, com valores de velocidade de varredura ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,0$ tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Além da ausência de pico durante a varredura inversa, é possível observar que com o aumento da velocidade de varredura, há um deslocamento do potencial de pico para regiões mais positivas. Este fato é característico e também evidencia um processo eletroquímico irreversível (Gosser, 1993).

4.2.2. Otimização de Parâmetros

O primeiro passo no desenvolvimento de uma metodologia é a otimização dos parâmetros envolvidos. Assim, parâmetros como a concentração hidrogeniônica do meio e o efeito do eletrólito suporte na oxidação da cafeína, foram investigados por meio da técnica de voltametria de onda quadrada (do inglês, *square wave voltammetry* – SWV), a fim de se obter o melhor sinal analítico.

Além destes, a otimização dos parâmetros da técnica de SWV, como frequência de aplicação dos pulsos de potencial, amplitude de potencial e incremento de varredura podem melhorar de forma significativa a resposta eletroanalítica. Desta forma, estes três parâmetros foram, também, avaliados.

4.2.2.1. Eletrólito Suporte

Estudos preliminares foram realizados para a determinação do eletrólito suporte mais adequado para o estudo do processo de oxidação eletroquímica da cafeína. Os eletrólitos suporte selecionados para esse estudo foram: o tampão Britton-Robinson (BR), a solução de fosfato de sódio e a solução de sulfato de sódio, todos na concentração de 0,1 mol/L e com pH igual a 1,0.

A técnica utilizada para esse teste foi a voltametria de onda quadrada, com os parâmetros e o conjunto de eletrodos previamente estabelecidos. Na Figura 12. estão contidos os voltamogramas referentes aos diferentes eletrólitos suporte utilizados. É possível observar que a cafeína apresenta um único pico de oxidação em torno de 1,46 V vs. Ag/AgCl.

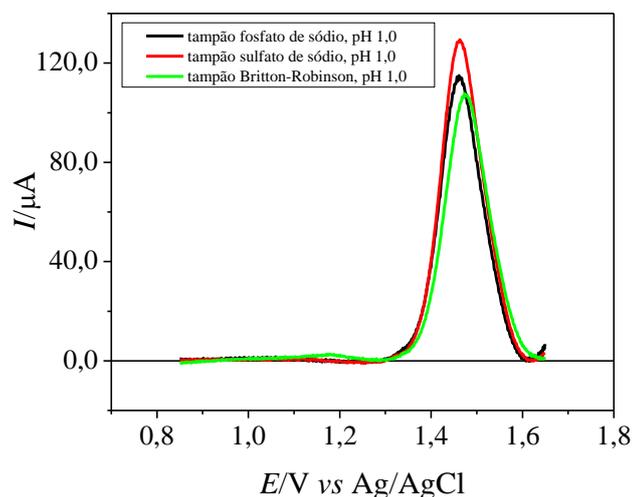


Figura 13. Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação da cafeína sobre DDB, para os eletrólitos suporte: solução de sulfato de sódio, tampão Britton Robinson, solução de fosfato de sódio ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$).

Apesar disso, a maior intensidade de corrente de pico referente à oxidação da cafeína foi obtida utilizando a solução de sulfato de sódio. Dessa maneira, a solução de sulfato de sódio na concentração de 0,1 mol/L e pH 1,0 foi o meio escolhido para o estudo de oxidação da cafeína sobre o eletrodo de DDB.

4.2.2.2. Estudo do Efeito da concentração hidrogeniônica

O estudo da influência da variação do pH do meio foi realizado com base na resposta voltamétrica da cafeína. A concentração hidrogeniônica do meio foi sendo alternada em 1,0, 5,0, 7,0 e 8,0, em meio de solução sulfato de sódio com concentração

de 0,1 mol/L. Os valores de pH foram escolhidos analisando o valor de pKa da cafeína de 8,5, sempre tornando o meio ácido para que a cafeína esteja protonada.

Os voltamogramas de onda quadrada resultantes da variação de diferentes valores de pH encontram-se na Figura 14. Observou-se que com o aumento do valor de pH, os valores de potencial relativos ao processo de oxidação da cafeína foram deslocados para valores menores. Com base nisso, revela-se que a transferência eletrônica decorrente do processo de oxidação da molécula de cafeína é dependente do pH do meio.

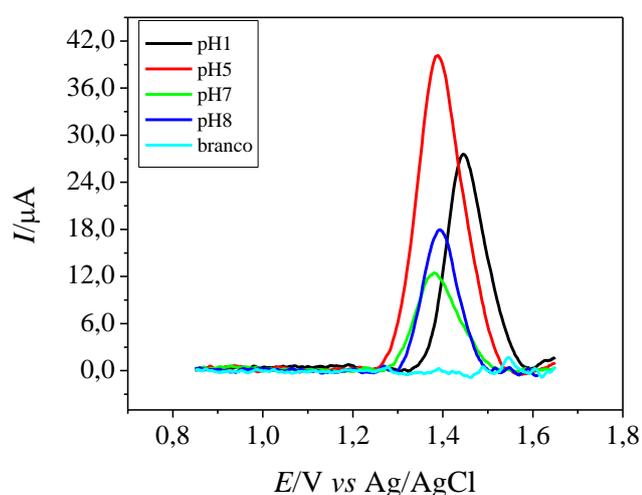


Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada par a oxidação da cafeína sobre o eletrodo diamante dopado com boro (DDB), em sulfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ para pH 5,0, pH 1,0, pH 7,0, pH 8,0 e branco (1,30x10⁻² mol L⁻¹, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$).

Nota-se que o pH que fornece maior intensidade de corrente de pico foi o pH de 5,0. De acordo com a literatura, a concentração hidrogeniônica do meio favorece a oxidação da cafeína em pH próximo a 4,5 (Lourenção, 2004). O potencial referente ao processo de oxidação da cafeína em meio de pH 5,0 está na região de 1,38 V vs. Ag/AgCl.

