



FLÁVIO VIEIRA MARTINS DE ALMEIDA

**A CAFEÍNA VISTA SOB NOVA ABORDAGEM:
DEGRADAÇÃO DO CONTAMINANTE EMERGENTE E
PRECURSOR DE MOLÉCULAS DE INTERESSE VIA REAÇÃO
DE N-DESMETILAÇÃO**

LAVRAS – MG

2021

FLÁVIO VIEIRA MARTINS DE ALMEIDA

**A CAFEÍNA VISTA SOB NOVA ABORDAGEM: DEGRADAÇÃO DO
CONTAMINANTE EMERGENTE E PRECURSOR DE MOLÉCULAS DE INTERESSE
VIA REAÇÃO DE N-DESMETILAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação Multicêntrico em Química, para a
obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Mário César Guerreiro

Orientador

Prof. Dr. Márcio Pozzobon Pedroso

Prof. Dra. Iara do Rosário Guimarães Carvalho

Coorientadores

LAVRAS – MG

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Almeida, Flávio Vieira Martins de.

A cafeína vista sob nova abordagem : degradação do
contaminante emergente e precursor de moléculas de interesse via
reação de N-desmetilação / Flávio Vieira Martins de Almeida. -
2021.

209 p. : il.

Orientador(a): Mário César Guerreiro.

Coorientador(a): Márcio Pozzobon Pedroso, Iara do Rosário
Guimarães Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Dimetilxantinas. 2. Catálise oxidativa. 3. Degradação
mediada por ácido ascórbico. I. Guerreiro, Mário César. II. Pedroso,
Márcio Pozzobon. III. Carvalho, Iara do Rosário Guimarães. IV.

FLÁVIO VIEIRA MARTINS DE ALMEIDA

**A CAFEÍNA VISTA SOB NOVA ABORDAGEM: DEGRADAÇÃO DO
CONTAMINANTE EMERGENTE E PRECURSOR DE MOLÉCULAS DE INTERESSE
VIA REAÇÃO DE N-DESMETILAÇÃO**

**CAFFEINE SEEN UNDER A NEW APPROACH: DEGRADATION OF THE
EMERGING CONTAMINANT AND PRECURSOR OF MOLECULES OF INTEREST VIA
N-DEMETHYLATION REACTION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação Multicêntrico em Química, para a
obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de outubro de 2021.

Dr. Jonas Leal Neto	UFLA
Dr. Jose Luis Díaz de Tuesta Triviño	IPB/Portugal
Dr. Sérgio Scherrer Thomasi	UFLA
Dra. Iara do Rosário Guimarães Carvalho	UFLA

Prof. Dr. Mário César Guerreiro

Orientador

Prof. Dr. Márcio Pozzobon Pedroso

Prof. Dra. Iara do Rosário Guimarães Carvalho

Coorientadores

LAVRAS – MG

2021

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Fábio Antônio e Maria Francisca.

Com carinho, OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, além da dádiva da vida, por todas oportunidades proporcionando as circunstâncias necessárias ao aprimoramento educacional, desde a curiosidade e anseio por conhecimento até o contato com pessoas incentivadoras.

Aos meus pais, Fábio e Maria Francisca, pela educação moral e intelectual, e exemplos de vida, com simplicidade, generosidade, trabalho e amor.

Aos meus irmãos Fernando e Franciana, pela torcida constante e força em tantos momentos (bons e difíceis) importantes da vida que ocorrem concomitantemente.

À minha esposa Rayssa, pelo companheirismo, amor, dedicação, torcida, incentivos tanto em palavras como em atitudes, e auxílio em diversas etapas importantes desse trabalho.

À minha filha Aurora, pelo amor despertado e incentivo ao melhor aproveitamento do tempo e de energias.

Ao meu orientador Mário Guerreiro pelos esclarecimentos, auxílio em momentos cruciais, atenção em detalhes importantes e brilhantismo em decisões acertadas.

Aos professores por aguçar a curiosidade e incentivo na busca do entendimento; aos funcionários do DQI pelo auxílio e conhecimentos compartilhados.

Aos colegas de estudo, a galera do DQI e do IPB, pela troca de conhecimentos, pelo convívio, amizade, companheirismo e momentos de lazer e descontração.

A todos que de alguma forma me auxiliaram nessa jornada marcada por dedicação, paciência, disciplina, serenidade e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, à UFLA e ao IPB pelas oportunidades e estruturas oferecidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigado!

Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria.

Santo Agostinho

RESUMO

As metilxantinas são alcalóides derivados do metabolismo secundário das plantas, representados por cafeína, teobromina e teofilina, cuja biosíntese depende da espécie da planta, assim a cafeína é formada preferencialmente no café, e a teobromina no cacau. São derivados da purina, com anéis pirimidínico e imidazólico fundidos cuja diferença estrutural é decorrente da ausência de um grupo metila em diferentes posições. A cafeína é a substância química com atividade psicoativa mais consumida pela população, sendo incorporada em produtos industrializados como bebidas estimulantes, suplementos dietéticos e medicamentos. No organismo humano, é metabolizada gerando as dimetilxantinas: paraxantina, teobromina e teofilina. Devido ao seu grande consumo e estabilidade, a cafeína tem sido encontrada em águas residuais e considerada um micropoluinte emergente. Dessa forma, foram estudadas condições para promover a degradação da cafeína em solução aquosa simulada de contaminação, aplicando-se as condições Fenton, tipo-Fenton e com ácido ascórbico que permitiram avaliar a influência dos reagentes Fenton $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$, além do pH e catalisadores (Fe^{3+} , óxidos/hidróxidos de ferro). Também foi investigada a aplicação das reações catalíticas visando a conversão da cafeína nas dimetilxantinas. O trabalho compreendeu o monitoramento reacional com avaliação dos produtos de transformação da cafeína, monitorados por HPLC. Além disso, avaliou-se a aplicação das técnicas analíticas cromatografia em papel, UV-Vis e FTIR para detecção de cafeína em amostras, obtendo melhores resultados com FTIR associada a técnica de deconvolução ou análise de componentes principais, que tornou possível a semiquantificação de cafeína mesmo em presença de teobromina. Paralelamente, buscou-se um método analítico adequado ao monitoramento reacional visando a quantificação da cafeína e de seus produtos de transformação. O método de HPLC, constituído por mistura de água e acetonitrila (9:1) como fase móvel, fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C18 150 x 4,6 mm e $5\mu\text{m}$ de tamanho de partícula, detecção em 272 nm com uso de DAD, tempo de corrida de 14 minutos, possibilitou a verificação de 10 produtos de transformação, com a identificação da teobromina (3,7-dimetilxantina) e a inferência de outros produtos como paraxantina, teofilina e derivados do ácido úrico. Também foi avaliada uma fração da amostra por espectrometria de massas apresentando íon m/z 181, compatível com as dimetilxantinas. Os mecanismos das reações de N-desmetilação e C-hidroxilação foram propostos, com razão molar cafeína/ HO^\cdot de 1:2, via radicais hidroxila, ou cafeína/ H_2O_2 1:1, mediada por H_2O_2 . A constatação da reação de N-desmetilação da formação das dimetilxantinas é interessante, uma vez que a cafeína se configura como um importante precursor de novas moléculas.

Palavras-chave: Dimetilxantinas. N-desmetilação. Catálise oxidativa. Processo Fenton. Degradação mediada por ácido ascórbico.

ABSTRACT

Methylxanthines are alkaloids derived from the secondary metabolism of plants, represented by caffeine, theobromine and theophylline, whose biosynthesis depends on the plant species, thus caffeine is preferably formed in coffee, and theobromine in cocoa. They are purine derivatives with fused pyrimidine and imidazole rings whose structural difference is due to the absence of a methyl group at different positions. Caffeine is the chemical substance with psychoactive activity most consumed by the population, being incorporated in industrialized products such as stimulant drinks, dietary supplements and medicines. In the human body, it is metabolized generating dimethylxanthines: paraxanthine, theobromine and theophylline. Due to its high consumption and stability, caffeine has been found in wastewater and considered an emerging micropollutant. Thus, conditions were studied to promote the degradation of caffeine in an aqueous solution simulated by contamination, applying the Fenton, Fenton-type and ascorbic acid conditions, which allowed evaluating the influence of Fenton $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ reagents, in addition to pH and catalysts (Fe^{3+} , iron oxides/hydroxides). The application of catalytic reactions aimed at converting caffeine into dimethylxanthines was also investigated. The work comprised the reactional monitoring with evaluation of caffeine transformation products, monitored by HPLC. In addition, the application of analytical techniques paper chromatography, UV-Vis and FTIR to detect caffeine in samples was evaluated, obtaining better results with FTIR associated with the deconvolution technique or principal component analysis, which made the semiquantification of caffeine possible, even in the presence of theobromine. At the same time, an analytical method suitable for reaction monitoring aimed at quantifying caffeine and its transformation products was sought. The HPLC method, consisting of a mixture of water and acetonitrile (9:1) as mobile phase, flow $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, C18 column $150 \times 4.6 \text{ mm}$ and $5\mu\text{m}$ particle size, detection at 272 nm using DAD, run time of 14 minutes, allowed the verification of 10 transformation products, with the identification of theobromine (3,7-dimethylxanthine) and the inference of other products such as paraxanthine, theophylline and uric acid derivatives. A fraction of the sample was also evaluated by mass spectrometry showing ion m/z 181, compatible with dimethylxanthines. The mechanisms of the N-demethylation and C-hydroxylation reactions were proposed, with a molar ratio caffeine/ HO^\cdot of 1:2, via hydroxyl radicals, or caffeine/ H_2O_2 1:1, mediated by H_2O_2 . The observation of the N-demethylation reaction in the formation of dimethylxanthines is interesting, since caffeine is an important precursor of new molecules.

Keynotes: Dimethylxanthines. N-demethylation. Oxidative catalysis. Fenton process. Ascorbic acid-mediated degradation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Estrutura química da cafeína (1), teobromina (2), paraxantina (3) e teofilina (4).....22

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Gráficos de validação cruzada (a) e detecção de amostras anômalas (b)..... 44

Figura 2 - Plotagem dos valores esperados e preditos na calibração e validação do modelo para cafeína (a, b) e teobromina (c, d).....45

Figura 3 - Espectro na região do UV da cafeína em pH 1,8 ; 7,1 e 10,6.....48

Figura 4 - Espectro na região do UV da teobromina em pH 1,1; 7,4 e 10,9.....49

Figura 5 - Representação da reação de ionização da teobromina em meio alcalino.....49

Figura 6 - Comparação dos espectros de UV da cafeína e teobromina nos diferentes valores de pH.....50

Figura 7 - Representação dos espectros de IR da cafeína e teobromina obtido dos sólidos.....51

Figura 8 - Espectros de IR na região de "fingerprint" da cafeína e teobromina.....53

Figura 9 - Espectro de IR na região de "fingerprint" das amostras cafeína, teobromina e as misturas (C T 9:1, 1:1, 1:9).....55

Figura 10 - Deconvolução dos espectros de IR na região de "fingerprint" da amostra C T (1:1), entre 1300 e 400 cm^{-1}57

Figura 11 - Espectros IR da região ligações dupla do em absorbância das amostras de cafeína, teobromina e mistura C T (1:1).....59

Figura 12 - Espectros UV na região referente a $\nu\text{C}=\text{O}$ de carbonila, destacando as principais bandas de cafeína e teobromina.....60

Figura 13 - Detalhamento do espectro IR em 3200 a 2750 cm^{-1} das amostras cafeína, teobromina e mistura C T (1:1), em absorbância.....62

Figura 14 - Deconvolução das bandas na região de 3300 a 2600 cm^{-1} do IR das amostras cafeína, teobromina, mistura C T (9:1, 1:1, 1:9).....63

Figura 15 - Gráfico de escores e pesos para 2 componentes principais (a), principais bandas na componente principal65

Figura 16 - Representação do dendrograma para as amostras analisadas por PCA.....67

Figura 17 - Verificação do modelo para a predição simultânea da concentração de cafeína (a) e teobromina (b) nas amostras.....	68
Figura 18 - Espectros de IR das reações de oxidação da cafeína preparadas em metanol.....	70
Figura 19 - Espectros na região 1750-1550 para avaliação das bandas relativas a $\nu\text{C}=\text{O}$ da carbonila e $\nu\text{C}=\text{N}$ $\nu\text{C}=\text{C}$, para cafeína e amostras reacionais.....	71
Figura 20 - Cromatograma dos padrões de cafeína e teobromina, obtidos em equipamento Shimadzu, coluna C18 de 250 mm, FM água/acetonitrila (9:1).....	74

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Representação estrutural do ácido L-ascórbico (AA).....	95
Figura 2 - Reação de oxidação do AA (1) a AAox (2) e hidrólise formando ADG (3).....	95
Figura 3 - Representação das espécies químicas do ácido ascórbico nos estados de protonação e oxidação, onde AA (1), AH^- (2), A^{2-} (3), AH^\cdot (4), $\text{A}^{\cdot-}$ (5), AH_2O (6).....	96
Figura 4 - Representação do sistema reacional.....	101
Figura 5 - Degradação da cafeína nos experimentos preliminares Fenton e condições oxidantes convencionais.....	109
Figura 6 - Degradação da cafeína (a) e consumo de H_2O_2 (b) na avaliação da condição Fenton.....	112
Figura 7 - Concentração dos reagentes Fenton na degradação da cafeína.....	113
Figura 8 - Influência do catalisador e do ácido para ajuste do pH na degradação da cafeína.....	114
Figura 9 - Avaliação do pH reacional na presença do catalisador Fe^{3+} ou Fe^{2+}	116
Figura 10 - Efeitos do meio alcalino na degradação da cafeína.....	118
Figura 11 - Reagentes que promovem ou inibem a reação Fenton: ácido ascórbico e etanol.....	119
Figura 12 - Efeito da adição de ácido ascórbico ao processo Fenton.....	124
Figura 13 - Degradação da cafeína promovida pelo ácido ascórbico.....	125
Figura 14 - Comparação da atividade sequestradora de radicais: etanol, metanol, acetonitrila.....	129
Figura 15 - Catálise heterogênea com $0,32 \text{ g.L}^{-1}$ de carga de catalisador.....	133
Figura 16 - Catálise heterogênea com $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de carga de catalisador e 1 hora de adsorção.....	134

CAPÍTULO 4

- Figura 1 - Produtos de oxidação da cafeína (1) formados por hidroxilação, ácido 1,3,7-trimetilúrico (2), desmetilação e oxidações sucessivas gerando ácido N-dimetilparabânico (3).....148
- Figura 2 - Síntese de purina proposta por Fischer a partir do ácido úrico.....149
- Figura 3 - Síntese de purina proposta por Traube a partir de 4-amino-6-hidroxipirimidina ou 4,6-diamino-pirimidina (a), ciclização de 4,5-diamino-pirimidina (b).....150
- Figura 4 - Representação das reações de von Braun para N-desmetilação de N-metilaminas terciárias com brometo de cianogênio ou cloroformato.....150
- Figura 5 - Reação Polonovski clássica.....153
- Figura 6 - Esquema de reação N-desmetilação em condições tipo-Polonovski.....153
- Figura 7 - Cromatograma da mistura de padrões da cafeína e seus metabólitos.....156
- Figura 8 - Representação dos íons moleculares e proposta de fragmentações para a cafeína e as dimetilxantinas.....159
- Figura 9 - Representação da estrutura química da cafeína (1) e possíveis produtos de transformação: ácido 1,3,7-trimetilúrico (2), teofilina (3), teobromina (4) e paraxantina (5).....167
- Figura 10 - Comportamento da degradação da teobromina e da cafeína na condição Fenton (2mM H₂O₂, 0,6mM Fe²⁺, pH3, 25°C) monitoradas por 24 horas.....169
- Figura 11 - Mecanismo de formação do ácido 1,3,7-trimetilúrico inicialmente proposto.....180
- Figura 12 - Proposta de mecanismo de reação para a oxidação da cafeína, mediada por radicais HO[·], com formação do ácido 1,3,7-trimetilúrico (a) majoritariamente, e produto minoritário na dupla ligação C4=C5 (b).....181
- Figura 13 - Representação do mecanismo de reação de N-desmetilação da cafeína (1) via radical HO[·] de razão molar 1:2, para a formação da teobromina (2).....182
- Figura 14 - Representação do mecanismo de reação de N-desmetilação da cafeína (1) mediada por H₂O₂ evidenciando a razão molar cafeína/ H₂O₂ 1:1.....183

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das metilxantinas.....	23
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Preparo das amostras para avaliação da semiquantificação por FTIR-ATR	42
Tabela 2 - Parâmetros de desempenho do modelo PLS.....	45
Tabela 3 - Construção da curva de calibração da cafeína e teobromina, expressos em concentração molar e g.L ⁻¹	46
Tabela 4 - Atribuições para as bandas de absorção no espectro de IR de cafeína e teobromina observadas no experimento em comparação com dados da literatura.....	52
Tabela 5 - Detalhamento das bandas dos espectros de absorção por deconvolução.....	54
Tabela 6 - Dados de regressão linear das áreas e alturas da deconvolução de bandas relacionados com número de mol.....	57
Tabela 7 - Atribuições para as bandas de absorção na região de dupla ligação da cafeína e teobromina observadas no experimento em comparação com dados da literatura.....	60
Tabela 8 - Dados de regressão linear das áreas e alturas da deconvolução de bandas relacionados com a razão do número de mol cafeína/teobromina.....	61
Tabela 9 - Detalhamento das bandas dos espectros de absorção por deconvolução.....	63
Tabela 10 - Dados de regressão linear das áreas e alturas da deconvolução de bandas relacionados com número de mol.....	64
Tabela 11 - Correlação de dados entre as amostras e números de onda.....	65
Tabela 12 - Avaliação das bandas principais obtidas por PCA.....	66
Tabela 13 - Exemplos de condições cromatográficas avaliadas, com os tempos de retenção da teobromina e cafeína e o tempo de corrida.....	72
Tabela 14 - Comparação do teor da cafeína (%) utilizando os métodos UV-Vis e HPLC, em diferentes condições Fenton.....	75

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Processos oxidativos com reações das espécies oxidantes e seus respectivos potenciais de redução.....	88
Tabela 2 - Condições reacionais dos experimentos preliminares para a oxidação da cafeína.	101

Tabela 3 - Experimentos e condições reacionais para a degradação da cafeína (1 mM) nos processos Fenton, tipo-Fenton e AA.....	102
Tabela 4 - Experimentos da catálise heterogênea e carga de catalisador para a degradação da cafeína (1 mM) no processo heterogêneo utilizando 2 mM H ₂ O ₂ a 25°C e pH 7..	104
Tabela 5 - Valores de pH no início e após 24 horas da reação.....	117
Tabela 6 - Resultados de degradação da cafeína, pH e TOC em 24 horas das condições experimentais Fenton, tipo-Fenton, AA e removedores.....	130

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Derivados da xantina detalhados por ordem de eluição, com indicação do íon molecular e íons gerados por fragmentação.....	159
Tabela 2 - Condições reacionais para avaliação dos produtos de transformação da cafeína por HPLC-DAD.....	163
Tabela 3 - Condições de formação da teobromina, evidenciando a conversão da cafeína e os valores de seletividade e rendimento, no tempo de 24 horas.....	168
Tabela 4 - Condições de formação do Pico 2, evidenciando a conversão da cafeína e os valores de seletividade e rendimento, no tempo de 24 horas.....	170
Tabela 5 - Condições de formação do Pico 3, evidenciando a conversão da cafeína e os valores de seletividade e rendimento, no tempo de 24 horas.....	170
Tabela 6 - Condições de formação do Pico 5, evidenciando a conversão da cafeína e os valores de seletividade e rendimento, no tempo de 24 horas.....	170
Tabela 7 - Condições de formação do Pico 6, evidenciando a conversão da cafeína e os valores de seletividade e rendimento, no tempo de 24 horas.....	171
Tabela 8 - Condições de formação do Pico 7, evidenciando a conversão da cafeína e os valores de seletividade e rendimento, no tempo de 24 horas.....	172
Tabela 9 - Condições de formação do Pico 10, evidenciando a conversão da cafeína e os valores de seletividade e rendimento, no tempo de 24 horas.....	172
Tabela 10 - Tempos de retenção (RT) e fator de retenção (k) dos picos cromatográficos, em condições isocráticas.....	174
Tabela 11 - Proposta de identificação dos picos cromatográficos verificados nas diferentes condições de transformação da cafeína, baseado na ordem de eluição.....	175
Tabela 12 - Produtos de degradação da cafeína (0,2 g.L ⁻¹) monitorados por HPLC-DAD e valores de conversão, seletividade e rendimento e máximos de absorção no UV.....	176

Tabela 13 - Bandas do espectro no UV referente aos picos da condição Fenton utilizando 20,0 g.L ⁻¹ de cafeína e proposta de identificação.....	179
Tabela 14 - Avaliação do padrão misto de cafeína e teobromina, e das amostras por HPLC-DAD previamente ao acoplamento com detector de massas.....	184
Tabela 15 - Dados dos espectros no UV e massas para os picos verificados por HPLC-QTOF.....	185

LISTA DE ABREVIATURAS

137U	Ácido 1,3,7-trimetilúrico
13X	1,3-dimetilxantina
1X	1-metilxantina
37X	3,7-dimetilxantina
3X	3-metilxantina
7X	7-metilxantina
A	Absorbância
AA	Ácido ascórbico
AA _{ox}	Ácido deidroascórbico
C	Conversão
cf	Cafeína
CT	Mistura de cafeína e teobromina
CYP	Citocromo P 450
exp	Experimento
HO [·]	Radical hidroxila
m/z	Razão massa carga
mL	mililitro
mx	Metilxantina
px	Paraxantina
Rt	Tempo de retenção
S	Seletividade
T	Transmitância
tf	Teofilina
v	Volume
X	Xantina

LISTA DE SIGLAS

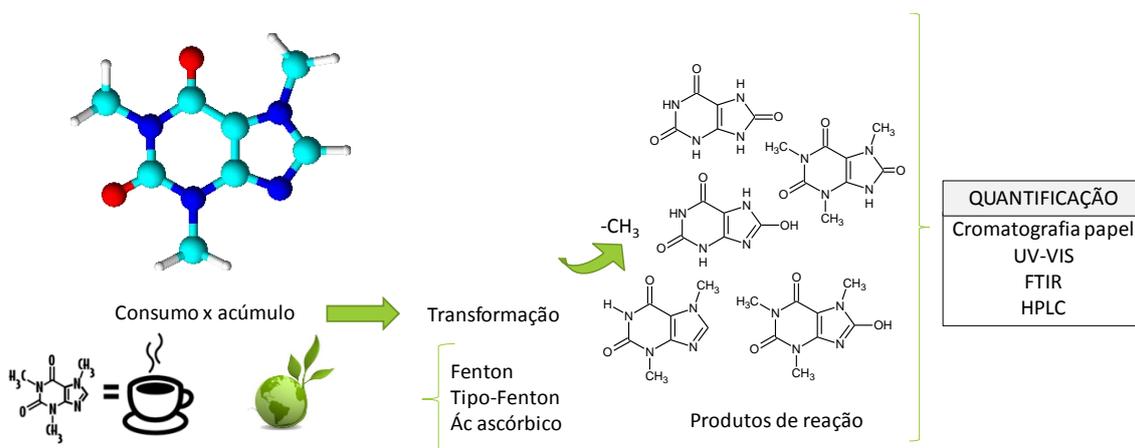
ATR	Acessório de reflectância total atenuada
CWPO	Oxidação catalítica com peróxido de hidrogênio
DAD	Detector de arranjo de diodos
ESI	Electrospray
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FTIR	Espectroscopia na região do IR com transformada Fourier
HCA	Análise de agrupamento hierárquico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IR	Infravermelho
MS	Espectroscopia de massas
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Regressão por componentes principais
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais
POA	Processo oxidativos avançado
QTOF	Detector Triplo quadrupolo acoplado a tempo de voo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
TOF	Detector de tempo de voo
UV-Vis	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO & REFERENCIAL TEÓRICO	20
1 INTRODUÇÃO GERAL	20
2 REFERENCIAL TEÓRICO	22
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	27
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS NA DETERMINAÇÃO DA CAFEÍNA E DA TEOBROMINA.....	30
1 INTRODUÇÃO	33
2 REFERENCIAL TEÓRICO	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 3 - DEGRADAÇÃO DA CAFEÍNA: AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS FENTON, TIPO-FENTON E ÁCIDO ASCÓRBICO	81
1 INTRODUÇÃO	84
2 REFERENCIAL TEÓRICO	86
3 MATERIAIS E MÉTODOS	99
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
5 CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	137
CAPÍTULO 4 - PRODUTOS OBTIDOS DA CONVERSÃO DA CAFEÍNA EM CONDIÇÕES FENTON, TIPO-FENTON E COM ÁCIDO ASCÓRBICO	143
1 INTRODUÇÃO	146
2 REFERENCIAL TEÓRICO	147
3 MATERIAIS E MÉTODOS	161
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	166
5 CONCLUSÃO	188
REFERÊNCIAS	189
APÊNDICES.....	194

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de tese divide-se em capítulos de acordo com os temas: referencial teórico, métodos de análise, condições de transformação da cafeína e seu estudo. No primeiro capítulo é apresentada a introdução geral contendo os objetivos, seguido do referencial teórico que aborda as metilxantinas e por fim as considerações gerais. Nos capítulos 2, 3 e 4 tem-se o detalhamento das atividades desenvolvidas com os resultados e conclusões. A ilustração abaixo apresenta uma visão geral do trabalho.



O intuito desse estudo visou abranger aspectos pouco estudados da molécula cafeína, desde o levantamento de sua presença no ambiente e métodos analíticos até formas de remediação ambiental e possíveis transformações químicas. Ao se trabalhar com uma molécula definida, seja no seu monitoramento ou conversão em outras moléculas, tem-se a necessidade de realizar sua determinação com especificidade proporcionando uma interpretação dos processos e entendimento das reações.

No capítulo 2 foram abordados aspectos metodológicos de análise da cafeína. Nesse âmbito, enfatizou-se o monitoramento da cafeína em presença de teobromina, substância de estrutura química semelhante à cafeína, também presente na biomassa e um produto de reação em condições oxidantes. As técnicas analíticas de cromatografia em papel, espectroscopia nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) ou do infravermelho (IR, do inglês *infrared*) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high pressure liquid chromatography*) foram empregadas de modo a identificar um método satisfatório, simples e rápido para monitoramento das reações. Foram preparadas amostras constituídas por diferentes proporções de cafeína e teobromina, e submetidas as análises utilizando-se as diferentes técnicas. A técnica de cromatografia em papel não

demonstrou resultado satisfatório, e UV-Vis não apresentou a seletividade necessária; enquanto IR revelou ser útil para indicar os grupos funcionais e permitir a determinação semiquantitativa. A técnica de HPLC demonstrou resultados consistentes com especificidade adequada e possibilitou a verificação de produtos reacionais, sendo então selecionada para as análises seguintes.

No capítulo 3 foram estudados possíveis tratamentos para degradação da cafeína, de forma ambientalmente amigável. Buscou-se processos oxidativos para promover a degradação da cafeína, em condições brandas, com um amplo experimento derivado do processo Fenton. Assim, foram avaliadas diferentes concentrações de reagentes, bem como a inclusão ou substituição de reagentes e variação de pH, para a obtenção das melhores condições de degradação da cafeína.

Nos testes de degradação da cafeína, monitorada por HPLC, verificou-se a formação de produtos com diferentes tempos de retenção e em diferentes concentrações. Dentre os produtos de transformação da cafeína, foram investigados candidatos à moléculas de interesse como as dimetilxantinas, relacionando-os com as condições reacionais de obtenção. Esses resultados são apresentados no capítulo 4 como indicativo de estudo mais profundo a respeito dessas observações.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO & REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO GERAL

As metilxantinas são encontradas em plantas sendo consumidas principalmente a partir de bebidas preparadas do café, chá e também do cacau, no caso da teobromina. São moléculas farmacologicamente ativas, apresentando benefícios como melhoria das funções cerebrais e respiratórias, entretanto com diferentes atividades biológicas. Devido a seus efeitos, as metilxantinas são exploradas industrialmente em medicamentos como antigripais, em associações para tratamentos de dores, broncodilatadores ou ainda incorporados em bebidas estimulantes, no caso da cafeína.

O teor de cafeína nas plantas varia conforme a espécie e a parte a qual é extraída. No grão do café seu conteúdo é de 1% a 4% para as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canéfora*, que são cultivadas no Brasil. A cafeína também está presente nas folhas e cascas do café, embora com menor teor. Da mesma forma, há a presença de outras xantinas como teobromina e teofilina, embora em quantidades inferiores. Dependendo da planta, as outras xantinas podem predominar, como a teobromina no cacau cujo teor é de aproximadamente 1%. A teobromina pode ser obtida a partir da extração do cacau ou por métodos sintéticos e biocatálise, ambos de custo elevado, pouca especificidade, com uso de solventes tóxicos e alta demanda tecnológica.

Do ponto de vista ambiental, a cafeína tem se tornado um problema. Por ser uma molécula quimicamente estável, muito solúvel e não volátil, percebe-se sua persistência no meio ambiente, sendo encontrada em águas residuais onde há ocupação humana. Nesse contexto, a cafeína é um micropoluinte emergente de difícil remoção nas estações de tratamento de esgoto. Com o surgimento de novas tecnologias, impulsionado pela consciência crescente do aproveitamento dos recursos naturais, com processos cada vez mais eficientes de purificação de água, tem-se estudado alternativas de remoção da cafeína dos cursos de água contaminados com rejeitos de atividade humana.

O desenvolvimento de instrumentos cada vez mais sensíveis e o avanço das técnicas analíticas aumentam a capacidade de determinação de micropoluentes no ambiente, proporcionando seu monitoramento. Existem diversos métodos analíticos destinados à determinação do conteúdo de cafeína e de outras xantinas envolvendo técnicas mais simples como cromatografia em papel, que permite a separação de diferentes moléculas, as espectroscopias na região do UV-Vis e IR, que fornecem dados qualitativos e quantitativos por meio de absorção de radiação eletromagnética nas regiões do IR e do UV-Vis. O emprego de

técnica mais sofisticada como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) proporciona a separação e quantificação dos analitos, sendo de interesse ao se avaliar amostras complexas e monitorar a concentração de cafeína seja em amostras reais ou na presença de metilxantinas em reações teste no laboratório.

Um dos objetivos do trabalho é a avaliação de diferentes técnicas analíticas como a cromatografia em papel, a espectroscopia na região do UV-Vis e do IR, e a cromatografia líquida de alta eficiência quanto a adequação e potencialidades de seu emprego visando abranger diferentes amostras e as particularidades de aplicações.

Os processos oxidativos avançados são uma forma de tratamento químico dos poluentes promovendo sua degradação via geração de radicais. A condição Fenton emprega o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons ferrosos (Fe^{2+}) para gerar os radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) de alto poder oxidante, capaz de degradar a matéria orgânica. Outro objetivo do trabalho visa a aplicação de processos Fenton, tipo-Fenton e outras condições reacionais como o efeito do ácido ascórbico para a degradação da cafeína. Assim serão avaliados diferentes catalisadores (Fe^{2+} e Fe^{3+}), em diferentes pH, temperatura e proporção de reagentes (íons ferro, H_2O_2 , AA, sequestradores de radicais) com vistas a obter a melhor condição de degradação e maior taxa de mineralização.

Além da grande utilização da cafeína nas indústrias alimentícias ou farmacêuticas, outras metilxantinas são interessantes devido seu alto valor de mercado. Nesse contexto, a possibilidade de obtenção das dimetilxantinas via reação de N-desmetilação a partir da cafeína torna-se interessante, uma vez que sua obtenção é difícil e de alto custo. A catálise é um processo de transformação em que uma molécula precursora pode ser convertida em produtos de interesse para novas aplicações, com pequena utilização de reagentes em processos limpos e “verdes”, em atenção a questão ambiental. Neste trabalho, pretende-se aplicar catalisadores de baixo custo como as condições Fenton, tipo-Fenton ou ácido ascórbico para promover a conversão da cafeína nas outras metilxantinas bem como elucidar os mecanismos de reação.

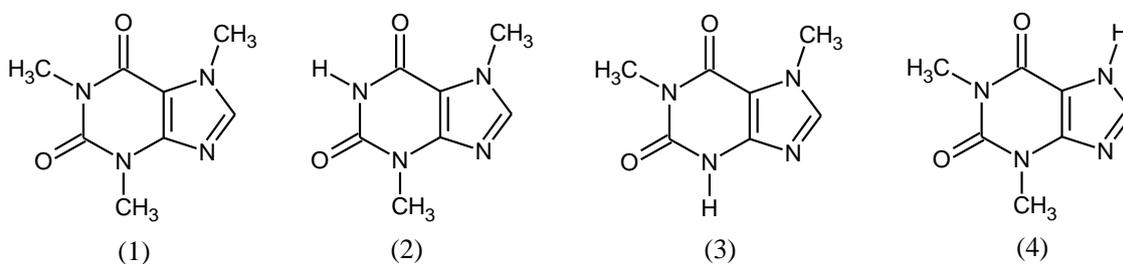
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metilxantinas

Metilxantinas pertencem a classe de alcalóides purínicos, que são metabólitos secundários de plantas, representados pela cafeína (trimetilxantina) e também as dimetilxantinas teobromina, teofilina e paraxantina. Comumente são encontradas em plantas como chá, cacau e café, sendo biossintetizados para a proteção contra patógenos e predadores como insetos (ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008; MONTEIRO et al., 2016). Também são obtidas por síntese química (POBUDKOWSKA; DOMAŃSKA; KRYSKA, 2014) com desvantagem de utilizarem reagentes de alto custo e tóxicos, necessidade de muitas etapas de reação e condições severas (AWALT et al., 2017; DO PHAM et al., 2014).

As principais metilxantinas são representadas pela cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina), paraxantina (1,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina), diferenciando-se estruturalmente por um grupo metila, conforme representado na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química da cafeína (1), teobromina (2), paraxantina (3) e teofilina (4).



Fonte: Pubchem (2021).

Os derivados metilas da xantina apresentam diferentes solubilidades e tem uma natureza alcalina fraca. A Tabela 1 resume as propriedades das metilxantinas.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas das metilxantinas.

Xantina	Fórmula molecular	MM g.mol ⁻¹	pka	T. fusão (°C)	Solubilidade água mg.mL ⁻¹ (25 °C)	Log P
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,0804	14,0	235-237	21,6	-0,07
Teobromina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,0647	9,9	357	0,33	-0,78
Paraxantina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,0647	-	351-352	0,03	-0,22
Teofilina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,0647	8,8	273-274	7,4	-0,02

Fonte: Adaptado de “Pubchem” e “Scientific Instrument Services” (2021).

A baixa solubilidade em água das metilxantinas pode ser atribuída a interações intermoleculares dos orbitais π , dificultando a solvatação. Os altos valores de temperaturas de fusão também são decorrentes dessas interações. As metilxantinas teofilina, paraxantina e teobromina agem também como ácidos com a liberação de um próton das posições 7, 3 e 1 respectivamente, embora predomine seu caráter básico. (POBUDKOWSKA; DOMAŃSKA; KRYSKA, 2014).

Com relação a lipofilicidade, as moléculas têm valores log P negativos e assim dissolvem levemente em solventes orgânicos. Cafeína e teofilina apresentam maior lipofilicidade do que a teobromina.

A cafeína é a substância química com atividade fisiológica mais consumida pela população, decorrente do efeito estimulante. É encontrada no café (*Coffea spp*) nas folhas de chá (*Camellia sinensis*), na erva mate (*Ilex paraguariensis*), no guaraná (*Paullinia cupana*) ou incorporada em alimentos.

A teobromina é encontrada no cacau (*Theobroma cacao*) com cerca de 2% nos grãos e 0,6% na casca; em folhas jovens de chá de cacau (*Camellia ptilophylla*) com cerca de 5 a 6%, em folhas de chá (*Camellia sinensis*) com conteúdo até 0,8% , em erva mate (*Ilex paraguariensis*) com cerca de 0,08 a 0,16% e traços em grãos de cola (*Cola acuminata*) e café (*Coffea spp*) (ASHIHARA; CROZIER, 2001; ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008). Apresenta efeitos de vasodilatação e diurético, além de ser utilizada pela indústria farmacêutica em medicamentos para resfriados e tratamentos respiratórios devido ao efeito de relaxamento do músculo liso, em particular nos brônquios. Seus efeitos no sistema nervoso central (SNC) são inferiores aos da cafeína e teofilina, devido a suas propriedades físico-químicas com menor permeabilidade na barreira hematoencefálica. Os principais mecanismos de ação são o bloqueio de receptores de adenosina e a inibição de fosfodiesterases, com tempo de meia-vida de 10

horas, superior à da cafeína, sendo uma vantagem de utilização farmacológica (MARTÍNEZ-PINILLA; OÑATIBIA-ASTIBIA; FRANCO, 2015).

De acordo com Sansone e colaboradores (2017) a teobromina acarreta abaixamento da pressão sanguínea. Estudos apontam que os efeitos benéficos ou maléficos são dependentes da dose: com efeito positivo em ingestão normal (como em chocolate), inclusive em casos de deficiência cognitiva de pacientes idosos, mas em elevadas concentrações pode ser prejudicial (AFONSO MOREIRA, MARIA JOSE DIOGENES, ALEXANDRE DE MENDON, NUNO LUNET, 2016; BAGGOTT et al., 2013). Há também estudos que apontam uma ação inibitória e profilática em células cancerosas (MAYA GEORGIEVAA, MAGDALENA KONDEVA-BURDINAB, JAVOR MITKOVA, VIRGINIA TZANKOVAB, 2016). Embora tóxica para mamíferos de pequeno porte, incluindo cães, a teobromina é segura para humanos e apresenta menos efeitos adversos do que a cafeína. Esse fato inclusive dificulta a pesquisa das ações farmacológicas e fisiológicas com seus mecanismos uma vez que limita a utilização de modelos animais (MARTÍNEZ-PINILLA; OÑATIBIA-ASTIBIA; FRANCO, 2015).

A teofilina é obtida de fontes naturais principalmente nas folhas de chá (*Camellia sinensis*), e em menor quantidade no café e grãos de cacau (MONTEIRO et al., 2019). É utilizada no tratamento da asma e outras doenças pulmonares, devido ao seu efeito broncodilatador, diminuindo a resistência da passagem de ar nas vias aéreas.

A paraxantina não é encontrada naturalmente em alimentos, sendo um produto do metabolismo da cafeína no homem (CORNELIS et al., 2016; MONTEIRO et al., 2016). Apresenta potencial ação protetora contra neurodegeneração e mal funcionamento das sinapses, mediado por ativação dos receptores rianodina do retículo endoplasmático promovendo a liberação de cálcio no citosol (GUERREIRO et al., 2008).

Os perfis de atividade das metilxantinas dependem do padrão de metilação. A cafeína é mais lipofílica e apresenta maior ação estimulante do SNC com menor influência na diurese. A teobromina tem pequena ação estimulante ao passo que apresenta maior efeito na diurese e no relaxamento da musculatura pulmonar. A teofilina apresenta maior efeito broncodilatador e também age como diurético, embora seja praticamente desprovida de ação estimulante (BARREIRO; KUMMERLE; FRAGA, 2011).

As metilxantinas têm sido utilizadas com fins medicinais desde o início dos anos 1920 para asma e doença pulmonar obstrutiva crônica. Posteriormente nos anos 1940 e 1950 utilizada com fins diuréticos, também para insuficiência cardíaca congestiva e angina. Já na década de 70, foi empregada em casos de apneia prematura, bradiarritmias e adjuvante analgésico. No fim dos anos 1990 passou a ser usada para resfriados, adjuvante no tratamento de câncer e leucemia

linfocítica crônica. A partir de 2010 tem sido usada no aumento de colesterol HDL. Alguns efeitos tóxicos também são relatados, variando conforme a espécie (MONTEIRO et al., 2019).

2.2 Aspectos fisiológicos e farmacológicos da cafeína

A cafeína apresenta diversos efeitos fisiológicos compreendendo: ação estimulante do sistema nervoso central, aumento da força muscular e resistência a fadiga, melhoria das funções cardiovasculares, aumento da pressão sanguínea e dos batimentos cardíacos, dentre outras.

A ação estimulante da cafeína, que permite um estado de alerta, está relacionado ao seu grande consumo. Esse efeito neuroestimulante é mediado por antagonismo dos receptores da adenosina no sistema nervoso central, além de outros mecanismos como a regulação dos níveis intracelulares de cálcio, inibição da fosfodiesterase, estimulação da liberação de adrenalina e ativação de receptores rianodina. Outros benefícios são: efeito ergonômico, com aumento da força muscular e resistência a fadiga (GRGIC et al., 2018); aumento da neuroproteção em bebês prematuros (< 32 semanas) pelo aumento do metabolismo cerebral (DIX et al., 2018); relação com a diminuição da prevalência de diabetes tipo 2 decorrente de efeitos metabólicos e da doença de Parkinson (GROSSO et al., 2017); melhoria de funções cardiovasculares (SANSONE et al., 2017); efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (KOLAHDOUZAN; HAMADEH, 2017). Entretanto seu consumo também pode apresentar alguns efeitos adversos relatados na literatura como aumento da pressão sanguínea e dos batimentos cardíacos, insônia, ansiedade (ALGHARRAWI; SUMMERS; SUBRAMANIAN, 2017; LOFTUS et al., 2016); outros efeitos são inconclusivos carecendo de avaliações como a ação no miocárdio, na parede dos vasos sanguíneos e no sistema nervoso autônomo, ressaltando que em doses excessivas apresentam impacto no coração com possibilidade de arritmias, recomendando ingestão moderada (LOFTUS et al., 2016). É importante relatar os benefícios da ingestão do café, e não apenas da cafeína, associado à provável diminuição do risco dos câncer de mama, cólon, reto, endométrio e próstata; bem como diminuição do risco de doenças cardiovasculares e diabetes (GROSSO et al., 2017).

No organismo humano a cafeína é metabolizada via sistema citocromo P450 (CYP) (NEVES et al., 2011), que apresenta o ferro como grupo prostético. Várias famílias de enzimas compõem a classe do CYP, assim diferentes reações são catalisadas por enzimas específicas tanto de oxidação com formação do ácido 1,3,7-trimetilúrico como por N-desmetilação gerando as dimetilxantinas teobromina, teofilina e paraxantina como metabólito majoritário. Ressalta-

se que o metabolismo da cafeína sofre grande variação interindividual, que pode inclusive modificar seus potenciais efeitos benéficos ou maléficos (CORNELIS et al., 2016).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A determinação da cafeína e da teobromina foi avaliada, seja nas amostras preparadas ou em experimentos de degradação, utilizando as técnicas analíticas comumente adotadas e selecionadas no âmbito deste trabalho: cromatografia em papel, espectroscopia na região do UV-Vis e IR e HPLC.

As baixas solubilidade da teobromina e afinidade pela fase estacionária foram as desvantagens na utilização da cromatografia em papel para o monitoramento reacional, além da necessidade de solventes orgânicos, alguns inclusive tóxicos, desmotivando seu uso. A avaliação por UV-Vis revelou espectros de absorção idênticos para a cafeína e teobromina, em conformidade com sua similaridade estrutural, inviabilizando o emprego dessa técnica. Ao avaliar os espectros na região do IR, foram verificadas diferenças em mais de uma região espectral porém de difícil interpretação. A adequada distinção dos analitos foi permitida com o uso da deconvolução das bandas ou por análise de componentes principais que também proporcionaram a semiquantificação por regressão linear ou calibração multivariada de ambas as substâncias, quando avaliada amostra sólida no ATR.

Um método cromatográfico de HPLC foi desenvolvido para a quantificação de cafeína e teobromina nos meios reacionais, além de proporcionar a separação de produtos de transformação nas diversas condições. O método permite a coleta de frações pós-coluna para a posterior análise por espectrometria de massas, de modo a identificar os produtos de transformação.

Na tentativa de remover a cafeína, uma solução simulada foi avaliada sob diferentes condições de degradação incluindo Fenton, tipo-Fenton e com ácido ascórbico (AA). Foi comprovado que a cafeína se mantém estável por mais de 10 dias em solução aquosa, seja em meio neutro e ácido. Também foram comprovados que o pH ótimo é em torno de 3; a maior eficiência dos íons Fe^{2+} sobre os Fe^{3+} ; pequeno efeito da temperatura e a ação de sequestradores de radicais, úteis na interpretação do mecanismo de reação, evidenciando ser via espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e radicais hioxila (HO^\cdot). Na avaliação do efeito do pH, foi observado que a cafeína sofre hidrólise em meio alcalino (pH 13), mas que nessa faixa de pH desfavorece a degradação via radicalar. A condição Fenton se mostrou atrativa para a remoção de contaminantes apresentando aproximadamente 80% de degradação de cafeína (2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3, 24 h).

O reagente AA, inicialmente adicionado ao sistema Fenton para avaliação de seu efeito pró-oxidante ao regenerar os íons Fe^{2+} , demonstrou promover a degradação da cafeína. Assim,

o AA é capaz de incrementar na formação de radicais HO[·] em processos Fenton (degradação de 70 % em 10 minutos) e promover diretamente a formação de H₂O₂ seguida de ROS ou radicais HO[·] (degradação de 30 a 40 % em 24 horas).

Foi verificado que os íons ferro, por si, são capazes de gerar ROS e promoverem a degradação da cafeína, embora em pequena extensão, cerca de 6% a 12% em 24 h. Da mesma forma, a adição de AA à solução contendo íons ferro promove o ciclo redutivo Fe³⁺ / Fe²⁺ bem como diminui o potencial redox do Fe³⁺ / Fe²⁺ por efeito quelante, gerando radicais HO[·] e aumentando a degradação da cafeína com aproximadamente 30 % em 24 horas.

Foi observado que a condição Fenton com acréscimo de AA e o removedor de radicais apresentou a maior inibição na degradação da cafeína com o completo consumo de H₂O₂ atribuído a decomposição mediada por Fe²⁺ e AA com a ação sequestrante do removedor.

A dificuldade de remoção da cafeína, bem como a formação de produtos recalcitrantes, foi comprovada já que não obteve sua mineralização.

A análise por HPLC permitiu a verificação de aproximadamente 10 produtos de degradação da cafeína. Baseado em comparações com artigos científicos, considerando os parâmetros cromatográficos, inferiu-se a ordem de eluição: xantina, monometilxantina, teobromina, ácido 1,7-dimetilúrico, paraxantina, teofilina, ácido 1,3,7-trimetilúrico e posteriormente a cafeína. Foi evidenciada a reação de N-desmetilação por mecanismo oxidativo com a formação de teobromina com cerca de 1 % de rendimento a partir da cafeína, inferindo-se também a formação de paraxantina e teofilina, corroborado por verificação do íon molecular de massa/carga 181, referente às dimetilxantinas (teobromina, paraxantina e teofilina) na avaliação da amostra por espectrometria de massas.

Foram propostos os mecanismos de reação de N-desmetilação e C-hidroxilação, via radical HO[·], com razão molar cafeína/ HO[·] de 1:2, ou mediada por H₂O₂ com razão molar cafeína/ H₂O₂ de 1:1.

REFERÊNCIAS

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: A well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 407–413, 2001.

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841–856, 2008.

BAGGOTT, M. J. et al. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 228, n. 1, p. 109–118, 2013.

BARREIRO, E. J.; KUMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M. The methylation effect in medicinal chemistry. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5215–5246, 2011.

CORNELIS, M. C. et al. Genome-wide association study of caffeine metabolites provides new insights to caffeine metabolism and dietary caffeine-consumption behavior. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 24, p. 5472–5482, 2016.

GUERREIRO, S. et al. Paraxanthine, the primary metabolite of caffeine, provides protection against dopaminergic cell death via stimulation of ryanodine receptor channels. **Molecular Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 980–989, 2008.

KOLAHDOUZAN, M.; HAMADEH, M. J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 23, n. 4, p. 272–290, 2017.

MARTÍNEZ-PINILLA, E.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; FRANCO, R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. February, p. 1–5, 2015.

MONTEIRO, J. et al. Pharmacological potential of methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2597–2625, 2019.

MONTEIRO, J. P. et al. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. **Molecules**, v. 21, n. 8, 2016.

POBUDKOWSKA, A.; DOMAŃSKA, U.; KRYSKA, J. A. The physicochemical properties and solubility of pharmaceuticals - Methyl xanthines. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 79, p. 41–48, 2014.

Pubchem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

Scientific Instrument Services. Disponível em: <<https://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>>. Acesso em: 26 ago. 2021.

**CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS NA
DETERMINAÇÃO DA CAFEÍNA E DA TEOBROMINA**

RESUMO

A cafeína e a teobromina diferem estruturalmente apenas por um grupo metil, sendo uma característica que restringe os métodos de análise quando em mistura. Este estudo envolveu a avaliação dos métodos analíticos de espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e do infravermelho (IR), a cromatografia em papel e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para as análises qualitativas e quantitativas da cafeína e da teobromina, com vistas a obtenção de um método analítico que permita monitoramento de reações de degradação da cafeína. A análise por cromatografia em papel mostrou-se inadequada, devido às baixas solubilidade da teobromina e afinidade com a fase estacionária, além de utilizar solventes tóxicos. A espectroscopia no UV não distingue as moléculas da cafeína e teobromina, por apresentarem espectro de absorção similar, mesmo variando o pH. A técnica FTIR-ATR, permite medidas diretas das amostras e apresentou regiões do espectro de IR distintos para os analitos no estado sólido, possibilitando sua diferenciação. Com a utilização do tratamento de deconvolução e análise de componentes principais foi possível distinguir as bandas, propiciando a semiquantificação por regressão linear ou calibração multivariada para amostras sólidas. No entanto, a técnica de FTIR não apresentou bons resultados para amostras em solução. Um método de HPLC foi desenvolvido para a análise da cafeína, teobromina e seus produtos de degradação. As condições otimizadas são mistura de água e acetonitrila (9:1) como fase móvel, fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C18 150 x 4,6 mm e $5 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula, detecção em 272 nm, com uso de detector de arranjo de diodos (DAD), tempo de corrida de 14 minutos. O método apresentou-se linear na faixa de $1,03 \times 10^{-5}$ a $5,15 \times 10^{-5}$ mM para a cafeína e $5,83 \times 10^{-6}$ a $2,92 \times 10^{-5}$ mM para a teobromina, com coeficientes de determinação (R^2) de 0,9996 e 0,9998, respectivamente. Uma adaptação foi realizada, empregando outro sistema cromatográfico com coluna de outra dimensão (250 x 4,6 mm) que apresentou coeficientes de determinação (R^2) de 0,9998 para a cafeína e 0,9994 para a teobromina em 20 minutos de corrida. O método HPLC possibilita a coleta de frações pós-coluna, para a posterior análise de identificação dos produtos de degradação, por outras técnicas analíticas.

Palavras-chave: FTIR-ATR. Quantificação e Deconvolução de bandas. Produtos de degradação da cafeína e teobromina.

ABSTRACT

Caffeine and theobromine differ structurally only by a methyl group, being a characteristic that restricts the methods of their analysis in mixture. This study involved the evaluation of analytical methods in the ultraviolet and visible (UV-Vis) and infrared (FTIR-ATR) regions, paper chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of caffeine and theobromine, in order to obtain an adequate analytical method that allows the monitoring of caffeine degradation reactions. The analysis by paper chromatography was inadequate, due to the low solubility of theobromine and little affinity with the stationary phase, in addition to using toxic solvents. UV spectroscopy does not distinguish between the caffeine and theobromine molecules, as they have a similar absorption spectrum, even with varying pH. The FTIR-ATR technique, allows direct measurements of the samples, and presented different regions of the IR spectrum when analyzed in the solid state, allowing their differentiation. With the use of the deconvolution treatment and principal component analysis, it was possible to distinguish the bands, providing semiquantification by linear regression or multivariate calibration for solid samples. However, the FTIR technique did not show good results for samples in solution. An HPLC method was developed for the analysis of caffeine, theobromine and its degradation products. The optimized conditions are a mixture of water and acetonitrile (9: 1) as a mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min⁻¹, C18 column 150 x 4.6 mm and 5µm of particle size, detection at 272 nm using DAD, run time of 14 minutes. The method was linear in the range of 1.03 x 10⁻⁵ to 5.15 x 10⁻⁵ mM for caffeine and 5.83 x 10⁻⁶ to 2.92 x 10⁻⁵ mM for theobromine, with determination coefficients (R²) of 0.9996 and 0.9998, respectively. An adaptation was performed, using another chromatographic system with a column of another dimension (250 x 4.6 mm) with coefficients of determination (R²) of 0.9998 for caffeine and 0.9994 for theobromine in 20 minutes of running. The HPLC method also allows the collection of post-column fractions for further analysis of the identification of the degradation products, by other analytical techniques.

Keynotes: FTIR-ATR. Quantification and Deconvolution of bands. Degradation products of caffeine and theobromine.

1 INTRODUÇÃO

A cafeína e a teobromina são amplamente consumidas em alimentos ou medicamentos, apresentando grande importância biológica com efeitos fisiológicos como estado de alerta e melhoramento do humor. Ambas estão presentes nos grãos de café, em diferentes quantidades prevalecendo a cafeína cujo teor varia de 1% a 4%. Nas cascas do café, o teor de cafeína varia entre 0,6% a 1,2%. Diante da quantidade de cafeína disponível, e de várias possibilidades de utilização ou monitoramentos, há o interesse de métodos analíticos aplicados na sua determinação, mesmo na presença de teobromina, permitindo o monitoramento da reação de degradação da cafeína que pode gerar teobromina.