4.2.2.3. Efeito da Frequência de Onda Quadrada (f)

A frequência de onda quadrada é um dos parâmetros da técnica utilizada, pois é ele que determina a intensidade dos sinais e conseqüentemente, a sensibilidade do método. Na Figura 14 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o

processo de oxidação da molécula de cafeína em função da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.

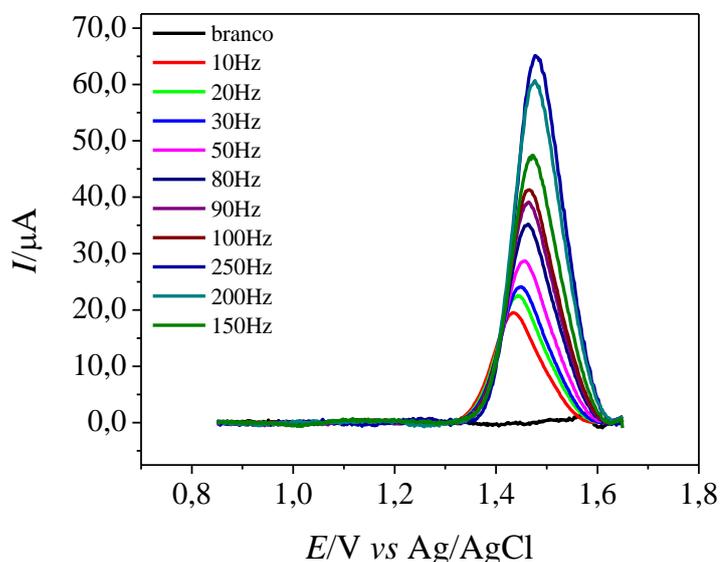


Figura 15. Influência da variação da frequência da onda quadrada no aspecto geral dos voltamogramas da cafeína sobre DDB, com valores de frequência ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 5,0, tampão sulfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

Por meio dos voltamogramas de onda quadrada obtidos pela variação da frequência, é possível observar que com o aumento da frequência ocorre um aumento proporcional na intensidade da corrente de pico, unida com um deslocamento do potencial de pico para regiões mais positivas.

Apesar disso, as frequências avaliadas acima de 200 Hz são consideradas elevadas, o que compromete a reação de oxidação da cafeína. Quando calculamos a velocidade de varredura para a técnica de voltametria de onda quadrada, multiplicamos a frequência e o incremento de varredura, se os valores de ambos forem muito elevados, a reação de oxidação da cafeína pode não ser completa, devido a rapidez da varredura.

De acordo com a teoria proposta por Osteryoung e O'Dea (1982), para sistemas os quais são totalmente irreversíveis e possuem processos eletroquímicos controlados pela adsorção das espécies, a intensidade de corrente varia linearmente com a frequência de aplicação dos pulsos. Com a Figura 15, é possível identificar o comportamento da corrente de pico em função da variação da frequência de onda quadrada para a molécula de cafeína.

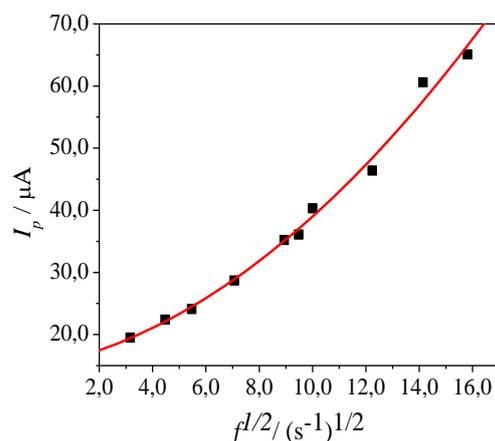
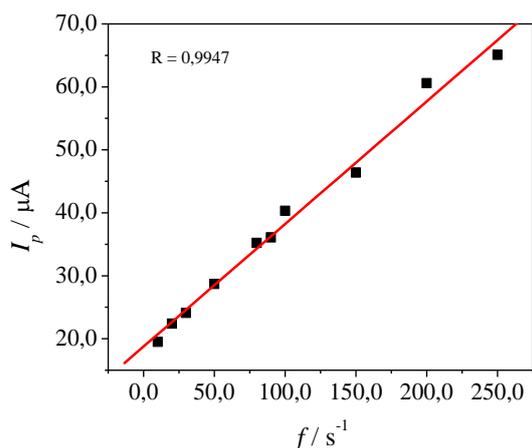


Figura 16. (A) Dependência da corrente de pico com a frequência para a cafeína sobre DDB.

Figura 16. (B) Dependência da corrente de pico com a raiz da frequência para a cafeína sobre DDB.

Além disso, observa-se que a intensidade de corrente de pico varia linearmente com a frequência de onda quadrada, mostrando assim que o processo de oxidação da molécula de cafeína sobre o DDB é irreversível e também controlado por adsorção (reagentes ou produtos).

Contudo, observando-se os diversos experimentos eletroanalíticos para a cafeína, notou-se que não houve queda no sinal analítico na oxidação de cafeína após sucessivas medidas, o que sugere que o processo de adsorção é devido a cafeína e não aos produtos da reação de oxidação.

4.2.2.4. Efeito da Amplitude de Onda Quadrada (*a*)

Por meio da variação da amplitude da onda quadrada, considerando os sistemas redox totalmente irreversíveis, a sensibilidade analítica dessa técnica sofre grande influência. Isso ocorre porque a largura da meia onda se mantém constante para amplitudes maiores que 50 mV. Dessa forma, a amplitude do pulso é um dos parâmetros avaliados no estudo de voltametria de onda quadrada.

A Figura 16 é referente aos voltamogramas obtidos para a cafeína em função da variação da amplitude de onda quadrada. Através dela, pode-se observar que para os valores de amplitude até 40 mV, o potencial de pico de oxidação da molécula de cafeína é mantido e para valores acima deste ocorre deslocamento para potenciais menos positivos.