Existem várias técnicas instrumentais e métodos analíticos para a determinação das xantinas com diferentes vantagens e desvantagens, alguns dos principais avaliados nesse estudo. Buscam-se evidências de opções dos métodos considerando aspectos operacionais, custo, preparo de amostras, estrutura instrumental de apoio até o tipo de resultados gerados, seja qualitativo ou quantitativo, e a escala de detecção, de porcentagens a traços. Portanto, é desejável a obtenção de um método analítico adequado, com maior facilidade de operação e menor custo, além de evitar o uso de reagentes tóxicos.

A espectroscopia na região do UV-Vis utiliza a interação da radiação eletromagnética com a matéria que passa de um estado fundamental, de baixa energia, para um estado excitado, mais energético, com comprimento de onda e intensidade de radiação absorvida dependentes da estrutura do analito como duplas ligações conjugadas e aromaticidade. A espectroscopia no IR gera bandas de absorção características dos grupos funcionais das diferentes moléculas. Diferentemente dessas técnicas, a cromatografia proporciona a vantagem da separação dos analitos eliminando problemas de seletividade. A cromatografia em papel é empregada na distinção de analitos em mistura por comparação de suas distâncias percorridas durante a eluição, no entanto não promove a quantificação. Já a análise por HPLC é mais sofisticada, permitindo a separação dos analitos mais adequadamente, seja por compreender a utilização de mais parâmetros cromatográficos como a modificação da fase móvel ou fluxo, a alteração das características químicas da fase estacionária e da temperatura do forno, além dos detectores que monitoram a eluição dos analitos continuamente permitindo sua quantificação por comparação das áreas dos picos com padrões.

Este trabalho pretende avaliar a aplicação desses métodos analíticos na determinação da cafeína e da dimetilxantina teobromina em misturas preparadas em concentração conhecida, para a posterior aplicação em amostras reais. Busca-se estudar recursos de tratamento de dados

para auxiliar nos resultados da análise FTIR-ATR, com aplicação do procedimento de deconvolução de bandas, bem como a análise de componentes principais e a análise multivariada, nas regiões do IR com diferença espectral da cafeína e teobromina para a identificação e semiquantificação, sendo uma vantagem por propiciar o emprego de método de IR que possibilita leitura direta das amostras com resultados rápidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Métodos analíticos

Existem diversos métodos aplicados a análise de cafeína que diferenciam entre si desde procedimentos simples com equipamentos comuns como gravimetria, passando por técnicas de fácil execução e baixo custo envolvendo a interação da radiação com a matéria como espectroscopia na região do UV-Vis e espectroscopia de IR, até métodos que permitem separação de matriz complexa, excluindo moléculas interferentes para uma quantificação seletiva como HPLC, com a utilização de diferentes detectores como UV, DAD e ainda acoplar a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) que é uma ferramenta auxiliar na identificação dos analitos (MARIA; MOREIRA, 2007).

Os aspectos que influenciam a seleção de determinada técnica de análise dependem das propriedades físicas e químicas do analito de interesse, considerando a matriz em questão. Assim, deve-se realizar ampla abordagem dos componentes da amostra, incluindo as moléculas de interesse bem como os instrumentos analíticos disponíveis, avaliando a capacidade de resposta de cada técnica, o custo de materiais e o tempo dedicado na execução do ensaio.

2.1.1 Cromatografia em papel aplicada na determinação da cafeína e teobromina

A cromatografia em papel consiste na separação dos componentes de uma mistura sobre uma superfície, denominada fase estacionária (FE), em presença de um solvente ou mistura de solventes, denominada fase móvel (FM), adequadamente preparada de modo a interagir seletivamente com os analitos. A separação promovida é verificada visualmente por manchas ou por luz UV, e decorre de migração diferencial dos analitos que são arrastados pela FM ao longo da FE, dentro de um recipiente vedado, denominado cuba cromatográfica (BRASIL, 2010).

2.1.2 Espectroscopia na região do UV-Vis

O espectro eletromagnético é o arranjo ordenado das radiações conforme seus comprimentos de onda, sendo dividido em regiões. Quando um feixe de radiação atravessa um material ocorre a absorção de energia quantizada, que depende da estrutura atômica e molecular.

A radiação do espectro eletromagnético de ultravioleta (UV) compreende a faixa de comprimento de onda (λ) entre 180 a 380 nm, e a região do Visível (Vis) a faixa de 380 a 780

nm. A espectroscopia de absorção na região UV/Vis do espectro é decorrente de transições eletrônicas de um orbital molecular de baixa energia, no estado fundamental, para um orbital de maior energia ou estado excitado. As substâncias orgânicas absorvem energia UV-Vis nos grupos cromóforos que consistem de ligações duplas ou sistemas de ligações duplas conjugadas (D.SKOOG; S.CROUCH; D.WEST Y J. HOLLER, 2009).

O método se fundamenta na interação da radiação eletromagnética na região do UV com a matéria, acarretando as transições eletrônicas para orbitais de maior energia que gera os espectros de absorção. Esses espectros são utilizados na análise qualitativa e quantitativa, pela medida da quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda.

A determinação de concentrações dos analitos é realizada por comparação com soluções padrões ou conhecimento da absorvidade molar do analito isolado. Para realização da quantificação, tem-se a aplicação da lei de Lambert-Beer em que a concentração das moléculas absorventes e o caminho óptico influenciam na atenuação do feixe de luz, ou seja, a absorbância aumenta com a concentração do analito e com a largura do caminho óptico. A transmitância (T) é a fração da radiação incidente transmitida pela solução, e a absorbância (A) é referente a radiação absorvida pela solução, sendo relacionada com a forma logarítmica inversa da transmitância, e proporciona a análise quantitativa.

De acordo com Maria e Moreira (2007), o método espectrofotométrico apresenta precisão e exatidão para a análise de cafeína em 272 nm, além de ser rápido e apresentar um baixo custo.

A espectroscopia na região do UV é a técnica do método oficial de análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz para a determinação de cafeína realizada a 276 nm, após extração da cafeína com clorofórmio e utilizando clorofórmio como branco (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

2.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho médio

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho abrange a região de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} , ou 780 a 100000 nm de comprimento de onda. Em termos de aplicação e instrumentação, é dividida nas faixas da radiação no infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*), médio (MIR, do inglês *midlle infrared*) e distante (FIR, do inglês *far infrared*) correspondentes a 12800 a 4000 ; 4000 a 200 e 200 a 10 cm^{-1} , respectivamente (PAVIA et al., 2015).

A faixa de interesse é do espectro de radiação médio, situado entre 4000 e 200 cm^{-1} , ou 2500 a 50000 nm em comprimento de onda, e menos energética do que a UV/Vis. Ao absorver

radiação infravermelha, ocorre transições nos estados vibracionais da molécula com variação do momento dipolo e vibrações entre suas ligações seja de estiramento (ν) ou deformação angular (δ) tanto simétrico como assimétrico. (D.SKOOG; S.CROUCH; D.WEST Y J. HOLLER, 2009). Essa interação da energia radiante com a matéria distingue os diferentes tipos de ligações permitindo a identificação de grupos funcionais químicos. Entretanto, alguns sinais espectrais são ambíguos e a presença de grupo funcional pode ser apenas sugerida.

O acessório de reflexão total atenuada (ATR do inglês, *Attenuated total reflectance*) permite a aplicação direta de amostras líquidas ou sólidas sobre um cristal para obtenção dos espectros de absorção IR tornando a análise rápida e simples. O cristal do ATR apresenta alto índice de refração conferindo a penetração do feixe de radiação na amostra (0,5 a 5,0 μm) que absorve a energia conforme sua estrutura química. Assim, a intensidade da radiação é atenuada devido as múltiplas reflexões ao longo do caminho da amostra e é gerado o espectro da superfície.

Muitos estudos científicos investigaram a aplicação da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR do inglês, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) para análise de cafeína e teobromina (TEWARI et al., 2012), incluindo a determinação da quantidade de cafeína em refrigerantes, utilizando a região de 3000 a 2800 cm^{-1} (PARADKAR; IRUDAYARAJ, 2002a); em extrato aquoso de grão de café verde (WELDEGEBREAL; REDDABSHIRO; CHANDRAVANSI, 2017); obtenção de informação de interações intermoleculares, solvatação utilizando modelagem e predição (BONDESSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2017); avaliação de interações das xantinas com DNA (JOHNSON et al., 2012) e investigações estruturais baseada em cálculos teóricos (SRIVASTAVA; SINGH, 2013; XIA et al., 2020).

2.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica versátil que permite a separação dos analitos que compõem a amostra, proporcionando sua posterior quantificação desde que se disponha de padrões químicos para a correta identificação dos picos eluídos e a comparação da área desses picos. Na cromatografia líquida de alta eficiência emprega-se uma fase estacionária (FE), sólida ou quimicamente ligada contida numa coluna cilíndrica, e uma fase móvel (FM) líquida que é impulsionada através da FE por bombeamento.

Fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica que dependem da interação entre o analito e as FE e FM. Resumidamente, as condições cromatográficas ideais como resolução entre os picos dependem das propriedades das

substâncias a serem separadas, da natureza e complexidade da matriz, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária, do volume de injeção das amostras e da temperatura de eluição (D.SKOOG; S.CROUCH; D.WEST Y J. HOLLER, 2009).

Existem numerosos tipos de detectores, sendo os mais utilizados e disponíveis nos laboratórios os detectores UV-Vis ou DAD (do inglês, *Diode Array Detector*), que permitem a verificação de toda faixa do espectro de UV e visível (200 a 800 nm) durante a corrida cromatográfica.

A técnica de HPLC é a mais reportada na determinação multianálise das xantinas, como cafeína e teobromina, entre os relatos científicos. O sistema mais utilizado é composto por FM polar e FE apolar, denominado cromatografia em fase reversa (RP, do inglês *reverse phase*). Na avaliação de xantinas, especialmente cafeína e teobromina, os métodos utilizam FM polar, constituída por misturas de água e metanol ou acetonitrila em diferentes proporções, e FE apolar comumente C18, com detecção por UV ou DAD (DE LUCA et al., 2018; HACKETT; TELEPCHAK; COYER, 2008; JEON et al., 2017; PERRONE; DONANGELO; FARAH, 2008; RUSSO et al., 2018). Schenkel e colaboradores (2007), a usar as condições condições cromatográficas de FM água/metanol (6:4), com fluxo de 1,1 mL.min⁻¹, coluna cromatográfica C18 250 x 4,6 mm e detecção em 280 nm, obteve os picos cromatográficos da teobromina em 4,8 minutos e da cafeína em 9,4 minutos.

Também existem métodos analíticos oficiais de análise, descritos em compêndios, aplicados na determinação de cafeína e teobromina de alimentos cujas condições cromatográficas são coluna C18 100 x 8 mm , 5 µm de tamanho de partícula, detecção a 280 nm, FM água/ácido acético e metanol (79:1:20) com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, temperatura do forno a 35 °C e 20 µL de volume de injeção (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

2.2 Quimiometria

Nas determinações químicas instrumentais são gerados muitos dados, compreendendo grande número de variáveis, como os números de onda em uma análise FTIR. Assim tem-se recursos matemáticos, estatísticos e computacionais de tratamento de dados para facilitar a interpretação e uso dessas informações.

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) consiste na manipulação dos dados de amostras e suas variáveis, que compõe uma matriz, com obtenção de um menor número de fatores permitindo representar as amostras em poucas

dimensões. De forma mais abrangente, a análise PCA promove a redução de dados, a modelagem, a seleção de variáveis, a classificação e a predição (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

A calibração multivariada consiste na construção de um modelo matemático capaz de prever uma resposta a partir de diversas variáveis via uma função de transferência. Visando obter as variáveis relevantes e evitar interferências tem-se os métodos de regressão por componentes principais (PCR, do inglês *Principal Component Regression*) e por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Square*) capazes de lidar com ruídos experimentais, colinearidade e não linearidades.

O método PCR utiliza os dados das respostas instrumentais (X) e não considera as informações provenientes das concentrações (y). Já o método PLS utiliza as informações das concentrações para a obtenção dos fatores, denominados variáveis latentes. A variável latente descreve a direção de máxima variância correlacionada com a concentração. A regressão PLS é um método de estimar parâmetros de modelagem, com grande utilização na química por permitir a análise de dados com alta correlação, ruídos, grandes quantidade de variáveis e modelos de resposta (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Ambos métodos são eficientes e pequenas variações dependem do caso específico.

Após a construção de um modelo de calibração, o mesmo deve ser validado para testar sua capacidade na previsão de concentrações de amostras, para então ser aplicado. A validação cruzada é um método para escolha de componentes principais baseado na avaliação da magnitude dos erros de previsão (FERREIRA et al., 1999).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Ácido acético glacial P.A, ácido clorídrico P.A, hidróxido de potássio P.A, etanol 95% P.A, amônio P.A, acetona P.A, clorofórmio P.A, 1-butanol P.A, iodo P.A, diclorometano P.A, água tipo I, acetonitrila (grau HPLC), metanol (grau HPLC). Cafeína e teobromina (Sigma-Aldrich) com pureza superior a 98%.

3.2 Equipamentos

Estufa de secagem (Quimis), reator com sistema fechado e temperatura programável (Parr), balança analítica (Shimadzu), mini centrífuga (Kasvi), agitador magnético com aquecimento (IKA), pHmetro (Imolab), espectrofotômetro UV/Vis (PG Instruments) e (Espectro Vision), infravermelho (Varian) com acessório ATR GladiATR, pipeta automática, membrana filtrante 0,45 µm (Millex), microseringa 25 µL (Hamilton), sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Jasco) constituído por degaseificador, bomba quaternária PU 2089 Plus, detector UV 2075 Plus, coluna cromatográfica (Varian e Kromasil) C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm), sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, série 20) constituído por degaseificador DGU-20, bomba quaternária LC-20AT, auto-amostrador SIL-20A, módulo de comunicação CBM-20A, detector DAD SPD-M20A, forno de coluna CTO-20AC, coluna cromatográfica (Supelco) C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm).

3.3 Cromatografia em papel

Por ser uma técnica simples e de fácil execução, foi avaliado um sistema cromatográfico originalmente utilizado para substâncias relacionadas do método de matéria-prima da cafeína adaptado (ANVISA, 2010). A fase móvel consistiu de mistura de amônia, acetona, clorofórmio e 1-butanol (10:30:30:40); como diluente utilizou mistura de metanol e clorofórmio (4:6) e a fase estacionária foi um recorte retangular de papel de filtro.

O preparo da amostra consistiu na pesagem individual de 20 mg de cafeína e 20 mg de teobromina, transferidas para balões volumétricos de 10 mL solubilizadas com o diluente acima. Cerca de 3 gotículas de cada solução foi aplicada na base do papel de filtro que foi

inserido na cuba contendo a FM para eluição. Após remoção do papel de filtro, foi seco ao ar e revelado em atmosfera de iodo como ilustrado na Figura 1 do Apêndice 1.

Alternativamente, outra condição foi avaliada: mistura de diclorometano e metanol (95:5) como fase móvel e diclorometano como diluente adaptado de González-Calderón e colaboradores (2015). Também utilizou-se outros solventes para realizar a solubilização da teobromina como mistura acetona, clorofórmio e metanol (1:1:1).

Uma bateria de testes de solubilidade da teobromina foi realizada empregando 1 mL dos solventes listados na Tabela 1 do Apêndice 1, em tubos de ensaio providos de tampas, contendo cerca de 10 mg de teobromina.

3.4 Espectroscopia na região do UV-Vis

O preparo das amostras envolveu a pesagem de cafeína e teobromina, com diluições e ajuste de pH (1,8 ; 7,1 e 10,6) para obtenção de soluções a 0,1 mM nos meios ácido, neutro e alcalino. A concentração de trabalho foi definida pela absorção das soluções diluídas, de modo a visualizar todas as bandas de absorção das moléculas, mantendo a banda principal de 272 nm próximo a 1,0 de absorção. Para ajuste de pH em valores ácido e alcalino foram utilizadas as soluções de HCl 1 M e KOH 1 M, respectivamente.

A varredura espectral das amostras foi realizada entre 200 a 400 nm em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, utilizando água para as leituras em branco. O máximo de absorção da cafeína em solução aquosa foi no comprimento de onda 272 nm.

3.5 Espectroscopia na região do IR

A avaliação dos espectros de IR da cafeína e teobromina foi realizada por ser uma técnica simples, rápida e acessível. Um estudo para avaliar a diferenciação desses espectros foi realizado com a finalidade de distinguir e quantificar essas substâncias pela técnica FTIR-ATR.

O espectrofotômetro (Varian) com acessório ATR (PIKE GladiATR), controlado pelo software “Resolutions Pro”, foi configurado para realizar a varredura na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , em 16 scans.

O “background” foi realizado com o prisma do cristal de diamante vazio. As amostras sólidas foram dispersas no cristal do ATR e a braçadeira pressionada, visando aumentar a superfície de contato.

No âmbito das análises de IR utilizou-se o estado sólido com as amostras de cafeína e teobromina isoladamente, bem como a mistura de ambas em quantidade conhecida, contemplando 7 faixas de proporção: cafeína/teobromina (1:9), cafeína/teobromina (1:4), cafeína/teobromina (1:1), cafeína/teobromina (2:2) cafeína/teobromina (4:1), cafeína/teobromina (5:1) e cafeína/teobromina (9:1), conforme Tabela 1. Também foram utilizadas amostras de solução aquosa e metanólica.

Tabela 1 - Preparo das amostras para avaliação da semiquantificação por FTIR-ATR.

Amostra	Cafeína		Teobromina		Concentração (mol %)	
	Massa (mg)	mol	Massa (mg)	mol	Cafeína	Teobromina
CT 1:9	10,9	0,0561	89,9	0,4990	10,11	89,89
CT 1:4	9,8	0,0505	39,6	0,2209	18,60	81,40
CT 1:1	50,0	0,2575	49,8	0,2764	48,23	51,77
CT 2:2	19,8	0,1020	19,7	0,1093	48,25	51,75
CT 4:1	40,3	0,2075	10,4	0,0577	78,24	21,76
CT 5:1	49,7	0,2559	9,9	0,0550	82,32	17,68
CT 9:1	90,3	0,4650	10,0	0,0555	89,34	10,66

Fonte: Do autor (2021).

Os dados das amostras e respectivos espectros foram registrados e, posteriormente, tratados com auxílio de planilha do “Excel”, para utilização de cálculos de regressão linear e geração de gráficos com verificação dos coeficientes de determinação. Também utilizou-se os software “Origin”, para deconvolução de bandas, e “Chemoface”, para realizar abordagem da quimiometria nos dados brutos dos espectros.

3.5.1 Deconvolução de bandas

Os dados dos espectros de IR obtidos em absorbância foram tratados no software “Origin Pro 2018” para a identificação e separação das bandas nas três regiões em estudo: fingerprint, ligações duplas e atribuições de ν N-H e ν C-H. Os parâmetros compreenderam: i. seleção da faixa espectral; ii. definição da linha base por seleção de pontos entre as bandas; iii. ajuste de bandas com a eliminação de bandas pequenas e a identificação dos máximos de absorção na tentativa de obter o melhor ajuste.

A partir da deconvolução das bandas, são gerados seus respectivos dados de número de onda (cm^{-1}), altura e área.

3.5.2 Análise de componentes principais

A análise de PCA foi empregada visando identificar as principais bandas dos espectros na região do infravermelho que proporcionam a diferenciação da cafeína e da teobromina. Posteriormente, foram obtidas as áreas e altura das bandas principais permitindo sua comparação.

Os dados de sete amostras conhecidas contendo diferentes proporções de mol de cafeína e teobromina foram plotados utilizando o software “Chemoface”, compreendendo as leituras em cm^{-1} como variáveis. Foram avaliados diferentes pré-tratamentos como autoescala, centrado na média, normalização e correção da linha base (MSC, do inglês *multiplicative scatter correction*).

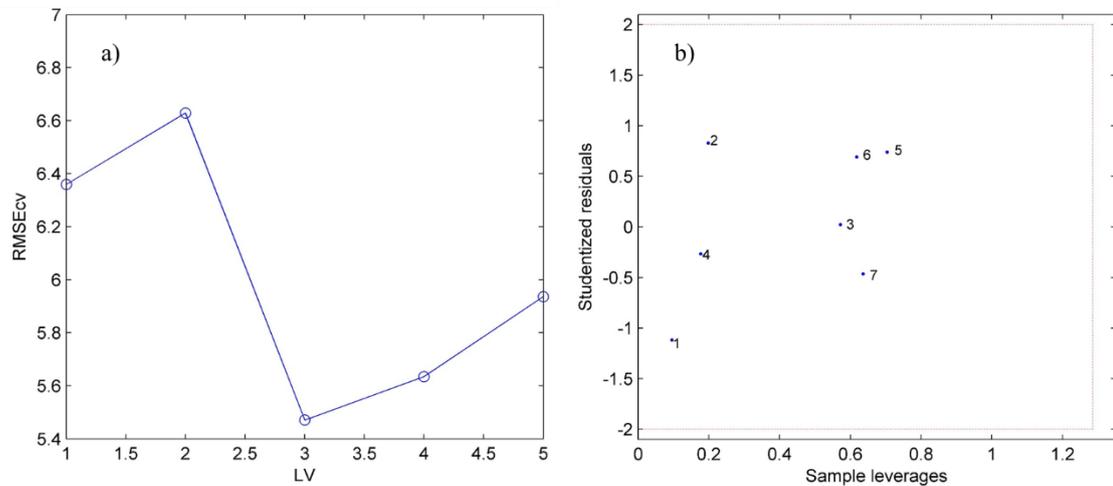
3.5.3 Modelo de calibração multivariada

A calibração multivariada foi realizada com auxílio do software “Chemoface” (NUNES et al., 2012). Para a construção do modelo de calibração variada foram avaliados os métodos PCR e PLS comparando seus resultados, abrangendo três variações de dados: i. matriz descritores sem préprocessamento; ii. matriz de descritores com dados transformados por normalização; iii. somente descritores mais relevantes com a seleção das regiões correspondentes a ligações duplas e fingerprint do espectro de IR.

O método de PLS apresentou melhores valores sendo selecionado. O algoritmo de cálculo de PLS centra os dados na média. A escolha do número de variáveis latentes foi realizada por análise do gráfico de validação cruzada que estabelece relação entre o erro e o número de variáveis Figura 1.a.

Foi avaliado a presença de amostras anômalas utilizando o valor 2,0 como limite para Resíduo de Student. Como nenhuma amostra apresentou valor de resíduo superior a 2,0, inferese que o modelo ajustou-se adequadamente para as amostras Figura 1.b.

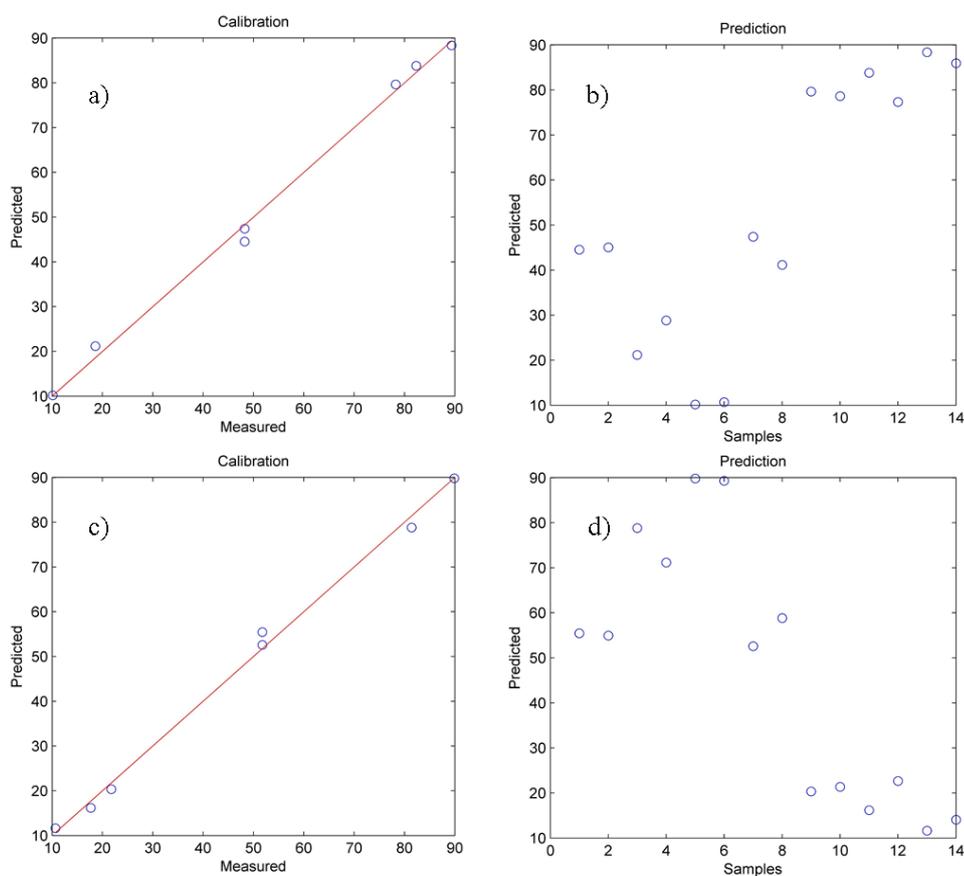
Figura 1 - Gráficos de validação cruzada (a) e detecção de amostras anômalas (b).



Fonte: Do autor (2021).

A qualidade dos modelos foi avaliada por parâmetros estatísticos de calibração R^2 (coeficiente de correlação) e do erro do modelo (RMSEC, do inglês *root mean square error of calibration*). Posteriormente, o modelo foi validado utilizando randomização Y (R^2 y-rand) e RSME (y-rand). Os parâmetros de desempenho do modelo PLS são apresentados na Figura 2 e Tabela 2.

Figura 2 – Plotagem dos valores esperados e preditos na calibração e validação do modelo para cafeína (a, b) e teobromina (c, d).



Fonte: Do autor (2021).

Tabela 2 - Parâmetros de desempenho do modelo PLS.

Parâmetros	Cafeína (mol %)	Teobromina (mol %)
RMSEc	1,9306	1,9306
R^2_{cal}	0,9956	0,9956
RMSE y-rand	10,8867	10,8867
R^2_{y-rand}	0,8466	0,8466
cR^2_p (y-rand)	0,3851	0,3851
RMSEcv	5,4708	5,4708
R^2_{cv}	0,9658	0,9658

Fonte: Do autor (2021).

Na etapa de validação externa, para a verificação da predição em novas amostras, utilizou-se as anteriores prensadas diferentemente sobre o cristal do ATR, com a obtenção de 2 leituras para cada amostra e um total de 14 conjuntos de dados: cafeína/teobromina (1:9),

cafeína/teobromina (1:4), cafeína/teobromina (1:1), cafeína/teobromina (2:2) cafeína/teobromina (4:1), cafeína/teobromina (5:1) e cafeína/teobromina (9:1).

3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência

O preparo das soluções padrões de cafeína e teobromina envolveu a pesagem de 20,02 de cafeína e 10,72 mg de teobromina para produção de 100 mL da solução estoque, que foi diluída conforme Tabela 3, para diferentes balões volumétricos de 5,0 mL, e construção da curva de calibração.

Tabela 3 - Construção da curva de calibração da cafeína e teobromina, expressos em concentração molar e g.L^{-1} .

Vol. pipetado (μL)	Cafeína (M)	Cafeína (g.L^{-1})	Teobromina (M)	Teobromina (g.L^{-1})
50	$1,03 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-3}$	$5,83 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-3}$
100	$2,06 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-5}$	$2,10 \times 10^{-3}$
150	$3,09 \times 10^{-5}$	$6,00 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-5}$	$31,5 \times 10^{-3}$
200	$4,12 \times 10^{-5}$	$8,00 \times 10^{-3}$	$2,33 \times 10^{-5}$	$4,20 \times 10^{-3}$
250	$5,15 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-2}$	$2,92 \times 10^{-5}$	$5,26 \times 10^{-3}$

Fonte: Do autor (2021).

Para garantir a aplicação da técnica HPLC às amostras com os materiais disponíveis no laboratório, fez-se necessário uma avaliação preliminar das condições cromatográficas para as necessidade do projeto. Assim, com base nas condições cromatográficas citadas nas referências, realizou-se testes preliminares utilizando os padrões de cafeína e teobromina, e amostras submetidas a diferentes condições reacionais, de modo a garantir uma separação adequada com picos bem resolvidos e simétricos.

O método analítico de HPLC empregou coluna cromatográfica C18 de 150 x 4,6 mm e 5 μm de tamanho de partícula, em diferentes proporções de metanol ou acetonitrila em água para a FM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da cromatografia em papel

Alguns ensaios utilizando cromatografia em papel foram realizados para avaliação de sua aplicação na indicação de cafeína e teobromina, nas amostras e no monitoramento reacional pretendido.

A avaliação da técnica de cromatografia em papel utilizando atmosfera de iodo como sistema de revelação, foi realizada por ser rápida, capaz de revelar compostos insaturados em poucos segundos e com materiais disponíveis no laboratório.

Não foi verificada mancha de eluição da teobromina, sendo concluído que não houve interação suficiente com o papel de filtro. Outra observação foi a presença de precipitados da teobromina no balão volumétrico com o diluente utilizado (metanol/clorofórmio 4:6) confirmando sua baixa solubilidade.

Assim foi realizado teste de solubilidade da teobromina, avaliando solventes com diferentes propriedades de modo a abranger várias polaridades. No entanto nenhum solvente apresentou solubilização satisfatória da teobromina. Esses dados estão em concordância com os resultados apresentados por Pobudkowska e colaboradores (2014) que constataram a solubilidade muito baixa da teobromina nos solventes água, etanol e 1-octanol, nas temperaturas entre 17 e 15 °C, sendo detectada apenas por espectrofotometria.

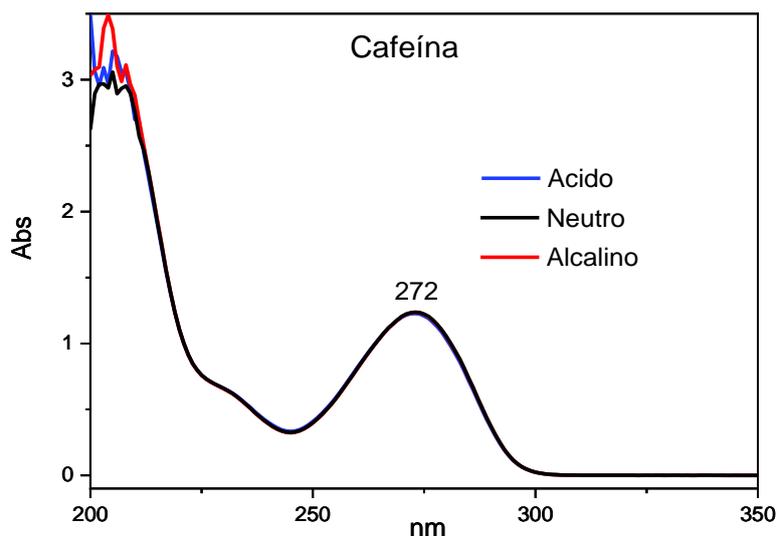
Outros autores determinaram a solubilidade da teobromina e cafeína em água, metanol, etanol, 1-propanol, acetato de etila e acetona por HPLC, observando a ordem de solubilidade para teobromina: metanol > 1-propanol ≥ etanol > acetona > acetato de etila; e que a solubilidade aumenta com a temperatura (17 a 55 °C). Foi determinado que a solubilidade da teobromina é muito inferior a da cafeína, em cerca de 100 vezes (ZHONG et al., 2017).

4.2 Avaliação da espectroscopia na região do UV-Vis

Os analitos cafeína e teobromina foram estudados utilizando a técnica de espectroscopia no UV-Vis com o intuito de avaliar a possibilidade de aplicação no monitoramento reacional, bem como entender o comportamento espectral dos analitos em diferentes valores de pH. Assim foi realizada a varredura espectral da cafeína e teobromina para verificar possíveis bandas de absorções diferentes entre ambas que poderiam ser utilizadas para a quantificação seletiva.

As Figura 3 e Figura 4 ilustram os espectros da cafeína e teobromina, na concentração de 0,1mM preparados em diferentes valores de pH abrangendo os meios ácido, neutro e alcalino.

Figura 3 - Espectro na região do UV da cafeína em pH 1,8 ; 7,1 e 10,6.

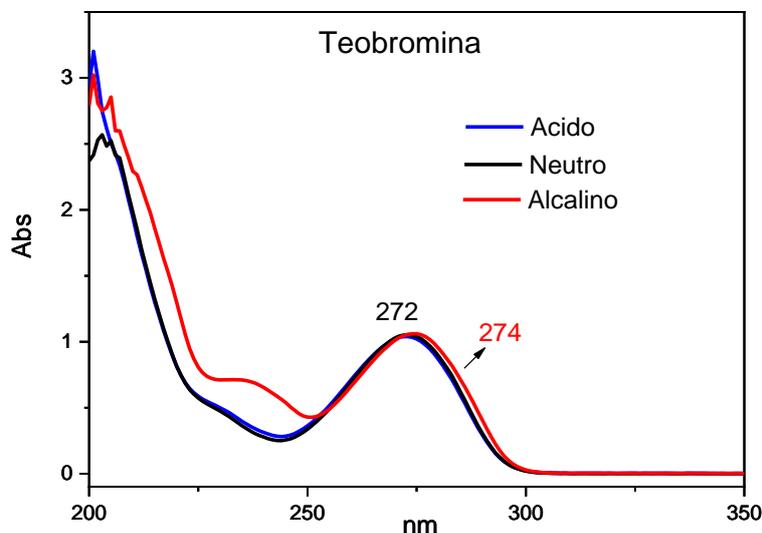


Fonte: Do autor (2021).

Por comparação dos espectros nos diferentes valores de pH, a cafeína não apresenta modificação de seu espectro, mantendo seu máximo de absorção em 272 nm independente do pH do meio. Esse comportamento já era esperado pois a molécula da cafeína não se ioniza por apresentar todos os nitrogênios amídicos metilados.

As bandas observadas em aproximadamente 205, 235 e 272 nm podem ser atribuídas a transições eletrônicas dos orbitais preenchidos para níveis desocupados como " $n \rightarrow \sigma^*$ ", " $\pi \rightarrow \pi^*$ " e " $n \rightarrow \pi^*$ " (PAVIA et al., 2015).

Figura 4 - Espectro na região do UV da teobromina em pH 1,1; 7,4 e 10,9.

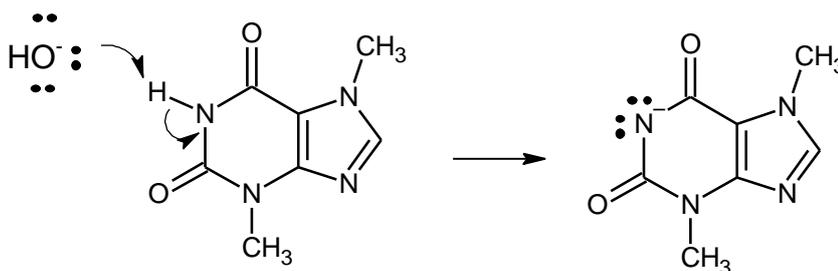


Fonte: Do autor (2021).

De acordo com os espectros obtidos na região do UV de cafeína e teobromina na faixa de pH do ácido a alcalino, constata-se a similaridade dos espectros em toda a faixa do UV, com máximos de absorção em aproximadamente 272 nm.

A teobromina apresentou alteração do espectro UV em relação ao pH, com deslocamento batocrômico (274 nm) quando avaliada em meio alcalino, com menor valor de energia. Esse comportamento se deve a presença de H ionizável (N-H) no grupamento imida, que em meio alcalino libera o próton H^+ permanecendo N^- com 4 elétrons livres, alterando a conjugação dos elétrons π e deslocalização mais eficiente, favorecendo as transições eletrônicas “ $n \rightarrow \pi^*$ ” ou “ $n \rightarrow \sigma^*$ ”, em menor energia e por isso o deslocamento do máximo de absorção para maiores comprimentos de onda. A Figura 5 ilustra a ionização da teobromina.

Figura 5 - Representação da reação de ionização da teobromina em meio alcalino.

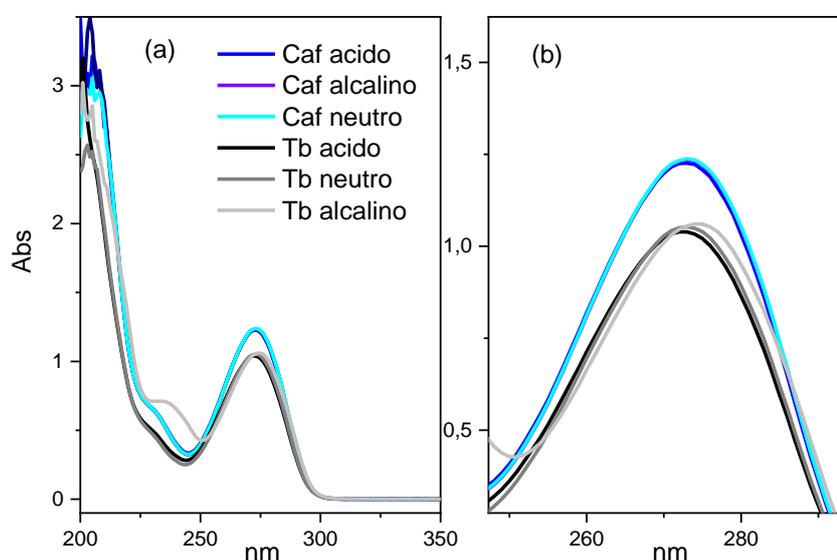


Fonte: Do autor (2021).

Como observado, a teobromina atua como um ácido liberando o próton H^+ quando em meio alcalino. O valor de pka da teobromina determinado foi de 10,35 em 17 °C, e 9,85 em 37 °C (POBUDKOWSKA; DOMAŃSKA; KRYSKA, 2014).

A partir de soluções de mesma concentração, compararam-se os espectros de UV da cafeína e teobromina, de modo a verificar aspectos de intensidade. A Figura 6 ilustra os espectros de cafeína e teobromina nas 3 faixas de pH.

Figura 6 - Comparação dos espectros de UV da cafeína e teobromina nos diferentes valores de pH.



Fonte: Do autor (2021).

Verifica-se que, independentemente do pH, as amostras de cafeína apresentam maior absorção da radiação UV do que as de teobromina, na mesma concentração de 0,1mM. Na cafeína, ocorre efeito doador de densidade eletrônica do grupo metila, que poderiam aumentar o nível de energia do par de elétrons livre do N, favorecendo a conjugação com a carbonila, culminando no aumento da intensidade em relação a teobromina que é menos metilada.

4.3 Avaliação dos espectros na região do IR

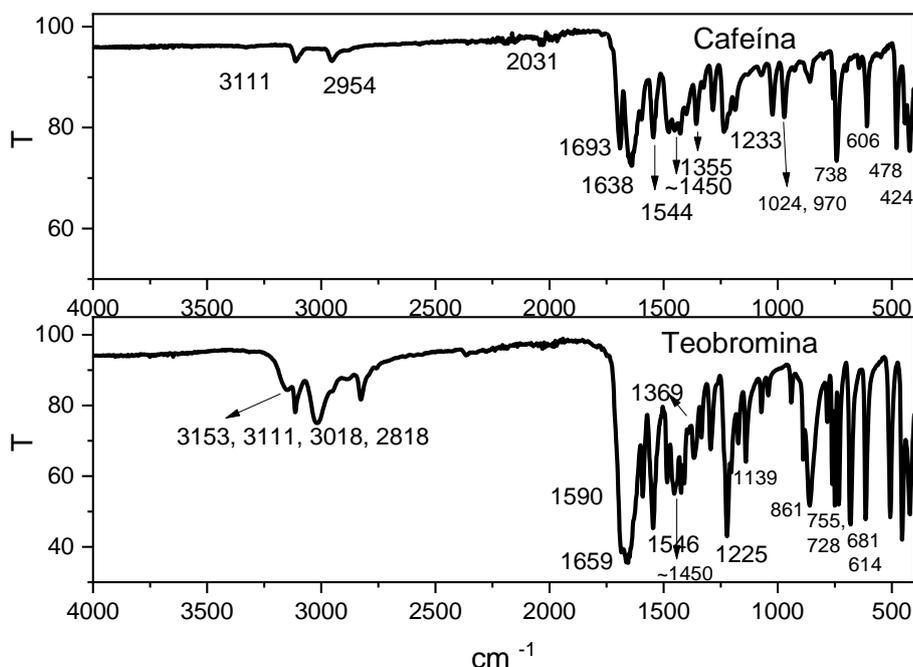
As pesquisas bibliográficas relatam que há diferença nos espectros de IR da cafeína e teobromina (GUNASEKARAN; SANKARI; PONNUSAMY, 2005; JOHNSON et al., 2012). Por se tratarem de moléculas muito semelhantes é esperado que seus espectros apresentem muitas bandas em comum, mas com algumas distinções evidenciadas pela peculiaridade de

cada analito como: região da impressão digital das moléculas ('fingerprint'); região de ligações duplas, destacando bandas em aproximadamente 1700 cm^{-1} de atribuição $\nu\text{C}=\text{O}$ carbonílico; região de N-H e C-H, que evidencia a ausência de um grupo metila na molécula da teobromina, com presença de banda $\nu\text{N-H}$ de amida (função imida) na região de 3400 a 3200 cm^{-1} (BILKAN, 2017; UCUN; SAĞLAM; GÜÇLÜ, 2007).

Ambos analitos apresentam dois anéis heterocíclicos aromáticos, sendo um anel pirimidínico de seis membros e outro anel imidazólico de cinco membros. Assim as atribuições de frequência vibracional são semelhantes a pirimidina e imidazol, além do benzeno e piridina (GUNASEKARAN; SANKARI; PONNUSAMY, 2005).

A abordagem inicial da aplicação da técnica FTIR-ATR foram para amostras no estado sólido. Experimentalmente, os espectros de IR da cafeína e teobromina foram avaliados de modo a identificar as bandas que os diferenciam, visando a distinção desses componentes bem como propor sua quantificação. Assim os espectros em transmitância foram plotados, com a indicação do maior número de bandas verificadas, visando um amplo estudo de cada banda. A Figura 7 apresenta os espectros de IR de amostras em estado sólido cujas atribuições são detalhadas na Tabela 4.

Figura 7 - Representação dos espectros de IR da cafeína e teobromina obtido dos sólidos.



Fonte: Do autor (2021).

É possível verificar a maior intensidade de absorção da radiação no espectro IR da teobromina, devido a maior polaridade de suas ligações em relação à cafeína.

Tabela 4 - Atribuições para as bandas de absorção no espectro de IR de cafeína e teobromina observadas na experimento em comparação com dados da literatura.

ANALITO	EXPERIMENTO		(PARADKAR; IRUDAYARAJ, 2002b; UCUN; SAĞLAM; GÜÇLÜ, 2007)		
	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	
Cafeína	3111	vC _{sp2} -H	2954	vC _{sp3} -H	
	2954	vC _{sp3} -H	2922 e 2850	vC _{sp3} -H	
	1693	vC=O amida 3 ^a	1700	vC=O	
	1638	vC=O + vC=N	1660	vC=O + vC=C + vC=N	
	1544 e 1450	vC=C aromático	1596	vC=N	
	1355 e 1233	vC-N aril-alquil- amina	1419	vC=C + vC=N	
	-	-	1237	δ (CH)	
	1024	vC-N (CH ₃)alquil- amina	1025	δ (CH ₃) + δ(CH) balanço	
	Teobromina	3153	vN-H amida 2 ^a	3114	vN-H
		3111, 3018	vC _{sp2} -H	3027	vC-H
2818		vC _{sp3} -H	-	-	
1659		vC=O amida 2 ^a + δN-H	1691	vC=O	
1590		vC=N	1592	vC=C + δN-H	
1546 e 1450		vC=C aromático	1548	vC=C aneis + δN-H	
1369 e 1225		vC-N aril-alquil- amina	1334	δCH ₃ + δNH + δCH	
1139		vC-N (CH ₃)alquil- amina	1041	δ (CH ₃) + δ(CH) balanço	

Nota: Algumas atribuições são diferentes em outras referências bibliográficas.

Fonte: Do autor (2021).

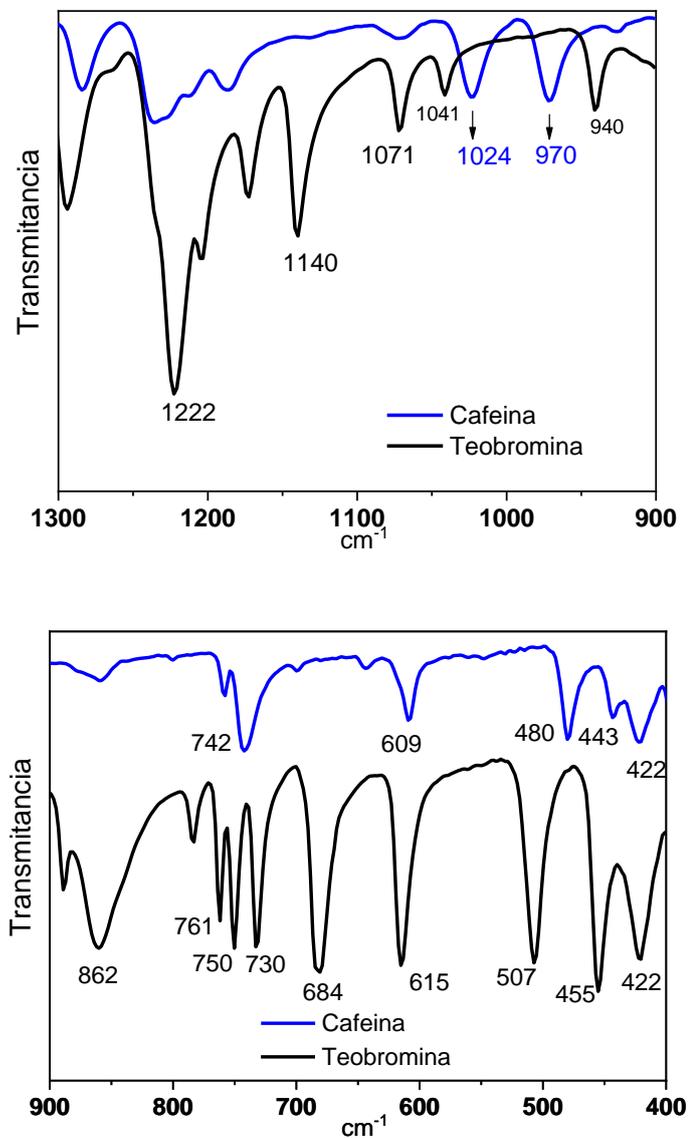
A identificação de vC-N de cadeia lateral ou de aromático é mais difícil. Por cálculos teóricos, a vibração C-N no anel imidazólico ocorre em maior frequência do que no anel pirimidínico. Assim as vibrações das bandas de cafeína observadas em aproximadamente 1326, 1285 e 1237 cm⁻¹ são atribuídas a vC-N de anel imidazólico e em 1210, 1130 e 1071 cm⁻¹ atribuídas a vC-N de anel pirimidínico. Considerando a teobromina, as bandas em 1334, 1295 e 1224 cm⁻¹ são atribuídas a vC-N de anel imidazólico e em 1173, 1140, 1072 e 1041 cm⁻¹ atribuídas a vC-N de anel pirimidínico (GUNASEKARAN; SANKARI; PONNUSAMY, 2005).

Os dados espectrais e suas atribuições são detalhados a seguir conforme a região do espectro IR: fingerprint, ligações duplas e atribuições de $\nu\text{N-H}$ e $\nu\text{C-H}$.

4.3.1 Região da impressão digital (Fingerprint)

Considerando a importância dos dados espectrais contidos nessa região e a abundância de bandas nas amostras, foram traçados os espectros de IR para cafeína e teobromina subdivididos em duas faixas, em transmitância, como ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Espectros de IR na região de “fingerprint” da cafeína e teobromina.



Fonte: Do autor (2021).

De acordo com a avaliação dos espectros obtidos na região do “fingerprint”, verifica-se presença ou ausência de bandas de absorção que permitem a diferenciação entre as duas substâncias.

Considerando o espectro obtido na região do “fingerprint” entre 1300-900 cm^{-1} , observa-se diferentes bandas de absorção que possibilitam a distinção entre cafeína e teobromina, como a verificação das bandas em 1024 e 970 cm^{-1} exclusivas para a cafeína; e as bandas 1041 e 940 cm^{-1} exclusivas da teobromina. Essas observações estão em conformidade com os dados relatados de 1025 e 973 cm^{-1} atribuídas a $\nu\text{N-CH}_3$ assimétrico na cafeína, e relatados em 1041 e 941 cm^{-1} na teobromina (GUNASEKARAN; SANKARI; PONNUSAMY, 2005).

Na região do “fingerprint” entre 900 a 400 cm^{-1} , observa-se presença da banda 480 cm^{-1} apenas para cafeína; e as bandas 684 e 507 cm^{-1} apenas para teobromina.

4.3.1.1 Deconvolução de bandas na região do “fingerprint”

Visando a melhor avaliação das bandas de absorção bem como a possibilidade de quantificação de cafeína e teobromina nas amostras, foi realizado o procedimento de deconvolução das bandas para obtenção das áreas e alturas relativas a cada banda presente no espectro da amostra. A deconvolução dos espectros de IR das amostras sólidas foi realizada com o software “Origin Pro 2018”, utilizando os dados em absorbância. A Tabela 5 detalha a distinção das bandas na região do fingerprint por deconvolução.

Tabela 5 - Detalhamento das bandas dos espectros de absorção por deconvolução.

Amostra	Bandas de deconvolução exclusivas (cm^{-1})
Cafeína	1022, 970, 480, 443
Teobromina	1200, 1137, 1040, 940, 888, 780, 750, 680, 507, 454

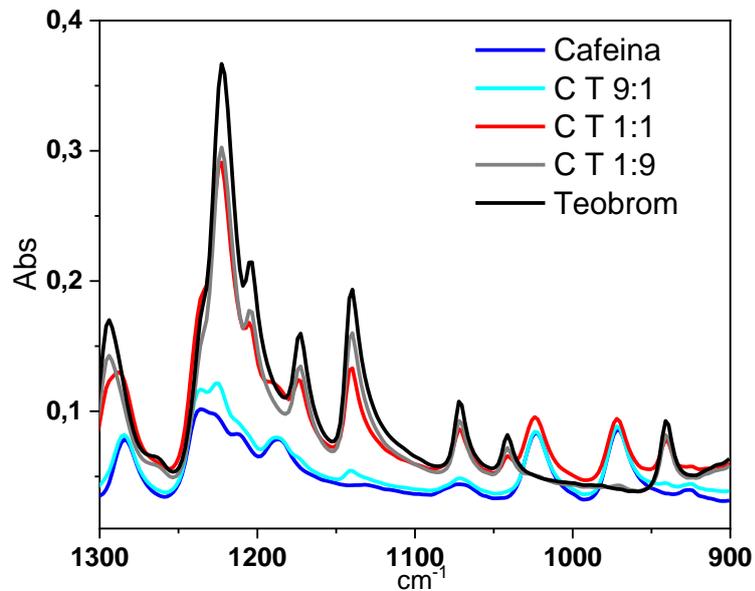
Fonte: Do autor (2021).

As bandas em cerca de 940 e 1040 cm^{-1} foram verificadas nas amostras de mistura de cafeína e teobromina nas proporções CT 1:1 e CT 1:9, entretanto não foram observadas em menor concentração da teobromina, como na amostra de CT 9:1.

Destaca-se a banda em 970 cm^{-1} cuja descrição de vibração é atribuída a deformação no plano do anel pirimidínico (balanço) CH_3 no carbono metilado que ocorre exclusivamente na cafeína (SRIVASTAVA; SINGH, 2013). Assim procedeu-se estudo espectral com foco em 970 cm^{-1} , para avaliação da presença dessa banda nas amostras de mistura de cafeína e

teobromina nas diferentes proporções (9:1 ; 1:1: e 1:9), evidenciando sua presença nas amostras contendo cafeína, como demonstrado na Figura 9.

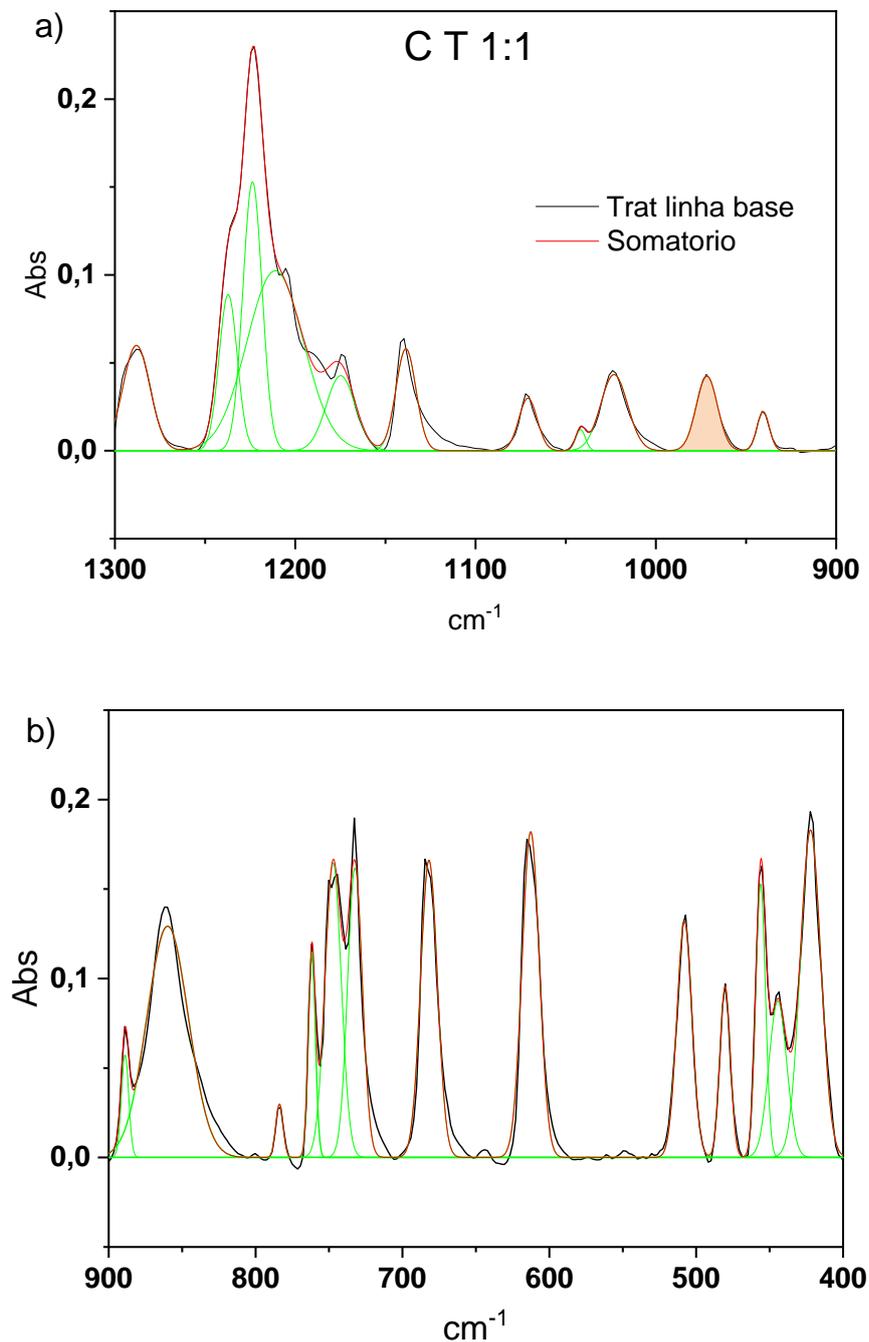
Figura 9 - Espectro de IR na região de "fingerprint" das amostras cafeína, teobromina e as misturas (C T 9:1, 1:1, 1:9).