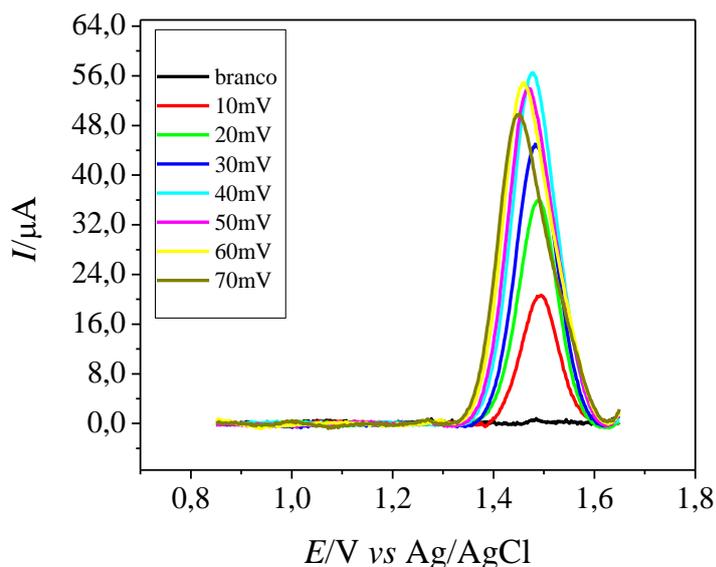


Figura 17. Influência da variação da amplitude da onda quadrada no aspecto geral dos voltamogramas da cafeína sobre DDB, com valores de amplitude ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 5,0$, tampão sulfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

Além do estudo da intensidade de corrente de pico relativo a oxidação da molécula de cafeína em função da variação da amplitude de onda quadrada, apresenta-se também a dependência entre essas duas variáveis (Figura 17). Com isso, observa-se que os valores de amplitude menores que 40 mV, resultaram em um aumento linear da intensidade de corrente.

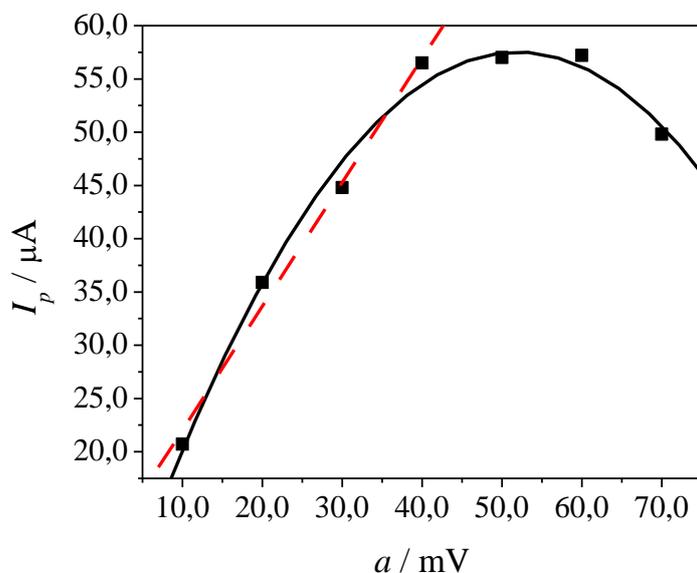


Figura 18. Dependência da corrente de pico vs a variação de amplitude da onda quadrada para a cafeína sobre DDB.

No entanto, com valores maiores de amplitude de onda quadrada, nota-se a diminuição da intensidade da corrente de pico. Esse comportamento está de acordo com a teoria referente à voltametria de onda quadrada, aplicada a sistemas totalmente irreversíveis com a espécie adsorvida na superfície eletródica.

4.2.2.5. Efeito do Incremento de Varredura (ΔE_s)

A velocidade efetiva da técnica de voltametria de onda quadrada, é calculada por meio do produto da frequência pelo incremento de varredura. Desta forma, quanto maior o valor do incremento de varredura, maior será o sinal obtido, melhorando também a sensibilidade do método.

Contudo, incrementos maiores podem promover alargamento do pico de potencial e assim comprometer o processo de oxidação da cafeína. Quando o valor do incremento e o valor da frequência são muito elevados, a técnica se torna muito rápida o que pode atrapalhar na chegada do analito ao eletrodo de trabalho. Devido a isso, faz-se necessário o estudo do efeito do incremento de varredura e sua influência com relação ao pico voltamétrico relativo à oxidação da cafeína.

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos por meio do estudo do efeito do incremento de varredura são mostrados na Figura 18. Dessa maneira, pode-se observar que o aumento do incremento de varredura proporciona um aumento na intensidade de corrente do pico de oxidação da cafeína.

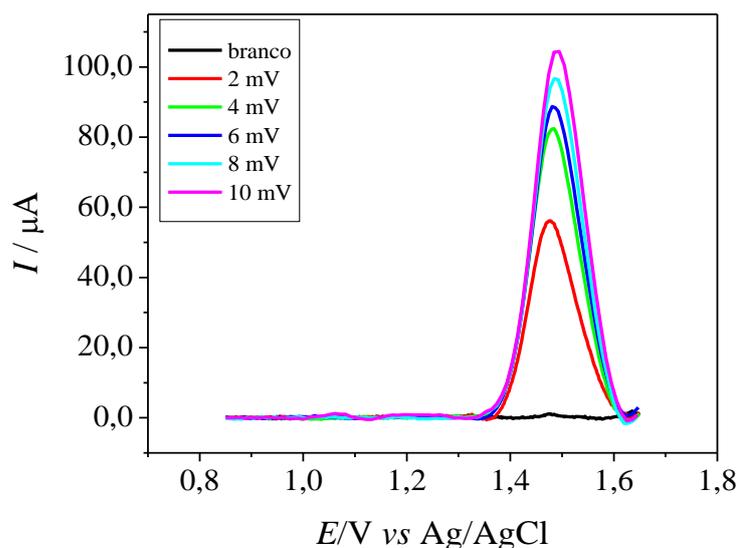


Figura 19. Voltamogramas de onda quadrada para a cafeína sobre DDB, com valores de incremento ($1,30 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 5,0$ solução sulfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$).