Fonte: Do autor (2021).

Os espectros foram obtidos em absorbância de modo a permitir a posterior quantificação. De acordo com os espectros, observa-se a banda de absorção presente na cafeína e nas misturas (CT 9:1 e 1:1), uma pequena banda no espectro de (C T 1:9), e a ausência no espectro da teobromina. A Figura 10 demonstra um espectro de IR com a deconvolução das bandas, na região de "fingerprint", na mistura C T (1:1) como exemplo, destacando a banda de interesse em 970 cm^{-1} (a).

Figura 10 - Deconvolução dos espectros de IR na região de "fingerprint" da amostra C T (1:1), entre 1300-900 cm^{-1} (a) e 900-400 cm^{-1} (b).



Fonte: Do autor (2021).

O tratamento de deconvolução de bandas proporciona a identificação das bandas em cm^{-1} e a obtenção de suas altura e área respectivas, como nas regiões próximas de 1200 cm^{-1} , 950 cm^{-1} , 750 cm^{-1} e 450 cm^{-1} .

Procedeu-se uma avaliação aprofundada dos resultados da deconvolução aplicando os valores tanto de área quanto de altura relacionando com o número de mol dos analitos nessas

amostras. Da mesma forma, comparou-se a razão das áreas e alturas de bandas comuns aos analitos com a razão do número de mol de cafeína e teobromina.

Essa abordagem possibilita a obtenção de correlações gráficas de regressão linear com quatro parâmetros:

a) razão de áreas entre bandas versus razão de mol de cafeína por teobromina, aplicada para bandas comuns a ambos analitos;

b) área de banda específica versus número de mol do analito, aplicado a bandas exclusivas de determinado analito;

c) razão de alturas entre bandas versus razão de mol de cafeína por teobromina, aplicada para bandas comuns a ambos analitos;

d) altura de banda específica versus número de mol do analito, aplicado a bandas exclusivas de determinado analito.

Os resultados da avaliação por regressão de cada abordagem são apresentados na Tabela 6, para as duas regiões 1300 a 900 cm^{-1} e 900 a 400 cm^{-1} , que constituem o “fingerprint”.

Tabela 6 - Dados de regressão linear das áreas e alturas da deconvolução de bandas relacionados com número de mol.

Parâmetro	Seleção bandas	Regressão
Razão área	Banda 1173/1291	R^2 0,9984
	Banda 730/422	R^2 0,9998
Área	Banda 970 (Cf)	R^2 0,9243
	Banda 1137 (Tb)	R^2 0,9629
	Banda 680 (Tb)	R^2 0,9983
Razão altura	Banda 1222/1291	R^2 0,9888
	Banda 750/422	R^2 0,9868
Altura	Banda 970 (Cf)	R^2 0,8531
	Banda 1137 (Tb)	R^2 0,9963
	Banda 970 (Cf)	R^2 0,8531
	Banda 680 (Tb)	R^2 0,9537

Fonte: Do autor (2021).

No intuito de promover a semiquantificação dos analitos consideram-se os dados de regressão linear, com verificação da correlação entre as variáveis pelo R^2 e a obtenção da equação da reta. Apesar da altura das bandas corresponder à absorvância da amostra em um

dado número de onda, pode-se considerar a área das bandas como ideal por diminuir a variabilidade decorrente de alterações da linha base da região espectral selecionada.

Diante dos dados na tabela acima e considerando o valor de R^2 , constata-se que a razão de áreas das bandas 730 cm^{-1} e 422 cm^{-1} versus a razão do número de mols de cafeína e teobromina, apresenta boa correlação com $R^2\ 0,9998$ adequada para proporcionar a semiquantificação de misturas das substâncias cafeína e teobromina. Ao avaliar exclusivamente o teor de teobromina, pode-se adotar a equação da reta referente as áreas da banda 680 cm^{-1} ou da banda 1137 cm^{-1} , ambas versus o número de mols de teobromina com $R^2\ 0,9983$ e $0,9629$, respectivamente. Para avaliação do teor de cafeína, pode-se adotar a equação da reta referente área da banda 970 cm^{-1} versus o número de mols de cafeína, porém com uma correlação inferior ($R^2\ 0,9243$).

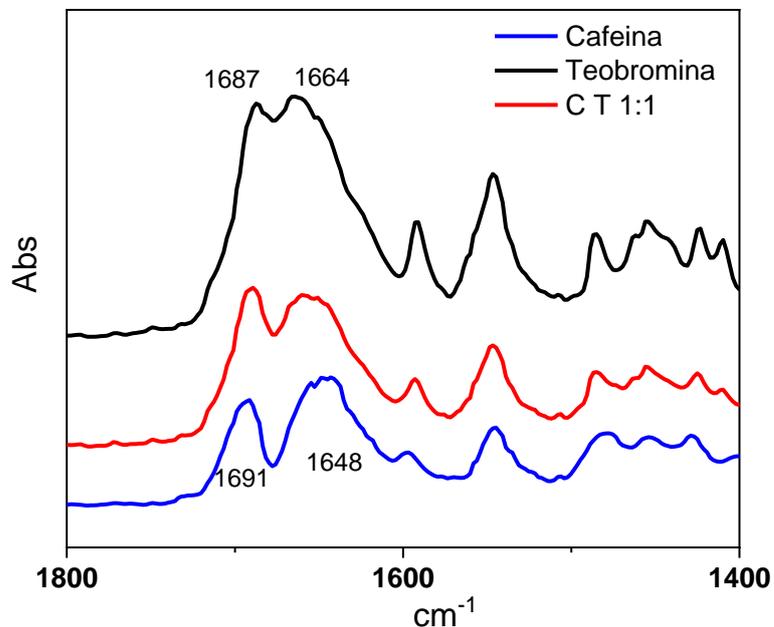
4.3.2 Região de ligação dupla, banda $\nu\text{C}=\text{O}$

Uma das regiões importantes de se avaliar no espectro FTIR é das ligações duplas ($2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$), cujas bandas de $\nu\text{C}=\text{O}$ carbonílicos situam-se na faixa entre 1820 e 1630 cm^{-1} com forte intensidade, destacando-se das demais pela relativa pouca interferência e facilidade de reconhecimento (GUNASEKARAN; SANKARI; PONNUSAMY, 2005; LOPES; FASCIO, 2004; STUART, 2004). Essa faixa espectral corresponde aos possíveis comprimentos de onda de cada grupo funcional contendo a carbonila, como grupamento amida em questão para cafeína e teobromina.

Considerando-se a diferença estrutural entre as moléculas, têm-se as funções amida (em N3) e imida (em N1, vizinha a duas carbonilas) terciárias na cafeína; já na teobromina, têm-se as funções amida terciária e imida secundária. Esse fato acarreta mudança de comprimento de onda, sendo que as bandas de amidas secundárias situam-se entre 1700 e 1630 cm^{-1} ; já as bandas de amidas terciárias situam-se entre 1670 e 1630 cm^{-1} (LOPES; FASCIO, 2004).

A Figura 11 ilustra a região para as amostras sólidas de cafeína, teobromina e a mistura de ambas (C T 1:1), destacando-se as bandas de absorção atribuídas a $\nu\text{C}=\text{O}$ carbonílico.

Figura 11 - Espectros da região ligações dupla do IR em absorvância das amostras de cafeína, teobromina e mistura C T (1:1).

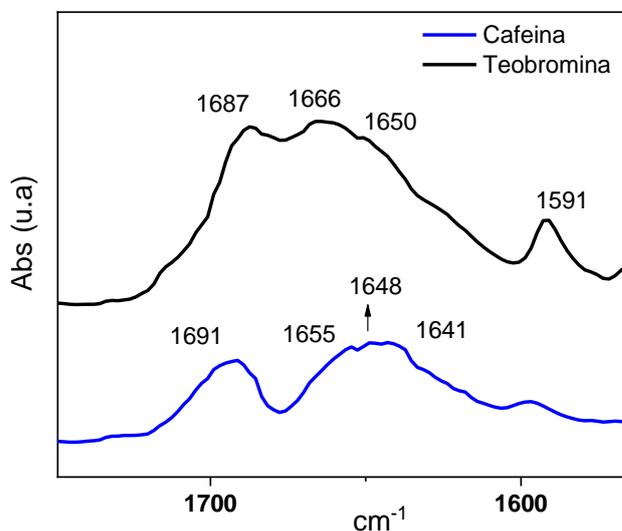


Fonte: Do autor (2021).

Em estudo de frequências vibracionais teórico/experimental compreendendo essas xantinas, foram atribuídas as bandas de $\nu\text{C}=\text{O}$ em 1700 e 1660 cm^{-1} para a cafeína e em 1691 e 1667 cm^{-1} para a teobromina (UCUN; SAĞLAM; GÜÇLÜ, 2007). Esses autores também atribuíram a banda de 1667 cm^{-1} para deformação N-H, da teobromina, aparecendo junto com o sinal C=O.

A Figura 12 apresenta uma visão detalhada das bandas situadas na região da $\nu\text{C}=\text{O}$ carbonila e a Tabela 7 resume os dados atribuídos a $\nu\text{C}=\text{O}$ carbonílico dos achados experimentais em estado sólido comparando com a bibliografia.

Figura 12 - Espectros na região referente a $\nu\text{C}=\text{O}$ de carbonila, destacando as principais bandas de cafeína e teobromina.



Fonte: Do autor (2021).

Tabela 7 - Atribuições para as bandas de absorção na região de dupla ligação da cafeína e teobromina observadas no experimento em comparação com dados da literatura.

ANALITO	EXPERIMENTO		(UCUN; SAĞLAM; GÜÇLÜ, 2007)	
	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
Cafeína	1691	$\nu\text{C}=\text{O}$ amida 3 ^a	1700	$\nu\text{C}=\text{O}$
	1655	$\nu\text{C}=\text{O}$ imida 3 ^a	1660	$\nu\text{C}=\text{O}$
	1648	$\nu\text{C}=\text{N}$	1600	$\nu\text{C}=\text{C} + \delta(\text{HCN})$
	1641	$\nu\text{C}=\text{C}$ aromático	-	-
		1548	$\delta(\text{HCN}) + \nu(\text{aneis})$	
Teobromina	1687	$\nu\text{C}=\text{O}$ amida 3 ^a	1691	$\nu\text{C}=\text{O}$
	1666	$\nu\text{C}=\text{O}$ imida 2 ^a + $\delta\text{N-H}$	1667	$\nu\text{C}=\text{O} + \delta\text{N-H}$
	1650	$\nu\text{C}=\text{N}$	-	-
	1591	$\nu\text{C}=\text{C}$ aromático	1592	$\nu\text{C}=\text{C} + \delta(\text{HCN})$

Fonte: Do autor (2021).

De acordo com os dados ilustrados e as atribuições, verifica-se grande similaridade das bandas na faixa espectral relativo aos grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$), ($\text{C}=\text{N}$), e alceno ($\text{C}=\text{C}$).

Conforme detalhado anteriormente, procedeu-se uma avaliação dos resultados da deconvolução aplicando os valores tanto de área quando de altura relacionando com a razão de número de mol cafeína/teobromina por regressão linear (Tabela 8).

Tabela 8 - Dados de regressão linear das áreas e alturas da deconvolução de bandas relacionados com a razão do número de mol cafeína/teobromina.

Parâmetro	Seleção banda	Regressão
Razão área	Banda 1590/1545	R ² 0,9999
Razão altura	Banda 1452/1545	R ² 0,9842

Nota: todas as bandas verificadas são comuns a cafeína e teobromina.
Fonte: Do autor (2021).

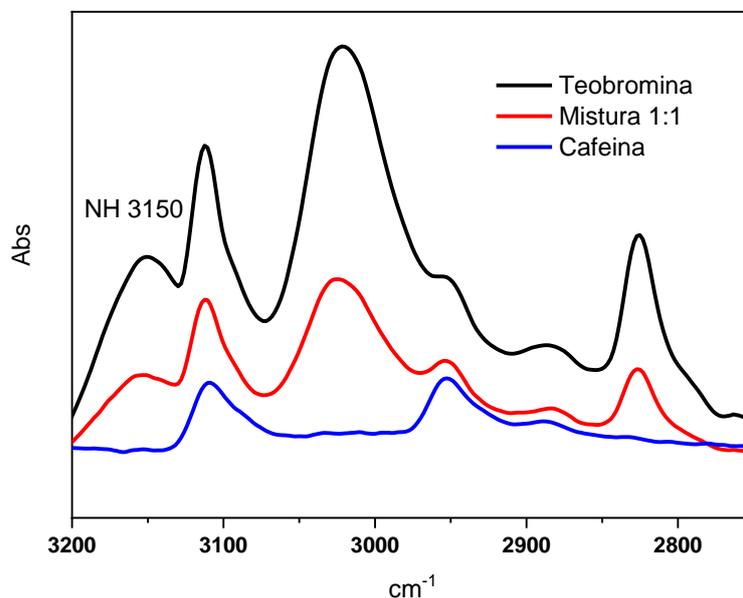
Diante dos dados na tabela acima e considerando o valor de R² constata-se que a razão de área das bandas 1590 cm⁻¹ e 1545 cm⁻¹ versus a razão do número de mols de cafeína e teobromina, apresentam a melhor correlação com R² 0,9999 para proporcionar a semiquantificação de misturas das substâncias cafeína e teobromina.

4.3.3 Região νN-H e νC-H

De acordo com a avaliação dos espectros de cafeína e teobromina, pode-se verificar como principal diferença a presença de banda em 3158 cm⁻¹ no espectro da teobromina, atribuído a νN-H da imida. Apesar dessa banda não estar na região esperada (3400 a 3200 cm⁻¹), pode ser confirmada com base em interações de ligação de hidrogênio, com provável dimerização, que causaria a mudança da banda para menores comprimentos de onda (BILKAN, 2017). A alteração também ocorre quando se tem amidas associadas (UCUN; SAĞLAM; GÜÇLÜ, 2007).

Como esperado, verifica-se a presença da banda νN-H no espectro das misturas dos analitos. Os espectros da faixa de 3200 a 2750 cm⁻¹ são apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Detalhamento do espectro IR em 3200 a 2750 cm^{-1} das amostras cafeína, teobromina e mistura C T (1:1), em absorbância.

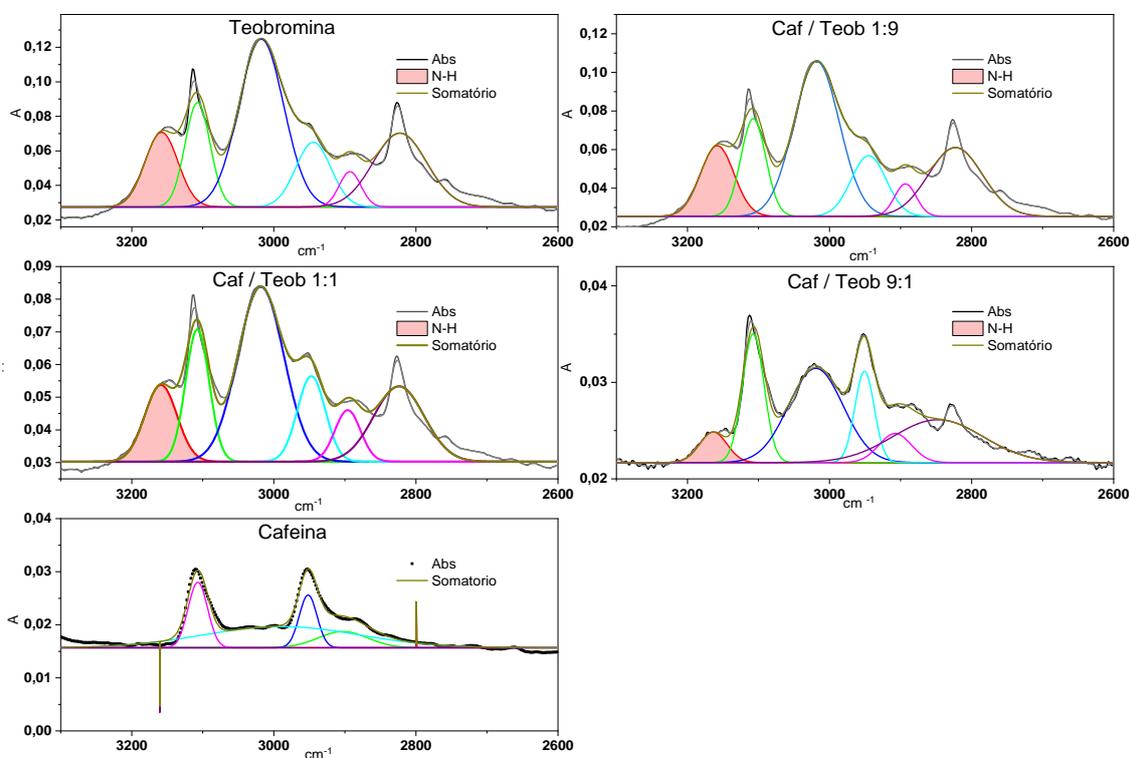


Fonte: Do autor (2021).

É possível verificar as diferenças entre os espectros no IR em que a teobromina apresenta maior número de bandas e com maior intensidade de absorção da radiação, devido a maior polaridade das ligações na teobromina. A partir das amostras sólidas preparadas em diferentes proporções de cafeína/teobromina, foi evidenciado a presença da banda em aproximadamente 3158 cm^{-1} atribuída a $\nu\text{N-H}$ da imida cíclica do anel pirimidínico da teobromina, dessa forma pode ser utilizada para quantificação de teobromina mesmo em presença de cafeína.

A seleção de maior faixa entre 3300 a 2600 cm^{-1} ocorreu com vista a melhorar a linha base e favorecer a correta deconvolução das bandas. A Figura 14 ilustra a deconvolução das amostras, com destaque para a banda em aproximadamente 3150 cm^{-1} , atribuída a $\nu\text{N-H}$.

Figura 14 - Deconvolução das bandas na região de 3300 a 2600 cm^{-1} do IR das amostras cafeína, teobromina, mistura C T (9:1, 1:1, 1:9).



Fonte: Do autor (2021).

Com a deconvolução dos picos, obtém-se as áreas e alturas relativas a cada banda correspondente as amostras possibilitando a construção da curva de calibração e sua comparação para fins de quantificação. A Tabela 9 detalha a distinção das bandas através da deconvolução.

Tabela 9 - Detalhamento das bandas dos espectros de absorção por deconvolução.

Análito	Bandas de deconvolução
Teobromina	3150, 3016, 2822
Cafeína e teobromina	3106, 2950, 2900

Nota: Não são verificadas bandas exclusivas da cafeína.

Fonte: Do autor (2021).

Conforme detalhado anteriormente, procedeu-se uma avaliação dos resultados da deconvolução aplicando os valores tanto de área quando de altura com dados de número de mol dos analitos. A Tabela 10 exemplifica o aprofundamento da avaliação por regressão trazendo parâmetros e resultados que constituem a região de ligação dupla.

Tabela 10 - Dados de regressão linear das áreas e alturas da deconvolução de bandas relacionados com número de mol.

Parâmetro	Seleção banda	Regressão
Razão área	Banda 2822/3106	R ² 0,8893
Área	Banda 3150 (Tb)	R ² 0,9996
	Banda 3016 (Tb)	R ² 0,9955
	Banda 2823 (Tb)	R ² 0,9118
Razão altura	Banda 2900/3106	R ² 0,9528
	Banda 2822/3106	R ² 0,8280
Altura	Banda 3150 (Tb)	R ² 0,9900
	Banda 3016 (Tb)	R ² 0,9704
	Banda 2823 (Tb)	R ² 0,9982

Fonte: Do autor (2021).

Diante dos dados na tabela acima e considerando o valor de R², constata-se que a razão de alturas das bandas 2900 cm⁻¹ e 3106 cm⁻¹ versus a razão do número de mols de cafeína e teobromina, apresentam a melhor correlação com R² 0,9528 para proporcionar a semiquantificação de misturas das substâncias cafeína e teobromina. Ao avaliar exclusivamente o teor de teobromina, pode-se adotar a equação da reta referente a área ou altura da banda 3150 cm⁻¹ versus o número de mols de teobromina com R² 0,9996 ou 0,9900, respectivamente. Não é possível determinar isoladamente a semiquantificação de cafeína pois todas bandas de absorção são comuns a teobromina.

4.3.4 Avaliação dos componentes principais das amostras sólidas

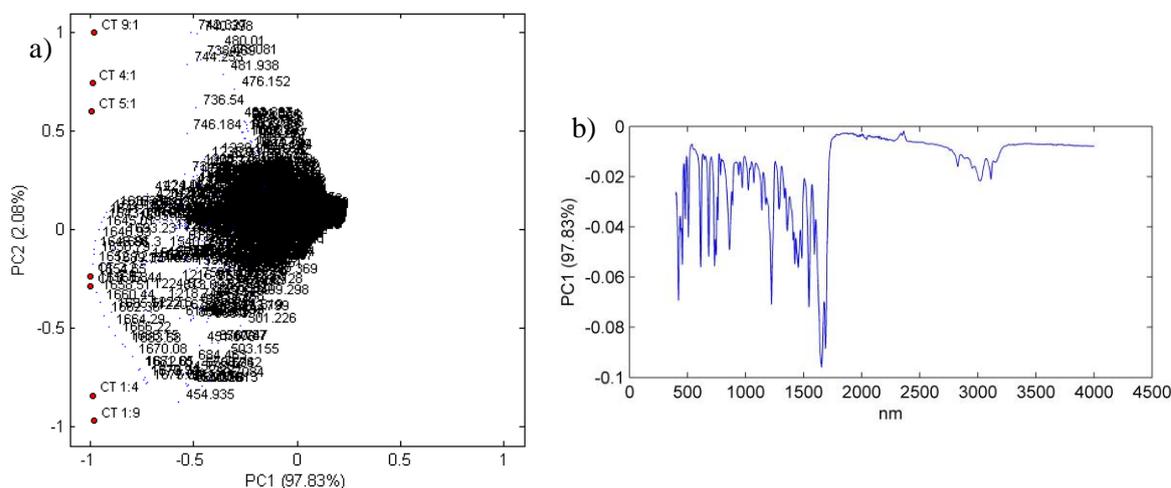
A abordagem da quimiometria foi utilizada para a determinação das bandas principais por PCA, com o objetivo de identificar as bandas do espectro que possibilitam a distinção entre as amostras.

Foi realizado o pré-tratamento dos dados com o intuito de remover matematicamente fontes de variação, sendo selecionada a normalização uma vez que as leituras de FTIR são variáveis contínuas (número de onda).

A análise de PCA indicou que duas novas variáveis a partir da combinação das variáveis originais é suficiente e explica 99,9% da distribuição dos dados, gerando um gráfico de 2 componentes principais (bidimensional). Foram obtidos os escores, que são informações do comportamento das amostras, e dos pesos, relativo ao comportamento das variáveis. A

representação gráfica de escores e pesos permite observar a posição das amostras bem como os números de onda mais relevantes (Figura 15).

Figura 15 - Gráfico de escores e pesos para 2 componentes principais (a), principais bandas na componente principal (b).



Fonte: Do autor (2021).

Atentando-se para as amostras, observa-se 3 grupos de amostras em proximidade: para maiores concentrações de cafeína (CT 4:1, CT 5:1 e CT 9:1); concentrações semelhantes de cafeína e teobromina (CT 1:1 e CT 2:2); para maiores concentrações de teobromina (CT 1:4 e CT 1:9). Em cada um desses grupos tem-se os números de onda mais relevantes, resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 – Correlação de dados entre as amostras e números de onda.

Amostras	Nº onda (cm ⁻¹)	Analito majoritário
CT 4:1, CT 5:1 e CT 9:1	480, 736, 744	cafeína
CT 1:1 e CT 2:2	1654, 1656, 1658	ambas
CT 1:4 e CT 1:9	455, 1670, 1675	teobromina

Fonte: Do autor (2021).

Constata-se que as principais bandas para a determinação de teobromina são 455, 1670 e 1675 cm⁻¹. Já para a cafeína, as principais bandas são 480, 736 e 744 cm⁻¹.

Posteriormente, procedeu-se a comparação das alturas obtidas para cada banda principal correlacionando com valor de mol% dos analitos para obtenção do coeficiente de determinação (R²) (Tabela 12).

Tabela 12 - Avaliação das bandas principais obtidas por PCA.

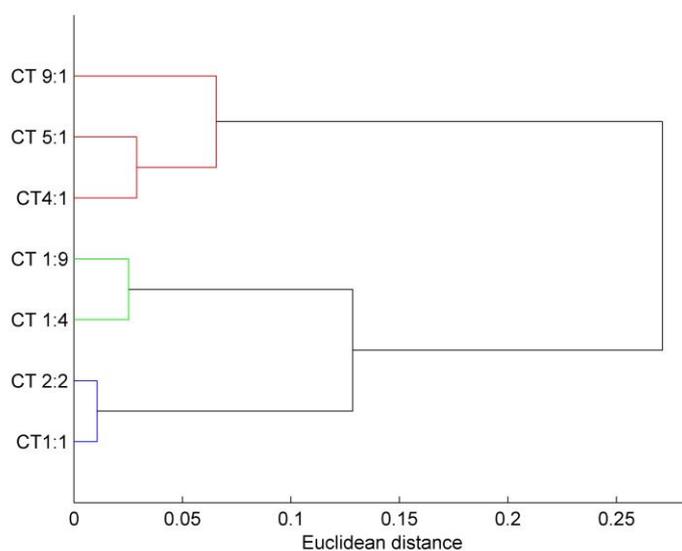
Analito	Nº onda (cm⁻¹)	R²
Cafeína	480	0,9010
	736	0,5430
	744	0,7938
Teobromina	455	0,9941
	1670	0,9851
	1675	0,9924
Cafeína e Teobromina	1654	0,9479
	1656	0,9513
	1658	0,9524

Fonte: Do autor (2021).

As bandas 1654, 1656 e 1658 cm⁻¹, apontadas por análise de PCA como principais para mesma faixa de concentração, podem ser atribuídas para a determinação concomitante de cafeína e teobromina. Assim suas alturas, ou medidas de intensidade, podem ser relacionadas a concentração em mol % de cada analito ou ainda da razão entre suas concentrações. Na tabela acima os valores de coeficiente de determinação foram obtidos utilizando mol de teobromina %. Ao utilizar relação de altura versus razão da concentração de cafeína por teobromina, em mol %, obtém-se valores de R² inferiores (0,7315, 0,7330 e 0,7351 respectivamente) indicando menor correlação.

Utilizando os dados de PCA procedeu-se a análise de agrupamento hierárquico (HCA), que interliga amostras com base em suas distâncias. Dessa forma, obteve-se o dendrograma que representa o agrupamento das amostras baseado em suas distâncias (Figura 16).

Figura 16 - Representação do dendrograma para as amostras analisadas por PCA.



Fonte: Do autor (2021).

O dendrograma permite visualizar o agrupamento de amostras baseados em suas semelhanças. Assim as amostras podem ser divididas em 3 grandes grupos: maior concentração de cafeína, maior concentração de teobromina e concentrações semelhantes dos analitos.

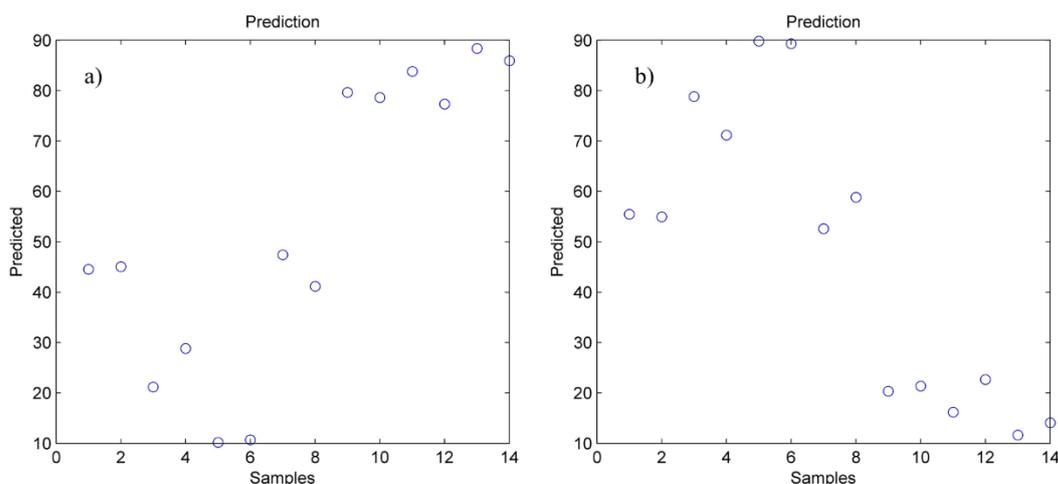
4.3.5 Avaliação da calibração multivariada das amostras sólidas

A calibração multivariada é utilizada por não existir uma única variável seletiva e ainda pelo fato do sinal analítico não ser proveniente de apenas uma espécie a determinar. Também permite determinações simultâneas, sendo útil na análise de FTIR que apresenta muitas variáveis.

O processo de calibração envolve a coleta e tratamento dos dados, provenientes da leituras do FTIR-ATR em absorvância; a construção do modelo, etapa de regressão e obtenção das correlações entre as variáveis e a resposta estimada; e a validação do modelo, em que testa outras amostras mensurando valores preditos e medidos.

De forma semelhante ao PCA, foi realizado o pré-tratamento dos dados por normalização previamente ao método de regressão PLS. Após construção e calibração do modelo, foram selecionados 14 amostras para verificação do valor predito pelo modelo, utilizando replicatas de leitura das amostras cafeína/teobromina (1:9), cafeína/teobromina (1:4), cafeína/teobromina (1:1), cafeína/teobromina (2:2) cafeína/teobromina (4:1), cafeína/teobromina (5:1) e cafeína/teobromina (9:1).

Figura 17 – Verificação do modelo para a predição simultânea da concentração de cafeína (a) e teobromina (b) nas amostras.



Nota: amostras 1 e 2 (CT 1:1), 3 e 4 (CT 1:4), 5 e 6 (CT 1:9), 7 e 8 (CT 2:2), 9 e 10 (CT 4:1), 11 e 12 (CT 5:1), 13 e 14 (CT 9:1).

Fonte: Do autor (2021).

É possível verificar pelo gráfico a proximidade dos valores preditos com os valores reais das amostras, confirmando a adequação do modelo de PLS proposto.

Com a obtenção das bandas principais e verificação que se encontram nas regiões de fingerprint e de ligação dupla, foram selecionados os dados espectrais de $400\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ para repetir a análise de PCA. Essa tentativa pretendeu diminuir o número de variáveis que geram ruídos e erros no modelo, no entanto não houve melhora significativa nos parâmetros de desempenho (TABELA 2 APÊNDICE 1), sendo mantido o modelo com dados totais de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

4.3.6 Avaliação da aplicação FTIR-ATR para amostras em solução

De forma semelhante a amostras sólidas, o acessório ATR permite a aplicação direta de soluções sobre o cristal para a realização de leituras. Com a finalidade de realizar o monitoramento reacional, que ocorre em soluções, procedeu-se a avaliação de reações teste nos meios aquoso e metanólico.

4.3.6.1 Amostras em solução aquosa

As soluções aquosas de cafeína, teobromina e da mistura CT nas proporções (9:1; 1:1; 1:9) foram analisadas e os espectros de transmitância registrados (FIGURA 2 APÊNDICE 1), sendo verificado a sobreposição das bandas dos analitos com bandas da água.

Constata-se que os espectros das amostras de solução aquosa de cafeína a $0,4\text{ mg.mL}^{-1}$, teobromina $0,4\text{ mg.mL}^{-1}$ e da mistura cafeína/teobromina (CT 1:1) são idênticos ao espectro da

água, indicando que as bandas de absorção referente a água encobre todas as demais bandas dos analitos. Também é observado que mesmo realizando o espectro em branco “background” com água, previamente à análise das amostras, obtém-se apenas uma linha de base evidenciando a ausência de bandas dos analitos e inviabilizando a análise ao utilizar solução aquosa. Esses resultados estão em desacordo com a literatura que reporta a identificação de bandas atribuídas a cafeína e sua determinação utilizando solução aquosa em FTIR-ATR na região de 2982 a 2825 cm^{-1} (WELDEGEBREAL; REDI-ABSHIRO; CHANDRAVANSI, 2017). Entretanto, e como esperado, a água é um forte interferente com bandas de grande intensidade que se sobrepõe às bandas de interesse nas regiões do espectro IR, impedindo a utilização dessa técnica para análise direta de soluções aquosas.

Como alternativa, deve-se realizar um tratamento das amostras em solução aquosa previamente à análise de IR. O procedimento seria a adição de sais inorgânicos até saturação nas amostras aquosas, em seguida realizar a extração dos analitos cafeína e teobromina com solventes orgânicos como o diclorometano, para a posterior aplicação do extrato orgânico no ATR, com intervalo de tempo de modo a permitir a evaporação do solvente e por fim registrar a leitura do sólido remanescente.

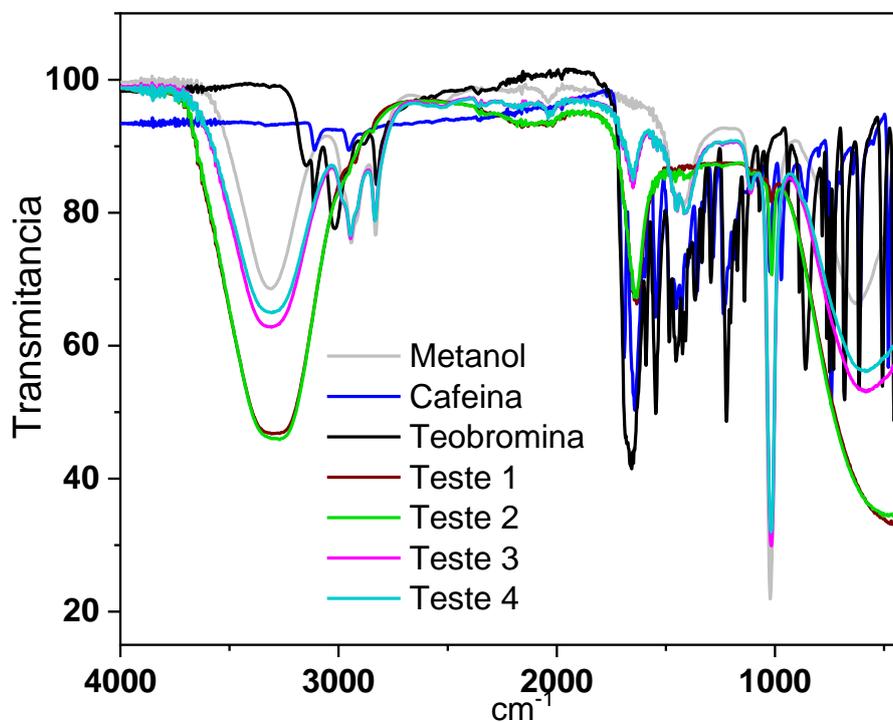
Diante do acréscimo de etapas e da necessidade de utilização de solventes orgânicos, não foram realizadas as análises de soluções aquosas já que o propósito da utilização de FTIR-ATR no âmbito do trabalho é a praticidade e diminuição de custos, além de evitar a utilização de solventes orgânicos.

4.3.6.2 Amostras em metanol

No intuito de promover as reações de conversão da cafeína em teobromina, realizaram-se testes reacionais em metanol. Dessa forma, avaliou-se os espectros de cafeína e teobromina em solução metanólica buscando possíveis alterações espectrais que viabilizem a utilização da técnica FTIR.

Visando o monitoramento reacional para a oxidação da cafeína, foram retiradas alíquotas de 4 condições reacionais em metanol e analisadas por FTIR-ATR. A Figura 18 ilustra os espectros dessas amostras reacionais, do metanol utilizado como solvente além da cafeína e teobromina no estado sólido.

Figura 18 - Espectros de IR das reações de oxidação da cafeína preparadas em metanol.



Nota: Espectros da cafeína e teobromina obtidos por leitura em estado sólido.

Fonte: Do autor (2021).

De acordo com os espectros acima, verifica-se a presença das bandas de absorção do metanol nas amostras Teste (1, 2, 3 e 4), com as bandas características dos analitos.

A avaliação dos espectros de metanol revela que as bandas referentes ao metanol encobrem as regiões de 3500 a 2700 cm^{-1} , de 1500 a 1320 cm^{-1} , de 1146 a 932 cm^{-1} e de 880 a 400 cm^{-1} . Assim as regiões de 1750 a 1500 cm^{-1} e 1350 a 1150 cm^{-1} permitiriam avaliar bandas nas amostras.

Procedeu-se a observação dos espectros das amostra de cafeína e teobromina solubilizados em metanol nas regiões sem interferência do metanol: 1750 a 1500 cm^{-1} e 1350 a 1150 cm^{-1} constatando a presença das bandas em aproximadamente 1700, 1636, 1599, 1548, 1284, 1236 e 1188 cm^{-1} em ambas amostras.

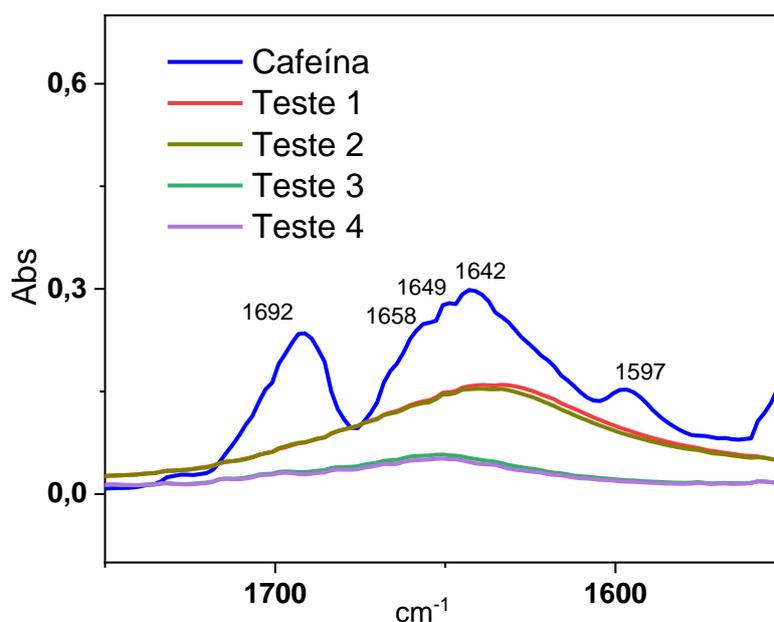
Nos espectros das amostras testes 1, 2, 3 e 4 não revelou bandas de absorção entre 1350 a 1150 cm^{-1} e apenas uma banda fraca em 1641 cm^{-1} mas que não permite sua mensuração.

Observam-se as bandas no espectro da cafeína na região de 3111 e 2954 cm^{-1} relativas a $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}}$ e $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}}$, respectivamente; e a sobreposição dessas bandas no espectro do metanol inviabilizando sua utilização para mensurar as amostras.

Da mesma forma, não é possível proceder a deconvolução de bandas para a quantificação da cafeína em aproximadamente 970 cm^{-1} , pois essa banda foi encoberta pelo metanol, que apresenta uma banda de forte intensidade em aproximadamente 1000 cm^{-1} .

Considerando a região não encoberta de 1750-1550 cm^{-1} de atribuição a ligações duplas, foi proposto a avaliação detalhada dos espectros das amostras Teste 1, 2, 3 e 4 de modo a evidenciar as bandas $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ da carbonila, ilustrados na Figura 19.

Figura 19 - Espectros na região 1750-1550 para avaliação das bandas relativas a $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ da carbonila e $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ $\nu_{\text{C}=\text{C}}$, para cafeína e amostras reacionais.



Fonte: Do autor (2021).

De acordo com os espectros obtidos na região de ligações duplas, foi comprovado que não há correspondência entre as bandas da cafeína para as amostras reacionais. Dessa forma não procedeu com a deconvolução.

Ainda no intuito de visualizar alguma banda ou identificar grupos funcionais presentes nas amostras, procedeu-se a subtração do espectro do metanol (FIGURA 3 APÊNDICE 1),

obtém-se os espectros apenas com bandas próximas a 1640 cm^{-1} . Portanto, fica evidente não ser possível a avaliação dos espectros das condições reacionais em solução metanólica.

4.4 Avaliação do método cromatográfico para quantificação da cafeína e da teobromina

A avaliação do método cromatográfico utilizou coluna de fase reserva C18 de 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e tamanho de partículas de 5 micrômetros. Diante das opções de marcas disponíveis no laboratório realizaram-se testes com injeção de soluções padrão para a seleção da coluna Kromasil que apresentou melhor simetria de picos. Os analitos foram monitorados no comprimento de onda de 272 nm, correspondente ao máximo de absorção da cafeína, e posteriormente com DAD.

A avaliação da FM, empregou diferentes proporções de água e metanol compreendendo a faixa (9:1 , 8:2 , 7:3), de modo a variar a força eluotrópica alterando a interação dos analitos com a FE. Além de mistura de água ultra-pura / metanol, executou-se testes com solução ácido acético em diferentes valores de pH, avaliando o impacto na retenção e simetria dos picos.

Posteriormente, substituiu-se o solvente por acetonitrila, com ajuste da força de eluição, obtendo-se picos mais finos e simétricos, além de diminuir os tempos de retenção sem afetar a resolução. A Tabela 13 reúne as condições cromatográficas com os dados de tempos de retenção e de corrida das alterações cromatográficas efetuadas. Os cromatogramas são apresentados nas Figuras 4 a 9 do Apêndice 1.

Tabela 13 – Exemplos de condições cromatográficas avaliadas, com os tempos de retenção da teobromina e cafeína e o tempo de corrida.

Condição	Tb	Cf	Tempo de Corrida
Coluna Varian / FM sol pH3/metanol (7:3)	3,3	9,2	12,0
Coluna Kromasil / FM sol pH3/metanol (8:2)	2,6	7,0	10,0
Coluna Kromasil / FM sol pH3/metanol (85:15)	3,9	12,1	15,0
Coluna Kromasil / FM sol pH3/metanol (9:1)	5,8	22,0	25,0
Coluna Kromasil / FM sol pH3/acetonitrila (85:15)	2,5	5,3	8,0
Coluna Kromasil / FM sol pH3/acetonitrila (9:1)	4,0	12,5	14,0
Coluna Kromasil / FM água/acetonitrila (9:1)	3,8	11,5	13,0

Nota: FE: C18 150 x 4,6 mm, 5 μm ; fluxo $1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 272 nm.

Fonte: Do autor (2021).

Durante as modificações na fase móvel, foram monitorados os valores de pressão gerados no sistema, constituindo-se um parâmetro adicional. Também foram avaliadas as concentrações dos analitos e as diluições da amostra necessárias a um método adequado em termos de faixa de trabalho e linearidade.

A condição que empregou eluição isocrática com 15% de acetonitrila apresentou simetria de picos de 1,2 para ambos analitos, com picos bem resolvidos em um tempo de corrida relativamente pequeno (8,0 minutos). Entretanto, com o surgimento de novos picos de subprodutos da degradação da cafeína próximos ao pico da teobromina, foi necessário a diminuição da força de eluição. A pressão do sistema foi monitorada mantendo-se em 9,0 MPa.

A FM de solução de ácido acético pH 3,0 / acetonitrila (9:1) apresentou simetria de 1,2 para ambos analitos com boa resolução entre os picos, inclusive dos produtos de degradação. A pressão do sistema foi de 8,9 MPa. Essa proporção de FM foi selecionada para o método de quantificação de teobromina e cafeína e monitoramento das reações de degradação da cafeína.

Posteriormente excluiu-se a etapa de acidificação da FM, preferindo utilizar água ultrapura, visando a possibilidade de coletar as frações pós-coluna e seguir a análise por espectrometria de massas, evitando interferências e incompatibilidade com a técnica.

Após otimização das condições cromatográficas, foi definido o método constituído por: FM água/acetonitrila (9:1), fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, fase estacionária coluna C18 150 x 4,6 mm e 5 μm de tamanho de partícula, com detecção a 272 nm.

A quantificação dos analitos foi obtida por comparação das áreas dos picos das amostras com os dados obtidos pela curva de calibração de soluções conhecidas de cafeína e teobromina. A curva de calibração abrangeu a faixa de $1,03 \times 10^{-5}$ a $5,15 \times 10^{-5}$ mM para a cafeína e $5,83 \times 10^{-6}$ a $2,92 \times 10^{-5}$ mM para a teobromina, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996 e 0,9998 respectivamente.

4.4.1 Transferência de método

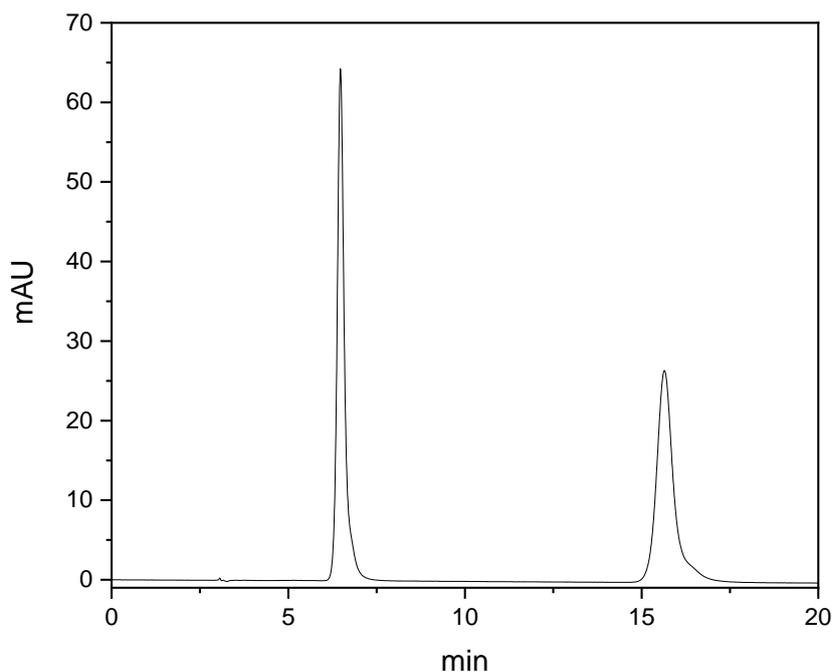
Diante da necessidade de utilização do método desenvolvido em outro laboratório, que possui outro equipamento de HPLC e disponibilidade de coluna com outra especificação, realizou-se testes para adequação do método.

Utilizou-se equipamento da marca Shimadzu e a coluna cromatográfica Supelco C18 250 x 4,6 mm e 5 μm de tamanho de partícula.

A Figura 20 ilustra um cromatograma dos padrões de teobromina e cafeína, nas condições otimizadas. FE: coluna cromatográfica fase reserva C18 de 250 mm de comprimento,

4,6 mm de diâmetro e partículas de 5 micrômetros. FM: água e acetonitrila na proporção (9:1), detecção em 272 nm e 20 minutos de tempo de corrida.

Figura 20 - Cromatograma dos padrões de cafeína e teobromina, obtidos em equipamento Shimadzu, coluna C18 de 250 mm, FM água/acetonitrila (9:1).



Fonte: Do autor (2021).

Como foram realizadas análises em laboratórios diferentes, a curva de calibração foi repetida apresentando boa linearidade com coeficientes de determinação (R^2) de 0,9998 para cafeína e 0,9994 para teobromina.

A técnica de cromatografia líquida foi escolhida para o monitoramento de reação pretendida que envolve a exposição da cafeína em condições degradantes com formação de teobromina e outros produtos de degradação, na presença de reagentes que podem interferir na análise por outras técnicas.

4.5 Comparação entre métodos UV-Vis e HPLC no doseamento da cafeína

No intuito de avaliar a resposta dos métodos de espectroscopia na região do UV-Vis e de HPLC, foram preparados 3 experimentos em diferentes condições reacionais do processo Fenton para mensuração da degradação de cafeína. Após 24 horas de reação, o teor de cafeína

foi analisado pelos métodos UV-Vis e HPLC utilizando o espectrofotômetro e o cromatógrafo líquido, respectivamente. Os resultados da degradação de cafeína são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Comparação do teor da cafeína (%) utilizando os métodos UV-Vis e HPLC, em diferentes condições Fenton.

Experimento	UV (%)	HPLC (%)	Diferença / (%)
1	80,8	74,9	5,9 (7,9%)
2	53,9	46,9	7,0 (14,9%)
3	50,0	45,2	4,8 (10,6%)

Fonte: Do autor (2021).

Verifica-se que o método de espectroscopia na região do UV-Vis apresentou teores mais altos de cafeína em relação ao método HPLC nas 3 condições de degradação. Considerando que o método de HPLC permite a separação de moléculas por diferenças de interação e posteriormente as quantifica, comparando a área de pico com curva de calibração, constata-se que é uma técnica mais adequada por sua seletividade, precisão e ainda apresentar maior sensibilidade. Dessa forma, consideram-se os valores obtidos por HPLC como corretos.

Os resultados estão expressos em porcentagem de cafeína obtida ao fim da reação de degradação Fenton. Como o método de UV obtém maiores valores de cafeína constata-se que algum produto de degradação da cafeína apresenta absorção no comprimento de onda de 272 nm interferindo nas leituras e acarretando o erro de quantificação. Essa constatação é reforçada por avaliação da Figura 6 que demonstra que a teobromina, um dos prováveis produtos de degradação da cafeína, apresenta espectro de absorção semelhante ao da cafeína.

Fica evidente que o método de UV não é adequado ao monitoramento da reação pretendida por não ser seletivo para cafeína e demais analitos.

5 CONCLUSÃO

A técnica de cromatografia em papel, nas condições avaliadas, não foi adequada para a finalidade deste trabalho. Outra desvantagem está relacionada com a necessidade de solventes orgânicos tóxicos, além da baixa solubilidade da teobromina.

A técnica de UV-Vis foi investigada, confirmando que os espectros da cafeína e teobromina são similares. De acordo com o estudo, não houve nenhuma região do espectro de UV que apresentasse especificidade para os analitos mesmo ao alterar os valores de pH das amostras analisadas. Essa técnica não é seletiva para cafeína inviabilizando sua utilização no monitoramento da degradação da cafeína.

A espectroscopia na região do IR por ATR foi avaliada para estado sólido e soluções aquosas e metanólicas. A avaliação de soluções foi prejudicada pela presença de bandas do solvente que sobrepõe e atrapalham a verificação das bandas dos analitos; já as amostras sólidas podem ser utilizadas para identificação de cafeína e teobromina, além de proporcionar a semiquantificação. Foi constatado a presença de bandas específicas aos analitos, como 3158 cm^{-1} de $\nu\text{N-H}$ para teobromina ou 970 cm^{-1} de $\nu\text{N-CH}_3$ para cafeína. O emprego de recursos auxiliares de deconvolução de bandas ou PCA possibilita a distinção de bandas e a realização da semiquantificação nas amostras sólidas.

A deconvolução de bandas foi investigada nas três regiões do espectro IR: 3300-2750, 1750-1350, 1500-400. Comparou-se as áreas ou alturas as bandas obtidas da deconvolução com o número de mols do analito, ou a relação entre bandas quando se tratou de banda comum aos analitos com a razão de mols cafeína/teobromina. Assim na região “fingerprint”, a razão de área das bandas $730\text{ cm}^{-1}/422\text{ cm}^{-1}$ proporcionou melhor correlação para determinação concomitante de cafeína e teobromina ($R^2\ 0,9998$); a área da banda 680 cm^{-1} para determinação de teobromina ($R^2\ 0,9983$) e a área da banda 970 cm^{-1} para determinação de cafeína ($R^2\ 0,9243$). Na região de ligação dupla, não evidenciou bandas exclusivas aos analitos e a razão de áreas das bandas $1590\text{ cm}^{-1}/1545\text{ cm}^{-1}$ proporcionou melhor correlação para determinação concomitante de cafeína e teobromina ($R^2\ 0,9999$). Na região de $\nu\text{N-H}$ e $\nu\text{C-H}$, a razão de alturas das bandas $2900\text{ cm}^{-1}/3106\text{ cm}^{-1}$ proporcionou melhor correlação para determinação concomitante de cafeína e teobromina ($R^2\ 0,9528$) e a área da banda 3150 cm^{-1} para determinação de teobromina ($R^2\ 0,9996$).