Analisando a dependência da intensidade de corrente de pico em função da variação do incremento de varredura (Figura 19), nota-se que valores de incremento de varredura superiores a 4 mV não proporcionam um aumento significativo da intensidade de corrente de pico.

Devido a isso, optou-se nesse trabalho em trabalhar com valor de incremento de varredura de 4 mV, o qual apresentou um aumento significativo quando comparado ao valor de 2 mV, aumentando a sensibilidade e o sinal relativo a intensidade de corrente de pico, e ainda possibilitando que a varredura de potenciais não seja tão rápida e que o analito consiga chegar até o eletrodo de trabalho.

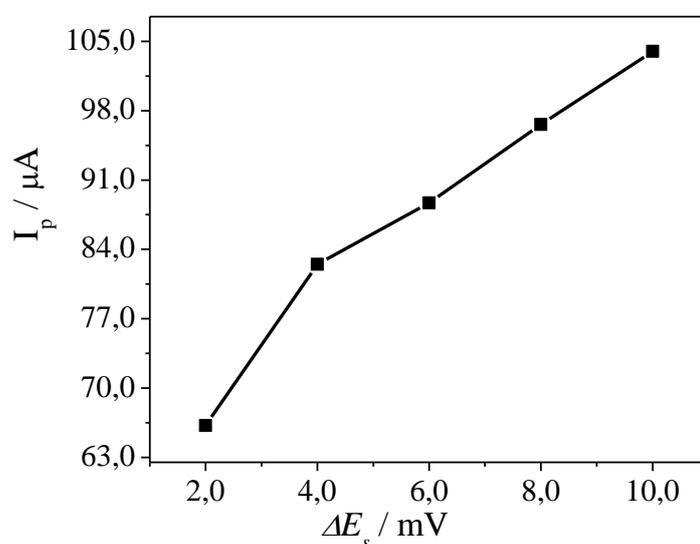


Figura 20. Efeito da variação do incremento de varredura sobre as correntes de pico para a cafeína sobre DDB.

Dessa forma e levando em consideração toda a otimização de parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada, as melhores condições para a determinação do pico de oxidação da cafeína foram em termos de pH 5,0, com frequência de aplicação dos pulsos de potencial da onda quadrada, 80 Hz, de incremento de varredura de potencial, 4 mV e amplitude de onda quadrada de 40 mV.

Tendo em vista toda a otimização realizada, fez-se necessária a validação do método analítico de determinação de cafeína. Como o intuito do atual trabalho é realizar a determinação de cafeína em cogumelos *Pleurotus*, o estudo de validação do método foi realizado visando a quantificação dessa molécula nas amostras de cogumelo A, B e C utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.

4.3. Validação do Método de Determinação de Cafeína em amostras de cogumelo *Pleurotus* com auxílio da técnica de voltametria de onda quadrada.

Contando com o método de determinação de cafeína através da técnica de voltametria de onda quadrada e seus parâmetros todos devidamente otimizados, faz-se necessário o estudo de validação. Esse estudo tem como finalidade a avaliação e a garantia da confiabilidade de um determinado método em desempenhar uma determinada função.

Para isso, alguns parâmetros precisam ser avaliados, tais como seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Dessa forma, fez-se portanto o estudo de validação, seguindo as regulamentações da ANVISA, visto que o cogumelo é um alimento.

4.3.1. Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, foi elaborada uma curva de calibração com concentrações na faixa de 0,91 a 10,3 $\mu\text{mol/L}$ de cafeína (solução padrão). Todos os pontos de concentração relativos a essa curva foram alíquotas de uma solução de 18,3 mmol/L de cafeína, denominada solução padrão de cafeína.

Todos os pontos da curva de calibração foram realizados em duplicata em um único dia, sem limpeza do eletrodo entre as curvas. Os dados experimentais referentes às intensidades de corrente de pico relativos à oxidação de cafeína foram submetidos à regressão linear no nível de 95% de confiança.

Tabela 3. Resultados da análise da regressão linear no nível de 95% de confiança e teste de falta de ajuste para a curva de calibração da Cafeína.

Regressão		Falta de Ajuste		r	R²
F _{regressão}	Valor de <i>p</i>	F _{faj}	Valor de <i>p</i>	99,3	99,3
3563,26	0,000	0,85	0,598		
Coefficientes da Reta de Regressão				<i>t_{observado}</i>	Valor de <i>p</i>
	Intercepto:	-0,00748		- 0,29	0,772
	Inclinação:	0,2466		59,69	0,000

*Para regressão, $F_{\text{crítico}} (0,05; 1,13) = 4,68$. **Para falta de ajuste $F_{\text{crítico}} (0,05; 11, 13) = 2,65$. *** Para os coeficientes da reta, $t_{\text{crítico}} (0,025; 23) = 2,069$.

Com a finalidade de verificar a linearidade do método foi aplicada a análise de regressão linear e também um teste de falta de ajuste (F_{raj}) aos dados relativos à curva de calibração de cafeína. Os resultados indicam que o modelo adotado é linear, sendo adequado para correlacionar a intensidade de corrente do pico de oxidação da cafeína com a concentração desta molécula em cada amostra. Estes resultados são ressaltados pela análise de regressão linear, a qual foi altamente significativa ($p = 0,000$).