A análise de PCA identificou as principais bandas de distinção das amostras que permitiram ainda seu agrupamento HCA baseado em sua semelhança: 455 cm^{-1} para amostras com maior concentração de cafeína; 1675 cm^{-1} para amostras com maior concentração de

teobromina; e 1658 cm^{-1} para amostras com concentrações semelhantes. As alturas dessas bandas principais foram utilizadas para regressão linear em relação ao número de mol por cento obtendo coeficientes de correlação 0,9941 ; 0,9924 e 0,9524, respectivamente.

A análise multivariada compreendeu o método de regressão PLS para a construção do modelo, que foi calibrado e validado com amostras apresentando R^2 de 0,9956 e erro RMSEc de 1,9306 sendo uma ferramenta aplicável na predição de concentrações de cafeína e teobromina em mistura de pós por FTIR-ATR.

O método cromatográfico adaptado mostrou-se adequado para a quantificação de cafeína e teobromina nos meios reacionais, além de proporcionar a separação de produtos de degradação formados nas diversas condições reacionais. Assim o método cromatográfico foi adotado com a finalidade do monitoramento reacional, indicando o consumo de cafeína e a formação dos produtos de transformação.

A otimização do método cromatográfico permite a coleta de frações pós-coluna para a posterior utilização de técnicas analíticas complementares como espectrometria de massas, a fim de identificar os produtos de degradação.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira, volume 2** Brasília, Brasil, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeias-virtuais>>
- BILKAN, M. T. Structural and spectroscopic studies on dimerization and solvent-ligand complexes of Theobromine. **Journal of Molecular Liquids**, v. 238, p. 523–532, 2017.
- BONDESSON, L. et al. Hydrogen bonding effects on infrared and Raman spectra of drug molecules. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 2, p. 213–224, 2007.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira** Brasília, Brasil Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2010.
- D.SKOOG; S.CROUCH; D.WEST Y J. HOLLER. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [s.l.] Thomson, 2009.
- DE LUCA, S. et al. Simultaneous quantification of caffeine and chlorogenic acid in coffee green beans and varietal classification of the samples by HPLC-DAD coupled with chemometrics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 28748–28759, 2018.
- FERREIRA, M. M. C. et al. **Chemometrics i: Multivariate calibration, a tutorial** *Quimica Nova*, 1999.
- GONZÁLEZ-CALDERÓN, D. et al. Síntesis de la cafeína a partir de la teobromina: Retomando un experimento remoto bajo una nueva perspectiva. **Educacion Quimica**, v. 26, n. 1, p. 9–12, 2015.
- GUNASEKARAN, S.; SANKARI, G.; PONNUSAMY, S. Vibrational spectral investigation on xanthine and its derivatives - Theophylline, caffeine and theobromine. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 1–2, p. 117–127, 2005.
- HACKETT, J.; TELEPCHAK, M. J.; COYER, M. J. Analysis of total caffeine and other xanthines in specialty coffees using mixed mode solid-phase extraction and liquid chromatography-diode-array detection after microwave digestion. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, n. 8, p. 695–701, 2008.
- JEON, J. S. et al. Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1064, n. April, p. 115–123, 2017.
- JOHNSON, I. M. et al. Spectral Analysis of Naturally Occurring Methylxanthines (Theophylline, Theobromine and Caffeine) Binding with DNA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 11, 2012.
- JOHNSON, N. O. et al. Anion-Caffeine Interactions Studied by ¹³C and ¹H NMR and ATR-FTIR Spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 7, p. 1649–1659, 2017.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.
- MARIA, C. A. B. DE; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise.

Quimica Nova, v. 30, n. 1, p. 99–105, 2007.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: A novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003–2010, 2012.

PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 261–266, 2002a.

PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. A rapid FTIR spectroscopic method for estimation of caffeine in soft drinks and total methylxanthines in tea and coffee. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2507–2511, 2002b.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 2. ed. [s.l.] Cengage Learning, 2015.

PERRONE, D.; DONANGELO, C. M.; FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 1030–1035, 2008.

POBUDKOWSKA, A.; DOMAŃSKA, U.; KRYSKA, J. A. The physicochemical properties and solubility of pharmaceuticals - Methyl xanthines. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 79, p. 41–48, 2014.

Pubchem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

RUSSO, M. et al. Use of an Online Extraction Technique Coupled to Liquid Chromatography for Determination of Caffeine in Coffee, Tea, and Cocoa. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 10, p. 2637–2644, 2018.

SCHENKEL, E. P. et al. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 304–307, 2007.

SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, V. B. Ab initio and DFT studies of the structure and vibrational spectra of anhydrous caffeine. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 45–50, 2013.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2004.

TEWARI, B. B. et al. An overview of molecular spectroscopic studies on theobromine and related alkaloids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 47, n. 3, p. 163–179, 2012.

UCUN, F.; SAĞLAM, A.; GÜÇLÜ, V. Molecular structures and vibrational frequencies of xanthine and its methyl derivatives (caffeine and theobromine) by ab initio Hartree-Fock and density functional theory calculations. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 67, n. 2, p. 342–349, 2007.

WELDEGEBREAL, B.; REDİ-ABSHIRO, M.; CHANDRAVANSI, B. S. Development of new analytical methods for the determination of caffeine content in aqueous solution of green coffee beans. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, 1987.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics.

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 58, n. 2, p. 109–130, 2001.

XIA, J. et al. Vibrational (FT-IR, Raman) analysis of tea catechins based on both theoretical calculations and experiments. **Biophysical Chemistry**, v. 256, n. July 2019, 2020.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ZHONG, J. et al. Measurement and Correlation of Solubility of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in Water and Organic Solvents at Various Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 62, n. 9, p. 2570–2577, 2017.

**CAPÍTULO 3 - DEGRADAÇÃO DA CAFEÍNA: AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS
FENTON, TIPO-FENTON E ÁCIDO ASCÓRBICO**

RESUMO

O aumento do consumo de alimentos e produtos industrializados, como consequência do crescimento populacional, acarretam a geração de resíduos que se acumulam contaminando o solo e recursos hídricos. Ao abordar alimentos e medicamentos, tem-se a presença de diversas substâncias químicas persistentes no ambiente, como a cafeína que é considerada um micropoluente emergente. A cafeína é estável e muito solúvel em água, permanecendo nos cursos d'água mesmo após tratamento em estações de esgoto. Procedimentos adicionais para remoção dos contaminantes são necessários, destacando-se processos oxidativos avançados como as condições Fenton. Este trabalho objetiva um estudo de condições Fenton e tipo-Fenton, abrangendo processos homogêneos e heterogêneos, para promover a degradação da cafeína em solução aquosa simulada priorizando condições reacionais brandas, bem como possibilitar o entendimento das reações envolvidas. Assim foram avaliados os parâmetros de relação H_2O_2/Fe^{2+} , a influência do pH, catalisadores (Fe^{2+} , Fe^{3+} , óxidos/hidróxidos de ferro), a temperatura, a influência de ácido ascórbico e a ação de sequestradores de radicais HO^\cdot , na degradação da cafeína e promoção de sua mineralização. As reações foram monitoradas por cromatografia líquida de alta eficiência a fim de verificar a concentração de cafeína e formação dos produtos de reação, sendo determinados o consumo de H_2O_2 ao longo da reação; e os valores pH, teor de ferro e teor de carbono orgânico, após 24 horas de reação. Confirmou-se a estabilidade da cafeína nos meios neutro, ácido e mesmo exposta a H_2O_2 ou íons ferro isoladamente. A condição Fenton demonstrou ser uma opção atrativa para a remoção de contaminantes, com degradação de aproximadamente 80% em condições brandas (2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3, 24 h) até completa remoção em excesso de reagentes. As avaliações dos parâmetros reacionais comprovaram o pH ótimo em torno de 3, o estado de oxidação Fe^{2+} mais ativo e os efeitos positivos da concentração dos íons ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) e da temperatura na degradação da cafeína. Constatou-se os efeitos redutores e promotores do ciclo Fe^{3+}/Fe^{2+} do AA, quando adicionado ao sistema Fenton, capaz de promover um incremento na formação de radicais HO^\cdot , resultando em aproximadamente 70% de degradação da cafeína, em 10 minutos de reação. Também foi constatado a degradação de cafeína ao utilizar AA isoladamente, atuando como promotor da reação. A variação das condições oxidantes e a utilização de sequestradores de radicais evidenciaram a via de reação mediada por radicais. No processo heterogêneo não foi observada degradação relevante da cafeína. A estabilidade da cafeína, bem como a formação de produtos recalcitrantes foi comprovada, já que não obteve sua mineralização em excesso de reagentes.

Palavras-chave: Catálise oxidativa. Processo Fenton aplicado a cafeína. Degradação mediada por ácido ascórbico.

ABSTRACT

The increased consumption of food and industrialized products, as a result of population growth, lead to the generation of waste that accumulates contaminating the soil and water resources. When approaching food and medicine, there is the presence of several persistent chemical substances in the environment, such as caffeine, which is considered an emerging micropollutant. Caffeine is stable and very water soluble, remaining in water courses even after treatment in sewage plants. Additional procedures for contaminant removal are needed highlighting advanced oxidative processes such as Fenton conditions. The work deals with a study of Fenton and Fenton-like conditions, covering homogeneous and heterogeneous processes, to promote the degradation of caffeine in simulated aqueous solution prioritizing mild reaction conditions, as well as to enable the understanding of the reactions involved. Thus, the parameters of the $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ratio, the influence of pH, catalysts (Fe^{2+} , Fe^{3+} , iron oxides/hydroxides), temperature, the influence of ascorbic acid and the action of HO^\cdot radical scavengers on the degradation of caffeine and promoting its mineralization. The reactions were monitored by high-performance liquid chromatography in order to verify the concentration of caffeine and the formation of reaction products, with the consumption of H_2O_2 being determined throughout the reaction; and pH values, iron content and organic carbon content after 24 hours of reaction. The stability of caffeine in neutral and acidic media and even exposed to H_2O_2 or iron ions was confirmed. The Fenton condition proved to be an attractive option for the removal of contaminants, with degradation of approximately 80% under mild conditions (2 mM H_2O_2 , 0.6 mM Fe^{2+} , pH 3, 24 h) until complete removal of excess reagents. The evaluations of the reaction parameters confirmed the optimum pH around 3, the most active Fe^{2+} oxidation state and the positive effects of iron ion concentration (Fe^{2+} and Fe^{3+}) and temperature on caffeine degradation. It was verified the reducing and promoting effects of the $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ cycle of AA, when added to the Fenton system, capable of promoting an increase in the formation of HO^\cdot radicals, resulting in approximately 70% of caffeine degradation, in 10 minutes of reaction. Caffeine degradation was also found when using AA alone, acting as a reaction promoter. The variation of oxidizing conditions and the use of radical scavengers evidenced the reaction pathway by radicals. In the heterogeneous process, no relevant caffeine degradation was observed. The stability of caffeine, as well as the formation of recalcitrant products, was proven since it did not obtain its mineralization in excess of reagents.

Keynotes: Oxidative catalysis. Fenton process applied to caffeine. Ascorbic acid-mediated degradation.

1 INTRODUÇÃO

A cafeína é um componente orgânico presente em alimentos e medicamentos sendo muito consumida pelo homem. É uma substância persistente no ambiente devido a sua estabilidade química e alta solubilidade, sendo encontrada em águas residuais. Diante do consumo de produtos contendo cafeína, e o avanço das técnicas analíticas aplicadas na avaliação ambiental, tem-se verificado sua presença nos cursos d'água em locais de maior densidade populacional, evidenciando que os processos de tratamento utilizados nas estações de tratamento de esgoto são insuficientes, necessitando de procedimentos adicionais.

O acúmulo de cafeína acarreta danos ao meio ambiente, principalmente em organismos aquáticos. Nesse contexto, o trabalho visa avaliar condições reacionais para promover a degradação da cafeína em produtos facilmente degradáveis e atóxicos como CO₂ e água, minimizando os impactos ambientais decorrentes desse acúmulo. A utilização de processos catalíticos aplicados ao tratamento de contaminantes é interessante do ponto de vista ambiental e de inovação tecnológica, em consonância com os princípios da “Química Verde”. Assim, pretende-se avaliar processos oxidativos avançados (POA) por serem ambientalmente amigáveis e de baixo custo.

O processo Fenton é um tipo de POA aplicado à remoção de contaminantes, que utiliza o peróxido de hidrogênio e íons Fe²⁺, ambos de baixo custo e em pequena concentração, mostrando-se promissores. Desse modo, propõe-se a avaliação da degradação da cafeína utilizando a condição Fenton, além das condições: oxidações clássicas, processo tipo-Fenton, hidrólise; visando favorecer a remoção da cafeína e proporcionar uma comparação entre os processos. O estudo prioriza a utilização de condições reacionais brandas, mas também investiga a possibilidade de mineralização.

No âmbito do projeto, as variáveis avaliadas são os catalisadores, a concentração dos reagentes, o tempo e a temperatura de reação, a influência do pH e a adição de diferentes reagentes com vistas a promover um incremento nas reações ou ainda apontar seus mecanismos. O efeito dessas variáveis utilizadas é monitorado pela medida da concentração da cafeína em solução aquosa ao longo das condições reacionais, através da técnica de HPLC. Além de estimar a degradação da cafeína, a técnica de HPLC permite a verificação de produtos de transformação gerados ao longo das reações. Esses produtos podem ser estudados a título de identificação de rotas e mecanismos de reações.

Outras análises realizadas nesse monitoramento incluem: a determinação do consumo de H₂O₂, como forma de estimar a geração de radicais HO[·]; a determinação do teor de carbono

orgânico, para avaliação da mineralização promovida pela catálise; a medida do pH final, visando indicar produtos ácidos formados, bem como o consumo de espécies ácidas ou alcalinas; e a determinação do teor de ferro, de modo a estimar a lixiviação de íons ferro nas condições que empregam catalisador sólido.

O trabalho também envolve a pesquisa do efeito do ácido ascórbico nas reações catalíticas, uma vez que há relatos de regeneração dos catalisadores, e seu impacto na degradação da cafeína.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Contaminantes ambientais emergentes

Contaminantes emergentes são substâncias de uso contemporâneo compreendendo insumos farmacêuticos, componentes de produtos de higiene, pesticidas, produtos químicos industriais que são constantemente descartados no ambiente por várias fontes, capazes de contaminar os meios aquático e terrestre. Esses contaminantes são detectados em águas de superfície e em estações de tratamento de esgoto em quantidade crescente, decorrente do aumento de utilização desses produtos pela população e de sua persistência no ambiente (KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009; RIZZO et al., 2019).

Esses compostos atingem os cursos d'água pelo descarte de água residuária e efluentes industriais, hospitalares e domésticos e se acumulam devido a sua maior estabilidade uma vez que alguns compostos são desenvolvidos com esse propósito, principalmente princípios ativos. Assim, não são completamente removidos em estações de tratamento de esgoto, podendo apresentar efeitos fisiológicos em humanos e animais, mesmo em concentrações traço ou ultratraço (ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Nesse contexto, a cafeína que farmacologicamente é classificada como uma droga estimulante do sistema nervoso central, é considerada como poluente emergente (GANZENKO et al., 2015; KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009; KUMAR et al., 2019; TROVÓ et al., 2013). O grande consumo da cafeína, desde alimentos a medicamentos, justifica a sua crescente presença no ambiente, sendo detectada em efluentes de água como micropoluentes em decorrência de sua capacidade de persistência no ambiente (LI et al., 2020), estabilidade química e alta solubilidade, cerca de 20 g.L^{-1} em água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (O'NEIL; HECKELMAN; ROMAN, 1996).

O efeito da cafeína e de seus produtos de degradação no ambiente e nas espécies de vida aquática é pouco conhecido. Pesquisas apontam para alterações fisiológicas em organismos aquáticos como plantas, crustáceos (JANISSEN; HUYNH, 2018) e peixes (RODRIGUEZ et al., 2014), e terrestres como insetos (LI et al., 2020), inclusive o homem (KUMAR et al., 2019; RIZZO et al., 2019).

Resultados de estudos demonstraram que as concentrações de alguns princípios ativos em cursos d'água apresentam variação sazonal, relacionado com doenças respiratórias e alérgicas, além de evidências relacionadas a características demográficas como a idade da população (PAÍGA et al., 2019).

Os compostos detectados nas águas residuais atuam como marcadores químicos antropogênicos indicando aspectos de consumo. Essa característica de persistência no ambiente da cafeína, e seu consumo constante pelo homem, possibilita seu emprego no monitoramento ambiental como um biomarcador de ocupação humana, relacionando seu teor com o índice demográfico (FERREIRA, 2006; MAR DA COSTA et al., 2016; PAÍGA et al., 2019), ou através de seu metabólito ácido 1,7-dimetilúrico, que é excretado na urina e avaliado em águas residuais (GRACIA-LOR et al., 2017).

Dessa forma, a cafeína foi capaz de indicar níveis de contaminação de ecossistemas aquáticos urbanos, sendo detectada em águas residuais (FERREIRA, 2006). Em estudo realizado na cidade de Brasília, avaliou-se a qualidade da água do Lago Paranoá e as estações de tratamento de água, e detectou diferentes concentrações de cafeína indicando sua remoção parcial pelas estações de tratamento. Sua concentração variou em relação aos pontos de coleta no Lago Paranoá de 98 a 212 $\mu\text{g.L}^{-1}$, coerente com pontos de poluição e densidade populacional, demonstrando que a cafeína é um indicador eficiente de contaminação doméstica do sistema aquático (MAR DA COSTA et al., 2016).

As concentrações residuais de cafeína atingem todos continentes e revelam a preocupação dos possíveis impactos adversos nos ecossistemas e na saúde humana, justificando a busca por processos amigáveis que promovam sua degradação (GANZENKO et al., 2015; GRACIA-LOR et al., 2017; LI et al., 2020).

Por outro lado, sabe-se que a cafeína não é eficientemente removida nas estações de tratamento de esgoto, com valores que variam de 38 a 99% em diferentes estações de tratamentos de efluentes. Comparativamente, os processos POA apresentam melhorias em sua remoção desde amostras simuladas à resíduos reais (GANZENKO et al., 2015; GRACIA-LOR et al., 2017).

2.2 Processo oxidativo avançado

Os processos oxidativos avançados (POA) são um conjunto de métodos de tratamento químico baseados na geração de radicais e aplicados na remoção de matéria orgânica de fase aquosa, sendo uma das alternativas de tratamento de fontes poluídas de água da rede pública urbana ou industrial. Nos POA ocorrem a produção de radicais oxidantes, principalmente hidroxila (HO^\cdot), que podem ser gerados do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reagente Fenton, ozônio, foto-catálise ou ainda de oxidante e luz UV (KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009), bem como processos derivados do Fenton que associam a radiação ou

eletroquímico; além de processos mediados por catalisadores heterogêneos (RIZZO et al., 2019).

A eficiência dos POA depende da taxa de geração dos radicais livre e do seu contato com os compostos orgânicos contaminantes (MIKLOS et al., 2018). A Tabela 1 resume algumas condições de reações de oxidação considerando a oxidação clássica, representada por permanganato, cloro e dicromato, e diferentes categorias de POA como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio e finalmente as reações em H_2O_2 catalisadas por metais de transição como sais de ferro.

Tabela 1 - Processos oxidativos com reações das espécies oxidantes e seus respectivos potenciais de redução.

Oxidante	Reação	E^0 (V)
Oxigênio	$\text{O}_2 (\text{g}) + 4\text{H}^+ (\text{aq}) + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	+ 1,23
Dicromato	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} (\text{aq}) + 14\text{H}^+ (\text{aq}) + 6\text{e}^- \rightarrow \text{Cr}^{3+} (\text{aq}) + 7\text{H}_2\text{O}$	+ 1,33
Cloro	$\text{Cl}_2 (\text{g}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Cl}^- (\text{aq})$	+ 1,36
Permanganato	$\text{MnO}_4^- (\text{aq}) + 8\text{H}^+ (\text{aq}) + 5\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}^{2+} (\text{aq}) + 4\text{H}_2\text{O}$	+ 1,51
Peróxido	$\text{H}_2\text{O}_2 (\text{aq}) + 2\text{H}^+ (\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	+ 1,77
Ozônio	$\text{O}_3 (\text{g}) + 2\text{H}^+ (\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2 (\text{g}) + \text{H}_2\text{O}$	+ 2,07
Radical hidroxila	$\text{HO}^\cdot + \text{R-H} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	+ 2,80

Fonte: Adaptado de Atkins e Jones (2011); Skoog, Crouch e Holler (2009).

De forma geral, um oxidante é um átomo, íon ou molécula que retira elétrons de outra molécula/átomo apresentando valores de potencial de redução elevados. O manganês apresenta grande variedade de estados de oxidação, e o íon permanganato (MnO_4^-) é um forte oxidante.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um forte oxidante mas pouco efetivo devido a baixa taxa de reação. Assim, outras substâncias são adicionadas com H_2O_2 no intuito de aumentar as taxas de reações, reduzindo seu tempo, pela rápida formação de radicais hidroxila (HO^\cdot) como metais de transição, ozônio, radiação UV-vis (NEYENS; BAEYENS, 2003).

O radical hidroxila (HO^\cdot) apresenta o maior potencial de oxidação, indicando que tem maior poder de degradação de contaminantes com taxas de reação mais rápidas que os demais processos. Esse forte oxidante não é seletivo, ou seja, ataca todas as moléculas presentes no meio, promovendo a quebra de compostos orgânicos com geração de moléculas menores e mais facilmente degradadas.

Os POA podem ser divididos em processos homogêneos e heterogêneos, esses últimos ocorrem na presença de catalisadores sólidos. Considerando a ausência de radiação tem-se os

seguintes processos homogêneos: Fenton, ozônio, H_2O_2 . No âmbito dos processos heterogêneos tem-se a utilização de H_2O_2 , tipo-Fenton, O_3 com catalisadores metálicos ou sólidos suportados.

Muitos contaminantes não são eliminados por tratamentos de água convencionais, assim os POA surgem como forma de tratamento capaz de promover a mineralização dos poluentes, mas com algumas desvantagens relacionadas com a toxicidade de catalisadores metálicos. Entretanto os processos Fenton são considerados seguros por utilizar químicos atóxicos. Processos Fenton homogêneo tem algumas limitações como faixa de pH e geração de lodo contendo ferro, aumentando as possibilidades para os sistemas heterogêneos (KUMAR et al., 2019).

POA empregando reagentes Fenton são efetivos para a remoção de diversos poluentes orgânicos de águas residuais (NEYENS; BAEYENS, 2003), sendo aplicados para degradação de cafeína por processos homogêneos Fenton e tipo-Fenton (OLIVEIRA et al., 2015). Outros processos aplicados na remoção de cafeína incluem foto-Fenton (TROVÓ et al., 2013; YAMAL-TURBAY; GRAELLS; PÉREZ-MOYA, 2012) e electro-Fenton (GANZENKO et al., 2015).

2.3 Processo Fenton

O processo de oxidação que utiliza íons Fe^{2+} como catalisador em fase homogênea contendo H_2O_2 é denominado Fenton. É um método atraente para o tratamento de águas residuais contaminadas, devido ao poder de oxidação aliado a facilidade de obtenção dos reagentes (H_2O_2 e sais de ferro), a facilidade de manuseio e segurança ambiental capaz de transformar poluentes orgânicos em compostos inofensivos como CO_2 , água e sais inorgânicos. Os processos tipo-Fenton se assemelham ao Fenton porém incluem a utilização de outros materiais catalisadores e são muito utilizados para POA, devido a sua simplicidade, rapidez e ampla aplicação (NEYENS; BAEYENS, 2003; RIBEIRO et al., 2016).

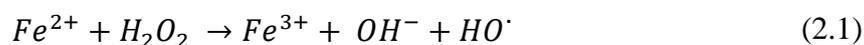
Originalmente, o processo Fenton foi proposto por Henry J. Fenton, relatando que H_2O_2 poderia ser ativado por sais de ferro $2+$ para oxidar ácido tartárico (FENTON, 1894). Em 1934, Haber e Weiss propuseram que o oxidante ativo é o radical hidroxila ($HO\cdot$). Esse processo continuou a ser estudado e aplicado se tornando de grande relevância nas áreas de química, biologia e tratamento de resíduos (PIGNATELLO; OLIVEROS; MACKAY, 2006).

O processo de oxidação que emprega reagente Fenton ocorre na presença de íons ferrosos com H_2O_2 para a formação de radicais hidroxila. O processo Fenton é considerado uma reação de oxidação catalisada por metal, com o ferro como catalisador, que promove a

mineralização de grande parte dos poluentes tornando os efluentes menos tóxicos (KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009). O processo pode ser homogêneo ou heterogêneo, dependendo do catalisador, quando dissolvido em solução ou utilizando material sólido (KUMAR et al., 2019).

2.3.1 Reações Fenton

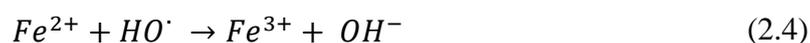
O mecanismo de decomposição do H_2O_2 na presença de íons ferro II consiste de uma série de reações cuja reação principal ocorre em maior velocidade, representada na equação (2.1).



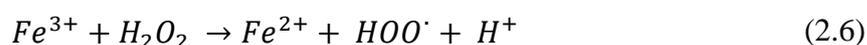
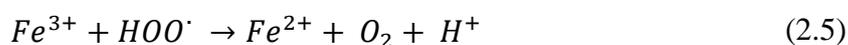
A destruição dos compostos orgânicos ocorre majoritariamente após a formação dos radicais $HO\cdot$, a partir da mistura dos reagentes Fenton (H_2O_2 e Fe^{2+}) em solução aquosa. As reações radiculares ocorrem pela abstração de um átomo de hidrogênio do composto orgânico (R-H) gerando o radical orgânico, como representado pela equação (2.2), que reage sucessivamente formando subprodutos até, no melhor dos casos, promover a mineralização com formação de água e dióxido de carbono, equação (2.3), desde que as concentrações dos reagentes não sejam limitantes.

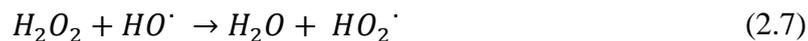


As reações radiculares são probabilísticas, ou seja, quanto mais espécies maior a escala de reação. Quando a concentração do contaminante for reduzida, há aumento da tendência de reações radiculares de terminação, equação (2.4).

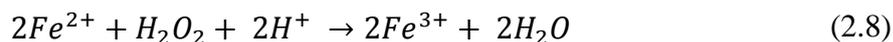


Pode ocorrer ainda a regeneração dos íons ferrosos (Fe^{2+}), equações (2.5) e (2.6) e a remoção de $HO\cdot$ pelo excesso de H_2O_2 ou do Fe^{2+} , equações (2.7) e (2.4) (NEYENS; BAEYENS, 2003; PIGNATELLO; OLIVEROS; MACKAY, 2006).





A equação (2.8) representa a química Fenton global, considerando a água de dissociação e sugerindo a presença de H^+ na decomposição do H_2O_2 para produção de máxima quantidade de radicais hidroxila (NEYENS; BAEYENS, 2003).



2.3.2 Parâmetros que afetam a condição Fenton

A oxidação Fenton depende de parâmetros operacionais de pH, razão e concentração de Fe^{2+}/H_2O_2 , temperatura e concentração do poluente. Ambos excesso na concentração de H_2O_2 e Fe^{2+} acarretam efeito sequestrante dos radicais hidroxila (KUMAR et al., 2019).

O efeito do aumento da temperatura no processo Fenton acarreta a decomposição do H_2O_2 , que pode gerar os radicais hidroxila (ZAZO et al., 2011), favorecendo a mineralização de contaminantes.

A reação Fenton é adequadamente obtida em condições ácidas, com maior eficiência em valor de pH próximo de 3 a 4, decorrente da formação de $Fe(OH)_2$ que é mais reativo que Fe^{2+} , além de minimizar a produção de lodo ($Fe(OH)_3$) (PIGNATELLO; OLIVEROS; MACKAY, 2006). Em valores de pH acima de 4 ocorre a formação de complexos constituindo pequenos materiais suspensos (coagulação) e posteriormente sua precipitação, que retiram íons ferro da solução. Por outro lado, quando o pH é muito baixo, inferior a 2,5, há formação de $(FeOH)^{2+}$ que reage mais lentamente com H_2O_2 e reduz a eficiência de degradação (SHEMER; KAC; LINDEN, 2006).

A influência da dosagem de H_2O_2 na degradação de cafeína foi avaliada, mantendo a concentração de $10 \text{ mg.L}^{-1} Fe^{2+}$ constante (YAMAL-TURBAY; GRAELLS; PÉREZ-MOYA, 2012). O aumento da concentração de H_2O_2 resulta em maior geração de $HO\cdot$ levando a maior taxa de degradação, entretanto a concentração excessiva pode induzir reações antogonistas (RIZZO et al., 2019). A proporção dos reagentes Fe^{2+} , H_2O_2 em relação aos compostos orgânicos (RH) é um importante parâmetro e necessita ser otimizada de modo a maximizar a eficiência do processo de degradação no processo Fenton. Dependendo da relação $H_2O_2/FeSO_4$, quando a quantidade de Fe^{2+} excede a de H_2O_2 , há uma tendência ao efeito de coagulação, pela formação de complexos (NEYENS; BAEYENS, 2003). Bautitz e Nogueira (2007) avaliaram a relação de H_2O_2/Fe nas proporções molares 5, 15, 25, 50 e 100, mantendo fixa a concentração

de Fe 0,2mM, variando a concentração de H₂O₂ em 1, 3, 5, 10 e 20 mM. Os resultados apontam que as concentrações de H₂O₂ na faixa de 1 a 5 mM foram semelhantes (correspondente as razões de 5 a 15), e que relação H₂O₂/Fe maior que 10 resulta em excesso de H₂O₂ em solução e o conseqüente sequestro dos radicais hidroxila, em conformidade com a equação (2.7) descrita acima. Essa faixa de proporção molar foi confirmada em trabalho posterior cuja condição que proporcionou maior degradação de cafeína foi com razão molar dos reagentes Fenton H₂O₂/Fe de 10/3 (OLIVEIRA et al., 2015).

Há uma desvantagem do processo Fenton que é a formação de lodo contendo hidróxido de ferro III como subproduto ao longa da reação. Assim etapas adicionais são necessárias para tratamento do lodo (BOLOBAJEV; TRAPIDO; DULOVA, 2015).

2.4 Catálise heterogênea

A catálise heterogênea se apresenta como alternativa principalmente devido às desvantagens da catálise homogênea, como a restrição da faixa de pH operacional para evitar a formação e precipitação de ferro oxihidróxidos, e a necessidade de recuperar os íons dissolvidos gerados na solução (KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009).

Suas aplicações incluem a remoção de contaminantes emergentes, mas ainda pouco abordada em grandes escalas, como já é realidade na catálise homogênea, devido a limitações técnicas e de custo, sendo considerado um método com perspectiva de longo prazo (RIZZO et al., 2019). Muitos materiais sólidos têm sido investigados para promover a mineralização de poluentes como argilas e zeólitas (ANIS; HAYDAR, 2019).

No processo heterogêneo pode ocorrer a remoção do contaminante por mecanismos distintos: a adsorção e a catálise, decorrente de reações que ocorrem nos sítios ativos da superfície do catalisador. Os principais benefícios da catálise heterogênea são devido a ampla faixa de pH e da recuperação do catalisador sólido ou imobilização do catalisador em um suporte sólido permitindo que esse material seja convenientemente adicionado ao meio reacional e posteriormente coletado para reaproveitamento (KUMAR et al., 2019). Quando Fe²⁺ ou Fe³⁺ está presente na fase sólida, o processo é definido como processo heterogêneo tipo-Fenton (DE FREITAS et al., 2019).

Fatores que afetam a atividade catalítica incluem o estado de oxidação de íons ferro, a presença de promotores de transferência de elétrons, como o boro (MESQUITA et al., 2016) ou o cromo (CHAGAS et al., 2019), bem como o tamanho dos poros e a área superficial do catalisador (GONÇALVES et al., 2019).

Em relação a aplicação do processo Fenton heterogêneo na oxidação da cafeína, foram estudadas nanopartículas de ferro suportadas em zeólita (ANIS; HAYDAR, 2019) e dispersão de óxido de ferro em carvão ativado obtido de resíduos de café (GONÇALVES et al., 2013), porém existem poucos trabalhos de utilização de catálise heterogênea para remoção da cafeína.

Comparativamente com os processos homogêneos, o processo tipo-Fenton heterogêneo apresenta a desvantagem da pequena reatividade, resultando em menor eficiência. Um fator da menor reatividade e da limitação na reutilização de materiais sólidos é o lento ciclo Fe^{3+}/Fe^{2+} , mas que pode ser contornado com a adição de AA. A combinação de AA ao sistema heterogêneo $Fe@Fe_2O_3$ foi aplicada e exibiu maior atividade na decomposição de H_2O_2 produzindo $HO\cdot$ (HOU et al., 2016a). A avaliação do processo oxidativo com goethita e hematita proporcionou maior ativação de H_2O_2 na presença de AA, independente do pH do meio, sem a liberação de íons ferro em solução. Sugere-se que a decomposição de H_2O_2 é na superfície do catalisador com a coordenação do $AA-Fe^{3+}$, seguido da transferência de elétrons do AA gerando Fe^{2+} (HOU et al., 2018).

2.5 Processo de oxidação catalítica com peróxido de hidrogênio

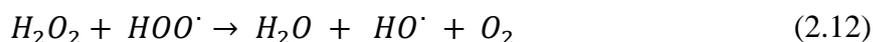
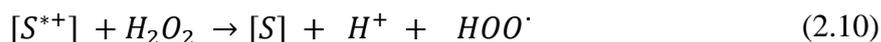
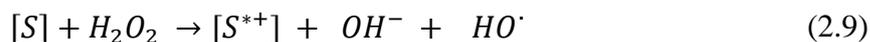
O processo de oxidação catalítica com o peróxido de hidrogênio (CWPO, do inglês *Catalytic wet peroxide oxidation*) é um POA emergente que emprega um catalisador sólido e H_2O_2 em solução aquosa. É um processo promissor para o tratamento de águas poluídas devido a eficiência de degradação de componentes orgânicos recalcitrantes de rejeitos industriais e urbanas, com um custo operacional relativamente baixo por ser em temperatura e pressão ambiente e sem a necessidade de radiações. Apresenta ainda a vantagem de utilizar rejeitos para a produção de materiais catalisadores, tais como composto gerado de resíduos urbanos (ROMAN et al., 2021) ou biomassa de rejeito agroindustrial como bagaço de cana-de-açúcar (DIAZ DE TUESTA et al., 2021).

Os materiais catalisadores contendo ferro são os mais comuns no CWPO, e podem ser classificados como sólidos não-suportados (ferro de valência zero, minerais de ferro, misturas de óxidos metálicos, materiais carbonáceos) ou suportados (materiais carbonáceos, argila, compostos orgânicos, estrutura organo-metálica suportados) podendo ainda conter outros metais (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}). Esses materiais podem apresentar como vantagens a possibilidade de remoção de contaminantes sem a geração de lodo e possibilidade de trabalhar em ampla faixa de pH (RUEDA MÁRQUEZ; LEVCHUK; SILLANPÄÄ, 2018).

O processo possibilita a utilização de H₂O₂ juntamente com catalisador não limitados a sais de ferro (RIZZO et al., 2019). Outros materiais incluem materiais carbonáceos ativados quimicamente e livres de metais (MARTIN-MARTINEZ et al., 2017, 2018) em que as reações ocorrem nos sítios que promovem a transferência de elétrons (RIBEIRO et al., 2013).

A aplicação desse processo depende do tipo de catalisador e pode ser afetado por pH, temperatura, concentração de H₂O₂ e pela carga do contaminante (RUEDA MÁRQUEZ; LEVCHUK; SILLANPÄÄ, 2018).

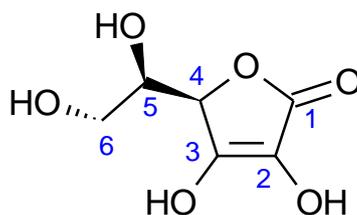
O mecanismo de reação é semelhante ao processo homogêneo, e a decomposição H₂O₂ ocorre em um sítio ativo do catalisador sólido (S) como uma superfície oxidante ou partícula de metal de transição, de acordo com as equações (2.14)(2.15)(2.16)(2.17) (MARTIN-MARTINEZ et al., 2016).



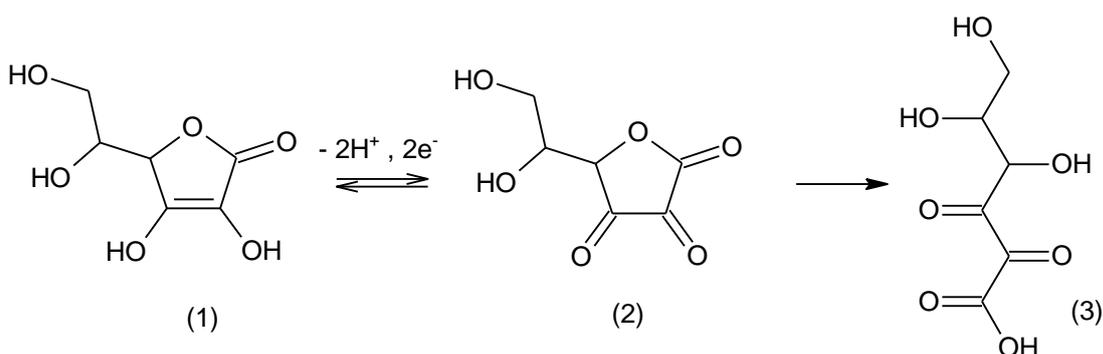
CWPO é efetivo para o tratamento de substâncias farmacêuticas em diferentes matrizes aquosas verificada por diminuição TOC, empregando catalisadores baseados na magnetita aplicado a remoção de diclofenco e ibuprofeno (HUACCALLO-AGUILAR et al., 2021), ou outros compostos aromáticos como hormônios do estradiol e antibióticos macrolídeos (MUNOZ et al., 2017).

2.6 Reações do ácido ascórbico

O ácido *L*-ascórbico (AA), conhecido como vitamina C, é um componente químico orgânico (C₆H₈O₆) de caráter ácido (Figura 1), com dois grupos hidroxila ionizáveis de pKa₁ 4,25 e pKa₂ 11,79, conforme equação (2.13) sendo o monoânion ascorbato dominante em pH neutro. É uma substância solúvel em água, com reconhecida atividade antioxidante que mantém o pleno funcionamento de uma série de enzimas, sendo de grande importância nas áreas da bioquímica, farmacêutica e alimentícia (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; HOU et al., 2017; LIANG; LIN; SHIU, 2016).

Figura 1 - Representação estrutural do ácido *L*-ascórbico (AA).

As reações de oxidação do AA ocorrem com a liberação de dois H^+ dos carbonos 2 e 3, e de elétrons de forma reversível. Inicialmente há liberação de íon H^+ em solução, seguida da perda de um elétron gerando o radical *L*-ascorbato (AH^\cdot), que se dissocia liberando H^+ para gerar o intermediário monodeidroascorbato (radical $A^{\cdot-}$). A perda do segundo elétron forma o ácido *L*-deidroascórbico, representando como A ou AA_{ox} . Por sua vez, AA_{ox} pode ser hidrolisado formando ácido 2,3-dicetogulônico (ADG) que sofre novas oxidações resultando espécies menores, contendo 5 ou menos carbonos (DEUTSCH, 1998; FORNARO; COICHEV, 1998). A Figura 2 representa as reações de oxidação do AA a AA_{ox} e sua hidrólise formando ADG.

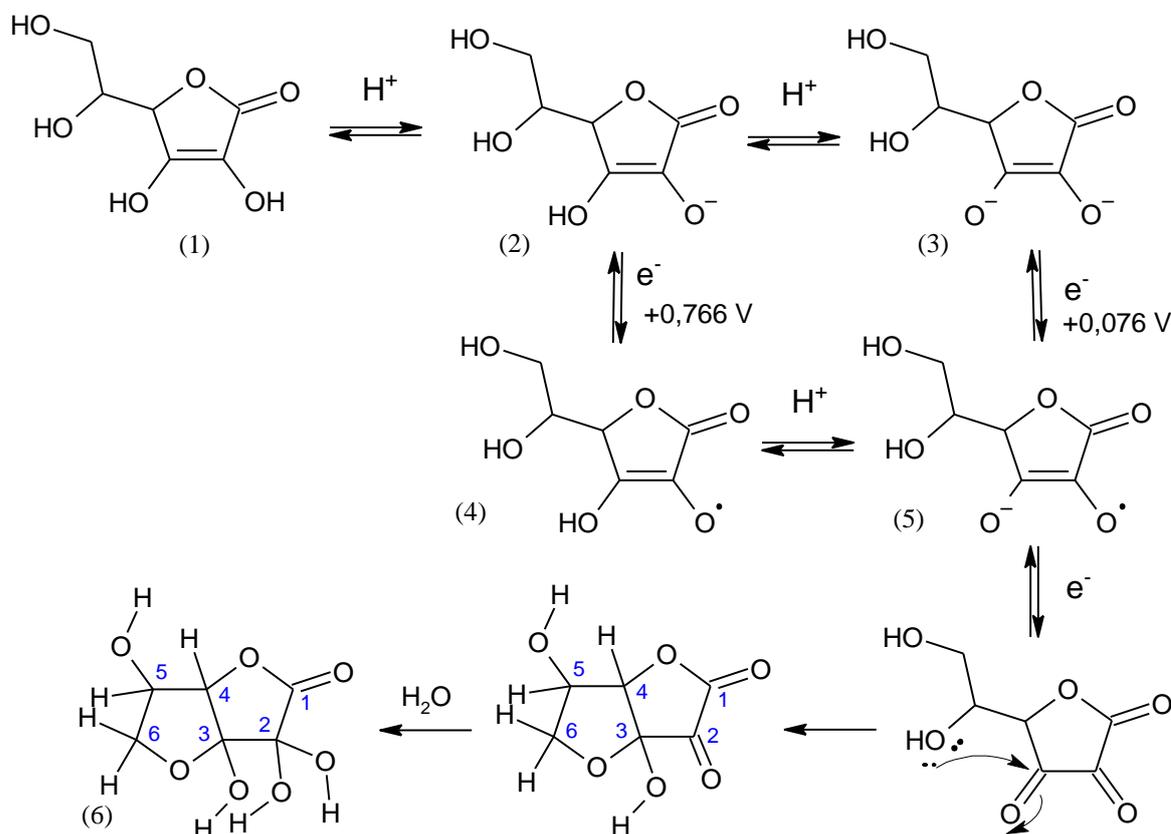
Figura 2 - Reação de oxidação do AA (1) a AA_{ox} (2) e hidrólise formando ADG (3).

Fonte: Coichev (1998).

AA é considerado um antioxidante incomum pois pode doar um único equivalente redutor, se oxidando ao intermediário monodeidroascorbato (radical $A^{\cdot-}$), que posteriormente reage preferencialmente com outras espécies radiculares ou pode sofrer reação de desproporcionamento dependente de pH, gerando ascorbato AH^- e AA_{ox} (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). Cada uma dessas espécies do AA apresentam diferentes valores de constantes ácidas e potenciais de redução em solução aquosa, assim AA tem a habilidade de

doar um ou dois elétrons (FORNARO; COICHEV, 1998). A formação de AA_{ox} sucede para sua forma bicíclica hidratada (AH₂O) que é mais estável (Figura 3) (NJUS et al., 2020).

Figura 3 – Representação das espécies químicas do ácido ascórbico nos estados de protonação e oxidação, onde AA (1), AH⁻ (2), A²⁻ (3), AH[•] (4), A^{•-} (5), AH₂O (6).



Fonte: Adaptado de NJUS et al. (2020).

As propriedades redutoras do AA são mais pronunciadas com o aumento do pH (FORNARO; COICHEV, 1998), que atua como um removedor de radicais livres ambientalmente amigável, sendo completamente oxidado em meios ácidos, neutro e alcalinos com diferentes taxas reacionais $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente (HOU et al., 2017).

O AA apresenta importante função antioxidante endógeno, doando um elétron para radicais oxidantes potencialmente prejudiciais ao organismo como radicais HO[•], RO[•], peróxido (LOO[•]), tiol (GS[•]) e tocoferoxil (TO[•]), resultando no radical monodeidroascorbato (A^{•-}) que é relativamente não reativo (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). Por outro lado, o AA apresenta efeitos pró-oxidantes em certas condições, como na presença de íons metálicos catalíticos ao regenerar íon Fe²⁺, podendo reagir com oxigênio e produzir H₂O₂ e radicais HO[•]. Sua taxa de

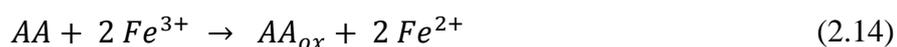
oxidação depende do valor de pH do meio e é acelerada por catalisadores metálicos (DEUTSCH, 1998; DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; STADLER; FAY, 1995).

Também foi comprovado que o próprio AA pode gerar radicais HO[·] na presença de Fe²⁺, em experimento realizado sem H₂O₂, porém em menor extensão verificado pela degradação da desoxiribose de aproximadamente 20% (ZHAO; JUNG, 1995) e que íons ferro aumentam a taxa de oxidação do AA a AA_{ox} (WECHTERSACH; CIGIĆ, 2007).

Outra constatação é que AA afeta a estabilidade de H₂O₂, principalmente em presença de íons ferro, por decomposição catalítica do H₂O₂ em pouco tempo. No entanto, deve ser avaliada sua concentração: em baixa concentração de AA, o excesso de íons ferro decompõe H₂O₂, já acima da concentração ótima de AA, ocorre decomposição do H₂O₂ promovida pelo excesso de AA (NARVÁEZ HERNÁNDEZ; MIRANDA VIDALES; MARTÍNEZ-FLORES, 2014).

O AA forma complexos com íons metálicos, dependendo do pH do meio. Em sua forma ionizada, pH acima de 5, o íon ascorbato complexa com Fe²⁺ com relação 1:1 [FeAA] / [Fe²⁺].[A²⁻] e com constante de equilíbrio log k 1,99. Diferentemente, o íon ascorbato pode formar quelato bidentado ao Fe³⁺, promovendo a redução do Fe³⁺ a Fe²⁺ (FORNARO; COICHEV, 1998).

Em pH neutro predomina a forma ascorbato (AH⁻) que reage prontamente com O₂ mediado por espécies metálicas mesmo em quantidades traço. A atividade catalítica dos metais e ascorbato pode produzir ou destruir H₂O₂ (KRAMARENKO et al., 2006). O AA é capaz de promover redução com liberação de 2 elétrons, reduzindo metais oxidados, como Fe³⁺, e também compostos orgânicos em condições ácidas (LIANG; LIN; SHIU, 2016). O AA pode aumentar a formação de radicais HO[·] em sistemas Fenton, devido às suas propriedades redutoras conforme equação (2.14) (ELMAGIRBI; SULISTYARTI, 2012; ZHAO; JUNG, 1995).



O efeito da presença e da concentração de AA intermediando a formação de radicais HO[·], gerados da condição Fenton, foi avaliado em estudo da degradação de desoxiribose cujo máximo de degradação está relacionado com o máximo de radicais gerados. As condições reacionais foram 3 mM desoxiribose, 0,85 mM H₂O₂, 0,03 mM Fe²⁺, 0,045 mM EDTA em 15 minutos de reação. Verificou-se que a presença de AA aumenta a taxa de reação e degradação da desoxiribose, com máximo de degradação (90%) a 0,65 mM AA e razão molar H₂O₂/ Fe²⁺

de 28:1. Foi verificado dois comportamentos opostos do AA no sistema Fenton: em baixas concentrações, o AA promove aumento na produção de HO[·] através da regeneração de Fe²⁺ e formação de H₂O₂, equações (2.15) e (2.16); após uma concentração ótima, maiores concentrações (acima de 5 mM) AA retém HO[·] com uma taxa de 1,2 x10¹⁰ M⁻¹s⁻¹ (ZHAO; JUNG, 1995).



Na ausência de metais catalíticos e dependendo do valor de pH, AA pode sofrer auto-oxidação gerando H₂O₂ equações (2.17) e (2.16) (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012).



Qualquer radical superóxido (O₂^{·-}) formado é imediatamente desmembrado para formar H₂O₂ ou reage com ascorbato, que também forma H₂O₂ juntamente com A^{·-}, com razão molar 1:1 (KRAMARENKO et al., 2006).

Numerosas investigações têm sido conduzidas na combinação de AA e íons metálicos, como ferro, no intuito de promover a oxidação de moléculas orgânicas. Foi demonstrado que AA é capaz de acelerar a degradação de poluentes orgânicos durante o processo Fenton heterogêneo, além de sua concomitante degradação, minimizando possíveis efeitos ambientais adversos (HOU et al., 2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Ácido acético glacial P.A, hidróxido de sódio P.A, ácido sulfúrico P.A, cloreto de ferro II tetra hidratado P.A, sulfato ferroso heptahidratado P.A, cloreto de ferro III hexahidratado P.A, peróxido de hidrogênio 30% P.A, sulfito de sódio P.A, oxissulfato de titânio P.A, ácido L-ascórbico P.A, 1,10-fenantrolina P.A; acetato de amônio P.A, silicone, clorofórmio P.A, etanol 95% P.A, gás nitrogênio e ar sintético, água de osmose reversa, água destilada, água ultrapurificada (tipo I), acetonitrila (grau HPLC), metanol (grau HPLC). Cafeína e teobromina (Sigma-Aldrich) com pureza superior a 98%.

3.2 Equipamentos

Estufa de secagem (Quimis), reator com sistema fechado e temperatura programável (Parr), balança analítica (Shimadzu), mini centrífuga (Kasvi), agitador magnético com aquecimento (IKA), pHmetro (Imolab), espectrofotômetro UV/Vis (PG Instruments), analisador TOC (Shimadzu), pipeta automática, microseringa 25 µL (Hamilton), sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Jasco) constituído por degaseificador, bomba quaternária PU 2089 Plus, detector UV 2075 Plus, coluna cromatográfica (Varian e Kromasil) C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm), sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu) constituído por degaseificador DGU-20, bomba quaternária LC-20AT, auto-amostrador SIL-20A, módulo de comunicação CBM-20A, detector DAD SPD-M20A, forno de coluna CTO-20AC, coluna cromatográfica (Supelco) C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm), espectrofotômetro UV-Vis (Espectro Vision), membrana filtrante 0,45 µm (Millex).

3.3 Preparo das soluções de trabalho

As condições para a degradação da cafeína por processo Fenton foram adaptadas de Oliveira (2015) e Trovó (2013).

O preparo de solução aquosa de cafeína a 1 mM correspondente a aproximadamente 0,2 g.L⁻¹, como realizado em estudo de N-desmetilação por engenharia genética (ALGHARRAWI; SUMMERS; SUBRAMANIAN, 2017) e de sua degradação como micropoluente (TROVÓ et al., 2013). Adicionou-se cerca de 200 mg de cafeína em balão

volumétrico de 1 L, seguido de adição de água deionizada e agitação, após solubilização o volume foi completado.

A concentração de peróxido de hidrogênio foi obtida a partir de alíquotas da solução peróxido de hidrogênio 3,0% cujo preparo se deu por diluição do reagente H_2O_2 30%. Assim uma alíquota dessa solução diluída de H_2O_2 (230 μL) foi utilizada em cada experimento, de modo a obter as concentrações desejadas de 1 e 2 mM como relatado na literatura (BAUTITZ; NOGUEIRA, 2007).

O efeito da concentração do catalisador foi avaliado em concentrações de 0,1 a 9,0 mM de íons ferro, conforme trabalhos anteriores (GANZENKO et al., 2015), utilizando cloreto de ferro II tetrahidratado P.A, sulfato ferroso heptahidratado P.A ou cloreto de ferro III hexahidratado P.A.

O pH das soluções aquosas foi ajustado com soluções de H_2SO_4 0,5 M ou HCl 0,5 M e NaOH 0,1 M.

As quantidades e proporções dos reagentes foram obtidas da literatura e modificadas ao longo dos testes. De acordo com Oliveira e colaboradores (2015), adotou-se a razão molar dos reagentes Fenton $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}$ de 10/3 como condição que proporcionou maior degradação de cafeína. Essa concentração de reagentes está de acordo com trabalho que avaliou as condições Fenton e tipo-Fenton na degradação de contaminantes (BOLOBAJEV; TRAPIDO; DULOVA, 2015). Apesar de algumas modificações necessárias à avaliação da influência dos reagentes e suas concentrações na seletividade dos produtos, a concentração geral adotada para os reagentes Fenton foi 0,07 g.L^{-1} de H_2O_2 (correspondente a 2 mM) e 0,03 g.L^{-1} de Fe^{2+} (0,6 mM), com pH ajustado para 3 utilizando-se solução de H_2SO_4 0,5M.

3.4 Procedimento experimental preliminar baseado nos oxidantes convencionais e Fenton

Em diferentes erlenmeyers contendo solução de cafeína 1,03 mM, foram adicionados os reagentes dicromato de potássio ou permanganato de potássio, representando condições oxidantes clássicas, além da condição Fenton, sendo avaliadas as temperaturas de 25 °C e 50 °C por 6 horas de reação (Tabela 2). Para o preparo das condições oxidantes convencionais duas concentrações reacionais (1 mM e 10 mM) foram obtidas da diluição a partir das soluções estoque 1 M de KMnO_4 e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, sendo adicionado quantidades estequiométricas de ácido sulfúrico para cada condição. Na condição Fenton não foi ajustado o pH, sendo apenas verificado (pH inicial 5,9).