Essa conclusão remete ao fato de não encontrarmos evidências de falta de ajuste no modelo linear ($p > 0,05$) para a molécula de cafeína, no intervalo de confiança de 95%. Além disso, foi obtido o valor para o coeficiente de determinação de $R^2 = 99,3 \%$, considerado bastante elevado, o que demonstra o bom ajuste do modelo linear aos dados da curva de calibração elaborada para correlacionar a intensidade de corrente de pico de oxidação da cafeína com a concentração desta molécula, pois somente 0,7 % da variabilidade dos dados experimentais é devido aos resíduos.

De forma similar, o teste t foi aplicado no nível de confiança de 95 %, para avaliar a significância dos coeficientes de calibração, a inclinação e o intercepto da curva de calibração. O coeficiente de calibração denominado intercepto da curva, através dos dados obtidos, não foi significativo ao cálculo das concentrações para a cafeína, o que indica que a reta passa pela origem e de sua curva de calibração.

A inclinação da curva de padrão de calibração, segundo coeficiente estudado, foi avaliado mostrando ser significativa à equação da reta de cafeína, sendo justificado pelo valor de p maior que 0,05 e pelo valor de t maior que o $t_{\text{crítico}}$. Desta maneira, é possível afirmar a linearidade da curva de calibração na faixa de concentração de 0,91 a 10,3 $\mu\text{mol/L}$ de cafeína e concluir que o método apresentado é descrito por um modelo linear.

Dessa maneira, obteve-se a curva de calibração ajustada através da aplicação da regressão linear no nível de 95 % de confiança na faixa de concentração de 0,91 a 10,3 $\mu\text{mol/L}$, mostrada nas Figuras 21 e 22.

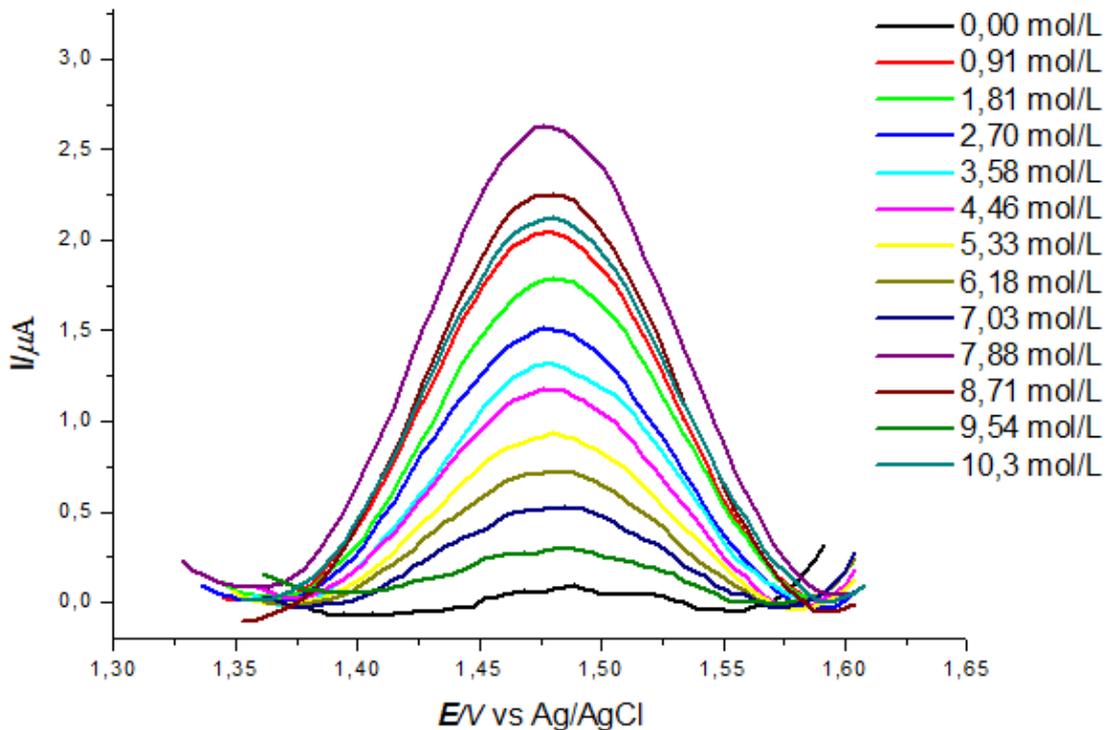


Figura 21. Voltamogramas referentes aos pontos da curva de calibração de cafeína, com concentrações de 0 a 10,3 mol/L, em sequência conforme o crescimento da corrente de pico.