Tabela 2 - Condições reacionais dos experimentos preliminares para a oxidação da cafeína.

Experimento	Condição	Reagentes	T (°C)
1	Fenton	1 mM H ₂ O ₂ , 0,3 mM Fe ³⁺	25
2	Fenton	1 mM H ₂ O ₂ , 0,3 mM Fe ³⁺	50
3	Dicromato 1 mM	1 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	25
4	Dicromato 1 mM	1 mM de K ₂ Cr ₂ O ₇	50
5	Dicromato 10 mM	10 mM K ₂ Cr ₂ O ₇	50
6	Permanganato 1 mM	1 mM KMnO ₄	25
7	Permanganato 1 mM	1 mM KMnO ₄	50
8	Permanganato 10 mM	10 mM KMnO ₄	50

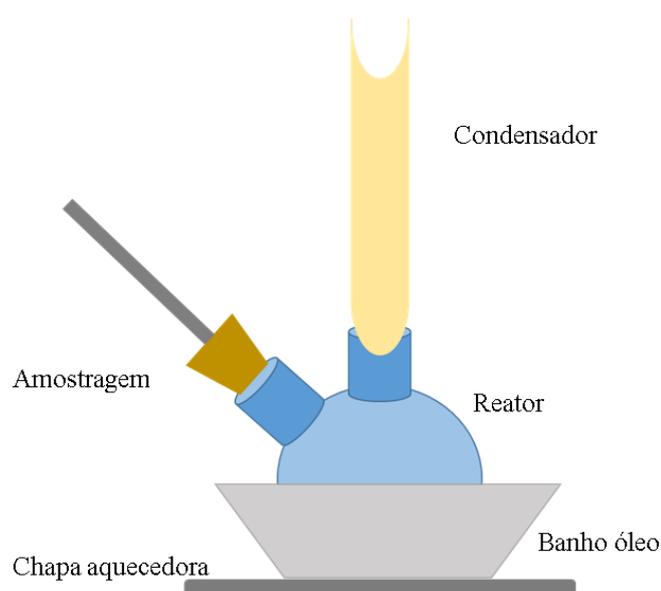
Fonte: Do autor (2021).

3.5 Procedimento experimental baseado no processo Fenton

Um modelo de reação foi realizado de modo a propiciar o processo Fenton, utilizando sais Fe²⁺, e tipo-Fenton, com sais Fe³⁺, em H₂O₂ e operação em batelada por tempo de até 24 horas, para avaliar a degradação da cafeína com pH inicialmente ajustado para 3, adaptando as condições de Oliveira e colaboradores (2015).

A reação foi realizada em reator de vidro (250 mL) acoplado a condensador de refluxo sob agitação magnética e aquecimento com banho de silicone, conforme Figura 4.

Figura 4 - Representação do sistema reacional.



Fonte: Do autor (2021).

Ao reator adicionou-se 100 mL da solução aquosa de cafeína com o pH devidamente ajustado conforme teste (adição gota-a-gota de solução de ácido sulfúrico 0,5 M). Posteriormente, adicionou-se quantidade adequada da solução de peróxido de hidrogênio e do catalisador (FeCl_2 , FeCl_3 ou FeSO_4), conforme avaliação pretendida. Após adição dos reagentes, iniciou-se a contagem do tempo, tendo como principais tempos 0, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 360 e 1440 minutos para monitoramento do consumo de H_2O_2 e degradação da cafeína. Ao fim de cada teste, procedeu-se a verificação do pH e do teor de carbono orgânico e total (TOC).

Após os experimentos iniciais, outros testes com diferentes condições experimentais foram conduzidos de modo a elucidar a influência de diferentes reagentes e otimizar a degradação da cafeína, resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Experimentos e condições reacionais para a degradação da cafeína (1 mM) nos processos Fenton, tipo-Fenton e AA.

Exp	H_2O_2 (mM)	Fe (mM)	T(°C)	pH	Reagentes
9	1	Fe^{2+} (0,3)	50	3	ajuste H_2SO_4
10	2	Fe^{2+} (0,6)	25	3	ajuste H_2SO_4
11	30	Fe^{2+} (9)	50	3	ajuste H_2SO_4
12	1	Fe^{2+} (0,3)	25	3	ajuste H_2SO_4
13	2	-	25	3	ajuste HCl
14	2	Fe^{2+} (0,6)	25	3	ajuste HCl
15	2	Fe^{3+} (0,6)	25	3	ajuste HCl
16	2	Fe^{3+} (0,6)	25	3	ajuste H_2SO_4
17	2	Fe^{3+} (0,6)	25	2	ajuste H_2SO_4
18	2	Fe^{2+} (0,6)	25	2	ajuste H_2SO_4
19	2	Fe^{2+} (0,6)	25	7	-
20	2	Fe^{3+} (0,6)	25	7	-
21	2	Fe^{2+} (0,6)	5	7	-
22	-	-	25	13	Solução NaOH 0,1M
23	2	Fe^{2+} (0,6)	25	10	ajuste NaOH
24	2	Fe^{2+} (0,6)	25	3	aj H_2SO_4 , AA 1mM
25	2	Fe^{2+} (0,6)	5	7	AA 1mM
26	2	Fe^{2+} (0,6)	25	3	H_2SO_4 , 10% etanol
27	2	Fe^{2+} (0,6)	25	3	AA 1 mM, 10% etanol

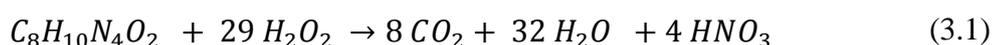
(Continua)

Exp	H ₂ O ₂ (mM)	Fe (mM)	T(°C)	pH	Reagentes
28	-	-	25	7	-
29	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	10	NaOH, AA 1mM, 10% etanol
30	1	Fe ²⁺ (0,3)	25	7	AA 1mM
31	1	Fe ²⁺ (0,1)	25	7	AA 2mM
32	-	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	AA 1mM
33	-	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	AA 2mM
34	-	-	25	7	AA 1mM
35	-	-	25	7	AA 2mM
36	-	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	-
37	-	Fe ²⁺ (0,6)	25	3	ajuste H ₂ SO ₄
38	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	10% metanol
39	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	10% metanol, AA 1mM
40	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	10% acetronitrila
41	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	10% acetoneitrila, AA 1mM
42	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	10% clorofórmio
43	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	10% clorofórmio, AA 1mM

Fonte: Do autor (2021).

De forma resumida, os experimentos avaliaram o efeito da concentração dos reagentes Fenton (experimentos 9, 10 e 11); diferentes catalisadores Fe²⁺, Fe³⁺ ou ausência do íon ferro em pH 3 (experimentos 13, 14, 15 e 16) e pH 2 e 7 (experimentos 17, 18, 19 e 20); efeito da adição do ácido ascórbico (AA) na condição Fenton (experimentos 24, 30, 31) ou na ausência de H₂O₂ (experimentos 32, 33, 34 e 35); efeito isolado dos íons Fe²⁺ (experimentos 36 e 37); efeito da temperatura de resfriamento (experimentos 21 e 25); efeito dos sequestradores de radicais etanol (experimentos 26, 27 e 28) ou outros solventes (experimentos 38, 39, 40, 41, 42, 43) a 10% (v/v); efeito do meio alcalino na hidrólise da cafeína e sua influência na reação Fenton (experimentos 22, 23 e 29).

O experimento 3 foi realizado utilizando quantidade de H₂O₂ suficiente para mineralizar a cafeína, conforme (3.1) (MUNOZ et al., 2017).



Substâncias orgânicas inseridas no meio reacional podem agir como promotores ou inibidores das reações radicalares. Assim, o ácido ascórbico (AA) foi investigado como promotor reacional; enquanto outras substâncias como etanol, metanol, acetonitrila e clorofórmio foram utilizadas para avaliação da atividade sequestradora de radicais.

3.6 Procedimento experimental de catálise heterogênea

Os experimentos da catálise heterogênea partiram da extrapolação dos resultados obtidos na condição homogênea e parâmetros reportados na literatura (ANIS; HAYDAR, 2019).

A capacidade de degradação da cafeína por materiais sólidos foram avaliadas nas condições experimentais: como ausência de ajuste do pH (pH da solução de cafeína é próximo a 7) e diferentes massas de catalisadores: i. adição de 16 mg dos catalisadores Goethita, Goethita dopada Cromo, Goethita dopada Cobalto, Goethita dopada Cobre e Magnetita correspondente a concentração de $0,32 \text{ g.L}^{-1}$ do catalisador em 50 mL de solução de cafeína $0,2 \text{ g.L}^{-1}$; ii. adição de 50 mg de Goethita e Magnetita correspondente a concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ do catalisador em 25 mL de solução de cafeína $0,2 \text{ g.L}^{-1}$. Nesses testes foram avaliadas a adsorção de cafeína, considerado o tempo de 1 hora de contato da solução com o catalisador, seguido da adição de 2 mM de H_2O_2 determinando o início do processo catalítico.

A Tabela 4 apresenta as condições experimentais adotadas para a catálise heterogênea.

Tabela 4 - Experimentos da catálise heterogênea e carga de catalisador para a degradação da cafeína (1 mM) no processo heterogêneo utilizando 2 mM H_2O_2 a 25 °C e pH 7.

Experimento	Carga (g.L^{-1})	Materiais
44	0,32	Goethita
45	0,32	Goethita cromo
46	0,32	Goethita cobalto
47	0,32	Goethita cobre
48	0,32	Magnetita
49	2,0	Goethita
50	2,0	Magnetita

Fonte: Do autor (2021).

3.7 Preparo das amostras para análise

Durante os experimentos catalíticos, alíquotas foram coletadas visando monitorar a reação e possibilitar estudos cinéticos. O reagente Na₂SO₃ foi adicionado em excesso nas alíquotas destinadas a avaliação do teor de cafeína e TOC, para a remoção do H₂O₂ remanescente, interrompendo a reação Fenton de modo a proporcionar uma avaliação mais exata (TROVÓ et al., 2013).

A cada tempo de reação decorrido, duas amostras foram colhidas e transferidas para diferentes frascos: i. uma amostra de aproximadamente 0,6 mL foi transferida para eppendorf contendo cerca de 200 mg de Na₂SO₃. Esta foi agitada e submergida em banho de gelo com posterior centrifugação. Dessa amostra, 0,2 mL do sobrenadante foi diluído para balão volumétrico de 5 mL e reservado para determinação de cafeína e teobromina por HPLC ; ii. outra amostra de aproximadamente 1,4 mL foi transferida para outro eppendorf (sem Na₂SO₃) e resfriado em banho de gelo. Desse, 1,0 mL foi transferido para balão volumétrico de 20 mL contendo 1,0 mL de solução H₂SO₄ 0,5 M e 0,1 mL de TiOSO₄, posteriormente o volume foi completado com água deionizada. Essa solução foi utilizada na análise de consumo de H₂O₂ por espectrofotometria a 405 nm.

3.7.1 Determinação da concentração da cafeína e produtos por HPLC

As alíquotas amostradas em cada tempo foram analisadas por HPLC para a determinação do teor da cafeína e dos produtos de transformação.

O método analítico de HPLC compreende: coluna cromatográfica de fase reversa Kromasil C18 de 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e partículas de 5 micrômetros, solução de ácido acético 0,5 % (pH verificado aproximadamente 3,0) e acetonitrila na proporção 9:1, ou alternativamente água e acetonitrila 9:1 como fase móvel. Volume de injeção de 10 µL. Detecção dos analitos monitorada em 272 nm, comprimento de onda relativo ao máximo de absorção da cafeína, com tempo de corrida de 14 minutos.

A concentração de cafeína no meio reacional foi determinada com os dados obtidos da curva de calibração da cafeína na faixa de $2,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ g.L⁻¹, com coeficiente de determinação (R²) de 0,9996. A conversão da cafeína foi calculada da razão entre a variação do número de mol e o número de mols no início da reação, equação (3.2).

$$C = \Delta mol / mol_i \quad (3.2)$$

A quantificação dos produtos de transformação da cafeína foi obtida por comparação das áreas dos picos das amostras com os dados obtidos da curva de calibração da teobromina na faixa de $1,1 \times 10^{-3}$ a $5,2 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹, com coeficiente de determinação (R²) de 0,9998.

A seletividade de formação dos produtos foi calculada da razão entre o mol do produto e a variação do número de mols da cafeína, multiplicado por 100 (%), equação (3.3). O rendimento de cada produto foi calculado da razão entre o mol do produto e o número de mols da cafeína no início da reação, multiplicado por 100 (%), equação (3.4).

$$S = \frac{\text{mol prod}}{\Delta \text{mol cf}} \quad (3.3)$$

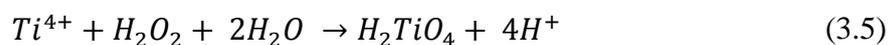
$$R = \frac{\text{mol prod}}{\text{mol cf}_i} \quad (3.4)$$

Diante da verificação de produtos de degradação, novas amostras foram analisadas empregando HPLC/DAD para a obtenção dos espectros na região do UV. Foi utilizado coluna cromatográfica de fase reversa Supleco C18 de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro com partículas de 5 micrômetros; mistura de água e acetonitrila (9:1) como fase móvel. Tempo de corrida de 20 minutos e detecção dos analitos monitorada em 272 nm e volume de injeção de 10 µL. A curva de calibração foi obtida por injeção dos padrões, apresentando coeficientes de determinação (R²) de 0,9998 para a cafeína e 0,9994 para a teobromina.

3.7.2 Determinação de H₂O₂ por espectroscopia no UV-Vis

A concentração de H₂O₂ remanescente foi determinada empregando espectroscopia na região do UV-Vis por reação com oxissulfato de titânio (IV) (TiOSO₄) como descrito por Ribeiro e colaboradores (2013). Utilizando solução de concentração conhecida de H₂O₂ a $5,1 \times 10^{-1}$ g.mL⁻¹ foram preparadas soluções diluídas para construção da curva de calibração na faixa de $2,55$ a $30,6 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹, compreendendo a concentração de 10 a 120% de H₂O₂ do meio reacional, com coeficiente de correlação (R²) de 0,9999.

Após coleta das amostras nos tempos determinados, seguiu-se a diluição e reação com TiOSO₄ em meio ácido. Verifica-se desenvolvimento de coloração amarelo decorrente da formação do ácido pertitânico (H₂TiO₄) com intensidade proporcional à concentração de H₂O₂ presente, conforme equação (3.5) (EISENBERG, 1943).



Procedeu-se a leitura das absorvâncias a 405 nm em cubeta de 1 cm, realizando análise do branco com água ou, nos casos de coloração da amostra, a própria solução reacional sem a adição do reagente TiOSO_4 .

3.7.3 Determinação do teor de carbono orgânico e total

Para a avaliação da mineralização promovida nas reações (TROVÓ et al., 2013), procedeu-se as análises de determinação do teor de carbono total, orgânico e inorgânico realizadas em equipamento automático, na faixa de trabalho calibrada de 20 a 100 ppm. A partir da concentração inicial de carbono na solução de cafeína $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, correspondente a cerca de 99 ppm de conteúdo de carbono, e de acordo com a faixa de trabalho fixada foi definido a realização do teste sem a diluição da amostra. Assim cada batelada teve um etapa de filtração e, posteriormente, análise direta no analisador TOC (Shimadzu).

3.7.4 Determinação de ferro

A avaliação da presença e do teor de ferro se faz necessária nos experimentos que empregam catálise heterogênea já que é indicativo de lixiviação de ferro do material avaliado. A análise de ferro foi realizada por método espectrofotométrico na região do UV/Vis por reação com 1,10-fenantrolina com formação de complexo avermelhado com intensidade proporcional à concentração de ferro presente.

Utilizando solução estoque de ferro, foram preparadas soluções diluídas para construção da curva de calibração compreendendo a faixa de concentração de $0,0$ a $3,6 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ de ferro, com linearidade apresentando coeficiente de determinação de 0,993. Foram preparadas as soluções reagentes: solução de ácido *L*-ascórbico $12,5621 \text{ g.L}^{-1}$; solução de 1,10-fenantrolina $2,0 \text{ g.L}^{-1}$; solução tampão acetato de amônio/ácido acético contendo 12,5 g de acetato de amônio e 35 mL de ácido acético para um balão volumétrico de 50 mL com volume preenchido com água ultrapura (MARTIN-MARTINEZ et al., 2016).

Ao fim de cada experimento, uma alíquota de 10 mL foi reservada para determinação de ferro. A partir dessa alíquota foram preparadas duas soluções com e sem 1,10-fenantrolina, relativas à amostra de leitura e ao branco respectivamente: i. a um balão volumétrico de 20 mL, transferiu-se 4,0 mL da amostra do experimento, seguido de 500 μL de solução de ácido ascórbico e agitação. Após repouso de 30 minutos, necessário a promover a redução das espécies presentes a Fe^{2+} , adicionou-se 500 μL de solução de 1,10-fenantrolina e de 1,0 mL da solução tampão. Por fim a solução foi deixada em abrigo da luz por 24 horas; ii. mesmo preparo

anterior substituindo-se a solução de 1,10-fenantrolina por água deionizada. Procedeu-se a leitura das absorvâncias a 510 nm em cubeta de 1 cm comparando-se os valores medidos com a equação obtida na curva de calibração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

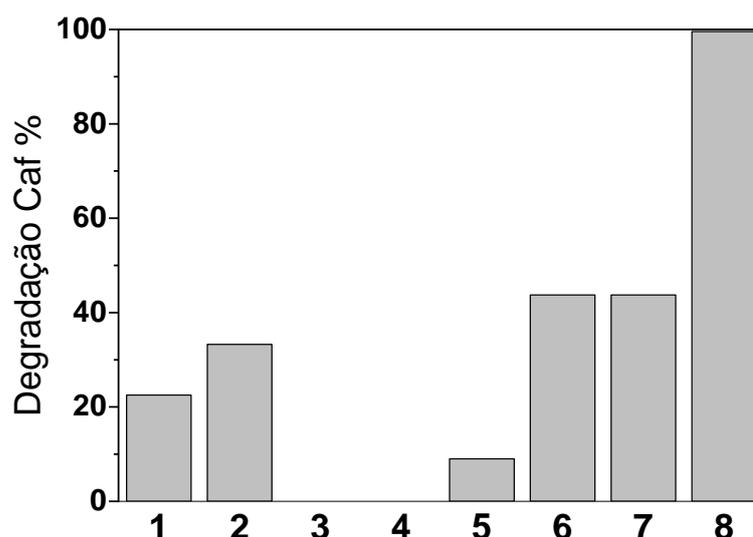
A concentração da solução de cafeína foi definida em $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, equivalente a $1,03 \text{ mM}$, sendo submetida a diferentes condições reacionais para sua degradação. Ao avaliar o teor de carbono da solução preparada foi obtido $102,1 \text{ ppm}$ de TOC, valor próximo e coerente com o teórico de 99 ppm (ou mg.L^{-1}).

Foi realizado o monitoramento da solução de cafeína utilizada nos experimentos com o pH ajustado para 3, sendo mantida estoque com a finalidade de avaliar sua estabilidade que foi obtida por mais de 10 dias por análise de HPLC. Assim foi possível constatar que a cafeína é estável em meio ácido.

4.1 Testes preliminares e oxidação convencional

Algumas condições oxidativas foram realizadas visando uma avaliação preliminar da degradação da cafeína. Assim foram avaliadas as condições de oxidação convencional com dicromato de potássio e permanganato de potássio, paralelamente a um ensaio inicial Fenton, por 6 horas de reação (Figura 5).

Figura 5 - Degradação da cafeína nos experimentos preliminares Fenton e condições oxidantes convencionais.



Nota: (1)* $1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, $0,3 \text{ mM Fe}^{3+}$, pH 6, $25 \text{ }^\circ\text{C}$; (2)* $1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, $0,3 \text{ mM Fe}^{3+}$, pH 6, $50 \text{ }^\circ\text{C}$; (3)* 1 mM dicromato , $25 \text{ }^\circ\text{C}$; (4)* 1 mM dicromato , $50 \text{ }^\circ\text{C}$; (5)* 10 mM dicromato , $50 \text{ }^\circ\text{C}$; (6)* $1 \text{ mM permanganato}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$; (7)* $1 \text{ mM permanganato}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$; (8)* $10 \text{ mM permanganato}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

Os experimentos 1 e 2, preliminares da condição tipo-Fenton, apresentaram valores de 22% e 33% na degradação da cafeína com as temperaturas de 25 °C e 50 °C, respectivamente. Evidencia-se um aumento da degradação da cafeína em maiores temperaturas (50 °C), necessitando da avaliação de outras condições como a concentração dos reagentes na degradação da cafeína.

Pode-se observar diferenças significativas entre as condições oxidantes dicromato e permanganato. Enquanto os experimentos que utilizaram dicromato de potássio não promoveram a degradação da cafeína, os experimentos empregando permanganato de potássio apresentaram degradação superior a 40%, com a completa degradação na maior proporção de permanganato 10 mM. Esses resultados estão em conformidade com o poder de oxidação dos reagentes, dicromato (1,33) e permanganato (1,51).

O íon permanganato tem sido utilizado com sucesso na remoção de contaminantes orgânicos, em molécula contendo anel imidazólico (semelhante a cafeína) em que promoveu oxidação seletiva na ligação C-H do anel imidazólico, na faixa de pH 5 a 9 (JIANG et al., 2020). Em investigação sobre as alterações químicas nos compostos orgânicos, constatou-se que compostos aromáticos contendo nitrogênio e alquilbenzenos são oxidados por permanganato, formando compostos alifáticos contendo nitrogênio ou ácido benzóico, mas sem promover a mineralização de matéria orgânica dissolvida (LASZAKOVITS; SOMOGYI; MACKAY, 2020).

De acordo com os resultados dos experimentos 6 e 7, conduzidos com permanganato em diferentes temperaturas, constata-se que o aumento da temperatura de 50 °C não implica em maior degradação da cafeína, descartando a possibilidade de utilização de altas temperaturas por apresentar custo ao processo, além de equipamentos apropriados.

Comparando-se os resultados mais promissores, tipo-Fenton e permanganato, nota-se maior degradação ao utilizar o permanganato, embora não seja mais eficiente uma vez que realizou a condição Fenton fora da faixa ótima de pH, além de utilizar íons ferro menos ativos no estado de oxidação 3+. O permanganato gera resíduo sólido que distancia do escopo da “Química Verde”, sendo utilizado neste trabalho com finalidade de comparação. Os POA são processos alternativos reconhecidamente vantajosos aplicados na remoção de poluentes ambientais, assim baseou-se nas condições oxidativas Fenton para promoção da degradação da cafeína em solução sintética/ simulada.

4.2 Avaliação das condições de processo Fenton

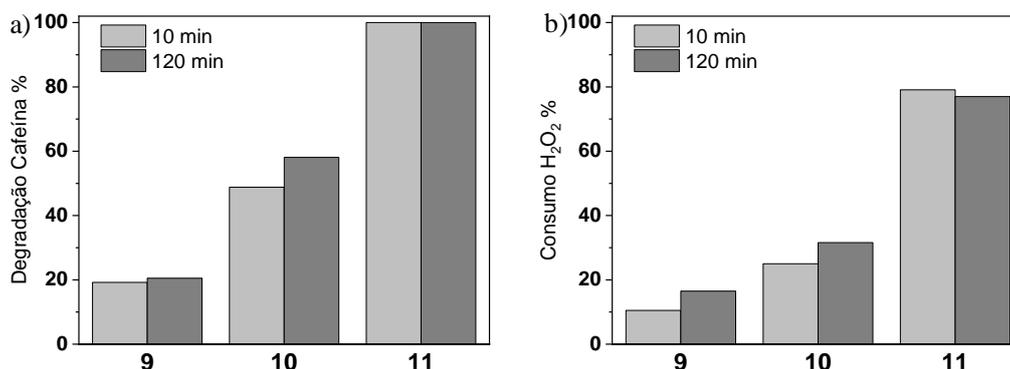
A partir dos ensaios preliminares, em que foi verificada a degradação da cafeína entre 20 e 40%, e os dados da literatura sobre experimentos de remoção de contaminantes por processo Fenton, foram avaliadas outras condições para as reações Fenton.

4.2.1 Concentração dos reagentes Fenton e temperatura

Inicialmente os experimentos foram planejados considerando a concentração de H_2O_2 na mesma razão molar da cafeína 1 mM (experimento 9) para promover a reação de oxidação em um sítio da molécula de cafeína. O experimento 10 utilizou o dobro da concentração de H_2O_2 (2 mM), capaz de promover a oxidação em extensão intermediária, atuando em dois sítios ou promovendo a oxidação de produto intermediário. Já o experimento 11 foi planejado utilizando quantidade de reagentes Fenton suficientes para a completa mineralização da cafeína, com 30 mM de H_2O_2 . Todos esses experimentos utilizaram íons Fe^{2+} suficientes para manter a razão molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ igual a 10/3, nas temperaturas 25 e 50 °C, abrangendo diferentes condições de modo a propiciar avaliação do comportamento da degradação da cafeína desde condições brandas de oxidação até condições suficientes para mineralização com formação de CO_2 e H_2O .

Os resultados são apresentados na Figura 6 ilustrando os gráficos de degradação da cafeína e consumo de H_2O_2 , nos tempos 10 e 120 minutos de reação. É possível constatar, como suposto, a completa degradação da cafeína nas condições mais severas (gráfico 'a', experimento 11), sem acarretar no entanto mineralização da matéria orgânica, evidenciado pelo teor de TOC 78,2 ppm, indicando que o produto de degradação da cafeína é estável e recalcitrante.

Figura 6 - Degradação da cafeína (a) e consumo de H₂O₂ (b) na avaliação da condição Fenton.



Nota: (9)* 1 mM H₂O₂, 0,3 mM Fe²⁺, pH 3, 50°C; (10)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 3, 25°C; (11)* 30 mM H₂O₂, 9,0 mM Fe²⁺, pH 3, 50°C. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

No experimento 9 verifica-se discreta degradação da cafeína, mesmo após 120 minutos de reação (20,5%), com 16,5% de consumo de H₂O₂ indicando pouca conversão ao radical HO[•]. Esses valores são semelhantes aos verificados no tempo de 10 minutos, indicando que a taxa de reação é lenta. Dessa forma, constata-se que essa condição é muito branda para a pretensão do estudo.

No experimento 10, em que utilizou o dobro da concentração dos reagentes Fenton e em temperatura ambiente (25 °C), obteve-se um aumento na degradação da cafeína (em cerca de 50%) e consumo de H₂O₂ (cerca de 30%). Também é possível observar a maior diferença dos resultados entre os tempos 10 e 120 minutos indicando a continuidade da reação. No tempo de 24 horas, obteve-se cerca de 80% de degradação da cafeína com 55% de consumo do H₂O₂, que comprova a remoção da cafeína ao longo do tempo, embora não seja capaz de promover sua mineralização cujo valor TOC foi de 100,3 ppm em 24 horas.

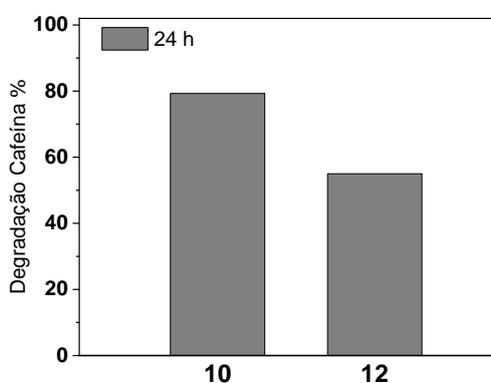
Já no experimento 11, em excesso de reagentes suficiente para promover a completa mineralização da cafeína, verificou-se a completa degradação da cafeína já em 10 minutos de reação. Também é possível notar o grande consumo de H₂O₂ verificado desde 10 minutos de reação, comprovando a decomposição do H₂O₂ com provável formação do radical hidroxila catalisador da degradação da cafeína. Após 120 minutos de reação foi avaliado o teor de carbono da solução apresentando valor de 78 ppm, que demonstra uma diminuição de cerca de 20% do inicial, indicando a formação de produtos recalcitrantes.

A adição de quantidade estequiométrica de H₂O₂ para promover a mineralização do contaminante foi adaptada de Alvarez-Torrellas (2017), que avaliou 6 princípios ativos farmacêuticos e constatou menor mineralização (cerca de 35%) no metronidazol, decorrente do

caráter refratário do anel imidazólico para oxidação, em comparação a outras substâncias aromáticas que foram as mais susceptíveis a mineralização. De forma análoga, infere-se a dificuldade na degradação da cafeína.

Uma variação do experimento foi realizada com a temperatura de 25 °C, experimento 12, que emprega metade dos reagentes da condição Fenton do experimento 10, 1 mM H₂O₂ e 0,3 mM de íons Fe²⁺ mantendo a razão molar H₂O₂/Fe de 10/3, para tentar esclarecer o impacto da concentração dos reagentes Fenton na degradação da cafeína Figura 7.

Figura 7 – Concentração dos reagentes Fenton na degradação da cafeína.



Nota: (10)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 3, 25°C; (12)* 1 mM H₂O₂, 0,3 mM Fe²⁺, pH 3, 25°C. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

Foi observado uma degradação da cafeína de aproximadamente 55% em 24 horas, cerca de 25% menor do que no experimento 10, indicando que a concentração dos reagentes Fenton (H₂O₂ e Fe²⁺) influenciam na geração dos radicais HO[•] e, conseqüentemente, na degradação da cafeína.

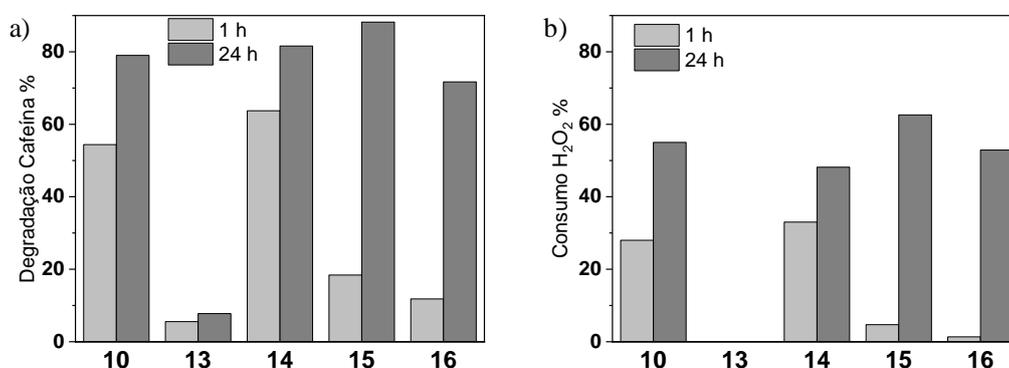
O efeito da temperatura não apresentou grande influência na degradação da cafeína. Como a utilização de aquecimento acarreta necessidade de utilização de chapas aquecedoras, além de custo operacional, procederam-se os experimentos seguintes a temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C.

Com base na avaliação desses resultados, verificou-se que no experimento 10 possibilita a degradação da cafeína ao longo do tempo, sem o emprego de excesso de reagentes, monitorando o efeito de modificações das condições reacionais. Assim foram fixados os valores de 2 mM H₂O₂ e 0,6 mM de íons ferro para prosseguimento dos ensaios seguintes e outras avaliações.

4.2.2 Influência do catalisador e do ácido utilizado no ajuste do pH 3

Uma série de experimentos foi realizada com intuito de avaliar a influência do catalisador íon ferro, bem como a importância do pH na condição baseada no processo Fenton por 24 horas. Avaliaram-se as condições sem a presença de catalisador (experimento 13) e a substituição do sal de ferro utilizado (Fe^{3+} , experimentos 15 e 16), bem como a substituição do ácido utilizado no ajuste do pH 3 (experimentos 13, 14 e 15). A Figura 8 apresenta os resultados de degradação da cafeína e consumo de H_2O_2 nessas condições.

Figura 8 - Influência do catalisador e do ácido para ajuste do pH na degradação da cafeína.



Nota: degradação da cafeína (a) e consumo de H_2O_2 (b) nos tempos 1 e 24 horas de reação dos experimentos: (10)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3 em H_2SO_4 , 25°C (para comparação); (13)* 2 mM H_2O_2 , sem íons ferro, pH 3 em HCl , 25°C; (14)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3 em HCl , 25°C; (15)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{3+} , pH 3 em HCl , 25°C; (16)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{3+} , pH 3 em H_2SO_4 , 25°C. * número do experimento.

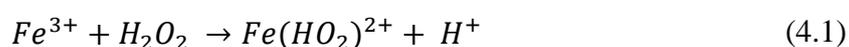
Fonte: Do autor (2021).

Uma reação na ausência do catalisador ferro foi realizada, experimento 13, demonstrando modesta degradação da cafeína inferior a 8%, sem consumo de H_2O_2 mesmo em 24 horas de reação. Por observação do gráfico de consumo de H_2O_2 , foi evidenciado a necessidade de íons ferro para geração de HO^\cdot que consumiria H_2O_2 . O ligeiro consumo de cafeína pode ser atribuído a degradação promovida pelo H_2O_2 que possui menor potencial de oxidação em relação ao radical hidroxila. Constatou-se a necessidade de utilização do catalisador (ferro) para promover decomposição do H_2O_2 gerando HO^\cdot e a posterior degradação da cafeína, evidenciando também que processos Fenton são mais eficientes.

Como esperado, não foram observadas diferenças significativas quanto ao ácido utilizado para ajuste do pH (solução de HCl ou H_2SO_4) na degradação da cafeína comparando-

se os experimentos 10 e 14 com íons Fe^{2+} , e experimentos 15 e 16 com íons Fe^{3+} . Dessa forma, nos experimentos seguintes foi utilizado solução H_2SO_4 0,5 M para o ajuste de pH ácido.

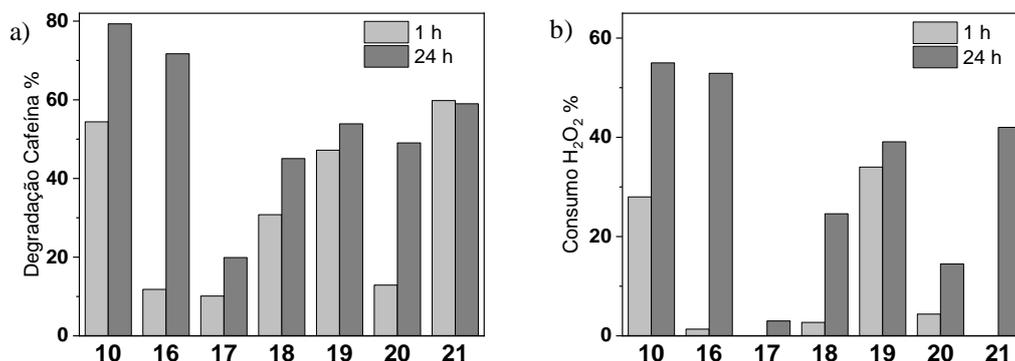
Considerando-se o estado de oxidação do íon ferro utilizado (sais $FeCl_2$ e $FeCl_3$) verifica-se menor degradação de cafeína no tempo de 1 hora ao utilizar Fe^{3+} , conforme apontamentos de Kwan e Voelker (2003), uma vez que Fe^{3+} proporciona geração mais lenta do radical hidroxila, passando pela geração *in situ* de íons Fe^{2+} , equações (4.1) e (4.2), ou gerar $HO\cdot$ pela decomposição do $Fe(HO_2)^{2+}$ intermediário, equação (4.3). A menor taxa de degradação do contaminante ao utilizar H_2O_2/Fe^{3+} em relação a H_2O_2/Fe^{2+} também foi observada por Bolobajev e colaboradores (2015 e 2016), confirmando os resultados obtidos no experimento.



4.2.3 pH reacional na presença do catalisador Fe^{3+} ou Fe^{2+}

Visando avaliar o valor de pH ótimo para promover a degradação da cafeína, outra série de experimentos foi realizada nos pH 2, ajustados com solução 0,5M H_2SO_4 e em pH 7, sem ajuste de pH. Nessa faixa de pH ácido a neutro foram empregados ambos os sais de ferro ($FeCl_2$ e $FeCl_3$). A Figura 9 apresenta os resultados obtidos para a degradação da cafeína e consumo de H_2O_2 para o tempo de 24 horas de reação.

Figura 9 – Avaliação do pH reacional na presença do catalisador Fe^{3+} ou Fe^{2+}



Nota: (10)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3 em H_2SO_4 , 25°C (para comparação); (16)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{3+} , pH 3 em H_2SO_4 , 25°C (para comparação); (17)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{3+} , pH 2, 25°C; (18)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 2, 25°C; (19)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 7, 25°C; (20)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{3+} , pH 7, 25°C; (21)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 7, 5°C. * número do experimento. Fonte: Do autor (2021).

Os experimentos 10 e 16 representam a condição Fenton em pH 3 utilizando Fe^{2+} e Fe^{3+} respectivamente, com maiores degradações de cafeína ao utilizar o Fe^{2+} . Os experimentos 17 e 18 representam a condição Fenton em pH 2 utilizando Fe^{3+} e Fe^{2+} respectivamente, revelando que da mesma forma ao utilizar o catalisador Fe^{3+} a reação é mais lenta e em menor extensão, e nesse caso fica evidente que o valor de pH exerce maior impacto. Em ambos experimentos, constata-se grande influência do pH, verificado pela diminuição na degradação da cafeína.

Os experimentos 19 e 20 representam a condição Fenton em pH 7 utilizando Fe^{2+} e Fe^{3+} respectivamente, revelando que da mesma forma ao utilizar o catalisador Fe^{3+} a reação é mais lenta e em menor extensão. O experimento 19 se diferencia do experimento 10 apenas pelo pH 7 utilizado, e apresentou menores valores de degradação da cafeína, sendo de aproximadamente 8 e 20% nos tempos 1 e 24 horas respectivamente, evidenciando o impacto do pH ácido na condição Fenton.

Na condição reacional do processo Fenton em pH 7 e submetido a resfriamento (5 °C), experimento 21, foram verificados valores de degradação da cafeína de aproximadamente 60% e 59% nos tempos de 1 e 24 horas. Comparativamente ao experimento 19, que foi na mesma condição com exceção da temperatura de 25 °C, os resultados foram ligeiramente superiores. Considerando a praticidade e custo operacional com manutenção de temperaturas controladas, optou-se por manter os testes em temperatura ambiente.

Ao se comparar o efeito da variação de pH na degradação da cafeína, verifica-se maior degradação em pH 3, seguido do pH 7 e menor degradação em pH 2. Esses resultados estão de acordo com relatos da literatura, em meio ácido para a condição Fenton e pH ótimo em 3, por

manter o ferro (Fe^{3+} ou Fe^{2+}) solubilizado e atuante na decomposição H_2O_2 para geração dos radicais hidroxila (PIGNATELLO; OLIVEROS; MACKAY, 2006; SHEMER; KAC; LINDEN, 2006).

Selecionando o catalisador mais efetivo Fe^{2+} , a diferença do pH 3 para o pH 7 representou uma diminuição de cerca de 7% e 25% nos tempos 1 e 24 horas, respectivamente. Considerando que o experimento 19 não passou pela etapa de ajuste de pH, sendo este apenas verificado, poderia ser uma vantagem pela diminuição de uma etapa do processo.

O gráfico do consumo de H_2O_2 indica resposta semelhante aos dados da degradação de cafeína, com maior consumo de H_2O_2 em pH 3, seguido de pH 7 e por fim pH 2, sendo também consumido em maior velocidade ao utilizar Fe^{2+} como catalisador (comparação dos experimentos 17 e 18 em pH 2, e exp. 19 e 20 em pH 7).

Ao fim do tempo de reação de 24 horas, os pH foram medidos e os resultados são apresentados Tabela 5. Verificou-se que nos experimentos realizados em meio ácido (pH 2 e 3) não houve alteração significativa dos valores de pH; já nos experimentos 19 e 20 realizados em meio neutro, tem-se diminuição do pH para cerca de 3,5. Essa observação pode ser decorrente da formação de espécies ácidas, como ácidos orgânicos de cadeia curta e íons inorgânicos (MUNOZ et al., 2017; SERRANO et al., 2018) além do ácido nítrico como um potencial produto final da degradação da cafeína, que favorecem a degradação da cafeína. Essa verificação indica a possibilidade de excluir a etapa de ajuste de pH.

Tabela 5 – Valores de pH no início e após 24 horas da reação.

Experimento	10	16	17	18	19	20
pH inicial	3,0	3,0	2,0	2,0	7,7	7,7
pH 24horas	3,1	2,9	2,0	1,9	3,6	3,3

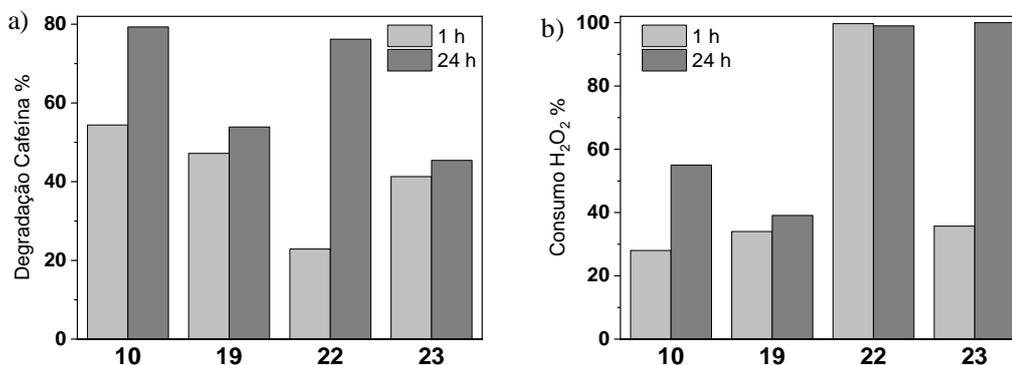
Fonte: Do autor (2021).

4.2.3.1 Efeitos do meio alcalino

Com o intuito de garantir a avaliação do impacto do pH nas reações Fenton, extrapolou-se as condições reacionais em meio alcalino ao mesmo tempo em que se avaliou a suscetibilidade da cafeína a hidrólise alcalina.

Assim os ensaios foram: i. em solução de NaOH com pH 13, experimento 22; ii. condição Fenton (H_2O_2 2 mM, Fe^{2+} 0,6 mM) com pH ajustado para 10, experimento 23. Os resultados da degradação da cafeína e consumo H_2O_2 relativos ao tempo de 1 e 24 horas estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Efeitos do meio alcalino na degradação da cafeína.



Nota: (10)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 3 em H₂SO₄, 25°C (para comparação); (19)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe³⁺, pH 7 em H₂SO₄, 25°C (para comparação); (22)* solução alcalina pH 13, 25°C ; (23)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 10, 25°C. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

Efeitos de hidrólise alcalina podem ser verificados no experimento 22, com degradação da cafeína de aproximadamente 25% e 75% nos tempos de 1 e 24 horas, respectivamente. A hidrólise promovida em pH 13 apresentou degradação semelhante a oxidação do processo Fenton (experimento 10) em 24 horas de reação.

Por observação dos resultados do experimento 23, constata-se a degradação da cafeína de cerca de 41 e 45% nos tempos de 1 e 24 horas respectivamente, mas com consumo gradativo de H₂O₂ que poderia indicar que o processo Fenton procede mesmo em meio alcalino (pH 10). Obteve-se menor degradação da cafeína comparada aos experimentos 10 e 22, indicando que o meio alcalino realmente desfavorece a oxidação por processo Fenton. Parte desse resultado pode ser atribuído a degradação por hidrólise alcalina.

4.3 Reagentes que promovem ou inibem a reação Fenton: Ácido ascórbico e Etanol

Espécies orgânicas podem atuar tanto como inibidores ou promotores da reação radicalar, seja como removedores dos radicais hidroxila ou adsorção na superfície dos catalisadores a regeneração dos catalisadores renovando o ciclo catalítico (LADO RIBEIRO et al., 2019).

A taxa de redução do Fe³⁺ para formação de HO[·] é influenciada por compostos orgânicos, mantendo a continuidade da reação Fenton clássica em que H₂O₂ atua como agente oxidante e Fe²⁺ como catalisador (BOLOBAJEV; TRAPIDO; GOI, 2016). Assim o ácido

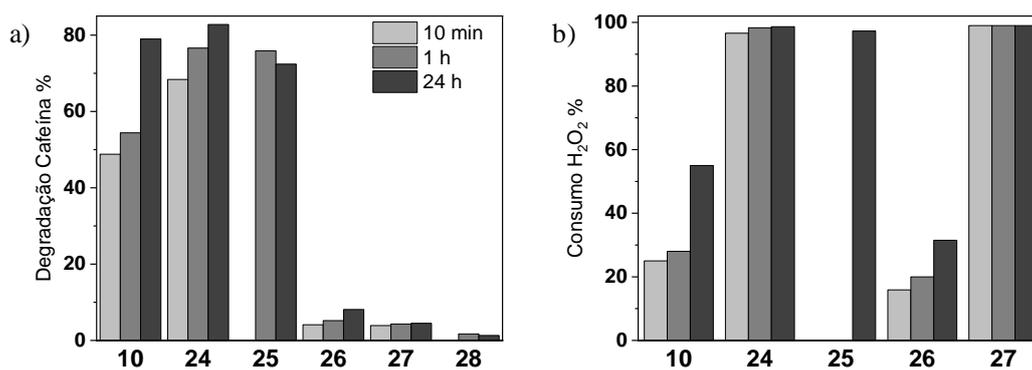
ascórbico adicionado ao meio reacional contendo íons férricos promove um sistema tipo-Fenton pela formação de complexos com Fe^{3+} com liberação redutiva de Fe^{2+} .

No intuito de promover uma melhoria dos resultados já obtidos em termos de degradação da cafeína, avaliou-se a utilização de reagentes capazes de proporcionar alterações nas reações oxidativas como o ácido ascórbico, que apresenta a possibilidade de atuar como redutor ou pró-oxidante dependendo das condições, e o etanol, por ser um potencial inibidor da formação de radicais, auxiliando no entendimento das reações de degradação, e possivelmente auxiliar com algum efeito de seletividade. O etanol foi incluído na reação por ser um sequestrador de radicais (STADLER; FAY, 1995) podendo auxiliar no entendimento do mecanismo de reação.

O ácido ascórbico foi explorado por ser um redutor orgânico com eficiência comprovada na regeneração do catalisador Fe^{2+} (BOLOBAJEV; TRAPIDO; DULOVA, 2015), pela capacidade de solubilizar íons metálicos por formação de complexos (HOU et al., 2016b), além de ser empregado diretamente na degradação de contaminante ambiental (atrazina) na concentração de 1 mM AA em diferentes valores de pH (HOU et al., 2017).

A Figura 11 ilustra os resultados obtidos nesses experimentos em que os reagentes ácido ascórbico e/ou etanol foram incluídos nas condições experimentais do processo Fenton.

Figura 11 - Reagentes que promovem ou inibem a reação Fenton: ácido ascórbico e etanol.

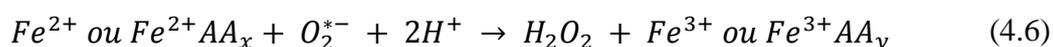
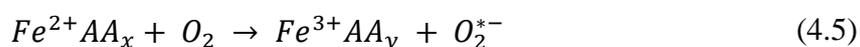
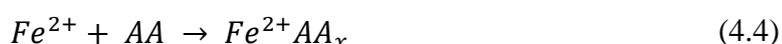


Nota: (10)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3 em H_2SO_4 , 25°C (para comparação); (24)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3, 25°C, 1 mM AA; (25)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 7, 1mM AA, 5°C; (26)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3, 25°C, 10% etanol; (27)* 2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3, 25°C, 1 mM AA, 10% etanol; (28)* pH 7, 25°C, 1 mM AA, 10% etanol. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

Verifica-se que a adição de ácido ascórbico em concentração de 1 mM aos reagentes Fenton, experimento 24, promove maior degradação da cafeína, com cerca de 70 e 84% nos

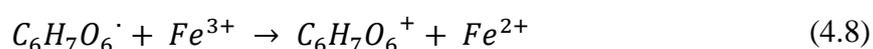
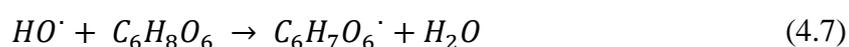
tempos de 10 minutos e 24 horas, respectivamente. Como constatado por Bolobajev e colaboradores (2015), o AA atua eficientemente como agente redutor orgânico ativando o sistema tipo-Fenton, por reduzir os íons Fe^{3+} regenerando o Fe^{2+} (reação (2.14)) e garantindo a continuação das reações com formação dos radicais $HO\cdot$. Além disso, AA pode complexar com Fe^{2+} formando composto de coordenação $Fe^{2+}AA_x$ que é termodinamicamente favorável para ser oxidado por oxigênio molecular produzindo o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), equações (4.4) e (4.5), com a seguinte formação de H_2O_2 (4.6) e sua posterior decomposição a $HO\cdot$ (HOU et al., 2016b).



Dessa forma, fica evidente a melhoria da eficiência na degradação da cafeína com aproximadamente 77% em 1 hora após adição de AA (experimento 24), comparado com cerca de 79% obtidos em 24 horas de reação na ausência de AA (experimento 10).

Na condição reacional do processo Fenton com adição 1 mM AA em pH 7 e submetido a 5 °C, experimento 25, foram verificados valores de degradação da cafeína de aproximadamente 76% e 73% nos tempos de 1 e 24 horas. Comparativamente aos experimento 24, os resultados são semelhantes em 1 hora de reação e inferiores em aproximadamente 10% no tempo de 24 horas. Novamente, constata-se que o resfriamento não apresentou impacto nas reações em condição Fenton, indicando que a degradação da cafeína não é significativamente afetada pela temperatura, além do aumento do custo operacional para garantir esse resfriamento.

Aprofundando nas reações envolvidas, um potencial mecanismo de reação favorecido ao ser adicionado AA em condições de processo Fenton é a oxidação do AA com consumo de $HO\cdot$, seguida de redução do Fe^{3+} , equações (4.7) e (4.8) (BOLOBAJEV; TRAPIDO; DULOVA, 2015).



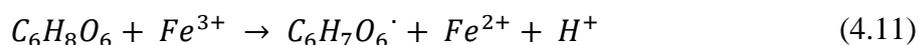
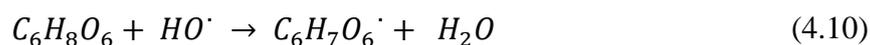
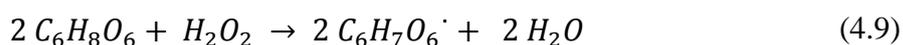
A adição de etanol aos reagentes Fenton, experimento 26, acarreta considerável diminuição da degradação de cafeína comparada ao processo Fenton (experimento 10) ou com adição de AA (experimento 24) ao longo de todo o tempo monitorado de reação (10 minutos a 24 horas). O resultado é coerente com o esperado já que o etanol é um inibidor de radicais, diminuindo sua concentração no meio reacional e mantendo um meio menos agressivo a oxidação (LADO RIBEIRO et al., 2019; SHI et al., 2020; ZHAO; JUNG, 1995).

No experimento 27 houve a adição simultânea de ácido ascórbico e etanol aos reagentes Fenton definidos no experimento 10, indicando o efeito inibidor de radicais do etanol semelhante ao experimento 26, que inclusive sobrepõe ao AA.

O experimento 28 foi realizado de modo a verificar o efeito da adição simultânea de ácido ascórbico e etanol apenas na solução de cafeína, sem ajuste de pH e na ausência dos reagentes Fenton. Verifica-se pequena degradação da cafeína, apenas nos tempos 1 e 24 horas, com aproximadamente 1,5%. Como há etanol presente no meio reacional que inibiria os radicais, essa pequena degradação pode ser atribuída ao reagente ácido ascórbico que poderia promover a degradação da cafeína, mas que foi inibida pelo sequestrante. Esses resultados possibilitam outras suposições de mecanismo de reação para promoção da degradação da cafeína. Nesse caso, novos ensaios são apresentados posteriormente a fim de esclarecer as reações envolvidas.

A avaliação do consumo de H_2O_2 também auxilia na interpretação dos resultados. No experimento 24 houve consumo quase completo de AA desde o início da reação como esperado, uma vez que o ácido ascórbico é um agente redutor (DEUTSCH, 1998; FORNARO; COICHEV, 1998).

Considerando o pH ácido no experimento 24, o AA ($C_6H_8O_6$) libera 1 H^+ juntamente com 1 elétron, podendo reagir com H_2O_2 ou com radicais HO^\cdot , ou ainda com íons Fe^{3+} exercendo efeito pró-oxidante conforme reações (4.9).



Como a concentração de AA é a metade da concentração de H_2O_2 , experimento 24, e o AA ainda pode reagir com outras espécies presentes no meio reacional, sua reação direta com

H_2O_2 (4.9) por si só não explicaria o consumo quase total de H_2O_2 . Fica evidente assim que, além da reação entre AA e H_2O_2 , ocorre decomposição do H_2O_2 e geração de radicais HO^\cdot , sendo esta a etapa que promove a degradação da cafeína.

A análise de monitoramento do teor de H_2O_2 no experimento 26 (adição apenas de etanol ao sistema Fenton), demonstra pequeno consumo de H_2O_2 , na faixa de 16 a 32%, apresentando valores inferiores aos do experimento 10, indicando menor decomposição do H_2O_2 e o sequestro dos radicais HO^\cdot . Ao comparar com o experimento 27, em que teve diminuição na degradação de cafeína e completo consumo de H_2O_2 , é possível atribuir à decomposição nos radicais HO^\cdot e sua posterior remoção pelo etanol, justificando os resultados pelo aumento da geração de radicais HO^\cdot promovido pelo AA. Essas observações indicam que o etanol apenas remove os radicais hidroxila que são gerados no sistema, minimizando a degradação da cafeína, mas não afetando significativamente o teor de H_2O_2 .

Em meio alcalino, o AA pode liberar outro próton H^+ e ceder mais um elétron, aumentando seu poder redutor. Assim foi realizado o experimento 29, representando a condição Fenton adicionado dos reagentes 1 mM AA e 20 mM etanol em pH 10, que apresentou pequena degradação de cerca de 15% nos tempos 10 minutos, 1 e 24 horas de reação. Esse resultado é coerente já que o etanol é um removedor de radicais hidroxila, diminuindo sua concentração no meio reacional e mantendo um meio menos agressivo a oxidação. O consumo de H_2O_2 foi completo com cerca de 99% ao longo do tempo de reação, indicando que pode ter sido reduzido pelo AA e que o etanol provavelmente sequestrou esses radicais formados com o consumo de H_2O_2 , justificando assim a pequena degradação da cafeína e a manutenção de sua concentração desde o tempo de 10 minutos. Esse resultado comprova que a adição de sequestradores de radicais diminuem a degradação do contaminante (HOU et al., 2016b). Uma parte da degradação da cafeína pode também ser decorrente de hidrólise alcalina, como discutido anteriormente no experimento 22, justificando uma maior degradação de cafeína do que em pH 3 (experimento 27).

Além da possibilidade de hidrólise alcalina, outra hipótese para sua degradação seria que em meio alcalino, o AA estaria ionizado e promoveria a reações de redução uma vez que, em condições alcalinas o AA é capaz de promover redução, especialmente em pH acima do pK_{a2} (11,79) com predomínio da espécie ionizada $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6^{2-}$, que apresenta maior potencial redutor por transferência de elétrons para formação de AA_{ox} sendo capaz de reduzir compostos orgânicos. Em meio alcalino obtém-se maior degradação redutiva do contaminante com o aumento da concentração de AA. Importante notar que 1 mol de AA gera 2 mols de H^+ , que

pode neutralizar o pH da solução e reduzir a taxa de liberação de elétrons ao longo do tempo de reação (CIOU; LIANG, 2017; LIANG; LIN; SHIU, 2016).

Em investigação da degradação de contaminante promovida por AA foi comprovado seu poder na indução de degradação redutiva na faixa de pH 4 a 12, e observado o aumento da degradação de contaminante ao utilizar maiores concentrações de AA na faixa de 0,5 a 2,0 mM. Também foi constatado a maior degradação redutiva de contaminante promovida por AA em maiores valores de pH, decorrente do maior poder redutor das espécies $C_6H_8O_6$, $C_6H_7O_6^-$, $C_6H_6O_6^{2-}$, e que as degradações redutivas dependem do contaminante (HOU et al., 2017).

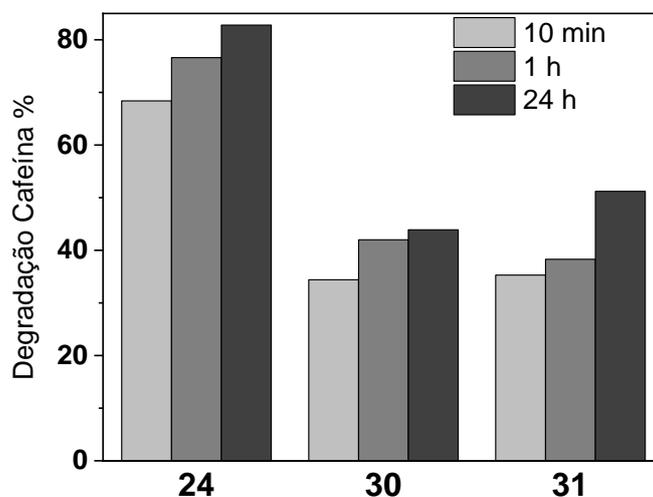
Considerando que o processo Fenton promove a degradação da cafeína via radicais hidroxila e diante dos resultados, constata-se que o etanol inibe os radicais impedindo a degradação da cafeína por esse mecanismo. Também é possível estabelecer que AA atua na reciclagem dos reagentes Fenton (ciclo Fe^{3+}/Fe^{2+}), e a possibilidade de promover a degradação da cafeína por outras reações.

4.3.1 Investigação da atuação do ácido ascórbico no sistema Fenton ou isoladamente

Com base nos resultados de experimentos com adição de ácido ascórbico, em que se observou degradação da cafeína, por formação de um ciclo oxidação-redução ou ainda intermediando outras reações, decidiu-se aprofundar a investigação desse reagente.

Dessa forma, foram conduzidos experimentos variando as condições oxidantes que comprovam a ação do AA cujos resultados são apresentados Figura 12 considerando o tempo de 10 minutos, 1 hora e 24 horas de reação.

Figura 12 - Efeito da adição de ácido ascórbico ao processo Fenton.



Nota: (24)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 3, 25°C, 1 mM AA (para comparação); (30)* 1 mM H₂O₂, 0,3 mM Fe²⁺, pH 7, 25°C, 1 mM AA; (31)* 1 mM H₂O₂, 0,1 mM Fe²⁺, pH 7, 25°C, 2 mM AA. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

O experimento 24 representa a condição Fenton em pH 3 adicionada de 1 mM AA, apresentando maior degradação da cafeína do que os experimentos seguintes para o estudo da atuação do AA.

Nos experimentos 30 e 31 foram avaliados o efeito da alteração da concentração dos reagentes Fenton, H₂O₂ e Fe²⁺, com a adição de diferentes concentrações de AA. Como apontado por Bolobajev e colaboradores (2015), a adição de agentes redutores é utilizada visando diminuir ou eliminar a fase menos ativa intrínseca de sistemas H₂O₂/Fe³⁺ pela regeneração de Fe²⁺.

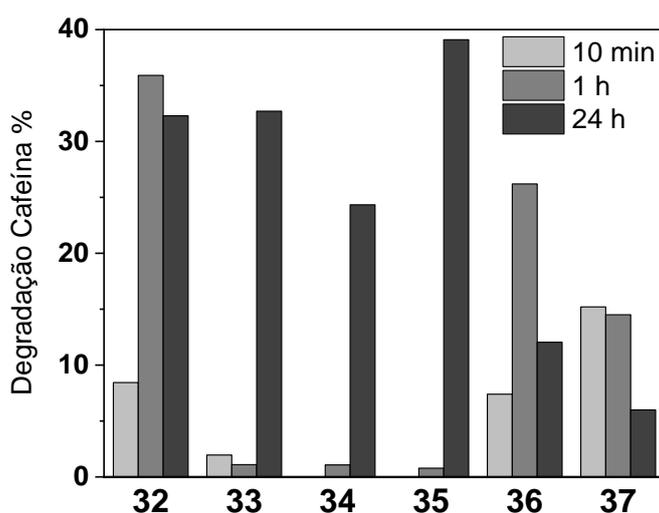
No experimento 30 a concentração dos reagentes Fenton foi reduzida à metade mantendo a mesma razão de 10/3, 1 mM H₂O₂ e 0,3 mM Fe²⁺, e adicionado 1 mM AA, resultando em degradação da cafeína de cerca de 35% em 10 minutos e aproximadamente 43% nos tempos de 1 e 24 horas. Constata-se que a taxa de degradação diminui com o tempo de reação.

Modificações no experimento 31 em relação ao 30, foram a diminuição da concentração do catalisador para 0,1 mM Fe²⁺, alterando a razão H₂O₂/Fe²⁺ para 10/1, e utilização de 2 mM de AA. Essas modificações resultaram em pequeno aumento na degradação da cafeína com valores de aproximadamente 35%, 38% e 51% nos tempos 10 minutos, 1 e 24 horas, respectivamente. Avaliando isoladamente a concentração de Fe²⁺, ao diminuir sua concentração

reduz a formação dos radicais HO^\cdot resultando em menor degradação da cafeína, fato não observado devido à presença de AA. Assim fica evidente o papel do AA na regeneração do catalisador Fe^{2+} capaz de promover a formação de radicais HO^\cdot e o consequente aumento da degradação da cafeína. Esse resultado sugere a possibilidade de trabalhar com menores concentrações de íon ferro e aumento da concentração de AA, que teria ainda consequências benéficas ao meio ambiente.

Com o intuito de esclarecer a promoção da degradação apenas pelo AA, foram realizados ensaios sem utilizar o oxidante H_2O_2 . Nos experimentos 32, 33, 34, 35, 36 e 37 além de ausente o H_2O_2 , foi avaliado o efeito da presença/ausência do catalisador Fe^{2+} , em pH 7 (Figura 13).

Figura 13 – Degradação da cafeína promovida pelo ácido ascórbico.

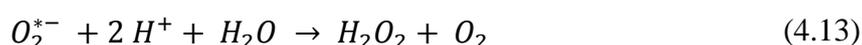


Nota: (32)* 0,6 mM Fe^{2+} , 1 mM AA, pH 7, 25°C ; (33)* 0,6 mM Fe^{2+} , 2 mM AA, pH 7, 25°C ; (34)* 1 mM AA, pH 7, 25°C; (35)* 2 mM AA, pH 7, 25°C; (36)* 0,6 mM Fe^{2+} , pH 7, 25°C; (37)* 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3, 25°C. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

No experimento 32 foram utilizados 0,6 mM Fe^{2+} , pH 7, 25 °C, 1 mM AA obtendo degradação da cafeína de aproximadamente 8%, 36% e 33% nos tempos 10 minutos, 1 e 24 horas, respectivamente. Na ausência de H_2O_2 , a reação se processa em menor extensão decorrente da menor geração do HO^\cdot , que apresenta o maior potencial de oxidação. Assim esses resultados de degradação são atribuídos a ação do AA no ciclo $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, e também a oxidação do AA com formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), mediado por Fe^{2+} , que resulta em geração de H_2O_2 conforme equações (2.15) e (2.16)

(ZHAO; JUNG, 1995). Outra possibilidade é que o Fe^{2+} poderia gerar ROS a partir do oxigênio dissolvido na solução, com a subsequente geração de H_2O_2 e HO^\cdot equações (4.12) e (4.13) (HOU et al., 2016b), contribuindo para a degradação da cafeína.



Ressalta-se que no experimento 32 não foi realizado o monitoramento de H_2O_2 já que não foi inserido nessa condição, assim não foi possível avaliar se houve geração de H_2O_2 , conforme reação (2.16), mas poderia ter sido imediatamente consumido para formar HO^\cdot .

A degradação obtida no experimento 32, de aproximadamente 35%, pode ter sido limitada pois o poder redutor do AA nos íons Fe^{3+} são mais pronunciados em meio ácido diminuindo em valores de pH acima de 5 (HOU et al., 2016b; HSIEH; HSIEH, 2000). Infere-se assim, que a degradação inicial é decorrente tanto dos íons Fe^{2+} e AA na geração de ROS, e posteriormente continua com a reciclagem de Fe^{2+} a partir do Fe^{3+} favorecida pelo meio ácido gerado pelas próprias reações, uma vez que o pH final medido foi 3,9.

A avaliação do pH no experimento 32 poderia auxiliar e confirmar os apontamentos, uma vez que ocorre consumo de prótons H^+ conforme a equação (4.13), entretanto não é possível uma conclusão precisa. Inicialmente o pH da solução de cafeína foi próximo a 7, não sendo avaliado o pH após a introdução de AA, e ao fim das 24 horas de reação o pH medido foi 3,9. A simples avaliação entre pH inicial e final não indica precisamente quais reações de consumo e liberação de prótons H^+ . Enquanto a formação de ROS consome H^+ , há liberação de H^+ pelo próprio AA além de outras reações provenientes da degradação da cafeína. Assim seria esperado que o AA promovesse o abaixando do pH para valores inferiores a 3,9 (final), por ser um ácido fraco, e ao longo da reação são gerados prótons H^+ (HOU et al., 2016b).

No experimento 33 foram utilizados 0,6 mM Fe^{2+} , pH 7, 25 °C, aumentando a concentração de AA para 2 mM a fim de verificar o efeito na degradação da cafeína. Comparando com o experimento 32, inicialmente obteve-se menor degradação da cafeína de aproximadamente 1% nos tempos 10 minutos e 1 hora; e 33% em 24 horas. O incremento de AA acima de 1 mM não resultou em aumento da degradação da cafeína quando os íons ferro estão presentes, pelo contrário, diminuiu a degradação. Diante do resultado, infere-se que a taxa de redução Fe^{3+} a Fe^{2+} por AA não é proporcional a concentração de AA, observado anteriormente como cinética de ordem zero (HSIEH; HSIEH, 2000). A menor degradação de

cafeína pode ser atribuída ao efeito sequestrador de radicais do AA, já que inicialmente AA não é consumido uma vez que o Fe^{3+} é gerado gradativamente (LEI et al., 2015). Dessa forma, o excesso de AA não promove a formação de ROS, mas os remove inibindo a degradação de contaminantes como foi constatado em investigação anterior (HOU et al., 2016b). Posteriormente, no decorrer da reação em que é gerado Fe^{3+} , o AA atua como pró-oxidante garantindo a degradação da cafeína ao fim de 24 horas.

Nas reações Fenton observou-se formação de coloração amarelada com precipitado após repouso, já nas reações que foram acrescentadas de AA não houve formação de precipitado, evidenciando a ação do AA sobre os íons ferro.

No experimento 34 os íons Fe^{2+} estão ausentes, de modo a verificar a ação exclusiva do AA na degradação da cafeína. Foi observado degradação da cafeína com aproximadamente 1% e 24% nos tempos 1 e 24 horas, respectivamente. Ao dobrar a concentração de AA para 2 mM, experimento 35, obteve um aumento quase proporcional na degradação da cafeína, com 40% de degradação em 24 horas. Constata-se que uma maior degradação pode ser obtida ao aumentar a concentração de AA em concordância com os resultados obtidos por Hou e colaboradores (2017). Essas observações foram diferentes quando o íon ferro estava presente (experimentos 32 e 33).

Essa condição reacional (experimentos 34 e 35), sem os reagentes do processo Fenton, evidencia a ação do AA como promotor da degradação da cafeína da mesma ordem de magnitude quando os íons Fe^{2+} estão presentes (experimento 33).

Outra constatação é que o mecanismo de reação promovida via AA é por oxirredução pela geração de ROS e radicais HO^\cdot , evidenciado por comparação dos resultados dos experimentos 34 e 28, em que o etanol inibe a formação de radicais, diminuindo a degradação da cafeína, inclusive os radicais que poderiam ser formados decorrente da ação do AA.

No experimento 36 foi avaliada a condição na ausência de H_2O_2 e AA, utilizando-se apenas 0,6 mM Fe^{2+} em pH 7, para verificar a ocorrência de degradação da cafeína promovida por íons Fe^{2+} conforme evidências apontadas no experimento 32, equações (4.12) e (4.13). Foi observado degradação da cafeína de aproximadamente 25% e 12% nos tempos 1 e 24 horas, respectivamente, sem os promotores de degradação até então observados H_2O_2 e AA, inferindo-se que o Fe^{2+} oxida a cafeína por formação de ROS. Em trabalho de Hou e colaboradores (2016b), ao utilizar apenas Fe^{2+} houve remoção de 9% do contaminante sugerindo que o Fe^{2+} poderia gerar ROS a partir do oxigênio do ar dissolvido na solução, e subsequente geração de H_2O_2 e HO^\cdot , conforme discutido no experimento 32, e que a oxidação dessa via (Fe^{2+}/ar) é insuficiente para a completa remoção dos poluentes devido a acumulação irreversível de íons

Fe^{3+} . Como esperado a degradação apenas contendo Fe^{2+} é menor na ausência do agente pró-oxidante AA, ao comparar com experimento 32.

De modo semelhante, no experimento 37 foi avaliada a condição na ausência de H_2O_2 e AA, utilizando 0,6 mM Fe^{2+} mas em pH 3, para verificar o efeito do pH na geração de ROS, mediada por Fe^{2+} , e seu impacto na degradação da cafeína. Foi observado degradação da cafeína de praticamente a metade do experimento 36, com aproximadamente 15% e 6% nos tempos 1 e 24 horas, respectivamente. Como discutido acima, os íons Fe^{2+} podem gerar ROS a partir do oxigênio do ar dissolvido na solução, justificando a degradação da cafeína. Como no experimento 37 o pH inicial foi ajustado para 3, seria esperado maior degradação em relação ao experimento 36 uma vez que a formação de ROS ocorre com consumo de H^+ , além do Fe^{3+} formado ser favoravelmente reciclado a Fe^{2+} em meio ácido por ROS conforme equação (4.14), já em pH neutro pode ocorrer precipitação irreversível do Fe^{3+} (HOU et al., 2016b).



Considerando os experimentos realizados com uso do AA isoladamente e adicionado aos reagentes do processo Fenton, conclui-se que o AA auxilia na degradação de contaminantes mediada por íons ferro, seja regenerando Fe^{2+} ou ao complexar com ferro gerando radicais, e como promotor de reação via formação de espécies reativas mesmo na ausência de metais.

De forma análoga, a adição de AA aumentou a atividade e degradação de contaminantes devido a efetividade do ciclo Fe^{3+}/Fe^{2+} , atuando como redutor, e a formação de complexo ferro-AA (HOU et al., 2016a).

4.3.2 Influência de outros solventes na condição Fenton e atividade inibidora de radicais

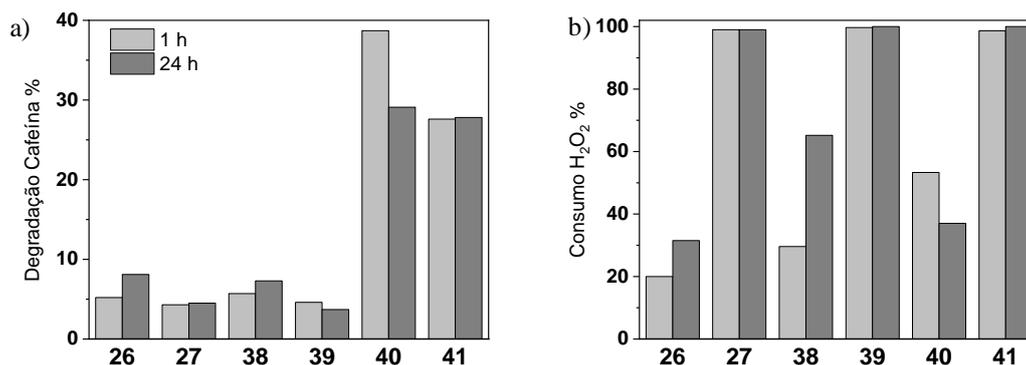
Com base na ação do etanol, que comprovadamente atua como inibidor de radicais e no intuito de promover uma melhoria dos resultados, seja por conferir diferenças de solubilidade e interações com as moléculas no meio reacional, avaliou-se a utilização dos solventes metanol, acetonitrila e clorofórmio na concentração de 10% v/v, na reação conduzida com reagentes Fenton, em pH 7 a 25 °C. O uso desses solventes tem a intenção de favorecer alguns dos produtos de reação bem como inibir os radicais livre, não sendo uma opção para a remoção da cafeína com propósito ambiental.

Com a adição de clorofórmio ($CHCl_3$), imiscível em água, o teor de cafeína foi muito pequeno que poderia ser interpretado como degradação, no entanto pode-se assumir que houve

extração da cafeína para a fase clorofórmica (experimentos 42 e 43), portanto não foram aprofundados.

Os resultados de degradação da cafeína estão apresentados na Figura 14, considerando os tempos de reação de 1 e 24 horas.

Figura 14 – Comparação da atividade inibidora de radicais: etanol, metanol, acetonitrila.



Nota: (26)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 3, 25°C, 10% etanol (para comparação) e (27)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 3, 25°C, 1 mM AA, 10% etanol (para comparação); (38)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 7, 25°C, 10% metanol; (39)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 7, 25°C, 1 mM AA, 10% metanol (40)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 7, 25°C, 10% acetonitrila (41)* 2 mM H₂O₂, 0,6 mM Fe²⁺, pH 7, 25°C, 1 mM AA, 10% acetonitrila. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

De modo geral verificam-se valores de degradação da cafeína semelhantes nos tempos 1 e 24 horas, indicando que a reação ocorre quase totalmente em até uma hora de reação.

Da mesma forma que o etanol (experimentos 26 e 27), metanol e acetonitrila atuam como inibidores de radicais hidroxila diminuindo a degradação da cafeína, como observado nos dados dos experimentos 38, 39, 40 e 41.

Os experimentos que empregaram metanol como inibidor, promoveram inibição da degradação da cafeína semelhante ao etanol seja na condição Fenton (experimento 38) ou com acréscimo de AA (experimento 39).

A utilização de acetonitrila, experimento 40, proporcionou um menor efeito inibidor de radicais comparado a etanol e metanol evidenciado pelos maiores valores de degradação da cafeína.

Ao avaliar o gráfico de consumo de H₂O₂ verifica-se que as reações que continham AA (experimentos 39 e 41) apresentaram consumo total do H₂O₂ como esperado.

De forma geral, e semelhante ao etanol (experimentos 26 e 27), ao adicionar AA ao meio reacional promove ligeira diminuição da degradação da cafeína com consumo integral do H_2O_2 , indicando que o AA induz a decomposição do H_2O_2 .

Considerando os dados da degradação da cafeína e a toxicidade dos reagentes, constata-se que o etanol é mais adequado para atuar como inibidor de radicais hidroxila. Ainda sobre a utilização desses solventes, descata-se o favorecimento da formação de alguns produtos de transformação da cafeína diferentes de quanto utilizou apenas a condição Fenton.

4.4 Resultados compilados dos processos catalíticos homogêneos

Os dados dos experimentos realizados são resumidos na Tabela 6, contendo valores de degradação da cafeína e valores de pH e TOC registrados ao fim das reações.

Tabela 6 – Resultados de degradação da cafeína, pH e TOC em 24 horas das condições experimentais Fenton, tipo-Fenton, AA e removedores.

Exp	Condições	pH final	Degrad	TOC
1	Fenton, 25 °C	2,7	22,5	-
2	Fenton, 50 °C	2,7	33,3	-
3	Dicromato 1 mM, 25 °C	2,1	0	-
4	Dicromato 1 mM, 50 °C	2,1	0	-
5	Dicromato 10 mM, 50 °C	1,0	9,0	-
6	Permanganato 1 mM, 25 °C	2,3	43,7	-
7	Permanganato 1 mM, 50 °C	2,3	43,7	-
8	Permanganato 10 mM, 50 °C	1,1	99,6	-
9	1 mM H_2O_2 , 0,3 mM Fe^{2+} , 50 °C, pH 3	2,8	23,0, 4 h	105,8
10	2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , 25 °C, pH 3	3,1	79,3	100,3
11	30 mM H_2O_2 , 9 mM Fe^{2+} , 50 °C, pH 3	1,9	100, 2h	78,2
12	1 mM H_2O_2 , 0,3 mM Fe^{2+} , 25 °C, pH 3	3,0	54,8	-
13	2 mM H_2O_2 , 25 °C, pH 3	3,1	7,8	102,6
14	2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , 25 °C, pH 3	3,1	81,6	95,2
15	2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{3+} , 25 °C, pH 3	3,1	88,2	99,8
16	2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{3+} , 25 °C, pH 3	2,9	71,7	97,9
17	2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{3+} , 25 °C, pH 2	2,0	19,9	98,9
18	2 mM H_2O_2 , 0,6 mM Fe^{2+} , 25 °C, pH 2	1,9	45,1	98,2

(Continua)

Exp	Condições	pH final	Degrad	TOC
19	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7	3,6	53,9	97,8
20	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7	3,3	49,1	99,5
21	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 5 °C, pH 7	-	59,0	-
22	25 °C, pH 13	13,2	76,2	-
23	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 10	4,0	45,4	-
24	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 3, 1 mM AA	3,3	82,8	-
25	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 5 °C, pH 7, 1 mM AA	-	72,4	-
26	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 3, 10 % etanol	3,1	20,1	-
27	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 3, 1 mM AA, 10 % etanol	3,1	19,5	-
28	1 mM AA, 10 % etanol, 25 °C, pH 7	4,4	10,3	-
29	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 10, 1 mM AA, 10% etanol	4,6	6,6	-
30	1 mM H ₂ O ₂ , 0,3 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 1 mM AA	3,9	43,9	-
31	1 mM H ₂ O ₂ , 0,1 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 2 mM AA	3,9	51,2	-
32	0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 1 mM AA	3,9	32,3	-
33	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7	4,1	32,7	-
34	25 °C, pH 7, 1 mM AA	4,4	24,3	-
35	25 °C, pH 7, 2 mM AA	4,3	39,1	-
36	0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7	4,9	12,1	-
37	0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 3	3,1	6,0	-
38	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 10 % metanol	3,4	7,3	-
39	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 1 mM AA, 10 % metanol	3,8	3,7	-

(Continua)

Exp	Condições	pH final	Degrad	TOC
40	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 10 % acetoneitrila	3,3	29,1	-
41	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 1 mM AA, 10 % acetoneitrila	3,6	27,8	-
42	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 10 % clorofórmio	3,5	95,4*	-
43	2 mM H ₂ O ₂ , 0,6 mM Fe ²⁺ , 25 °C, pH 7, 1 mM AA, 10 % clorofórmio	3,3	85,4*	-

Nota: * condição com adição de clorofórmio apresentou separação de fase.

Fonte: Do autor (2021).

A determinação de TOC não foi realizada nos experimentos que tiveram adição de reagentes como AA ou solventes, bem como nos que apresentaram pequena degradação de cafeína.

Apesar de não obter a completa degradação da cafeína e sua mineralização no tempo avaliado, consideram-se os resultados satisfatórios já que outros estudos utilizam períodos muito longos em até 10 dias para completa degradação (HOU et al., 2017), ou empregando grande quantidade de catalisador, íon ferro 3,6 mM (DALMÁZIO et al., 2005).

Trovó e colaboradores (2013) trabalharam com condições Fenton e foton-Fenton para degradação de solução 50,0 mg.L⁻¹ cafeína com 10,0 mg.L⁻¹ de Fe²⁺ e 42,0 mg.L⁻¹ de H₂O₂ obtendo, na condição Fenton otimizada, 13,5% de mineralização em 120 minutos. Ressalta-se que apesar da menor concentração de cafeína (50,0 mg.L⁻¹) e dos reagentes Fenton, esses reagentes são proporcionalmente mais concentrados em relação ao presente estudo, que adotou a concentração de 200,0 mg.L⁻¹ de cafeína, 33,5 mg.L⁻¹ de Fe²⁺ e 68,0 mg.L⁻¹ de H₂O₂ (com base na condição do experimento 2).

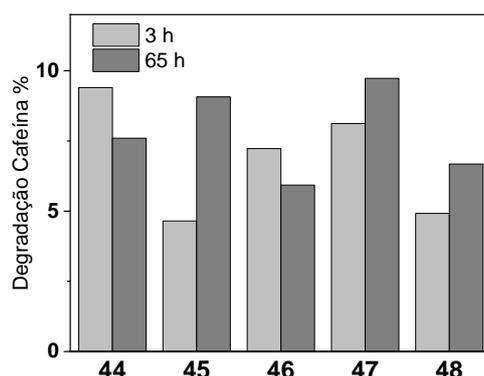
Visando a completa mineralização da cafeína deve-se avaliar condições utilizando quantidade estequiométrica de H₂O₂ equivalente a 30 mM, resultando em aproximadamente 20% de mineralização em 2 horas de reação. Em condição estequiométrica, Munoz e colaboradores (2017) obtiveram valores de aproximadamente 35% de mineralização para contaminante contendo anel imidazólico, confirmando a dificuldade de sua mineralização. Os mesmos autores também trabalharam com menor dose de H₂O₂ (20% da quantidade estequiométrica) de modo a investigar as rotas de degradação e seus produtos intermediários.

4.5 Avaliação da utilização dos catalisadores sólidos no processo heterogêneo

Após os experimentos envolvendo a catálise homogênea, realizou-se avaliações com materiais sólidos de óxidos de ferros para avaliação do processo de catálise heterogênea. Partindo de uma adaptação dos experimentos anteriores, propôs-se a utilização de óxidos de ferro em solução de cafeína $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a pH 7 empregando 2 mM de H_2O_2 a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para a degradação da cafeína.

Inicialmente avaliou-se os materiais: Goethita, Goethita dopada com Cromo, Goethita dopada com Cobalto, Goethita dopada com Cobre e Magnetita utilizando cerca de 16 mg de cada material, correspondente a concentração de aproximadamente $0,32 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados de remoção de cafeína estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 – Catálise heterogênea com $0,32 \text{ g.L}^{-1}$ de carga de catalisador.



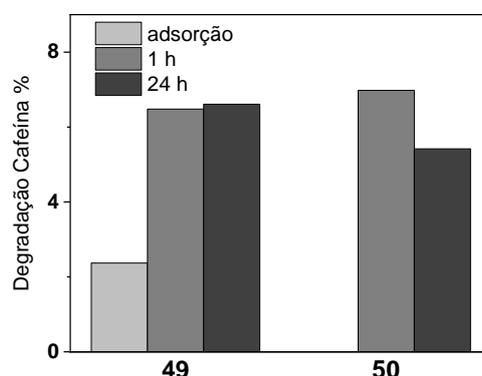
Nota: Remoção da cafeína em H_2O_2 2 mM , $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e diferentes catalisadores sólidos: (44)* Goethita; (45)* Goethita cromo; (46)* Goethita cobalto; (47)* Goethita cobre; (48)* Magnetita. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

Verifica-se degradação da cafeína com valores semelhantes em todos os óxidos de ferro, variando entre 4 e 10% para um grande período de reação de até 65 horas.

Com o intuito de aumentar a degradação da cafeína e avaliar o impacto do incremento de materiais, novo ensaio foi realizado aumentando-se a concentração dos catalisadores. Assim utilizou-se as mesmas condições anteriores com quantidade de 50 mg de Goethita e Magnetita, correspondendo a concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 16). Uma alíquota foi coletada antes da adição do H_2O_2 , após contato entre a solução de cafeína e o material sólido, a fim de avaliar efeitos de adsorção, por 1 hora.

Figura 16 - Catálise heterogênea com $2,0\text{g.L}^{-1}$ de carga de catalisador e 1 hora de adsorção.



Nota: Remoção da cafeína em H_2O_2 2 mM, 25 °C: (49)* Goethita; (50)* Magnetita. * número do experimento.

Fonte: Do autor (2021).

Novamente, verificou-se pequena degradação da cafeína tanto na Goethita (aproximadamente 6%) como na Magnetita (aproximadamente 5 e 7%) nos tempos de 1 e 24 horas de reação. Com o aumento da concentração dos catalisadores e o longo tempo de reação, conclui-se que esses materiais alcançaram seu máximo de atividade catalítica. Nesse teste foi possível avaliar que a cafeína não é adsorvida em Magnetita, mas aproximadamente 2% foi adsorvido em Goethita.

Mesmo em condições com degradação de cafeína, não é observado a diminuição do teor de TOC, mantendo os valores próximos a 100 ppm após as reações, indicando que há formação de intermediários orgânicos persistentes. Tal resultado está de acordo com as observações relatadas na literatura (DALMÁZIO et al., 2005) que apesar da completa degradação da cafeína não obteve mineralização significativa.

Após os experimentos catalíticos foi avaliado o teor de ferro, constatando a lixiviação de íons ferro para a solução.

Pela avaliação dos resultados, constata-se que esses materiais não apresentam capacidade de degradação nas condições estudadas.

Não foram encontrados trabalhos científicos empregando a catálise heterogênea para a reação de N-desmetilação da cafeína.

5 CONCLUSÃO

A cafeína é uma molécula estável mesmo em solução persistindo no ambiente e assim atrai maior atenção com vistas a promoção de sua remoção dos cursos d'água. No trabalho realizado, foi comprovado que a cafeína se mantém estável por mais de 10 dias em solução aquosa, seja em meio neutro e ácido. A aplicação dos distintos processos estudados revela a degradação da cafeína por exposição a: íons permanganato, processo Fenton, tipo-Fenton, íons ferro, meio alcalino e ao AA.

A condição Fenton é uma opção atrativa para a remoção de contaminantes e apresentou maior degradação de cafeína, de aproximadamente 80% em condição Fenton branda por 24 horas, (2 mM de H_2O_2 e 0,6 mM Fe^{2+} , pH 3,0) e remoção completa sob Fenton com excesso de reagentes por 10 minutos. Também foram comprovados que o pH ótimo é em torno de 3; os íons Fe^{2+} são mais eficientes na decomposição de H_2O_2 e conseqüentemente na degradação do contaminante do que Fe^{3+} ; e pouco efeito da temperatura preferindo-se utilizar a temperatura ambiente.

Quando o AA é adicionado ao sistema Fenton, ocorre um incremento na formação de radicais HO^\cdot e conseqüente aumento da degradação do contaminante desde o início da reação, com valores de 70% em 10 minutos e cerca de 80% em 1 hora. Nessas condições, o AA atua como pró-oxidante regenerando os íons Fe^{2+} que garante maiores taxas da geração de radicais HO^\cdot . Dessa forma, fica evidente a possibilidade trabalhar com menores concentrações de íon ferro garantindo a degradação do contaminante.

Foi verificado que os íons ferro são capazes de gerar ROS e promoverem a degradação da cafeína em pequena extensão, cerca de 6 a 12% em 24 horas. A adição de AA a solução contendo íons ferro promove o ciclo redutivo $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ bem como diminui o potencial redox do $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ por efeito quelante, gerando radicais HO^\cdot e aumentando a degradação da cafeína, obtendo aproximadamente 30% em 24 horas. O incremento da concentração de AA aumenta seu efeito sequestrante de radicais diminuindo a degradação do contaminante nos tempos iniciais porém após a geração de íons Fe^{3+} no meio reacional, o AA é consumido para regenerar os íons Fe^{2+} promovendo uma degradação equivalente a condição reacional de menor concentração de AA.

O AA, utilizado isoladamente, também promove a degradação do contaminante por mecanismo de geração de radicais. Nessa condição foi comprovado que o incremento da sua concentração acarreta no aumento da degradação do contaminante, com valores de 30 e 40% em 24 horas.

Conclui-se que o AA auxilia na degradação de contaminantes mediada por radicais de três maneiras: regenerando Fe^{2+} que reage com O_2 ou com H_2O_2 ; por complexação com ferro gerando radical superóxido que também pode formar H_2O_2 e radicais hidroxila; e como promotor de reação por formação direta de H_2O_2 decorrente de auto-oxidação.

Foi investigado a ação de inibidores de radicais, úteis na interpretação do mecanismo de reação, evidenciando ser via ROS e HO^\cdot . Os reagentes etanol e metanol apresentaram atividade inibidora semelhante, e foram superiores a acetonitrila.

A condição com maior inibição de degradação é a Fenton com acréscimo de AA e etanol ou metanol. Nessas condições, há o completo consumo de H_2O_2 decorrente da decomposição mediada por Fe^{2+} e AA.

Na avaliação do efeito do pH, foi comprovado que a cafeína sofre hidrólise em meio alcalino, mas que nessa faixa de pH desfavorece a degradação via radicalar.

No processo heterogêneo não foi observada degradação relevante da cafeína.

A dificuldade de completa remoção da cafeína, bem como a formação de produtos recalcitrantes, foi comprovada já que não obteve sua mineralização.

REFERÊNCIAS

- ALGHARRAWI, K. H. R.; SUMMERS, R. M.; SUBRAMANIAN, M. Production of theobromine by N-demethylation of caffeine using metabolically engineered E. coli. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. December 2016, p. 153–160, 2017.
- ANIS, M.; HAYDAR, S. Heterogeneous Fenton Oxidation of Caffeine Using Zeolite-Supported Iron Nanoparticles. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 44, p. 315–328, 2019.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química**. 5. ed. [s.l: s.n.].
- BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradation of tetracycline by photo-Fenton process-Solar irradiation and matrix effects. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 33–39, 2007.
- BOLOBAJEV, J.; TRAPIDO, M.; DULOVA, N. Application of different techniques for activation of H₂O₂/Fe³⁺ system: A comparative study. **Journal of Advanced Oxidation Technologies**, v. 18, n. 2, p. 347–352, 2015.
- BOLOBAJEV, J.; TRAPIDO, M.; GOI, A. Effect of iron ion on doxycycline photocatalytic and Fenton-based autocatalytic decomposition. **Chemosphere**, v. 153, p. 220–226, 2016.
- CHAGAS, P. M. B. et al. Use of an Environmental Pollutant From Hexavalent Chromium Removal as a Green Catalyst in The Fenton Process. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.
- CIOU, C.; LIANG, C. 1,3-Dinitrobenzene reductive degradation by alkaline ascorbic acid – Reaction mechanisms, degradation pathways and reagent optimization. **Chemosphere**, v. 166, n. 2, p. 482–488, 2017.
- D.SKOOG; S.CROUCH; D.WEST Y J. HOLLER. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [s.l.] Thomson, 2009.
- DALMÁZIO, I. et al. Advanced oxidation of caffeine in water: On-line and real-time monitoring by electrospray ionization mass spectrometry. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 16, p. 5982–5988, 2005.
- DE FREITAS, V. A. A. et al. Use of iron ore tailing from tailing dam as catalyst in a fenton-like process for methylene blue oxidation in continuous flow mode. **Chemosphere**, v. 219, p. 328–334, 2019.
- DEUTSCH, J. C. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. **Analytical Biochemistry**, v. 255, n. 1, p. 1–7, 1998.
- DIAZ DE TUESTA, J. L. et al. Assisted hydrothermal carbonization of agroindustrial byproducts as effective step in the production of activated carbon catalysts for wet

peroxide oxidation of micro-pollutants. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, 2021.

DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 2, p. 443–457, 2012.

EISENBERG, G. M. Colorimetric Determination of Hydrogen Peroxide. **Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition**, v. 15, n. 5, p. 327–328, 1943.

ELMAGIRBI, A.; SULISTYARTI, H. Study of Ascorbic Acid as Iron(III) Reducing Agent for Spectrophotometric Iron Speciation. **The Journal of Pure and Applied Chemistry Research**, v. 1, n. 1, p. 11–17, 2012.

FENTON, H. J. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **J. Chem. Soc.**, v. 65, p. 899–910, 1894.

FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1884–1892, 2006.

FORNARO, A.; COICHEV, N. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de oxido-redução com alguns íons metálicos de transição. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 9, 1998.

GANZENKO, O. et al. Removal of psychoactive pharmaceutical caffeine from water by electro-Fenton process using BDD anode: Effects of operating parameters on removal efficiency. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 987–995, 2015.

GONÇALVES, M. et al. A friendly environmental material: Iron oxide dispersed over activated carbon from coffee husk for organic pollutants removal. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 206–211, 2013.

GONÇALVES, R. G. L. et al. Performance of magnetite/layered double hydroxide composite for dye removal via adsorption, Fenton and photo-Fenton processes. **Applied Clay Science**, v. 179, n. June, 2019.

GRACIA-LOR, E. et al. Estimation of caffeine intake from analysis of caffeine metabolites in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 609, n. June, p. 1582–1588, 2017.

HOU, X. et al. Ascorbic acid/Fe@Fe₂O₃: A highly efficient combined Fenton reagent to remove organic contaminants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 310, p. 170–178, 2016a.

HOU, X. et al. Ascorbic acid enhanced activation of oxygen by ferrous iron: A case of aerobic degradation of rhodamine B. **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 67–74, 2016b.

HOU, X. et al. Ascorbic acid induced atrazine degradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 327, p. 71–78, 2017.

- HOU, X. et al. Fenton oxidation of organic contaminants with aquifer sediment activated by ascorbic acid. **Chemical Engineering Journal**, v. 348, n. February, p. 255–262, 2018.
- HSIEH, Y. H. P.; HSIEH, Y. P. Kinetics of Fe(III) reduction by ascorbic acid in aqueous solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1569–1573, 2000.
- HUACCALLO-AGUILAR, Y. et al. New insights on the removal of diclofenac and ibuprofen by CWPO using a magnetite-based catalyst in an up-flow fixed-bed reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 281, n. January, 2021.
- JANISSEN, B.; HUYNH, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products : A review. **Resources, Conservation & Recycling**, v. 128, p. 110–117, 2018.
- JIANG, X. et al. Eliminating imidacloprid and its toxicity by permanganate via highly selective partial oxidation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 191, n. September 2019, 2020.
- KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environment International**, v. 35, p. 402–417, 2009.
- KRAMARENKO, G. G. et al. Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 6, p. 1634–1637, 2006.
- KUMAR, A. et al. Recent advances in nano-Fenton catalytic degradation of emerging pharmaceutical contaminants. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 27, 2019.
- KWAN, W. P.; VOELKER, B. M. Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 37, n. 6, p. 1150–1158, 2003.
- LADO RIBEIRO, A. R. et al. **Impact of water matrix on the removal of micropollutants by advanced oxidation technologies** **Chemical Engineering Journal**, 2019.
- LASZAKOVITS, J. R.; SOMOGYI, A.; MACKAY, A. A. Chemical Alterations of Dissolved Organic Matter by Permanganate Oxidation. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 3256–3266, 2020.
- LEI, Y. et al. Rapid and continuous oxidation of organic contaminants with ascorbic acid and a modified ferric/persulfate system. **Chemical Engineering Journal**, v. 270, p. 73–79, 2015.
- LI, S. et al. Risks of caffeine residues in the environment: Necessity for a targeted ecopharmacovigilance program. **Chemosphere**, v. 243, n. 125343, p. 1–10, 2020.

LIANG, C.; LIN, Y. T.; SHIU, J. W. Reduction of nitrobenzene with alkaline ascorbic acid: Kinetics and pathways. **Journal of Hazardous Materials**, v. 302, p. 137–143, 2016.

MAR DA COSTA, N. Y. et al. Biogeochemical mechanisms controlling trophic state and micropollutant concentrations in a tropical artificial lake. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, n. 854, p. 1–15, 2016.

MARTIN-MARTINEZ, M. et al. Role of Nitrogen Doping on the Performance of Carbon Nanotube Catalysts: A Catalytic Wet Peroxide Oxidation Application. **ChemCatChem**, v. 8, n. 12, p. 2068–2078, 2016.

MARTIN-MARTINEZ, M. et al. Lignin-based activated carbons as metal-free catalysts for the oxidative degradation of 4-nitrophenol in aqueous solution. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 219, p. 372–378, 2017.

MARTIN-MARTINEZ, M. et al. Exploring the activity of chemical-activated carbons synthesized from peach stones as metal-free catalysts for wet peroxide oxidation. **Catalysis Today**, v. 313, n. December 2017, p. 20–25, 2018.

MESQUITA, A. M. et al. Boron as a promoter in the goethite (α -FeOOH) phase: Organic compound degradation by Fenton reaction. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 192, p. 286–295, 2016.

MIKLOS, D. B. et al. **Evaluation of advanced oxidation processes for water and wastewater treatment – A critical review** **Water Research**, 2018.

MUNOZ, M. et al. Application of CWPO to the treatment of pharmaceutical emerging pollutants in different water matrices with a ferromagnetic catalyst. **Journal of Hazardous Materials**, v. 331, p. 45–54, 2017.

NARVÁEZ HERNÁNDEZ, L.; MIRANDA VIDALES, J. M.; MARTÍNEZ-FLORES, E. E. Effect of ascorbic acid on hydrogen peroxide decomposition into an environmentally friendly mixture for pickling of 316L stainless steel. **Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces**, v. 50, n. 3, p. 384–390, 2014.

NEYENS, E.; BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, v. 98, n. 1–3, p. 33–50, 2003.

NJUS, D. et al. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 159, n. May, p. 37–43, 2020.

O'NEIL, M. J.; HECKELMAN, P. E.; ROMAN, K. J. **The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, biologicals**. 12. ed. NY: Merck & CO, 1996.

OLIVEIRA, T. D. DE et al. Caffeine Oxidation in Water by Fenton and Fenton-Like Processes: Effects of Inorganic Anions and Ecotoxicological Evaluation on Aquatic Organisms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 1, p. 178–184, 2015.

PAÍGA, P. et al. Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS: Hourly variation. **Science of the Total Environment**, v. 648, p. 582–600, 2019.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the fenton reaction and related chemistry. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 1–84, 2006.

RIBEIRO, R. S. et al. The influence of surface chemistry of activated carbons on the selective decomposition of hydrogen peroxide. **Carbon**, v. 62, p. 97–108, 2013.

RIBEIRO, R. S. et al. Catalytic wet peroxide oxidation: A route towards the application of hybrid magnetic carbon nanocomposites for the degradation of organic pollutants. A review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 187, p. 428–460, 2016.

RIZZO, L. et al. Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 655, n. August 2018, p. 986–1008, 2019.

RODRIGUEZ, R. S. et al. Reversible neuronal and muscular toxicity of caffeine in developing vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 163, p. 47–54, 2014.

ROMAN, F. F. et al. Hydrochars from compost derived from municipal solid waste: Production process optimization and catalytic applications. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2021.

RUEDA MÁRQUEZ, J.; LEVCHUK, I.; SILLANPÄÄ, M. Application of Catalytic Wet Peroxide Oxidation for Industrial and Urban Wastewater Treatment: A Review. **Catalysts**, v. 8, n. 673, p. 1–18, 2018.

SERRANO, E. et al. Efficient removal of the pharmaceutical pollutants included in the EU Watch List (Decision 2015/495) by modified magnetite/H₂O₂. **Chemical Engineering Journal**, n. xxxx, 2018.

SHEMER, H.; KAC, Y.; LINDEN, K. G. Degradation of the pharmaceutical Metronidazole via UV, Fenton and photo-Fenton processes. **Chemosphere**, v. 63, p. 269–276, 2006.

SHI, Z. et al. Enhanced Transformation of Emerging Contaminants by Permanganate in the Presence of Redox Mediators. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 3, p. 1909–1919, 2020.

STADLER, R. H.; FAY, L. B. Antioxidative Reactions of Caffeine: Formation of 8-Oxocaffeine (1,3,7-Trimethyluric Acid) in Coffee Subjected to Oxidative Stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1332–1338, 1995.

TROVÓ, A. G. et al. Degradation of caffeine by photo-Fenton process: Optimization of treatment conditions using experimental design. **Chemosphere**, v. 90, n. 2, p. 170–175, 2013.

WECHTERSACH, L.; CIGIĆ, B. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 5, p. 767–772, 2007.

YAMAL-TURBAY, E.; GRAELLS, M.; PÉREZ-MOYA, M. Systematic assessment of the influence of hydrogen peroxide dosage on caffeine degradation by the photo-fenton process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 13, p. 4770–4778, 2012.

ZAZO, J. A. et al. Intensification of the Fenton process by increasing the temperature. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 2, p. 866–870, 2011.

ZHAO, M. J.; JUNG, L. Kinetics of the competitive degradation of Deoxyribose and other molecules by Fenton reaction in the presence of ascorbic acid. **Free Radical Research**, v. 23, n. 3, p. 229–243, 1995.

**CAPÍTULO 4 - PRODUTOS OBTIDOS DA CONVERSÃO DA CAFEÍNA EM
CONDIÇÕES FENTON, TIPO-FENTON E COM ÁCIDO ASCÓRBICO**

RESUMO

Foram verificados a formação de cerca de 10 produtos de transformação da cafeína, detectados por HPLC, sendo avaliados quanto ao tempo de retenção e espectro no UV-Vis. Com base nas reações de oxidação da cafeína e em relatos científicos, espera-se que esses produtos correspondam aos derivados metilados da xantina e do ácido úrico. O trabalho tem por objetivo aplicar os processos catalíticos para promover a conversão da cafeína nas dimetilxantinas. Dessa forma, busca-se avaliar os produtos formados, propor as reações envolvidas e seus mecanismos, e ainda tentar relacionar condições reacionais com formação dos produtos. Foram avaliadas condições reacionais incluindo diferentes concentrações dos reagentes Fenton (íons ferro e H_2O_2), AA e inibidores de radicais, utilizando a teobromina como indicador das reações de N-desmetilação da cafeína. Foi comprovada a formação de teobromina ao utilizar processo Fenton ou em ácido ascórbico, indicando a capacidade de promoverem reações de N-desmetilação. O levantamento dos relatos bibliográficos permitiu estimar a ordem de eluição dos outros produtos de transformação, levando em consideração as condições cromatográficas, coluna C18 com fase móvel de mistura de água e solventes metanol ou acetonitrila: monometilxantina, teobromina, ácido 1,7-dimetilúrico, paraxantina, teofilina, ácido 1,3,7-trimetilúrico e posteriormente a cafeína. A avaliação dos espectros no UV revela os máximos de absorção para as xantinas em aproximadamente 205 e 272 nm; e para os derivados do ácido úrico 220 e 295 nm sendo verificados entre 8 e 10 minutos de eluição. Como tentativa de identificação dos analitos, foi realizada a análise empregando a espectrometria de massas sendo verificado o íon m/z 181, compatível com as dimetilxantinas. Assim foi comprovado a formação de metilxantinas e derivados do ácido úrico cujos mecanismos de reação de N-desmetilação e C-hidroxilação foram propostos com razão cafeína/ HO^\cdot de 1:2, via radicais hidroxila, ou cafeína/ H_2O_2 1:1, mediada por H_2O_2 .

Palavras-chave: Oxidação catalítica da cafeína. N-desmetilação. Obtenção da teobromina.

ABSTRACT

It was verified the formation of about 10 caffeine transformation products, detected by HPLC, being evaluated for retention times and UV spectrum. Based on the oxidation reactions of caffeine and scientific reports, these products are expected to correspond to the methylated derivatives of xanthine and uric acid. The work aims to apply catalytic processes to promote the conversion of caffeine into dimethylxanthines. Thus, we seek to evaluate the products formed, propose the reactions involved and their mechanisms, and also try to relate reaction conditions with product formation. Reaction conditions were evaluated including different concentrations of Fenton reagents (iron and H₂O₂), AA and radical inhibitors, using theobromine as an indicator of caffeine N-demethylation reactions. The formation of theobromine was proven using Fenton process or in ascorbic acid, indicating the ability to promote N-demethylation reactions. The survey of bibliographic reports allowed to estimate the elution order of the other transformation products, taking into account the chromatographic conditions of a C18 column with a mobile phase of a mixture of water and methanol or acetonitrile solvents: monomethylxanthine, theobromine, 1,7-dimethyluric acid, paraxanthine, theophylline, 1,3,7-trimethyluric acid and then caffeine. Evaluation of the UV spectra reveals absorption maxima for xanthines at approximately 205 and 272 nm; and for the uric acid derivatives 220 and 295 nm being verified between 8 and 10 minutes of elution. As an attempt to identify the analytes, the analysis was carried out using mass spectrometry, verifying the ion m/z 181, compatible with the dimethylxanthines. Thus, the formation of methylxanthines and uric acid derivatives was confirmed, whose reaction mechanisms of N-demethylation and C-hydroxylation were proposed with a caffeine/HO[•] ratio of 1:2, via hydroxyl radicals, or caffeine/H₂O₂ 1:1, mediated by H₂O₂.

Keynotes: Catalytic oxidation of caffeine. N-demethylation. Obtaining theobromine.

1 INTRODUÇÃO

Determinadas moléculas de interesse são obtidas por extração de fontes naturais ou síntese. A obtenção das dimetilxantinas é difícil e onerosa, tornando vantajoso a pesquisa por métodos alternativos, com processos sustentáveis utilizando a cafeína como precursor. Desse modo, as reações catalíticas Fenton e tipo-Fenton são potenciais processos de transformação para a obtenção dessas moléculas de interesse.

As metilxantinas são um grupo de alcalóides purínicos presentes em plantas como chá, cacau e café, representados pela cafeína, teobromina e teofilina. A cafeína é abundante sendo encontrada com cerca de 1 a 4% no café, e facilmente extraída com fins industriais. As outras metilxantinas são de difícil obtenção e a paraxantina não é encontrada em fontes naturais.

O processo Fenton emprega íons ferro como catalisadores e pode gerar as dimetilxantinas a partir da cafeína, mimetizando o meio biológico. No metabolismo hepático humano, as enzimas que degradam a cafeína gerando as dimetilxantinas tem o ferro no sítio catalítico, que promove a reação de N-desmetilação.

Considerando a demanda por processos ambientalmente amigáveis, pretende-se aplicar as reações catalíticas para a conversão da cafeína nas dimetilxantinas, consistindo em um método alternativo para sua obtenção. Ao estudar reações Fenton, tipo-Fenton e com ácido ascórbico, verificou-se a formação de diferentes produtos da cafeína que foram monitorados por HPLC. Nesse contexto, o trabalho objetiva identificar os produtos gerados da oxidação da cafeína, elucidar a obtenção das dimetilxantinas a partir da cafeína por processos catalíticos homogêneos Fenton, tipo-Fenton ou com ácido ascórbico, e propor suas rotas de transformação.

Diante das diferentes condições reacionais de transformação da cafeína e baseado nos produtos gerados, buscou-se otimizar as condições reacionais para favorecer as reações de N-desmetilação avaliados através do rendimento e seletividade desses produtos.

Dessa forma, buscou-se o aproveitamento dos recursos naturais, com a utilização da cafeína para obtenção de moléculas com valor agregado, utilizando processos de inovação tecnológica com menor número de etapas, evitando uso de reagentes de alto custo ou tóxicos, alinhado aos preceitos da “Química Verde”.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produtos de degradação da cafeína

Diante da importância da cafeína para o homem e sua vasta presença no ambiente, compreendendo aspectos fisiológicos ou metabólicos e de controle ambiental, existem muitos estudos sobre sua oxidação relacionada tanto ao seu metabolismo ou como alternativa de remoção do ambiente.

Um dos principais produtos de degradação da cafeína relatado é o ácido dimetilparabênico, verificado em diferentes condições seja ao utilizar metaloporfirina, em condições Fenton ou ainda em cloração (SIMÕES et al., 2013; ZARRELLI et al., 2014). O emprego do catalisador metaloporfirina e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como modelo biomimétrico do *citocromo P450* (CYP) na degradação de cafeína, resulta na conversão entre 78 e 100% em até 10 horas, gerando principalmente ácido dimetilparabênico (NEVES et al., 2011).