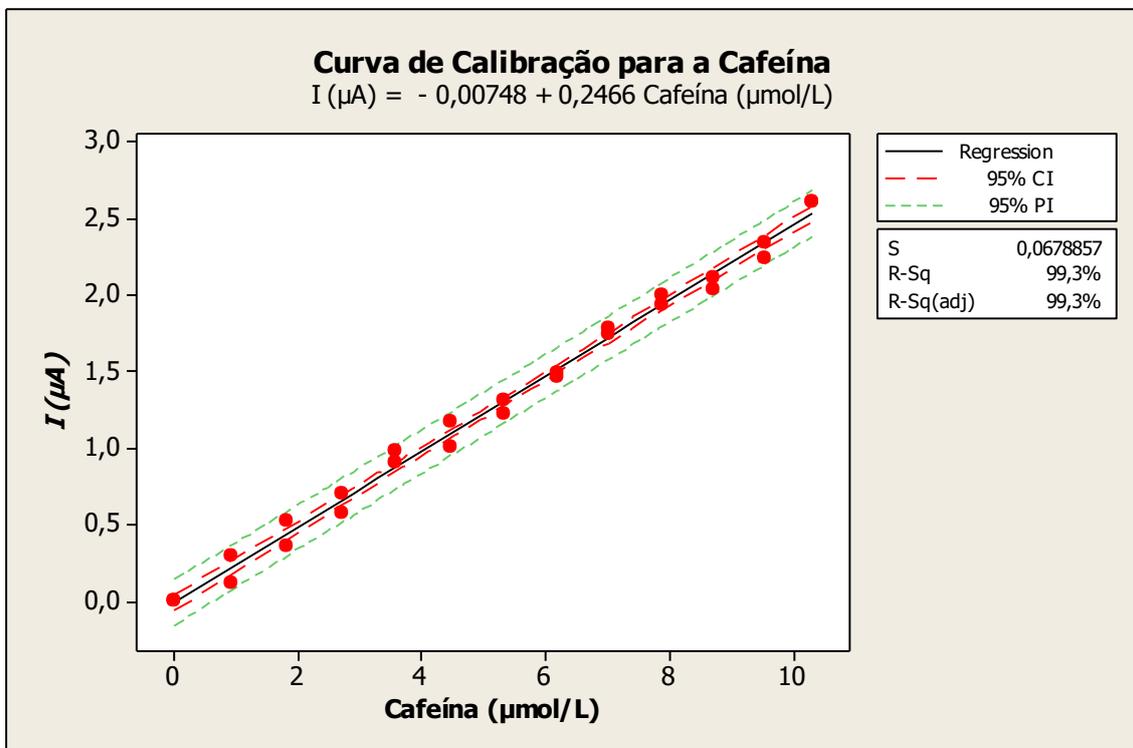


Figura 22. Curva analítica obtida através da Regressão Linear no nível de confiança de 95% para determinação de Cafeína através da intensidade de corrente do pico de oxidação da cafeína.

4.3.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação são calculados com a finalidade de avaliar a sensibilidade da técnica eletroanalítica escolhida, a voltametria de onda quadrada. O LD é a menor concentração de analito, no caso de cafeína, que a técnica pode detectar, mas não quantificar, ou seja, não pode determinar exatamente sua concentração.

O LQ é a menor quantidade de cafeína que a técnica de voltametria de onda quadrada consegue quantificar com precisão e exatidão, tendo assim dados confiáveis. O cálculo de LD e LQ foi realizado levando em consideração a curva de calibração de 0,91 a 10,3 $\mu\text{mol/L}$ de cafeína, considerando o desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva de calibração.

Os valores de LD e LQ obtidos utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada na faixa de concentração de 0,91 a 10,3 $\mu\text{mol/L}$ foram de 0,29 e 0,98 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Esses limites foram inferiores aos limites encontrados por Kultz (2014) em seu trabalho na determinação de cafeína em cogumelos *Pleurotus*, usando a técnica CLAE com detector UV, que foram de 7,83 e 23,69 $\mu\text{mol/L}$, utilizando a altura do pico cromatográfico como dado experimental na faixa de concentração de 154,4 a 926,9 $\mu\text{mol/L}$ de cafeína.

Ramalho (2015), em trabalho similar, obteve LD e LQ com valores de 1,44 e 4,94 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente para a curva de calibração na faixa de 5,14 a 308,9 $\mu\text{mol/L}$, utilizando a técnica CLAE com detector UV, utilizando como dado cromatográfico a área do pico relativo à cafeína.

Considerando métodos eletroanalíticos, Lourenção (2009) em seu trabalho obteve LD com valor de 0,49 $\mu\text{mol/L}$, sem apresentar um valor de LQ, para a faixa de concentração de 0,50 a 83,0 $\mu\text{mol/L}$. Braga (2006) encontrou valores de LD e LQ na determinação de cafeína de 88,7 e 295,0 $\mu\text{mol/L}$, para a faixa de concentração de 0,4 a 6,00 mmol/L de cafeína, usando a técnica de voltametria cíclica.

4.3.3. Precisão

A avaliação do parâmetro da precisão tem por finalidade verificar se o método é confiável, apresentando resultados corretos e precisos durante a variação de alguns

parâmetros como períodos em um único dia, dia diferentes, laboratórios diferentes e analistas diferentes.

Neste trabalho, optou-se pela variação entre dois dias consecutivos, avaliando dois componentes: repetitividade e precisão intermediária. Ambas as componentes foram avaliadas em dois dias consecutivos com amostras extraídas em triplicatas. Para essa etapa da validação foram utilizadas porções de cogumelos A enriquecidas com $1,83 \cdot 10^{-4}$ mol/L de cafeína. A massa de cogumelo utilizadas para as extrações em triplicatas foi de aproximadamente 0,2 g.

Os cálculos foram feitos com base nos dados de corrente de pico referente a oxidação da molécula de cafeína em cada concentração distinta. O método de calibração por adição-padrão foi aplicado para o cálculo dos valores de precisão, para ambos os componentes.

Tabela 4. Precisão intermediária e repetitividade para recuperações de cafeína.

Parâmetro/Analito	CAFEÍNA
Precisão intermediária (% RSD)	9,79
Repetitividade (% RSD)	10,02

Considerando os dados de precisão intermediária e repetitividade, com desvio padrão relativo de 9,79 e 10,02 %, respectivamente e seguindo a regulamentação estabelecida pela ANVISA (2003) para a determinação de compostos em alimentos, onde valores até 15 % de RSD são considerados aceitáveis, diz-se que o método de determinação foi preciso quanto à técnica utilizada.

Apesar dos valores estarem de acordo com a norma estabelecida, tem-se que os mesmos são considerados altos, isso se deve ao fato da matriz complexa do cogumelo contendo inúmeras proteínas, carboidratos que podem ser extraídos juntamente com a cafeína. Além disso, outras substâncias da classe das metilxantinas (teobromina e teofilina) podem ser extraídas com cafeína, como Alves (2002) mostra em seu trabalho com chás.

Costa (2015) obteve valores de repetitividade e precisão intermediária de 0,5 a 1,4 e 3,3 % de RSD para a cafeína na determinação de conservantes em refrigerantes.