A reação Fenton foi avaliada como ferramenta sintética para N-desmetilação frente as xantinas: cafeína, teofilina e teobromina, no intuito de simular o metabolismo hepático, com obtenção de produtos decorrentes das reações de N-desmetilação e hidroxilação, indicando que o reagente Fenton poderia atuar como modelo biomimétrico das reações de hidroxilação e N-desmetilação das xantinas no CYP (ZBAIDA et al., 1987).

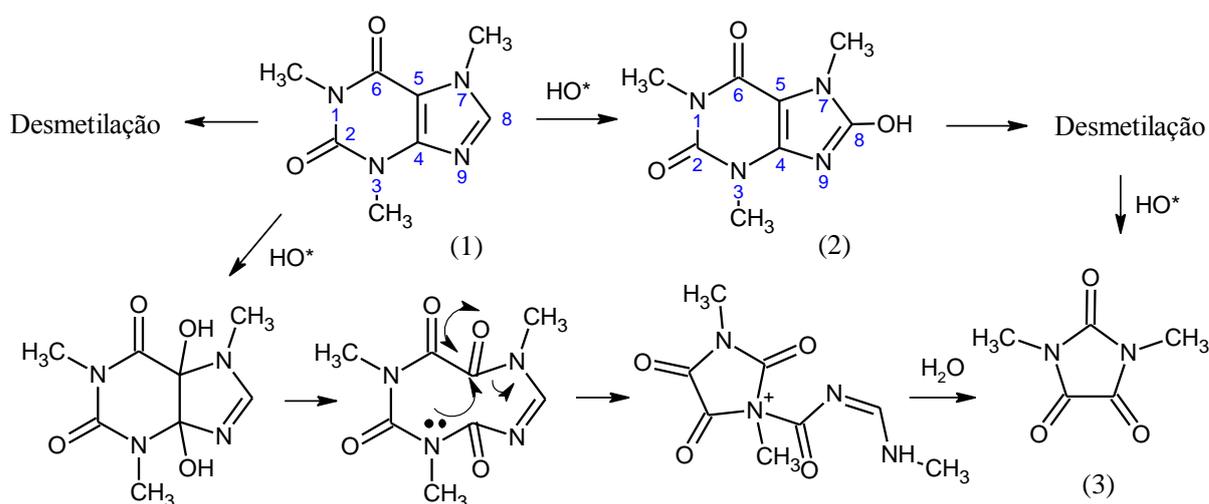
A avaliação de produtos de degradação da cafeína por reações radiculares já foi relatada, apontando o ácido 1,3,7-trimetilúrico como principal produto de degradação (STADLER; FAY, 1995), além dos produtos de monodesmetilação, teobromina e teofilina, em quantidade traço (TELO; VIEIRA, 1997).

Na condição tipo-Fenton Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 /ascorbato, foram observados por LC-MS majoritariamente o produto da incorporação do átomo de oxigênio na posição C8, denominado 8-oxocafeína ou ácido 1,3,7-trimetilúrico com m/z 211, além do produto de abertura do anel imidazólico, 6-amino-5-(N-formilmetilamino)-1,3-dimetiluracil (1,3,7-DAU) com m/z 213, e as metilxantinas teobromina, paraxantina e teofilina com m/z 181 (STADLER et al., 1996).

Outro estudo de degradação da cafeína por processos oxidativos com sistema Fenton, UV/ H_2O_2 , TiO_2 /UV, aponta o mecanismo de reação via radicais hidroxila livres e a formação dos produtos de oxidação pela inserção de OH na ligação dupla, principalmente em C8 gerando ácido 1,3,7-trimetilúrico; além de produtos de N-desmetilação como teofilina, embora em baixas concentrações. Foi relatado que estes compostos são progressivamente convertidos ao

ácido dimetilparabânico sob fortes condições oxidantes (DALMÁZIO et al., 2005). A Figura 1 ilustra alguns dos produtos de reações de oxidação da cafeína.

Figura 1 - Produtos de oxidação da cafeína (1) formados por hidroxilação, ácido 1,3,7-trimetilúrico (2), desmetilação e oxidações sucessivas gerando ácido N-dimetilparabânico (3).



Fonte: Adaptado de Dalmázio et al. (2005); Ganzenko et al. (2015).

A cafeína, assim como seus principais metabólitos (teobromina, teofilina, paraxantina e 1-metilxantina) apresenta atividade antioxidante removedora de radicais livres com reatividade similar, destacando-se a teobromina (LEÓN-CARMONA; GALANO, 2012). Um recente estudo para avaliação da potencial atividade antioxidante da cafeína para proteção de moléculas biológicas, empregou a oxidação mediada por radicais HO^* gerados por irradiação gama ou fotólise-UV/ H_2O_2 e identificou os produtos da degradação da cafeína por HPLC: ácido 1,3,7-trimetilúrico, teofilina, teobromina, paraxantina, ácido 3-metilxantina e ácido 1,3-dimetilúrico (VIEIRA; GASPAR; SANTOS, 2020).

Fica evidente que as reações de oxidação da cafeína acarretam, além da incorporação de oxigênio ou abertura do anel, reações de N-desmetilação capazes de gerar as metilxantinas teofilina, paraxantina (DALMÁZIO et al., 2005; GANZENKO et al., 2015; INDERMUHLE et al., 2013) e teobromina (VIEIRA; GASPAR; SANTOS, 2020).

2.2 Estratégias de obtenção das dimetilxantinas

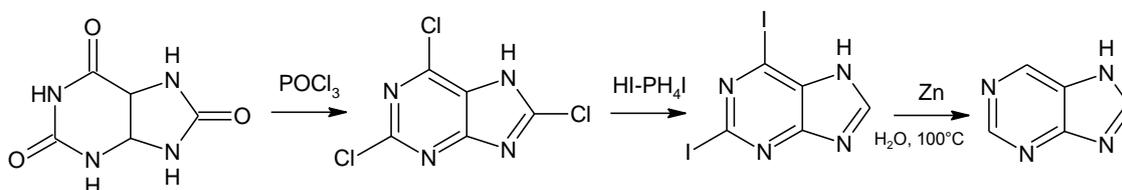
A teobromina é obtida naturalmente por extração de plantas ou por métodos de síntese, incluindo a catálise e a biocatálise. Como é um componente fitoquímico presente em plantas,

pode ser extraída dos grãos do cacau, embora apresente teores abaixo de 1%. No café, a teobromina é encontrada em quantidades traço (ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008).

Existem protocolos de obtenção da teobromina incluindo diferentes preparos da amostra e extrações líquido-líquido, fase-sólida, com uso de solventes, assistido por micro-ondas e fluido supercrítico, empregando água e solventes orgânicos (MONTEIRO et al., 2016). Tem-se ainda etapas adicionais de purificação dependendo da finalidade desejada. Diante da pequena quantidade de teobromina nos tecidos vegetais e complexidade da matriz, sua obtenção natural apresenta grandes desvantagens como uso de reagentes tóxicos, baixa especificidade, alto custo de instalações e operações (ALGHARRAWI; SUMMERS; SUBRAMANIAN, 2017; MONTEIRO et al., 2019).

As metilxantinas, como a teobromina, podem ser sintetizadas em laboratório. A síntese química de alcalóides purínicos foi primeiramente realizada por Fischer em 1898, a partir do ácido úrico, conforme Figura 2.

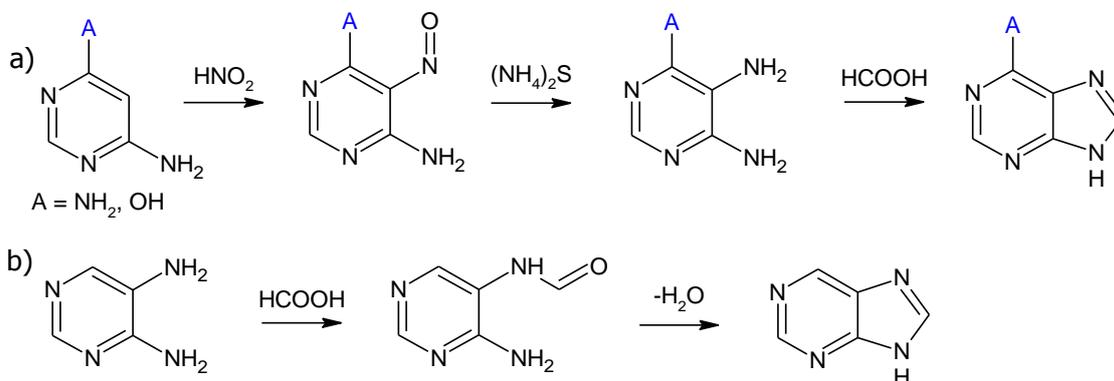
Figura 2 - Síntese de purina proposta por Fischer a partir do ácido úrico.



Fonte: Wikipedia “Purine” (2021).

Posteriormente, em 1900 Traube sintetizou purina a partir de 4-amino-6-hidroxipirimidina ou 4,6-diamino-pirimidina; alternativamente, a purina foi produzida da ciclização de 4,5-diaminopirimidina com ácido fórmico (Figura 3) (WANG, 2010).

Figura 3 - Síntese de purina proposta por Traube a partir de 4-amino-6-hidroxipirimidina ou 4,6-diamino-pirimidina (a), ciclização de 4,5-diamino-pirimidina (b).

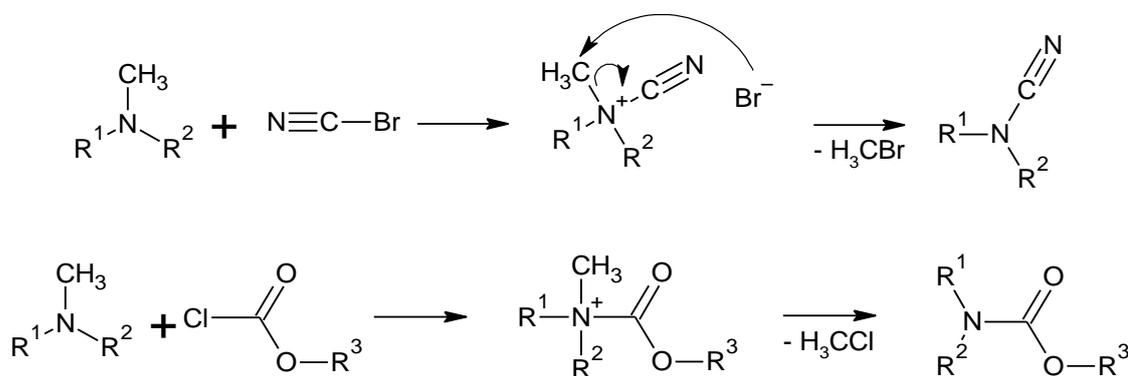


Fonte: Adaptado de Wang (2010).

A teobromina pode ser sintetizada por metilação da 3-metilxantina com dimetilsulfato (CHRIST, 1999), entretanto é um método inviável devido ao alto custo dos reagentes e da toxicidade do dimetilsulfato (ALGHARRAWI; SUMMERS; SUBRAMANIAN, 2017).

Métodos de N-desmetilação podem ser empregados para obtenção das metilxantinas a partir da cafeína. O método mais comum para N-desmetilação de N-metilaminas terciárias é a reação de von Braun, em que o brometo de cianogênio (BrCN), ou cloroformato são os agentes desmetilantes, os quais após hidrólise, geram as aminas secundárias conforme Figura 4 (AWALT et al., 2017; COOLEY; EVAIN, 1989).

Figura 4 - Representação das reações de von Braun para N-desmetilação de N-metilaminas terciárias com brometo de cianogênio ou cloroformato.



Fonte: Adaptado de Cooley (1989).

De maneira geral, os métodos sintéticos possuem a desvantagem de utilizarem reagentes de alto custo e tóxicos, além de necessitarem de muitas etapas de reação em condições severas

e ainda a geração de subprodutos perigosos. Nesse sentido, métodos que empregam catálise tem demonstrado bons resultados nas reações de N-desmetilação, principalmente em alcalóides opiáceos, usando uma reação Polonovski modificada com a vantagem de diminuição dos impactos ambientais, utilizando menor quantidade de solventes e reagentes menos agressivos (AWALT et al., 2017; DO PHAM et al., 2014; KOK; SCAMMELLS, 2012).

Uma alternativa para a formação de metilxantinas, empregando a cafeína como precursor, é via biocatálise. Assim, a teobromina pode ser obtida por emprego de engenharia genética utilizando microrganismos modificados através de catálise enzimática com a vantagem de alta seletividade (ALGHARRAWI; SUMMERS; SUBRAMANIAN, 2017).

2.3 Reações de N-desmetilação

Partindo da cafeína que é abundante, e ainda pode ser retirada de biomassa pouco explorada como a casca do café, tem-se a reação de N-desmetilação como forma de gerar moléculas de interesse. Nesse sentido busca-se elucidar as alternativas para aplicação.

2.3.1 In vivo

As enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica, algumas com íons metálicos nos sítios catalíticos específicos capazes de mediar reações de oxirredução, pela transferência de elétrons, além de interações iônicas que orientam o substrato na reação ou ainda proporcionam a estabilização dos estados de transição. Reações de N-desmetilação são frequentemente encontradas em reações metabólicas, responsáveis pelo metabolismo de drogas contendo nitrogênio (CHEN et al., 2015).

Existem 4 vias principais do metabolismo da cafeína envolvendo reações de N-desmetilação nas posições N1, N3 e N7, e reação de oxidação em C8, mediados por dois tipos de enzimas *citocromo P450* e *flavina monooxigenase* (CHEN et al., 2015; KANG et al., 2016).

O *citocromo P450* (CYP ou CYP450) é uma superfamília de proteínas responsáveis por promover a oxidação de diversas substâncias durante o metabolismo humano para torná-las mais polares e hidrosolúveis, facilitando sua excreção. Possuem o grupo prostético heme, que consiste em átomo de ferro no estado de oxidação 2+ (ferroso) no centro de anel orgânico heterocíclico (NELSON; COX, 2002).

No organismo humano, as principais enzimas envolvidas na reação de N-desmetilação pertencem a família CYP1A2, que é responsável por cerca de 95% do metabolismo da cafeína (CORNELIS et al., 2016), sendo a principal rota de oxidação a 3-N-desmetilação, gerando a

paraxantina, e posteriormente a 1-metilxantina (MONTEIRO et al., 2019). Nesse sentido, a cafeína é empregada como molécula sonda na avaliação da atividade da enzima CYP1A2 (BIANCO et al., 2009).

Existem ainda outras enzimas responsáveis por outras rotas metabólicas, como a família CYP3A que produz principalmente ácido 1,3,7-trimetilúrico. Fica evidente a atuação de diversas enzimas no metabolismo hepático da cafeína, resultando na formação de diversos produtos/intermediários, compreendendo os 3 principais metabólitos: paraxantina (84%), teobromina (12%) e teofilina (4%), que podem ainda ser degradados a xantinas e ácidos úricos. Ressalta-se que esses valores são aproximados, com variações interindividuais, e decorrentes da especificidade e atividade enzimática (CORNELIS et al., 2016).

No metabolismo vegetal, a cafeína é biosintetizada a partir da xantosina com três passos de metilação, mediada por enzimas *sintase*, incluindo a teobromina como intermediário (ASHIHARA, 2016). Nas folhas do café, a principal via catabólica da cafeína é sua conversão inicial a teofilina, mediada pela enzima *N7-desmetilase*, seguindo para 3-metilxantina, xantina até gerar CO₂ e NH₃. Outras vias catabólicas passam pela formação de teobromina (ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008).

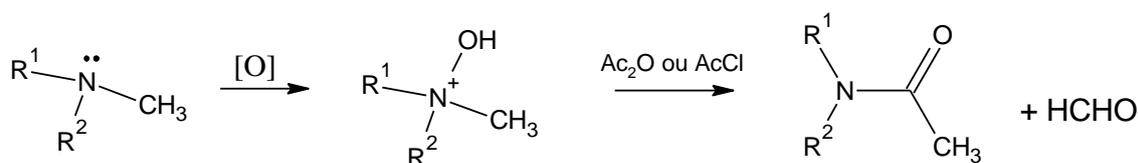
Ao contrário de muitos microrganismos que são sensíveis a cafeína, sendo inibidos em sua presença, a bactéria do solo *Pseudomonas putida* (mais especificamente a cepa CBB5) é capaz de utilizar a cafeína como substrato promovendo sua degradação em xantinas via N-desmetilação. Os estudos das enzimas bacterianas envolvidas apontam que os centros ativos são constituídos por ferro não-heme ou cobalto (KIM et al., 2019).

2.3.2 Reação Polonovski

A reação de Polonovski foi descoberta em 1927 por Max e Michel Polonovski para o tratamento de amina terciária N-óxido com anidrido acético ou cloreto de acetila, promovendo a quebra de um grupo alquila ligado ao nitrogênio, que pode resultar em vários produtos como: sais imínio, derivado N-acetilado da amida secundária correspondente e aldeído, ou ainda amidas terciárias e aminas secundárias. A reação é caracterizada por formação de íon imínio intermediário e efetivamente empregada em reações de N-desmetilação de aminas terciárias, devido a condições brandas utilizadas, sendo uma alternativa a reações de von Braun e alquil-cloroformatos anteriormente relatadas, que requerem condições mais drásticas (GRIERSON, 1990).

A Figura 5 ilustra de forma simplificada as reações Polonovski clássica.

Figura 5 – Reação Polonovski clássica.

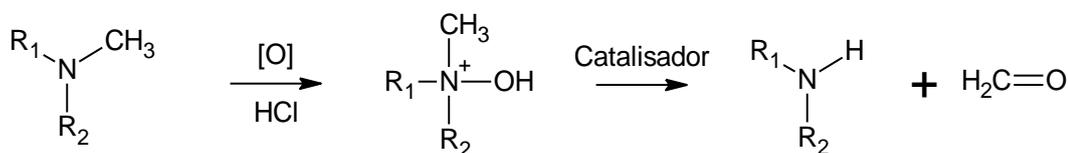


Fonte: Adaptado de Grierson (1990).

Em princípio, qualquer reagente capaz de ativar o oxigênio N-óxido poderia promover a reação Polonovski, entretanto os principais agentes ativantes são anidridos e cloretos ácidos, sais de ferro e dióxido de enxofre. Sais de ferro promovem a reação Polonovski, porém apresentam rendimentos moderados pois ocorrem reações competitivas como a redução do N-óxido a amina terciária, necessitando de otimização das condições de modo a favorecer a formação de amina secundária. O ferro catalisa a transformação de amina N-óxido a aminas secundárias com duas etapas de transferência de elétrons envolvendo reações $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ redox (GRIERSON, 1990).

Alguns trabalhos relatam que a reação Polonovski clássica não promove adequadamente a N-desmetilação de alcalóides opiáceos e detalham que a reação definida como Polonovski modificada promove a N-desmetilação em 2 etapas: i. oxidação do substrato para o correspondente N-óxido, seguido do isolamento do N-óxido como sal de cloridrato; ii. tratamento do N-óxido com catalisador (ativação) e decomposição do produto desmetilado, conforme Figura 6 (AWALT et al., 2017; DO PHAM et al., 2014; KOK et al., 2010; KOK; SCAMMELLS, 2012).

Figura 6 - Esquema de reação N-desmetilação em condições tipo-Polonovski.



Fonte: Adaptado de Kok; Scammells (2012).

A reação de N-desmetilação seletiva é relatada em alcalóides utilizando complexos de ferro como catalisadores (DO PHAM et al., 2014). A reação ocorre em duas etapas como supracitado, com excesso de H_2O_2 (50 equivalentes) para a oxidação do alcalóide ao correspondente N-óxido, e a seguinte N-desmetilação. Esse estudo permite propor um método com óxidos de ferro ou reagentes Fenton para avaliação da reação redox.

Outros exemplos de aplicação da reação Polonovski modificada são a utilização de ferro metálico em pó, que apresentou cerca de 86% em rendimento do opióide derivado N-

desmetilado (KOK et al., 2010); o emprego de ferroceno, que catalisou a conversão de diversos opióides (KOK; SCAMMELLS, 2012); e ferro zero valente, que foi gerado *in situ* e proporcionou boas taxas de conversão de 80 a 90% para diferentes derivados opióides N-desmetilados. Além disso o ferro zero valente promoveu melhorias operacionais, como condições mais brandas e reagentes menos agressivos, sem utilizar solventes orgânicos e com fácil recuperação do catalisador (AWALT et al., 2017).

2.3.3 Biocatálise

A biocatálise é um processo de modificação molecular específica catalisada por meios biológicos como células ou enzimas, apresentando assim vantagens de ser ambientalmente correta e com ótima seletividade. Entretanto, apresenta grandes dificuldades de realização seja pela inibição que a própria cafeína acarreta nas diferentes cepas de microrganismos ou da grande demanda tecnológica. Os alcalóides purínicos cafeína e teobromina foram sintetizadas por fermentação em cultura de *Saccharomyces cerevisiae* modificados embora em baixo rendimento com conversão de cerca 2% (JIN et al., 2014).

Uma possibilidade de realização de reações de N-desmetilação é o emprego de engenharia metabólica utilizando microorganismos modificados que expressam enzimas *N-desmetilases*. A teobromina foi obtida por reação de N-desmetilação enzimática a partir da cafeína catalisada por cepas *E. coli* geneticamente modificadas com genes *P. putida* CBB5, apresentando 98% de conversão e 80% de rendimento (ALGHARRAWI; SUMMERS; SUBRAMANIAN, 2017).

2.3.4 Reação Fenton como promotora de N-desmetilação

Reações de N-desalquilação, assim como a formação de N-óxidos são comumente realizadas via oxidação catalisadas por CYP. Métodos *in vitro*, utilizando estratégias não-enzimáticas tem sido desenvolvidos como promotores de reações simulando processos enzimáticos, catalisadas no centro heme do CYP. Nesse sentido inclui-se a reação Fenton, que é principalmente avaliado para tratamento de água residuais, como promotora de reações N-desalquilação e hidroxilação. O radical hidroxila gerado no sistema Fenton, é uma espécie altamente eletrofílica que inicia várias reações com componentes orgânicos pela adição a sistemas insaturados ou abstração de hidrogênio (LOHMANN; KARST, 2008).

As metilxantinas sofrem N-desmetilação e C-hidroxilação por reações na condição Fenton gerando derivados da xantina e do ácido úrico, respectivamente. Estas reações se

processam pela transferência de oxigênio para o substrato, simulando as reações do metabolismo hepático de drogas (ZBAIDA et al., 1987).

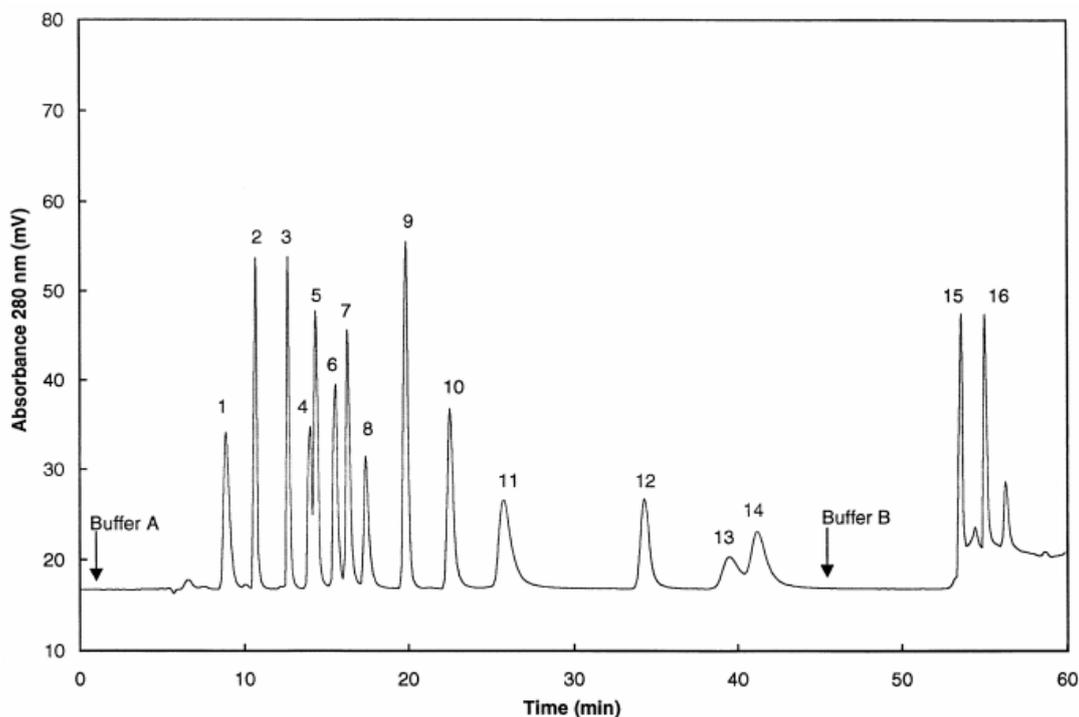
2.4 Monitoramento de produtos reacionais por HPLC

Ao abordar as técnicas de quantificação das metilxantinas constata-se a predominância do uso de HPLC, com configuração de fase estacionária reversa C18 e fase móvel constituída de misturas de água e solventes, utilizando padrões analíticos das substâncias para a identificação dos analitos com base em seus RT. Dessa forma, a técnica de HPLC é empregada seja visando o desenvolvimento analítico (BENDRISS; MARKOGLU; WAINER, 2000; BÜYÜKTUNCEL, 2010; DMITRIENKO et al., 2013; GEORGA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2000; LOPEZ-SANCHEZ et al., 2018) ou na determinação da cafeína e seus derivados metabólicos para relacionar a condições fisiológicas (CHEN et al., 2017; GEORGAKOPOULOS et al., 2009; GRACIA-LOR et al., 2017; HE et al., 2018; VIEIRA; GASPAR; SANTOS, 2020).

No trabalho de Büyüktuncel (2010), foram identificados os picos de teobromina, paraxantina, teofilina e cafeína por comparação com padrões, utilizando a mistura tampão pH 4/ metanol 86:14 como fase móvel, fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C18 150 x 4,6 mm e 5 μm de tamanho de partícula. Dmitrienko e colaboradores (2013) avaliaram a eluição de teobromina, teofilina e cafeína em coluna C18 150 x 3 mm 5 μm de tamanho de partícula, com fluxo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando solução 0,1% de ácido fosfórico e acetonitrila nas proporções (95:5) e (93:7).

Em outro relato de aplicação, a técnica de HPLC avaliou a determinação de cafeína e de 14 metabólitos em urina humana, utilizando coluna de fase reversa com dois programas de eluição de modo isocrático em faixas de tempo distintas. Essas condições possibilitaram a adequada separação dos analitos, conforme cromatograma representado na Figura 7 (BENDRISS; MARKOGLU; WAINER, 2000).

Figura 7 - Cromatograma da mistura de padrões da cafeína e seus metabólitos.



Nota: 1: 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil (AFMU), 2: ácido 3-metilúrico, 3: ácido 7-metilúrico, 4: 7-metilxantina, 5: ácido 1-metilúrico, 6: 3-metilxantina, 7: ácido 3,7-dimetilúrico, 8: 1-metilxantina, 9: padrão interno, 10: ácido 1,3-dimetilúrico, 11: 3,7-dimetilxantina, 12: ácido 1,7-dimetilúrico, 13: 1,7-dimetilxantina, 14: 1,3-dimetilxantina, 15: ácido 1,3,7-trimetilúrico, 16: 1,3,7-trimetilxantina (cafeína). Solvente A: solução de ácido acético 0,05% /metanol (92,5:7,5); solvente B: solução de ácido acético 0,05% /metanol (60:40).

Fonte: adaptado de Wainer (2000).

Para a comparação entre analitos eluídos é importante o entendimento de alguns parâmetros cromatográficos. O tempo de retenção (RT, do inglês *retention time*) é característico do analito e depende das condições cromatográficas como composição e fluxo da fase móvel, temperatura do forno e da coluna cromatográfica em uso. Apesar da técnica proporcionar a separação por diferentes interações das moléculas, pode ocorrer coeluição de analitos no mesmo tempo. Assim, a comparação entre tempos de retenção das amostras e padrões de referência são apenas indicativos da correta identidade da molécula, sendo necessário outras técnicas que auxiliem em sua caracterização.

Para fins de comparação entre analitos eluídos em diferentes condições cromatográficas utiliza-se o fator de retenção (k), equação (2.1), que depende dos tempos de retenção e do tempo morto da coluna (2.2), estabelecendo uma razão entre a quantidade de analito com afinidade pela fase estacionária e pela fase móvel.

$$k = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

$$V_0 = \pi \cdot r^2 \cdot comprimento \cdot f \quad (2.2)$$

$$t_0 = V_0 \times fluxo \quad (2.3)$$

Como forma de superar dificuldades de eluição ou comparação de analitos baseado no RT, tem-se o emprego de detectores que garantem a identificação das moléculas mesmo sem um padrão de comparação ou quando coeluem, destacando-se a associação da cromatografia líquida com técnicas de espectrometria de massas (BARTELLA et al., 2019; JERKOVIĆ et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2017).

2.5 Aplicação da espectrometria de massas na identificação das moléculas

A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é uma técnica analítica que consiste na dispersão das moléculas em fase gasosa com formação de íons, com posterior separação desses íons baseado em seu peso molecular e carga iônica, denominado razão massa/carga (m/z), e a seguinte detecção. A estrutura geral do instrumento compreende: a unidade de introdução da amostra, a fonte de ionização, o analisador de massa, o detector e um sistema de dados (PAVIA et al., 2015). Essa técnica proporciona a identificação de moléculas com a obtenção da fórmula molecular e ainda a comparação com uma biblioteca de possíveis moléculas baseado no peso molecular.

Dentre as fontes de ionização, tem-se o “Electrospray” (ESI, do inglês *electrospray ionization*) que possibilita acoplar à saída do HPLC, com a vantagem de introduzir a amostra em solução ao ser borrifada na ponta do tubo capilar em câmara aquecida com aplicação de potencial de alta voltagem para a formação de pequenas gotículas carregadas, liberando íons que são atraídos para o analisador de massas. Esse sistema permite a seleção do modo de ionização positivo ou negativo.

Os analisadores de massa realizam a separação dos íons de acordo com a razão m/z , gerando o espectro de massas. Existem analisadores de massa de baixa resolução como o quadrupolo; e analisadores de alta resolução como o tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*). Esses analisadores podem ser acoplados em sequência denominado *tandem* (MS/MS), assim, um instrumento com configuração *tandem* seleciona o íon molecular para promover sua fragmentação gerando o íon filho, denominado monitoramento de reações múltiplas (MRM, do

inglês *multiple reaction monitoring*), conferindo alta especificidade e sensibilidade na identificação e quantificação de compostos orgânicos.

Espectrômetros do tipo triplo quadrupolo selecionam um íon ou fragmento no primeiro quadrupolo (Q1), na célula de colisão (Q2) promove fragmentação dos íons e filtra os fragmentos em Q3, gerando o espectro MS². Outras configurações de espectrometria de massas, como transformada de Fourier e ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR) ou o aprisionador de íons (IT, do inglês *ion trap*), permitem isolar íons de m/z específica e submetê-los a novas colisões, gerando fragmentos menores ou íons produtos possibilitando a identificação precisa dos compostos por avaliação MS², MS³, MS⁴.

Rodriguez e colaboradores (2017) desenvolveram um método de cromatografia líquida empregando fase reversa C18, fase móvel constituída por água ultrapura e acetonitrila contendo ácido fórmico, acoplado a espectrometria de massas com fonte ESI para a quantificação de metabólitos das metilxantinas em urina. Foi evidenciado a ordem de eluição dos analitos: ácido úrico, hipoxantina, xantina, 7-metilxantina, ácido 1-metilúrico, 3-metilxantina, 1-metilxantina, ácido 1,3-dimetilúrico, teobromina, paraxantina, teofilina, cafeína. A quantificação por MS foi realizada no modo positivo, uma vez que os analitos 7-metilxantina, teobromina, paraxantina e cafeína não foram detectados no modo negativo, atribuído a presença de grupo metila na posição 7. Essa ordem de eluição foi confirmada em outro trabalho, que empregou coluna C18 e mistura de água ultrapura e metanol como fase móvel e detecção MS/MS (com triplo quadrupolo), para a quantificação dos metabólitos da cafeína em estações de tratamento de esgoto (HE et al., 2018).

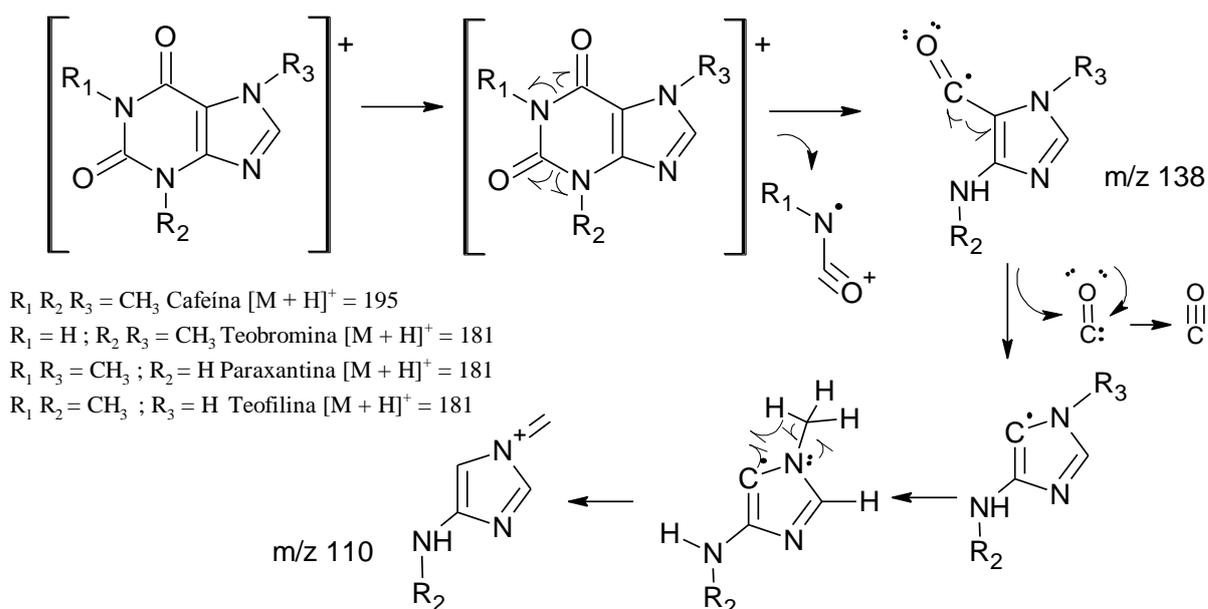
Um método analítico empregando MS/MS foi desenvolvido por Bartella e colaboradores (2019) para determinação de metilxantinas em produtos de cacau e formulações farmacêuticas. Nas condições MRM foram monitoradas as transições m/z 195 para m/z 138 na cafeína; m/z 181 para m/z 138 na teobromina e m/z 181 para m/z 124 na teofilina.

A importância do ajuste de pH na fase móvel foi constatada em estudo para a otimização de método para quantificação da cafeína, teobromina, paraxantina e teofilina em plasma humano por HPLC-ESI-MS/MS, com coluna C18 e FM de mistura de água ultrapura e metanol contendo 25 mM de ácido fórmico. Houve melhoria da intensidade do sinal de teobromina e diminuição de efeitos de matriz com a adição do ácido fórmico (CHEN et al., 2017).

O uso das técnicas MS em sequência permitem avaliar a fragmentação nas moléculas identificando os íons filhos, verificados nos espectro de massas. Dessa forma, a formação dos íons gerados das quebras da cafeína e de 14 metabólitos, indicou a fragmentação retro Diels-Alder como dominante com reação de contração do anel por perda de metil isocianato (57 Da)

ou de ácido isociânico (43 Da), ao utilizar MS/MS através da dissociação induzida por colisão em íon trap (BIANCO et al., 2009). A partir dessas informações tem-se a formação dos íons e suas fragmentações que são representadas na Figura 8.

Figura 8 – Representação dos íons moleculares e proposta de fragmentações para a cafeína e as dimetilxantinas.



Fonte: Adaptado de Bianco et al. (2009).

A Tabela 1 resume os dados da literatura levando em consideração a ordem de eluição e a fragmentação verificada.

Tabela 1 – Derivados da xantina detalhados por ordem de eluição, com indicação do íon molecular e íons gerados por fragmentação.

Analito	Abreviação	Íon molecular	Íons produto
5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil	AFMU	227	209; 199; 185 ; 181; 167
5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil	AAMU	199	181; 171 ; 157
Ácido 7-metilúrico	7U	183	183; 168; 155; 140 ; 112
7-metilxantina	7X	167	167; 150; 142; 124
Ácido 7-metilúrico	1U	183	183; 155 ; 126
3-metilxantina	3X	167	167; 124 ; 123; 96
Ácido 3,7-dimetilúrico	37U	197	197; 182; 179 ; 110

(Continua)

Analito	Abreviação	Íon molecular	Íons produto
1-metilxantina	1X	167	167; 110
Teobromina	37X	181	181; 138 ; 137; 110; 96
Ácido 1,3-dimetilúrico	13U	197	197; 169 ; 140
Paraxantina	17X	181	181; 142; 124
Ácido 1,7-dimetilúrico	17U	197	197; 140
Teofilina	13X	181	181; 124 ; 96
Ácido 1,3,7-trimetilúrico	137U	211	211; 196; 154 ; 126
Cafeína	137X	195	195; 151; 138 ; 110

Nota: Eluição empregando coluna C18 e mistura água e acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1% como fase móvel. Íons fragmentados de maior intensidade com destaque.

Fonte: Adaptado de Bianco et al. (2009).

Na cafeína, além do íon produto majoritário m/z 138, são observados os fragmentos m/z 163 decorrente da perda neutra de CH_3OH (32 Da) do íon molecular (m/z 195), o íon de m/z 151 resultado da contração do anel com perda de $\text{CH}_3\text{CH}=\text{O}$ (44 Da), e o íon a m/z 110 resultado da perda de CO (28 Da) do pico base m/z 138. Fragmentação similar ocorre nas outras metilxantinas com segmentação retro Diels-Alder para perda do metil isocianato ou de ácido isociânico originando os íons produtos $[\text{M}+\text{H}-57]^+$ ou $[\text{M}+\text{H}-43]^+$, respectivamente (BIANCO et al., 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Ácido acético glacial P.A, hidróxido de sódio P.A, ácido sulfúrico P.A, cloreto de ferro II tetra hidratado P.A, sulfato ferroso heptahidratado P.A, cloreto de ferro III hexahidratado P.A, peróxido de hidrogênio 30% P.A, ácido L-ascórbico P.A, 1,10-fenantrolina P.A; acetato de amônio P.A, etanol 95% P.A, ácido fórmico, silicone, clorofórmio P.A, gás nitrogênio e ar sintético, água de osmose reversa, água destilada, água ultrapurificada (tipo I), acetonitrila (grau HPLC), metanol (grau HPLC). Cafeína e teobromina (Sigma) com pureza superior a 98%.

3.2 Equipamentos

Estufa de secagem (Quimis), reator com sistema fechado, agitação, temperatura programável (Parr), balança analítica (Shimadzu), mini centrífuga (Kasvi), agitador magnético com aquecimento (IKA), pHmetro (Imolab), espectrofotômetro UV/Vis (PG Instruments), pipeta automática, microseringa 25 μ L (Hamilton), sistema de cromatografia líquida (Jasco) constituído por degaseificador, bomba quaternária PU 2089 Plus, detector UV 2075 Plus, coluna cromatográfica (Varian e Kromasil) C18 (150 x 4,6 mm x 5 μ m), sistema cromatográfico (Shimadzu) constituído por degaseificador DGU-20, bomba quaternária LC-20AT, autoamostrador SIL-20A, módulo de comunicação CBM-20A, detector DAD SPD-M20A, forno de coluna CTO-20AC, coluna cromatográfica (Supelco) C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m), sistema cromatográfico (Shimadzu) série 20 acoplado a MS TOF (micrOTOF QII Bruker), coluna C18 (150 x 2,1 mm x 2,7 μ m) membrana filtrante de 0,45 e de 0,20 μ m (Millex).

3.3 Preparo das soluções de trabalho

As condições para a degradação da cafeína por processo Fenton foram adaptadas de Oliveira (2015) e Trovó (2013).

O preparo da solução aquosa de cafeína a 1 mM correspondente a aproximadamente 0,2 g.L⁻¹ foi realizado como em outros estudos de N-desmetilação (ALGHARRAWI; SUMMERS; SUBRAMANIAN, 2017) e de sua degradação como micropoluentes (TROVÓ et al., 2013). Adicionou-se exatamente 200 mg de cafeína em balão volumétrico de 1 L, seguido de adição de água deionizada e agitação, após solubilização o volume foi completado.

A concentração de peróxido de hidrogênio nas reações foi obtida a partir de alíquotas da solução de peróxido de hidrogênio 3,0% cujo preparo se deu por diluição do reagente H_2O_2 30%. Assim uma alíquota dessa solução diluída de H_2O_2 foi utilizada em cada experimento, de modo a obter as concentrações desejadas de 1 e 2 mM como relatado na literatura (BAUTITZ; NOGUEIRA, 2007).

O efeito da concentração do catalisador foi avaliado em concentrações de 0,3 e 0,6 mM de íons ferro, conforme trabalhos anteriores (GANZENKO et al., 2015), utilizando cloreto de ferro II tetra hidratado P.A, sulfato ferroso heptahidratado P.A ou cloreto de ferro III hexahidratado P.A.

O pH das soluções aquosas foi ajustado com soluções de H_2SO_4 0,5 M ou HCl 0,5 M e NaOH 0,1 M.

As quantidades e proporções dos reagentes foram obtidas da literatura e modificadas ao longo dos testes. De acordo com Oliveira e colaboradores (2015), adotou-se a razão molar dos reagentes Fenton $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}$ de 10/3 como condição que proporcionou maior degradação de cafeína, essa concentração de reagentes está de acordo com trabalho que avaliou as condições Fenton e tipo-Fenton na degradação de contaminantes (BOLOBAJEV; TRAPIDO; DULOVA, 2015). Apesar de algumas modificações necessárias à avaliação da influência dos reagentes e suas concentrações na seletividade dos produtos, a concentração geral adotada foi de H_2O_2 0,07 g.L^{-1} correspondente a 2 mM, e Fe^{2+} 0,03 g.L^{-1} ou 0,6 mM, com pH ajustado para 3 utilizando-se solução de H_2SO_4 0,5M.

3.4 Procedimento experimental

Os experimentos foram realizados em reator de vidro (250 mL) acoplado a condensador de refluxo sob agitação magnética e aquecimento com banho de silicone, utilizando as soluções de trabalho descritas no item 3.5, em quantidades e concentrações especificadas já detalhadas. A utilização de solventes (etanol, metanol e acetonitrila) adicionados ao sistema Fenton, tipo-Fenton e com ácido ascórbico favoreceu a formação de alguns produtos de transformação da cafeína que não foram verificados em outras condições.

Uma outra sequência de experimentos foi realizada utilizando a solução de cafeína 0,20 g L^{-1} (1,03 mM), baseada nas condições reacionais anteriores, incluindo modificações como excesso de reagente Fenton visando avaliação dos produtos de transformação por HPLC-DAD (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições reacionais para avaliação dos produtos de transformação da cafeína por HPLC-DAD.

Experimento	H ₂ O ₂ (mM)	Fe (mM)	T(°C)	pH	Reagentes
51	5	Fe ²⁺ (1,5)	25	3	ajuste H ₂ SO ₄
52	5	Fe ²⁺ (0,3)	25	3	ajuste H ₂ SO ₄
53	30	Fe ²⁺ (9,0)	25	3	ajuste H ₂ SO ₄
54	-	-	25	7	2 mM AA
55	-	-	25	3	ajuste H ₂ SO ₄ , 2 mM AA,
56	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	7	2 mM AA, Metanol (10%)
57	2	Fe ²⁺ (0,6)	25	3	ajuste H ₂ SO ₄ , 2 mM AA, Metanol (10%)
58	10	Fe ²⁺ (3)	25	7	-

Fonte: Do autor (2021).

Posteriormente, foi preparada uma solução concentrada de cafeína a 20,0 g L⁻¹ (103 mM) no intuito de identificar os produtos de degradação gerados, ao submeter a condição reacional Fenton (10 mM de H₂O₂, 3 mM de Fe²⁺, em pH neutro) a temperatura ambiente por 24 horas (experimento 58). Essas reações foram monitoradas por HPLC-DAD.

3.5 Preparo das amostras para análise

Durante os experimentos, alíquotas foram coletadas visando monitorar a reação. O reagente Na₂SO₃ foi adicionado em excesso nas alíquotas destinadas a avaliação do teor de cafeína e TOC, para a remoção do H₂O₂ remanescente, interrompendo a reação Fenton de modo a proporcionar uma avaliação mais exata (TROVÓ et al., 2013).

A cada tempo de reação decorrido, uma alíquota foi coletada e tratada para análise: uma alíquota de aproximadamente 0,6 mL foi transferida para eppendorf contendo cerca de 200 mg de Na₂SO₃. Esta foi agitada e submergida em banho de gelo com posterior centrifugação. Dessa amostra, 0,2 mL foram diluídos para balão volumétrico de 5 mL, que após completar o volume foi filtrado através de membrana filtrante de 0,45 ou 0,20 µm para vial e reservado para monitoramento dos produtos de degradação da cafeína e teobromina por HPLC.

3.6 Determinação da concentração dos produtos por HPLC

Nesse trabalho utilizou-se 3 sistemas cromatográficos distintos: 1) HPLC com detector UV (Jasco), com coluna C18 de 150 x 4,6 mm e 5 micrômetros de tamanho de partículas, solução ácido acético 0,5 % (v/v) e acetonitrila na proporção 9:1, ou alternativamente água e acetonitrila 9:1 como fase móvel e fluxo de 1,0 mL.min⁻¹; 2) HPLC com detector DAD (Shimadzu), coluna C18 de 250 x 4,6 mm e 5 micrômetros de tamanho de partículas, mistura de água e acetonitrila 9:1 como fase móvel e fluxo de 1,0 mL.min⁻¹; 3) HPLC acoplado a DAD (Shimadzu) ou a micrOTOF QII Bruker para as análise por espectrometria de massas, coluna C18 de 150 x 2,1 mm e 2,1 micrômetros de tamanho de partículas, mistura de solução ácido fórmico 0,1 % (v/v) e acetonitrila 9:1 como fase móvel e fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

A concentração de cafeína no meio reacional foi determinada com os dados obtidos da curva de calibração da cafeína na faixa de $2,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ g.L⁻¹, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996. A conversão da cafeína foi calculada da razão entre a variação do número de mol e o número de mols no início da reação, equação (3.1).

$$C = \Delta mol / mol_i \quad (3.1)$$

A quantificação dos produtos de transformação da cafeína foi obtida por comparação das áreas dos picos das amostras com os dados obtidos da curva de calibração da teobromina na faixa de $1,1 \times 10^{-3}$ a $5,2 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9998.

A seletividade de formação dos produtos foi calculada da razão entre o mol do produto e a variação do número de mols da cafeína, multiplicado por 100 (%), equação (3.2). O rendimento de cada produto foi calculado da razão entre o mol do produto e o número de mols da cafeína no início da reação, multiplicado por 100 (%), equação (3.3).

$$S = \frac{mol\ prod}{\Delta mol\ cf} \quad (3.2)$$

$$R = \frac{mol\ prod}{mol\ cf_i} \quad (3.3)$$

Diante da verificação de produtos de degradação, novas amostras foram analisadas empregando HPLC/DAD para a obtenção dos espectros na região do UV. A curva de calibração foi obtida por injeção dos padrões como acima, apresentando coeficientes de determinação (R^2) de 0,9998 para a cafeína e 0,9994 para a teobromina.

3.7 Avaliação dos analitos por espectrometria de massas

Um sistema HPLC- QTOF constituído por cromatográfico Shimadzu, série 20, contendo detector de DAD acoplado a detector de massas híbrido do tipo triplo quadrupolo/TOF com ionizador ESI Bruker foi utilizado. O espectrômetro de massas foi configurado com fonte de ionização ESI no modo positivo: end plate offset 500V, fonte capilar 5.500V, pressão do gás N₂ nebulizador a 4 bar, fluxo do gás de secagem 10 L.min⁻¹ e temperatura de 200 °C ,com energia de colisão de 25 eV. Os parâmetros de ajustes de voltagens, lentes para seleção de íons nos módulos quadrupolo e TOF foram automaticamente otimizados pelo equipamento. Os dados foram adquiridos utilizando o software Compass.

O método cromatográfico empregou coluna C18 de 150 x 2,1 mm e fase móvel constituída de água ultrapura contendo ácido fórmico 0,1 % (v/v) e acetonitrila em eluição isocrática na proporção 9:1, com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, a 50 °C, monitorado a 272 nm por 10 minutos.

A solução de padrão foi preparada para a concentração final de 0,008 mg.mL⁻¹ de cafeína e injetada no HPLC-DAD em sextuplicada, apresentando DPR de 0,5%. Uma solução de padrão misto foi preparada contendo 0,004 mg.mL⁻¹ de cafeína e 0,002 mg.mL⁻¹ de teobromina, foi injetada no HPLC-DAD e HPLC-QTOF e utilizada para as quantificações.

As amostras foram preparadas reproduzindo as condições reacionais dos experimentos 39 e 41, que favoreceram a formação de produtos de transformação. Assim utilizou-se duas condições reacionais para promover a degradação da solução de cafeína 0,2 g.L⁻¹ ao longo de 24 horas: 1) Fenton (2mM H₂O₂, 0,6mM Fe²⁺) com adição de 1 mM de AA, 10% (v/v) de metanol, em pH neutro e temperatura ambiente; 2) Fenton (2mM H₂O₂, 0,6mM Fe²⁺) com adição de 1 mM de AA, 10% (v/v) de acetonitrila, em pH neutro e temperatura ambiente.

Após o tempo de 24 horas de reação sob agitação, foram retiradas alíquotas do reator e tratadas para eliminar interferentes: verificação do pH (aproximadamente 3,4), etapa de alcalinização (pH próximo de 10) com adição de 3 gotas de solução NaOH 1 M, centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, coleta do sobrenadante e diluição de 25 vezes, de modo a obter a concentração teórica de 0,008 mg.mL⁻¹ de cafeína. Posteriormente, procedeu-se filtração através de membrana filtrante de 0,2 µm de tamanho de poro para um vial identificado.

Inicialmente as amostras tratadas e contidas nos vials foram injetadas no HPLC-DAD para verificação dos RT dos produtos de degradação e áreas de pico. Assim, foi proposto um esquema de isolamento desses analitos formados, através da separação cromatográfica e coletada fracionada pós-DAD. Posteriormente cada fração foi injetada no HPLC-QTOF.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como apontado por dados da literatura, a cafeína pode gerar outras moléculas dependendo das condições reacionais. Dentre as possibilidades tem-se os produtos decorrentes de reações de hidroxilação e N-desmetilação.

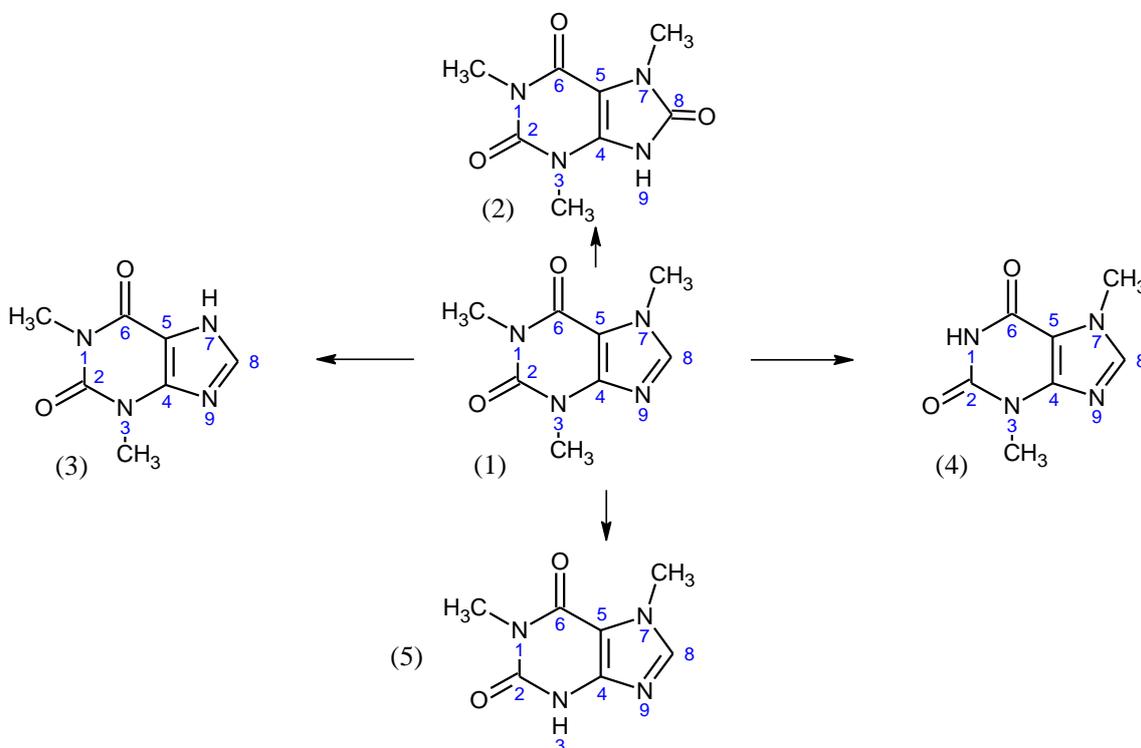
Considerando a reação de N-desmetilação, existem 3 possibilidades correspondentes às posições metiladas em N1, N3 e N7, com grupos funcionais vizinhos distintos afetando assim suas interações intra e intermoleculares e conseqüentemente sua reatividade.