Aragão (2009) obteve valores de precisão intermediária de 2,6 e 3,0 para soluções de mistura de padrões em duas concentrações distintas e repetitividade de 2,5 para café solúvel e 1,5 para chá verde. Os valores mais baixos de precisão são relativos às matrizes simples e ao método CLAE de análise, através da técnica de separação.

Sendo assim, o estudo do parâmetro precisão concluiu que o método de determinação de cafeína em amostras de cogumelo do gênero *Pleurotus* utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) é preciso para a determinação da cafeína com relação a determinações em um mesmo dia e em dias diferentes.

4.3.4. Exatidão

O último parâmetro avaliado durante o processo de validação do método é a exatidão. A exatidão é avaliada com a finalidade de que o método proposto consiga obter resultados adequados na presença de diferentes meios. Devido a isso, a recuperação foi analisada utilizando o método de adição-padrão na presença da matriz do cogumelo.

Dessa forma, a média dos valores de recuperação do analito cafeína em cogumelos foi de 107,09 %. A concentração teórica utilizada para o cálculo da recuperação foi a previamente estabelecida pelo método cromatográfico CLAE com detector UV. Por meio da normativa estipulada pela ANVISA (2003), a porcentagem de recuperação de analitos quantificados recomendada está dentro do intervalo de 80 a 120 % para concentrações na faixa de 10^{-7} a 10^{-5} mol/L. Com a média de recuperação de 107,09, os resultados se enquadram na regulamentação vigente.

O cogumelo é constituído em sua maior parte por proteínas, fibras e carboidratos. Esses componentes estão presentes na matriz e conseqüentemente no extrato de cogumelo. Supõe-se que os componentes dessa matriz interferiram na extração e no processo de oxidação da cafeína.

Gnoatto (2007) em seu trabalho de extração de metilxantinas em erva-mate evidencia a influência do procedimento sobre a quantificação simultânea de cafeína e teobromina aplicando sete métodos de determinação distintos. Devido às duas moléculas possuírem o mesmo sítio ativo, o perfil eletroativo delas é muito semelhante, o que pode atrapalhar em sua quantificação. Matos (2004) encontrou resíduos de teobromina em casca de café, avaliando os teores de cafeína utilizando um

procedimento de extração similar ao aplicado neste trabalho, o que comprova a possível presença da teobromina no extrato de cogumelo, visto que a teobromina também pode ser encontrada em café.

Roloff (2006) utilizando condições similares de concentração hidrogeniônica do meio e concentração de eletrólito suporte, observou que a teofilina apresenta um pico de oxidação na região de 1,0 V, o que pode também justificar o deslocamento de potencial da cafeína nas análises com extrato.

Menezes (2014) concluiu seu estudo sobre identificação de cocaína mediante interferentes elucidando que a teobromina e a cafeína possuem não apenas o mesmo sítio ativo, mas também o mesmo comportamento eletroquímico e perfis voltamétricos muito similares. No entanto Menezes menciona que a teobromina desloca o seu potencial para valores mais negativos, o que justifica o deslocamento do pico de cafeína para a região de 1,0 V neste trabalho.

Através do estudo de exatidão, para a determinação da cafeína em cogumelos do gênero *Pleurotus*, diz-se que o método proposto é exato, visto que os valores, apesar de altos estão dentro da faixa estabelecida pela normativa da ANVISA.

Conclui-se, portanto, o estudo de validação do método de determinação de cafeína em cogumelos *Pleurotus* através da técnica de voltametria de onda quadrada. O método apresentou boa linearidade e excelentes limites de detecção e quantificação, apesar disso a precisão não foi tão satisfatória, visando seus altos valores, mesmo atendendo a norma vigente.

4.4. Aplicação nas Amostras

Devido ao método já validado, aplicou-se o procedimento de extração e o método de determinação utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada com todos os parâmetros devidamente otimizados nas amostras de cogumelo A, B e C. A amostra A se refere ao cogumelo cultivado e inoculado em resíduos de trigo, sendo que em nenhuma etapa do cultivo o cogumelo teve contato com resíduos de café.

A amostra B é referente ao cogumelo cultivado em palha de trigo e inoculado em resíduo de café (borra de café). A amostra A Tabela 4 contempla os valores das respectivas concentrações recuperadas.

Tabela 5. Concentrações de cafeína encontradas nas amostras A, B e C.

Concentração de Cafeína/Amostras	Concentração Determinada ($\mu\text{g/g}$)	Concentração Determinada (% m/m)
Amostra A	<LD	<LD
Amostra B	694,3	0,30
Amostra C	1207,3	0,55

Através da Tabela 4, evidencia-se que a amostra que possui maior teor de cafeína é a amostra C, a qual teve maior contato com derivados de café, tanto no período do cultivo quanto no de inóculo, comprovando assim maior absorção de cafeína pelo cogumelo. O cogumelo com teor menor de cafeína foi o cogumelo B, justificado pelo contato com derivados de café apenas em um período durante o processo de cultivo.

No cogumelo A não foi encontrada nenhuma evidência de cafeína, o que é justificado pelo fato de não haver qualquer contato com resíduos de café durante o cultivo do cogumelo. Esses resultados são condizentes com os encontrados por Ramalho (2015) em seu trabalho de determinação de cafeína em cogumelos utilizando a técnica de CLAE-UV. Apesar disso, a técnica utilizada não apresentou evidência de cafeína em amostra similar ao cogumelo B, o que comprova que a técnica utilizada neste trabalho apresenta maior sensibilidade devidos aos limites mais baixos.

4.5. Referências

- AGOSTINHO, S.M.L., VILLAMIL, R.F.V., NETO, A.A., ARANHA, H. **O eletrólito suporte esuas múltiplas funções em processos de eletrodo.** *Química Nova*, v. 27, n.5, p. 813-817, 2004.
- GOSSER JR, K. D. **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms.** New York, VCH, p. 97, 1993.

- **INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE008 –Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 04, julho/2011.

- SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L., ROCHA FILHO, R. C.; AVACA, L. A. **Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment.** *Electrochimica Acta*, v. 49, n. 22/23, p. 4021-4026, 2004.

ARAGÃO, N. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise – um exemplo de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida (CLAE) e os princípios da ‘Química Verde’ na determinação de metilxantinas em bebidas.** *Química Nova*, v. 32, n. 39, p. 2476-2481, 2009.

BATISTA, E.C, OLIVEIRA, R.T.S., FERREIRA, R.Q., MIWA, D., SANTOS, M.C. **Degradação eletroquímica da vinhaça usando o eletrodo diamante dopado com boro.** *Química Nova*, v. 34, n.9, 2011.

BRAGA, O.C. **Determinação de cafeína em produto farmacêutico por voltametria cíclica com eletrodo de ouro.** 2006. 22f. Universidade Estadual de Santa Catarina. Florianópolis.

BRASIL, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. A ANVISA determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília. n. 889, 2 jun. 2003.

COSTA, J.C.D. **Validação de um método de cromatografia de alta eficiência para a determinação de conservantes em gêneros alimentícios.** 2015. 105f. Dissertação de Mestrado – Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa, Portugal.

DE SOUZA, D., MACHADO, S.A.S., AVACA, L.A. **Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos.** *Química Nova*, v.26, n. 1, p. 81-89, 2003.

FURLANI, R. P. Z., GODOY, H. T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

GNOATTO, S.C.B., BASSANI, V.L., COELHO, G.C., SCHENKEL, E.P. **Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL., AQUIFOLIACEAE).** *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007.

KULTZ, T. W. **Validação do processo de extração e determinação de cafeína em cogumelos do gênero *Pleurotus* através de métodos espectrofotométricos e cromatográficos.** 2014. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Bacharelado) – Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava.

LOURENÇÃO, B.C. **Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro.** 2009. 139 p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2009.

MATOS, L.P.C. **Compostos Fitoquímicos e atividade antioxidante de casca de café.** 2014. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão.

MENDONÇA, C.D. **Determinação eletroanalítica e cromatográfica de metilparabeno. Uma comparação estatística.** Dissertação de Mestrado. 2015. 72f. Universidade de São Paulo. São Carlos.

MENEZES, M. M. T. **Desenvolvimento de sensores voltamétricos e piezelétricos modificados quimicamente com cucurbiturilas para análise de cocaína em amostras de interesse forense.** 2014. 129f. Tese (Tese de Doutorado em Ciências, Área: Química) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

OSTERYOUNG, J. G.; O'DEA, J. J. **Square-Wave Voltammetry.** In: BARD, A. J. *Electroanalytical Chemistry.* New York, Marcel Dekker, v. 14, p. 459, 1982.

PEDROSA, V.A., CODOGNOTO, L., AVACA, L.A. **Determinação Voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada.** *Química Nova*, v. 26, n. 6, 2003.

RAMALHO, A.N. **Cafeína em cogumelo *Pleurotus ostreatus* cultivado com resíduos de café.** 2015. 79f. Tese (Dissertação de Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava.

RIBANI, M. **Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROLOFF, F.B., **Determinação eletroanalítica de teofilina em produto farmacêutico.** Trabalho de Conclusão de Curso. 2006. 35f. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. **Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos.** *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o estudo e a otimização de parâmetros para a determinação de cafeína utilizando as técnicas de voltametria de onda quadrada (VOQ) e a voltametria cíclica (VC).

Sendo assim, considera-se como parâmetros que melhor definem o pico referente ao processo de oxidação da cafeína a frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f) cujo valor é de 80 Hz, o incremento de onda com valor de 4 mV, a amplitude de onda quadrada de 40 mV e como eletrólito suporte a solução de sulfato de sódio na concentração de 0,1 M e pH 5,0.

Através da voltametria cíclica realizada com o estudo de velocidade de varredura conclui-se que o processo de oxidação da molécula da cafeína apresenta características de processo irreversível, uma vez que não houve presença de pico reverso. Outro detalhe observado é um deslocamento de potencial de pico para regiões mais positivas com o aumento da velocidade de varredura, fato este característico de processos irreversíveis.

A método eletroanalítico proposto por meio da técnica de voltametria de onda quadrada é eficiente para a determinação de eletroanalítica, visando a normativa da ANVISA, com todos os parâmetros avaliados dentro dos padrões estabelecidos. Dessa maneira, foi realizada a validação do método de determinação, com parâmetros devidamente otimizados para a determinação desejada.

À curva de calibração foram aplicados a regressão linear, bem como o teste de falta de ajuste para a faixa de concentração de $9,81 \cdot 10^{-7}$ a $1,03 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Ambos os resultados foram satisfatórios para a análise da linearidade. Os limites de detecção e de quantificação são menores que os encontrados na literatura, tem como comparação o mesmo método de cálculo e faixas de concentração muito similares.

O método de determinação apresentou valores aceitáveis de precisão. No entanto, a precisão mostrou que o método apesar de sensível, apresenta precisão a ser melhorada, com recuperações de 107,09 %.

A amostra A, cultivada e inoculada em trigo, não apresentou indícios de cafeína devido a seu processo de cultivo. Para a amostra B que teve a presença de resíduos de

café em um período apenas foram encontrados teores de cafeína, os quais representam 0,30 % (m/m) do cogumelo. Para a amostra C, os teores encontrados são maiores e representam cerca de 0,55 % (m/m) do cogumelo, justificado pela maior parte do cultivo haver a presença de resíduos de café.

Com isso, conclui-se o trabalho de determinação de cafeína em cogumelos *Pleurotus* pela técnica de voltametria de onda quadrada salientando que para uma matriz tão complexa como o cogumelo, é necessária uma técnica de separação com a finalidade de obter recuperações mais altas devido a separação de compostos.