A estrutura química da cafeína e sua reatividade pode ser relacionada com o número de possibilidades de ressonância, assim para maiores possibilidades de ressonância menor a probabilidade de ocorrer uma reação ou maior a estabilidade da molécula gerada. Dessa forma, o N7 da cafeína está menos envolvido em estruturas de ressonância que N1 e N3 apresentando maior possibilidade de reação uma vez que seus elétrons livres estão disponíveis para ataque e poderiam auxiliar na estabilidade da molécula resultante.

Com isso é esperado que o principal produto de N-desmetilação da cafeína seja a teofilina, cujo N desmetilado está no anel imidazólico. Posteriormente seria gerado em extensão intermediária a paraxantina, correspondente a N-desmetilação do N3 vizinho a uma carbonila, e por fim a teobromina correspondente a N-desmetilação do N1 vizinho a duas carbonilas.

A Figura 9 ilustra de maneira sucinta os principais produtos de degradação discutidos.

Figura 9 – Representação da estrutura química da cafeína (1) e possíveis produtos de transformação: ácido 1,3,7-trimetilúrico (2), teofilina (3), teobromina (4) e paraxantina (5).



Fonte: Do autor (2021).

4.1 Produtos de transformação da cafeína obtidos em diferentes condições

De acordo com as referências bibliográficas foi evidenciado que as reações inespecíficas tipo-Fenton promovem a hidroxilação em C8 e as desmetilações em N1, N3 e N7, que também ocorrem *in vivo* no metabolismo da cafeína. Assim, sugere-se que os produtos de degradação verificados nos cromatogramas correspondam a algumas dessas moléculas.

No monitoramento por HPLC-UV e DAD, verificou-se 10 picos como produtos de diferentes condições reacionais, sendo um deles a teobromina confirmada por injeção de padrão. Os outros produtos não foram comparados a padrão analítico, podendo apenas ser inferidos. Assim os produtos de transformação da cafeína foram denominados conforme sua ordem de eluição, sendo o “Pico 4” referente a teobromina. A Tabela 3 evidencia as condições reacionais que proporcionaram a obtenção da teobromina.

Tabela 3 - Condições de formação da teobromina, evidenciando a conversão da cafeína (C) e os valores para seletividade (S) e rendimento (R), no tempo de 24 horas.

Exp.	Condição	C (%)	S (%)	R (%)
9	1mM H ₂ O ₂ , 0,3mM Fe ²⁺ , pH3, 50 °C – 4h	23,0	2,9	0,7
10	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH3, 25 °C	79,3	1,0	0,8
14	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH3, 25 °C HCl	81,6	0,8	0,6
15	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ³⁺ , pH3, 25 °C HCl	88,2	1,1	1,0
16	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ³⁺ , pH3, 25 °C	71,7	1,0	0,7
18	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ³⁺ , pH2, 25 °C	45,1	1,8	0,8
19	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH7, 25 °C	53,9	1,6	0,9
20	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ³⁺ , pH7, 25 °C	49,1	1,6	0,8
21	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH7, 5 °C	57,9	1,4	0,8
23	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH10, 25 °C	45,4	1,9	0,8
24	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, pH3, 25 °C	82,8	0,9	0,8
25	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, pH7, 5 °C	71,7	1,2	0,9
30	1mM H ₂ O ₂ , 0,3mM Fe ²⁺ , 1mM AA, pH7, 25°C	43,9	1,8	0,8
31	1mM H ₂ O ₂ , 0,1mM Fe ²⁺ , 2mM AA, pH7, 25 °C	51,2	1,7	0,9
32	0,6mM Fe ²⁺ , 1mM AA, pH7, 25 °C	32,3	2,1	0,7
33	0,6mM Fe ²⁺ , 2mM AA, pH7, 25 °C	32,8	2,4	0,8
34	1mM AA, pH7, 25 °C	22,3	3,2	0,7
35	2mM AA, pH7, 25 °C	39,1	2,1	0,8
41	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, Acetonitrila, pH7, 25 °C	27,8	2,8	0,8
42	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , Clorofórmio, pH7, 25 °C	95,4	0,8	0,8
43	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, Clorofórmio, pH7, 25 °C	85,4	0,9	0,8

Nota: Os dados do experimento 9 são para o tempo de 4 horas de reação.

Fonte: Do autor (2021).

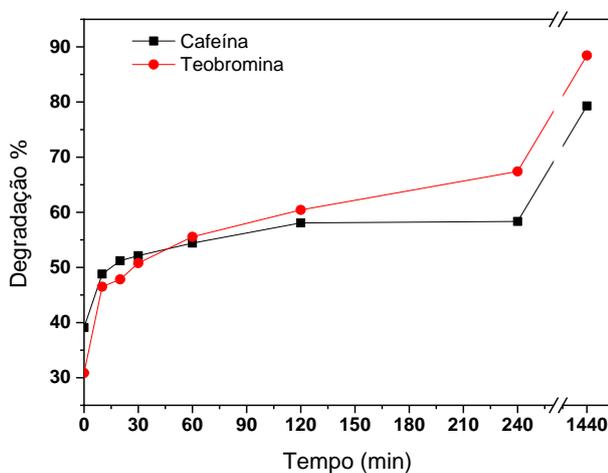
Os experimentos 32 e 35, realizados com a adição de clorofórmio, apresentaram separação de fase e seus resultados são imprecisos uma vez que ocorre extração dos analitos

para a fase clorofórmica. Essas condições em clorofórmio foram mantidas pois geraram produtos de transformação.

Observa-se que a teobromina é formada nas reações Fenton (inclusive com a adição de AA) e nas reações com AA (com ou sem a adição íons Fe^{2+}), no entanto não foi observado uma relação entre as condições reacionais com a formação de teobromina, impossibilitando determinar uma condição que a favoreça. A teobromina não foi formada em solução contendo apenas com íon ferro, ou por hidrólise alcalina. Dessa forma, infere-se que o mecanismo de formação da teobromina é via radicalar por espécies reativas de oxigênio, decorrente de ataque dos radicais hidroxila, superóxido ou do peróxido de hidrogênio.

Uma solução de teobromina foi submetida a degradação em mesma condição empregada no experimento 10 (2mM H_2O_2 , 0,6mM Fe^{2+} , pH3, 25 °C), selecionada por ser uma condição reacional branda e que proporciona degradação relevante, para avaliar sua estabilidade em comparação com a cafeína (Figura 10).

Figura 10 - Comportamento da degradação da teobromina e da cafeína na condição Fenton (2mM H_2O_2 , 0,6mM Fe^{2+} , pH3, 25°C) monitoradas por 24 horas.



Fonte: Do autor (2021).

De acordo com a figura, fica evidente a semelhança de estabilidade entre essas xantinas.

Nesse experimento de degradação da teobromina, foi verificado o produto de transformação relativo ao “Pico 1” (RT 2,7) desde o início até o fim da reação (tempo de 24 horas), no entanto sua área e concentração não foram obtidas.

O produto de transformação relativo ao “Pico 2” (RT 2,9) foi verificado em 4 experimentos, inclusive no tempo inicial da condição mais drástica de reação Fenton, detalhados na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições de formação do Pico 2, evidenciando a conversão da cafeína (C) e os valores para seletividade (S) e rendimento (R), no tempo de 24 horas.

Exp.	Condição	C (%)	S (%)	R (%)
10	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH3, 25 °C	79,3	0,7	0,5
11	30mM H ₂ O ₂ , 9 mM Fe ²⁺ , pH3, 50 °C - início	100	0,6	0,6
33	0,6mM Fe ²⁺ , 2mM AA, pH7, 25 °C	32,8	1,7	0,6
35	2mM AA, pH7, 25 °C	39,1	1,4	0,5

Nota: Os dados do experimento 11 são para o tempo de 10 minutos de reação.

Fonte: Do autor (2021).

O produto de transformação relativo ao “Pico 3” (RT 3,1) foi verificado em 2 experimentos apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições de formação do Pico 3, evidenciando a conversão da cafeína (C) e os valores para seletividade (S) e rendimento (R), no tempo de 24 horas.

Exp.	Condição	C (%)	S (%)	R (%)
33	0,6mM Fe ²⁺ , 2mM AA, pH7, 25 °C	32,8	1,3	0,4
43	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, 10% clorofórmio, pH7, 25 °C	85,4	0,7	0,6

Fonte: Do autor (2021).

O produto de transformação relativo ao “Pico 5” (RT 4,3) foi verificado em 5 experimentos apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições de formação do Pico 5, evidenciando a conversão da cafeína (C) e os valores para seletividade (S) e rendimento (R), no tempo de 24 horas.

Exp.	Condição	C (%)	S (%)	R (%)
34	1mM AA, pH7, 25 °C	22,3	4,2	0,9
41	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, 10% acetonitrila, pH7, 25 °C	27,8	2,4	0,7
42	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 10% cloroformio, pH7, 25 °C	95,4	1,0	1,0
43	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, 10% cloroformio, pH7, 25 °C	85,4	0,6	0,5

Fonte: Do autor (2021).

O produto de transformação relativo ao “Pico 6” (RT 5,1) foi verificado em 11 experimentos apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Condições de formação do Pico 6, evidenciando a conversão da cafeína (C) e os valores para seletividade (S) e rendimento (R), no tempo de 24 horas.

Exp.	Condição	C (%)	S (%)	R (%)
21	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH7, 5 °C	57,9	3,3	1,9
23	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH10, 25 °C	45,4	2,9	1,3
24	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, pH3, 25 °C	82,8	5,4	4,5
25	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, pH7, 5 °C	71,7	4,2	3,0
30	1mM H ₂ O ₂ , 0,3mM Fe ²⁺ , 1mM AA, pH7, 25 °C	43,9	8,3	3,6
31	1mM H ₂ O ₂ , 0,1mM Fe ²⁺ , 2mM AA, pH7, 25 °C	51,2	7,5	3,8
32	0,6mM Fe ²⁺ , 1mM AA, pH7, 25 °C	32,3	6,5	2,1
33	0,6mM Fe ²⁺ , 2mM AA, pH7, 25 °C	32,8	2,9	1,0
35	2mM AA, pH7, 25 °C	39,1	2,7	1,0
41	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, 10% acetonitrila, pH7, 25 °C	27,8	4,0	1,1
43	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, 10% clorofórmio, pH7, 25 °C	85,4	1,1	1,0

Fonte: Do autor (2021).

O produto de transformação relativo ao “Pico 7” (RT 6,2) foi verificado em 3 condições reacionais, inclusive no tempo de 2 horas da condição Fenton branda (experimento 1), apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Condições de formação do Pico 7, evidenciando a conversão da cafeína (C) e os valores para seletividade (S) e rendimento (R), no tempo de 24 horas.

Exp.	Condição	C (%)	S (%)	R (%)
9	1mM H ₂ O ₂ , 0,3mM Fe ²⁺ , pH3, 50 °C – 2h	20,5	3,4	0,7
10	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , pH3, 25 °C	79,3	1,3	1,0
39	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1 mM AA, 10% metanol, pH7, 25 °C	3,7	81,1	3,0

Nota: Os dados do experimento 9 são para o tempo de 2 horas de reação.

Fonte: Do autor (2021).

Constatou-se que a condição reacional referente ao experimento 39 foi favorável para a formação do “Pico 7”, apesar da pequena conversão de cafeína.

O produto de transformação relativo ao “Pico 8” (RT 6,9) foi verificado no experimento 2 apresentando valor de 0,7% de seletividade com 0,6% de rendimento para a conversão de 79,3% de cafeína. O mesmo foi verificado no experimento 1, no entanto sua área e concentração não foram obtidas.

O produto de transformação relativo ao “Pico 9” (RT 8,4) foi verificado nos experimento 9 e no experimento 10. Ressalta-se que esse pico cromatográfico diminui ao longo do tempo registrando apenas traços nos tempos de 4 e 6 horas. Assim, houve formação do “Pico 9” com 4,7% de seletividade e 2,3% de rendimento para a conversão de 48,8% de cafeína, considerando o tempo de 10 minutos.

O produto de transformação relativo ao “Pico 10” (RT 10,3) foi verificado em 2 condições reacionais Fenton com adição de AA e etanol, apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Condições de formação do Pico 10, evidenciando a conversão da cafeína (C) e os valores para seletividade (S) e rendimento (R), no tempo de 24 horas.

Exp.	Condição	C (%)	S (%)	R (%)
27	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1mM AA, 10% etanol, pH3, 25 °C	4,5	31,6	1,4
29	2mM H ₂ O ₂ , 0,6mM Fe ²⁺ , 1mM AA, 10% etanol, pH10, 25 °C	6,6	27,5	1,8

Fonte: Do autor (2021).

Não foi possível estabelecer uma relação que justifique o surgimento dos produtos de transformação da cafeína com as condições reacionais. Esses produtos não foram identificados, já que não se dispunha de padrões para comparação, assim uma tentativa avaliação foi por comparação com dados reportados na literatura.

4.2 Avaliação dos picos cromatográficos

A partir dos cromatogramas obtidos, verificou-se os tempos de retenção e fator de retenção dos analitos de modo a avaliar os possíveis produtos de transformação da cafeína, gerados com base na comparação com trabalhos relatados que identificaram os analitos. O parâmetro cromatográfico de fator de retenção possibilita uma comparação aproximada, de modo a embasar a suposição dos produtos de transformação da cafeína mantida a FE. Entretanto, ressalta-se que pode ocorrer eluição de moléculas distintas com mesmo tempo de retenção.

A ordem de eluição dos derivados da cafeína foi verificada: xantina (X), 7-metilxantina (7X), 3-metilxantina (3X), 1-metilxantina (1X), teobromina (Tb), paraxantina (Px), teofilina (Tf) e cafeína (Cf) em trabalhos que empregaram separação em fase reversa C 18, seja com eluição em gradiente (GEORGA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2000; HE et al., 2018) ou em eluição isocrática (BENDRISS; MARKOGLU; WAINER, 2000).

Os métodos que utilizam eluição em gradiente não proporcionam uma comparação adequada de seus tempos de retenção ou fator de retenção, uma vez que altera-se a força de eluição ao longo da corrida cromatográfica, modificando as interações entre analito-fase móvel-fase estacionária. No entanto, auxiliam a indicação da ordem de eluição dos analitos, com exceção dos analitos teofilina e paraxantina no trabalho de Santos (2020) que apresentaram inversão na eluição.

Partindo-se das características da coluna cromatográfica e dos tempos de retenção dos analitos foram calculados o t_0 da coluna e o fator de retenção (k) dos analitos derivados da cafeína com os dados disponíveis de duas colunas cromatográficas de 150 e 250 mm de comprimento. No sistema HPLC-DAD utilizando de 250 mm foi avaliado a formação de produtos em alta concentração a cafeína (20 g.L^{-1}), no intuito de facilitar a verificação dos picos cromatográficos. Os dados de tempos de retenção (RT) e fator de retenção (k) foram comparados com valores de artigos que empregaram a eluição isocrática, conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Tempos de retenção (RT) e fator de retenção (k) dos picos cromatográficos, em condições isocráticas, com dados deste trabalho (a, b) e de artigos (c, d).

Picos	Esse trabalho				(c)		(d)	
	(a)		(b)		RT	k	RT	k
1	2,7	1,1	4,2	0,6	-	-	-	-
2	2,9	1,2	4,7	0,7	-	-	-	-
3	3,1	1,4	5,0	0,9	-	-	-	-
4 - Tb	3,8	1,9	6,0	1,2	4,4	1,9	5,0	2,8
5	4,3	2,3	7,0	1,6	-	-	-	-
6	5,0	2,8	8,2	2,0	-	-	-	-
7	6,2	3,8	9,6	2,5	6,8 - Px	3,5	-	-
8	6,9	4,3	11,3	3,2	7,5 - Tf	4,0	8,0	5,2
9	8,4	5,5	-	-	-	-	-	-
10	10,0	6,7	12,3	3,5	-	-	-	-
11 - Cf	11,7	8,0	14,5	4,4	13,8	8,2	15,8	11,2

Nota: FM de solução aquosa/acetoneitrila (9:1), com as colunas C18 4,6 mm de: (a) 150 mm com t_0 de 1,3; (b) 250 mm com t_0 de 2,7; e os artigos: (c) Büyüktuncel (2010) C18 150 x 4,6 mm com t_0 de 1,5; (d) Dmitrienko et al. (2013) coluna C18 150 x 3 mm com t_0 de 1,3. Tb –teobromina, Cf – cafeína, Px – Paraxantina, Tf – teofilina.

Fonte: Do autor (2021).

Por avaliação dos dados reportados comprova-se a ordem de eluição, seguindo a ordem crescente: teobromina < paraxantina < teofilina < cafeína.

Considerando o trabalho de Büyüktuncel (2010), cujos dados dos quatro analitos são apresentados na Tabela 10, as moléculas teobromina e cafeína apresentaram RT e k (calculado) de 4,4 minutos e 1,9, e 13,8 minutos e 8,2, respectivamente. Esses valores de RT e k são muito semelhantes aos obtidos no estudo ao utilizar coluna de 150 mm (a), assim extrapola-se que os outros analitos sejam a paraxantina (k 3,5), atribuída ao pico “7”, e a teofilina (k 4,0) atribuída ao pico “8”.

No entanto a comparação entre valores de k não demonstrou uma relação no trabalho de Dmitrienko e colaboradores (2013) (d), que obtiveram maiores valores de k para teobromina (2,8) e cafeína (11,2).

Diante dos dados de tempos de retenção das xantinas levantados na literatura e na Tabela 10, constata-se que a ordem de eluição em coluna cromatográfica de fase reversa é: xantina, monometilxantinas, teobromina, paraxantina, teofilina e cafeína.

Abrangendo a investigação para a totalidade de produtos de transformação da cafeína tem-se ainda os derivados do ácido úrico, citados segundo sua ordem de eluição: hipoxantina, ácido 3-metilúrico, ácido 7-metilúrico, ácido 1-metilúrico, ácido 3,7-dimetilúrico, ácido 1,3-dimetilúrico, ácido 1,7-dimetilúrico e ácido 1,3,7-trimetilúrico (BENDRISS; MARKOGLU; WAINER, 2000; RODRIGUEZ et al., 2017; VIEIRA; GASPAR; SANTOS, 2020).

Assim propõe-se a identificação dos demais picos, com a provável ordem de eluição e comparação dos valores de k , que são resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 – Proposta de identificação dos picos cromatográficos verificados nas diferentes condições de transformação da cafeína, baseado na ordem de eluição.

Picos	RT	Identificação
1	2,7	Xantina, 7-metilxantina, 3-metilxantina, ácido 3-metilúrico, ácido 7-metilúrico
2	2,9	3-metilxantina, 1-metilxantina, ácido 1-metilúrico, ácido 3,7-dimetilúrico
3	3,1	1-metilxantina, ácido 1,3-metilúrico
4	3,8	Teobromina
5	4,3	Ácido 1,7-dimetilúrico
6	5,1	
7	6,2	Paraxantina
8	6,9	Teofilina
9	8,4	Ácido 1,3,7-trimetilúrico
10	10,3	
11	11,6	Cafeína

Fonte: Do autor (2021).

No experimento de degradação da teobromina há formação do “pico 1” em 2,7 minutos de retenção. Com base nos apontamentos acima, e sabendo que a teobromina não apresenta a metila na posição 1, infere-se que seja a xantina (X), ou uma monometilxantina (7X ou 3X) ou ainda derivados do ácido úrico (3U, 7U), devido ao menor tempo de retenção. Assim eliminam-se as possibilidades de 1-metilxantina, ácido 1-metilúrico e ácido 1,3-dimetilúrico serem atribuídas a esse pico, auxiliando na proposição de identificação dos demais picos.

Atentando para ordem de eluição assumida, o “pico 2” poderia ser uma metilxantina (3X, 1X) ou um dos derivados do ácido úrico (1U, 37U). O “pico 3” poderia ser o ácido

1,3-dimetilúrico (13U) ou 1-metilxantina (caso não seja o “pico 2”) , excluindo a possibilidade do ácido 1,7-dimetilúrico uma vez que apresenta maior retenção que a teobromina.

Os picos “5”, “6”, “7”, “8”, “9” e “10” apresentam maior retenção do que a teobromina, podendo corresponder a paraxantina, teofilina e algum outro componente como ácido 1,7-dimetilúrico e ácido 1,3,7-trimetilúrico (BENDRISS; MARKOGLOU; WAINER, 2000; VIEIRA; GASPAR; SANTOS, 2020). Assim as possibilidades sugeridas para os picos “5”, “6”, “7”, “8”, “9” e “10” são: ácido 1,7-dimetilúrico, paraxantina (1,7-dimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina) e ácido 1,3,7-trimetilúrico.

4.3 Avaliação dos espectros na região do UV

No intuito de estudar os produtos de transformação, foram realizadas outras condições reacionais (experimentos 51 a 57) avaliados por HPLC-DAD após 24 horas (Tabela 12).

Tabela 12 – Produtos de degradação da cafeína (0,2 g.L⁻¹) monitorados por HPLC-DAD e valores de conversão (C), seletividade (S) e rendimento (R) e máximos de absorção no UV.

Condição	Pico (min)	C / S / R (%)	UV máx. (nm)
51 - Fenton (5 mM de H ₂ O ₂ , 1,5 mM de Fe ²⁺ , pH 3)	5,0	S 1,2 ; R 1,2	215
	6,9	S 4,3 ; R 4,3	218 , 265
	Cafeína	C 100,0	n.a.
52 - Fenton (5 mM de H ₂ O ₂ , 0,3 mM de Fe ²⁺ , pH 3)	4,9	S 0,9 ; R 0,8	216
	5,2	S 0,2 ; R 0,2	203 , 233
	5,8 Tb	S 0,2 ; R 0,2	203 , 272
	6,9	S 3,6 ; R 3,0	218 , 265
	7,7	S 0,9 ; R 0,8	202 , 269
	8,2	S 0,0 ; R 0,0	194 , 270
	9,1	S 0,0 ; R 0,0	205 , 276
13,6 Cf	C 84,4	203 , 272	

(Continua)

Condição	Pico (min)	C / S / R (%)	UV máx. (nm)
53 - Fenton (30mM H ₂ O ₂ , 9 mM Fe ²⁺ , pH3)	3,1	S 4,7 ; R 4,7	195
	3,6	S 0,5 ; R 0,5	199 , 276
	4,3	S 0,2 ; R 0,2	linha base
	5,0	S 3,0 ; R 3,0	215
	5,5	S 0,5 ; R 0,5	215
	6,9	S 5,9; R 5,9	218 , 265
	11,4	S 0,8; R 0,8	207 , 276
	Cafeína	C 100,0	n.a.
54 - 2 mM AA, pH neutro	5,7 Tb	S 2,3 ; R 0,7	204 , 253
	6,9	S 0,3 ; R 0,1	218 , 269
	7,7	S 2,7 ; R 0,8	202 , 269
	9,1	S 7,9 ; R 2,4	196 , 290
	13,5 Cf	C 30,1	204 , 272
55 - 2 mM AA, pH 3	7,7	S 20,0 ; R 1,0	201 , 269
	9,3	S 44,4 ; R 2,1	194, 234 , 290
	13,5 Cf	C 4,7	204 , 272
56 - Fenton (2 mM de H ₂ O ₂ , 0,6 mM de Fe ²⁺ , pH 7), 2 mM AA, metanol 10 %	3,8	S 0,1 ; R 0,0	200 , 222
	4,1	S 0,1 ; R 0,0	190 , 260
	4,6	S 0,0 ; R 0,0	190 , 269
	4,9	S 0,0 ; R 0,0	196 , 214 , 260
	5,2	S 0,2 ; R 0,2	203 , 234
	5,7 Tb	S 0,2 ; R 0,2	200 , 269
	6,9	S 0,4 ; R 0,3	218 , 280
	7,7	S 0,9 ; R 0,7	201 , 269
	8,7	S 3,0 ; R 2,2	190 , 235 , 290
	13,5 Cf	C 75,3	205 , 272
21,7	S 0,2 ; R 0,1	190 , 270	

(Continua)

Condição	Pico (min)	C / S / R (%)	UV máx. (nm)
57 - Fenton (2 mM de H ₂ O ₂ ,	3,8	S 0,1 ; R 0,0	200 , 222
0,6 mM de Fe ²⁺ , pH 3), 2	4,1	S 0,1 ; R 0,0	190 , 254
mM AA, metanol 10 %	4,6	S 0,0 ; R 0,0	190 , 269
	5,2	S 0,3 ; R 0,3	203 , 234
	5,7 Tb	S 0,3 ; R 0,3	200 , 232 , 269
	6,9	S 0,3 ; R 0,3	217 , 279
	7,7	S 0,6 ; R 0,5	200 , 269
	9,0	S 4,5 ; R 3,8	190 , 235 , 291
	13,5 Cf	C 82,9	205 , 272
	21,7	S 0,1 ; R 0,1	190 , 270

Fonte: Do autor (2021).

Esses experimentos foram realizados com o intuito de avaliar os espectros na região do UV dos analitos, mediante análise por HPLC-DAD, contemplando diferentes produtos de transformação da cafeína gerados em condições Fenton ou com ácido ascórbico.

Os espectros autênticos na região do UV das xantinas e derivados do ácido úrico (17U, 37U, 137U) foram consultados em plataforma de banco de dados (NIST, do inglês National Institute of Standards and Technology) apresentando máximos de absorção em aproximadamente 230 e 270 nm, e 220 e 300 nm, respectivamente (“NIST Livro de Química na Web”, 2021). Pode-se, então, verificar uma semelhança com os espectros de alguns analitos eluídos nos tempos 8,2; 11,3; 12,3 e 25,7 minutos para as xantinas e em cerca de 9,0 minutos para o ácido 1,3,7-trimetilúrico.

Por avaliação desses espectros no UV e considerando a provável ordem de eluição dos analitos, infere-se a seguinte atribuição nessas amostras: teobromina (5,7 minutos) com rendimento de até 0,7%, pico não identificado (6,9 minutos), paraxantina (7,7 minutos) com rendimento de até 1,0%, derivados do ácido úrico (entre 8,3 a 10,0 minutos), teofilina (11,4 minutos) com rendimento de até 0,8% , cafeína (13,5 minutos).

Atentando para as condições reacionais, verifica-se que a condição Fenton favorece a formação de pico “não identificado” em 6,9 minutos. A formação do pico eluído em 7,7 minutos, que foi atribuído a paraxantina, ocorre tanto em condições Fenton como em AA. Ao utilizar condição Fenton com adição de AA e metanol (experimentos 56 e 57) favorece a formação de derivado do ácido úrico (8,7 e 9,0 minutos), que também é formado

preferencialmente na condição de AA. A formação do pico eluído em 11,4 minutos, que foi atribuído a teofilina, somente ocorreu em excesso de reagentes Fenton (experimento 53).

De forma geral, os picos situados entre 3,8 a 5,2 minutos apresentam banda de absorção principalmente entre 190 a 200 nm, outra banda de intensidade intermediária entre 215 a 235 nm e alguns picos com uma banda de menor intensidade 250 a 276 nm. Algumas bandas na região de 270 nm são muito sutis, possivelmente devido a baixa concentração e uma menor absorção nessa região do espectro UV, já que a ausência de grupos metila, como nas monometilxantinas, acarreta diminuição da intensidade de absorção.

Visando contornar esse problema, de baixa intensidade do espectro UV, e evidenciar o surgimento dos produtos de transformação da cafeína, foi realizado o experimento 58 utilizando alta concentração de cafeína (20,0 g.L⁻¹) submetido ao processo Fenton e monitorado por HPLC-DAD (FIGURA 1 APÊNDICE 2), permitindo o estudo dos espectros na região do UV (TABELA 1 APÊNDICE 2) cujos dados são na Tabela 13.

Tabela 13 – Bandas do espectro no UV referente aos picos da condição Fenton utilizando 20,0 g.L⁻¹ de cafeína e proposta de identificação.

Picos	RT (min)	k	Espectro UV (nm)	Proposta de identificação
1	4,2	0,6	197 e 250	“não identificado”
2	4,7	0,7	194 e 300	Derivado do ácido úrico
3	5,0	0,9	211 e 265	Monometilxantina
4	6,0	1,2	201 e 272	Teobromina
5	7,0	1,6	218 e 264	“não identificado”
6	8,2	2,0	199 e 269	Paraxantina*
7	9,5	2,5	200, 232 e 290	Ácido 1,3,7-trimetilúrico
8	11,3	3,2	207 e 275	Paraxantina* ou
9	12,3	3,5	207 e 277	Teofilina
10	14,5	4,4	200 e 270	Cafeína
11	25,7	8,5	206 e 274	Derivado da xantina

Nota: algumas diferenças de ordem provável dos analitos em relação a Tabela 10 se devem à alteração das condições cromatográficas.

Fonte: Do autor (2021).

Nessa condição reacional são verificados 10 picos cromatográficos além da cafeína. Foi observado o pico cromatográfico em 25,7 minutos, que elui após a cafeína e apresenta semelhante espectro no UV. Também foi verificado pico após RT da cafeína nas condições

Fenton acrescido de etanol 10 % (v/v) por 20 minutos de reação, e Fenton contendo AA e Metanol (experimento 57).

Por avaliação dos espectro no UV obtidos, sugere-se a formação de monometilxantinas, dimetilxantinas, derivados do ácido úrico mono, di e trimetilados.

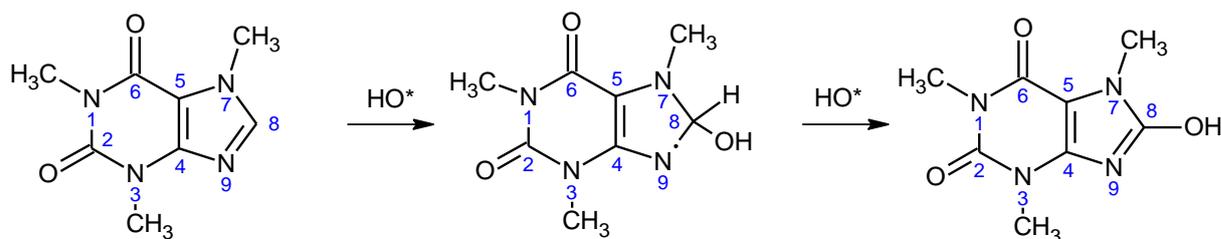
4.4 Propostas de mecanismos de reação

De acordo com os relatos de literatura, o principal produto de oxidação da cafeína é 137U, indicando que a reação de hidroxilação em C8 ocorre em maior extensão. Poucos trabalhos científicos citam a formação das metilxantinas por reações de oxidação da cafeína, sugerindo que a desmetilação é um mecanismo menos provável (DALMÁZIO et al., 2005; STADLER et al., 1996; TELO; VIEIRA, 1997; VIEIRA; GASPAR; SANTOS, 2020).

Também é comprovado que a oxidação em C8 predomina sobre as reações de N-desmetilação na degradação da cafeína por ação da enzima *flavina monooxigenase*, favorecendo a formação do metabólito 137U (KANG et al., 2016).

A Figura 11 apresenta o mecanismo inicialmente proposto por Telo (1997) para formação do ácido 1,3,7-trimetilúrico.

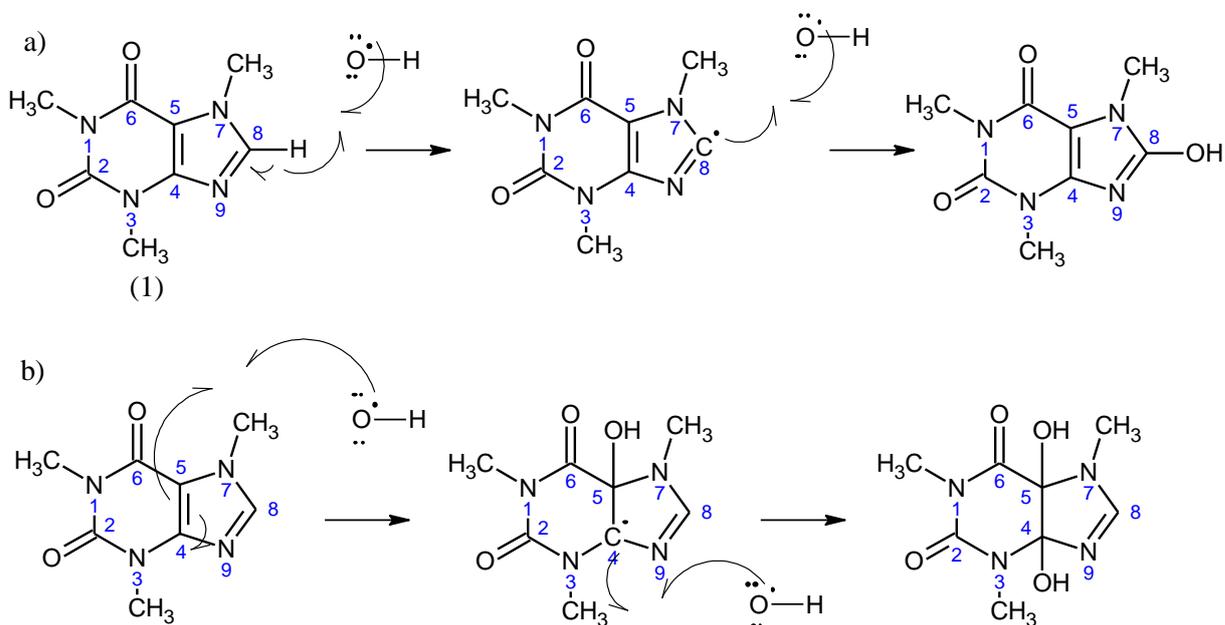
Figura 11 – Mecanismo de formação do ácido 1,3,7-trimetilúrico inicialmente proposto.



Fonte: Adaptado de Telo; Vieira (1997).

Diante dos prováveis produtos de degradação da cafeína, apresenta-se as propostas de mecanismo de reação para formação do ácido 1,3,7-trimetilúrico (a) majoritariamente, e ainda um produto minoritário que também pode ser formado por ataque radicalar na dupla ligação C4=C5 com m/z 228 (b) Figura 12.

Figura 12 – Proposta de mecanismo de reação para a oxidação da cafeína, mediada por radicais HO[·], com formação do ácido 1,3,7-trimetilúrico (a) majoritariamente, e produto minoritário na dupla ligação C4=C5 (b).

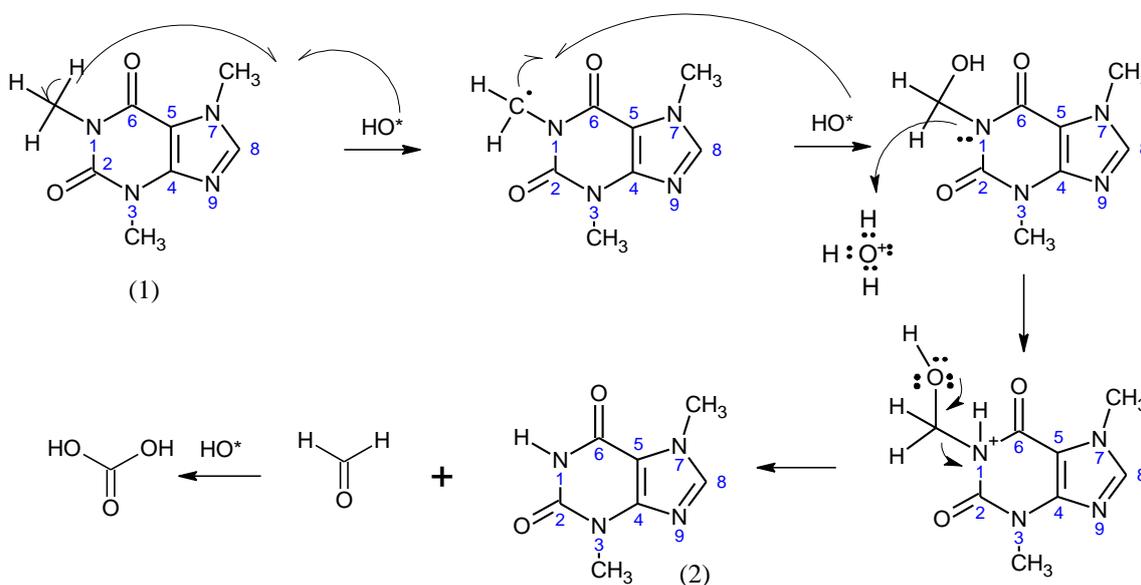


Fonte: Do autor (2021).

Com os resultados obtidos no trabalho, pode-se estabelecer que ocorre reação de N-desmetilação, da ordem de 1% de rendimento para a formação de teobromina e paraxantina, e 0,8% de rendimento para teofilina, dependendo das condições reacionais. Essa observação é baseada na avaliação dos picos cromatográficos e confirmada a reação de desmetilação com a formação comprovada de teobromina, inferindo-se a geração de paraxantina e teofilina, também por reação radicalar HO[·] com a cafeína, já que tem-se picos cromatográficos possíveis de serem atribuídos a essas moléculas, com RT correspondentes em trabalhos relacionados na literatura, e semelhança dos espectros na região do UV.

A teobromina foi produzida a partir da cafeína em condições Fenton, tipo-Fenton e com AA, via radical HO[·] com razão molar cafeína/ HO[·] é 1:2, conforme a proposta de mecanismo de reação representada na Figura 13, e apontando por Chen e colaboradores (2015) que as reações de N-desalquilação procedem com a hidroxilação do C_α-H e a subsequente quebra da ligação C-N para liberação de formaldeído.

Figura 13 – Representação do mecanismo de reação de N-desmetilação da cafeína (1) via radical HO^\cdot de razão molar 1:2, para a formação da teobromina (2).

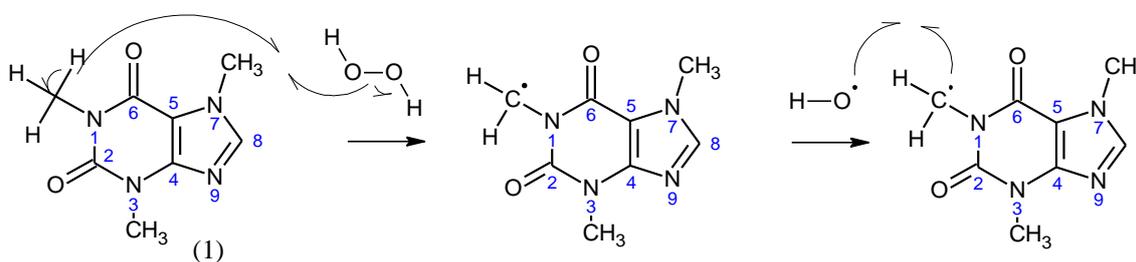


Fonte: Do autor (2021).

De acordo com a proposta acima, são consumidos 2 mol de HO^\cdot para promover a N-desmetilação da cafeína. Primeiramente, ocorre a oxidação da metila por mecanismo radicalar. Em uma segunda etapa, com a metila oxidada, os pares de elétrons livres no oxigênio auxiliam na desconexão da metila por clivagem heterolítica em que a quebra da ligação é favorecida por meio ácido, com a liberação de formaldeído. O formaldeído continua a ser oxidado pelos radicais HO^\cdot gerando ácido fórmico e posteriormente ácido carbônico, que pode se decompor em H_2O e CO_2 .

Além da condição Fenton, a teobromina foi formada em solução contendo AA e ainda com a associação de íons ferrosos e AA. O AA promove a formação de espécies reativas como H_2O_2 que por sua vez podem atuar na conversão da cafeína a teobromina. Nesse caso, poderá ocorrer a reação de N-desmetilação mediada por H_2O_2 com razão molar cafeína/ H_2O_2 1:1, cujas etapas iniciais propostas são demonstradas na Figura 14.

Figura 14 – Representação do mecanismo de reação de N-desmetilação da cafeína (1) mediada por H₂O₂ evidenciando a razão molar cafeína/ H₂O₂ 1:1.



Fonte: Do autor (2021).

Ressalta-se que todas as metilas (posições 1, 3 e 7) podem ser oxidadas de maneira semelhante, conferindo a reação de N-desmetilação nas posições 1, 3 e 7 para gerar teobromina, paraxantina e teofilina, respectivamente. Da mesma forma, podem ocorrer reações de C-hidroxilação com N-desmetilação para formar derivados do ácido úrico mono e dimetilados além de moléculas menores como ácido dimetilparabânico, justificando o grande número de produtos de transformação da cafeína.

4.5 Avaliação dos subprodutos de degradação por espectrometria de massas

Diante das limitações nas tentativas de identificação dos produtos de transformação baseados no RT e espectros na região do UV, selecionou-se as condições dos experimento 39 e 41 para avaliação das massas m/z dos analitos utilizando a espectrometria de massas acoplado ao sistema HPLC. Esses experimentos favorecem a formação do “Pico 7” em cerca de 6,2 minutos e do “Pico 6” em 5,1 minutos, respectivamente. A identificação desses picos também auxilia na elucidação da ordem de eluição abordada anteriormente, Tabela 10 e Tabela 13, em que foram observadas diferenças entre as possíveis moléculas.

Assim, considerando a condição cromatográfica HPLC-UV na coluna C18 de 150 x 4,6 mm utilizada os experimentos 39 e 41, o “Pico 6” poderia ser o ácido 1,7-dimetilúrico de fórmula molecular C₇H₈N₄O₃ com massa exata 196,0596 g.mol⁻¹; e o “Pico7” poderia ser a paraxantina com massa exata 180,0647 g.mol⁻¹ (“Scientific Instrument Services”, 2021), que podem gerar íon molecular [M + H]⁺ 197,0675 g.mol⁻¹ e 181,0725 g.mol⁻¹, respectivamente.

Definidas as amostras para análise por espectrômetro de massas, inicialmente foram avaliadas em sistema HPLC-DAD, visando identificar a cafeína e teobromina e verificar outros produtos de transformação. Essa etapa foi definida para realizar o isolamento dos produtos de transformação de interesse. A solução de padrão misto forneceu o cromatograma com RT de

1,3 minutos para teobromina e 3,4 minutos para cafeína. Nas amostras, verificou-se os produtos de transformação da cafeína de tempos 1,4 ; 1,8 e 2,2 minutos (Tabela 14).

Tabela 14 – Avaliação do padrão misto de cafeína e teobromina, e das amostras por HPLC-DAD previamente ao acoplamento com detector de massas.

Amostra	Analito	RT	Espectro UV	Área (272)
Padrão cafeína e teobromina	Teobromina	1,4	205 e 272	267,0
	Cafeína	3,4	205 e 272	444,7
Amostra 1 (Fenton + AA + Metanol)	Teobromina	1,4	272	3,9
	-	1,4	270	0,9
	-	1,8	267	11,7
	-	2,2	290	4,2
	Cafeína	3,4	272	420,1
Amostra 2 (Fenton + AA + Acetonitrila)	Teobromina	1,3	272	4,2
	-	1,4	270	2,4
	-	1,7	268	9,6
	-	2,1	290	1,3
	Cafeína	3,2	272	294,8

Nota: As amostras representam a condição Fenton (2mM H₂O₂, 0,6mM Fe²⁺) em pH neutro e temperatura ambiente, com adição de 1 mM de AA e 10% (v/v) de metanol ou acetonitrila. Padrão de cafeína e teobromina com concentrações de 0,004 e 0,002 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Fonte: Do autor (2021).

Nas amostras foi observado uma maior degradação de cafeína que o esperado para essas condições, sendo atribuído a reação de hidrólise já que tiveram etapa de alcalinização para remoção de interferentes previamente a injeção no HPLC-QTOF.

Tomando por base o RT dos picos de interesse, procedeu-se o isolamento desses analitos presentes nas amostras por fracionamento pós-detector com coleta nos intervalos de 1,7 a 1,9 minutos (fração 1) e 2,1 a 2,3 minutos (fração 2). Em seguida, essas frações de coletas cromatográficas foram injetadas no HPLC-QTOF, além do padrão misto de cafeína e teobromina. Os dados dos padrões e amostras são apresentados na Tabela 15. Os espectros dos analitos, com seus RT, são apresentados nas Figuras 2 a 6 do Apêndice 2.

Tabela 15 – Dados dos espectros no UV e massas para os picos verificados por HPLC-QTOF.

Amostra	Pico (min)	Espectro UV (nm)	Espectro de massas (m/z)
Padrão cafeína e teobromina	Tb -1,2	202 e 272	285,2714 ; 203,0493 ; 181,0639 ; 142,9863
	Cf - 2,6	203 e 272	337,0579 ; 217,0644 ; 195,0863
Amostra 1, fração 1	1,6	231 e 267	216,9682 ; 181,0466 ; 162,0038 ; 159,9673
	4,4	190, 220 e 270	181,0366 ; 162,0070 ; 142,9844 ; 122,0823
Amostra 1, fração 2	1,5	205	181,0400 ; 122,0796
	4,4	190, 220, 270	181,0398 ; 122,0824 ; 223,1289; 250,9365
Amostra 2, fração 1	1,7	-	261,1289 ; 239,1475 ; 181,0371
	4,4	190 , 220, 270	195,0433
Amostra 2, fração 2	1,4	203	250,9365 ; 181,0332 ; 122,0782
	4,4	190, 220, 272	181,0367

Nota: em destaque os picos de maior intensidade.

Fonte: Do autor (2021).

De acordo com a injeção do padrão, verifica-se a confirmação do espectro no UV com máximo de absorção em 272 nm para teobromina e cafeína, e os espectros de massa registrando os íons moleculares $[M+H]^+$ em m/z 181,0639 para teobromina e m/z 195,0863 para cafeína, conforme esperado, uma vez que a teobromina de massa exata $180,0647 \text{ g.mol}^{-1}$, ou a cafeína de massa exata $194,0804 \text{ g.mol}^{-1}$ são protonadas no ionizador gerando os íons moleculares $[M + H]^+$ 181,0725 e 195,0882, respectivamente.

Nas injeções das amostras foram verificados sinal com m/z 144, inclusive na linha base, sendo atribuído a interferente, possivelmente algum plastificante de material utilizado no acondicionamento das amostras até momento da injeção.

Também foi verificado a presença do pico eluído em 4,4 minutos, que não era esperado, já que o esquema de fracionamento pretendeu recuperar os analitos referente aos picos eluídos originalmente em 1,8 e 2,2 minutos, avaliado no sistema HPLC-DAD. Esse pico apresenta espectro no UV (220, 270 nm) e espectro de massas (m/z 181) semelhante as xantinas. Presente apenas nas amostras, descartou-se a possibilidade de contaminação do equipamento, uma vez que eluiria como um ruído constante em todo o tempo de análise, podendo ser um interferente.

Assim, infere-se que essa molécula seja um derivado da xantina que foi gerado no frasco, talvez devido a fase móvel acidificada, entre o tempo de fracionamento e a injeção no HPLC-QTOF em dias diferentes e que possa equivaler ao pico de RT 25,7 minutos verificado no experimento 59.

Na amostra 1 (Fenton + AA + Metanol) era esperado a observação do sinal próximo a m/z 181 referente a suposição do “pico 7” ser a paraxantina. Foi verificado sinal em 1,6 minutos inferindo-se o analito de interesse, que teve uma pequena alteração de eluição ao mudar a tubulação do sistema detector. Embora apresente sinal m/z 181, seu espectro no UV indica os máximos de absorção em 231 e 267 nm, diferente das dimetilxantinas, descartando a possibilidade de atribuir a alguma das dimetilxantinas. Esses dados conflitantes impossibilitam uma atribuição mesmo que aproximada.

Na fração 1 da amostra 1, embora o sinal do pico em 4,4 minutos apresente espectro de massas com sinal de maior intensidade em m/z 181,0366; foi observado o sinal m/z 142,9844 que poderia corresponder ao íon do ácido dimetilparabênico, um dos produtos de oxidação da cafeína, de fórmula molecular $C_5H_6N_2O_3$ gerado durante a ionização $[M+H]^+$ 143,0457 (“Scientific Instrument Services”, 2021).

Na amostra 2 (Fenton + AA + Acetonitrila) era esperado a observação do sinal próximo a m/z 197 referente a suposição do “pico 6” ser o ácido 1,3-dimetilúrico, entretando não foi verificado esse valor m/z . Em sua coleta da fração 1, ao considerar o sinal do espectro UV é observado apenas pico em 4,4 minutos; já na verificação por cromatograma de íons totais foi observado pico em 1,7 minutos com íon base de 239,1475 que não foi atribuído a nenhum dos produtos esperados.

Na fração 2 das amostras 1 e 2, verificou-se sinal pouco evidente em aproximadamente 1,5 minutos cujo espectro no UV apresenta banda em apenas 205 nm, provavelmente decorrente da baixa concentração, e espectro de massas com íon base m/z 181 compatível com as dimetilxantinas. Possivelmente se trata do mesmo componente verificado nas frações 1 embora em menor concentração.

Com base nos resultados, verifica-se que o fracionamento dos analitos realizado no sistema HPLC-DAD promove uma diluição excessiva dos mesmos atrapalhando o estudo seguinte por espectrometria de massas.

Ressalta-se que apesar do equipamento apresentar configuração capaz de fragmentar o íon molecular para gerar os íons produtos, importantes na identificação da moléculas, o equipamento se encontrava com problema no quádruplo e não fragmentou os íons, assim os espectros de massa apresentam apenas os íons moleculares e fragmentos gerados na ionização.

A posterior fragmentação do íon molecular da cafeína resultaria no íon filho de m/z 138, que poderia fragmentar para formar o íon de m/z 110; já nas dimetilxantinas ocorreria a perda da molécula de ácido isociânico (43 Da) na teobromina e formaria o íon produto de m/z 138, enquanto o íon m/z 124 seria formado para teofilina e paraxantina decorrente da perda do metil isocianato (57 Da).

5 CONCLUSÃO

Foi evidenciado a reação de N-desmetilação por mecanismo oxidativo com a formação de teobromina com cerca de 1% de rendimento a partir da cafeína. Dessa forma, é esperado a formação de paraxantina e teofilina por reação de N-desmetilação da cafeína nas posições 3 e 7, respectivamente.

Os produtos de transformação da cafeína foram monitorados por HPLC que forneceu a verificação de 10 picos obtidos em diferentes condições reacionais. Foi indicada sua provável ordem de eluição confirmada por seus espectros na região do UV: derivados monometilados do ácido úrico, monometilxantina, teobromina, ácido 1,7-dimetilúrico, paraxantina, teofilina, ácido 1,3,7-trimetilúrico e posteriormente um derivado das xantinas.

Os mecanismos de reação de N-desmetilação e C-hidroxilação foram propostos, via radical HO[·], com razão molar cafeína/ HO[·] de 1:2. A reação de N-desmetilação mediada por H₂O₂ apresenta razão molar cafeína/ H₂O₂ 1:1.

Uma análise mais detalhada realizada por HPLC-QTOF proporcionou a verificação dos íons moleculares de massa/carga 181 referente as dimetilxantinas (teobromina, paraxantina e teofilina) corroborando com as inferências de RT e espectros no UV da avaliação por DAD.

Com vistas a correta identificação das moléculas é necessária a comparação com padrões ou avaliação dos íons filhos gerados por fragmentação do íon molecular no espectro de massas (MS²).

Não foi possível estabelecer uma relação entre as condições reacionais e a formação dos produtos uma vez que não foram adequadamente identificados. Assim, novos trabalhos podem aprofundar na identificação dos produtos e otimizar os processos para formação desses produtos.

REFERÊNCIAS

- ALGHARRAWI, K. H. R.; SUMMERS, R. M.; SUBRAMANIAN, M. Production of theobromine by N-demethylation of caffeine using metabolically engineered *E. coli*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. December 2016, p. 153–160, 2017.
- ASHIHARA, H. Biosynthetic Pathways of Purine and Pyridine Alkaloids in Coffee Plants. **NPC Natural Product Communications**, v. 11, n. 7, p. 1047–1054, 2016.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841–856, 2008.
- AWALT, J. K. et al. Utility of iron nanoparticles and a solution-phase iron species for the: N-demethylation of alkaloids. **Green Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 2587–2594, 2017.
- BARTELLA, L. et al. A rapid method for the assay of methylxanthines alkaloids: Theobromine, theophylline and caffeine, in cocoa products and drugs by paper spray tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 278, n. November 2018, p. 261–266, 2019.
- BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradation of tetracycline by photo-Fenton process-Solar irradiation and matrix effects. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 33–39, 2007.
- BENDRISS, E. K.; MARKOGLU, N.; WAINER, I. W. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 746, n. 2, p. 331–338, 2000.
- BIANCO, G. et al. Identification and fragmentation pathways of caffeine metabolites in urine samples via liquid chromatography with positive electrospray ionization coupled to a hybrid quadrupole linear ion trap (LTQ) and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spec. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1065–1074, 2009.
- BOLOBAJEV, J.; TRAPIDO, M.; DULOVA, N. Application of different techniques for activation of H₂O₂/Fe³⁺ system: A comparative study. **Journal of Advanced Oxidation Technologies**, v. 18, n. 2, p. 347–352, 2015.
- BÜYÜKTUNCEL, E. Simultaneous determination of theobromine, paraxanthine, theophylline, and caffeine in urine by reversed-phase high-performance liquid

chromatography with diode array UV detection. **Analytical Letters**, v. 43, n. 16, p. 2518–2524, 2010.

CHEN, F. et al. Measurement of caffeine and its three primary metabolites in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS and clinical application. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 6, p. 1–8, 2017.

CHEN, Z. et al. Metabolic mechanisms of caffeine catalyzed by cytochrome P450 isoenzyme 1A2: a theoretical study. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 134, n. 9, p. 1–14, 2015.

CHRIST, C. Poduction of Theobromine. In: CHRIST, C. (Ed.). . **Production-integrated environmental protection and waste in the chemical industry**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. p. 57–59.

COOLEY, J. H.; EVAIN, E. J. Amine Dealkylation with Acyl Chlorides. **Synthesis**, p. 1–7, 1989.

CORNELIS, M. C. et al. Genome-wide association study of caffeine metabolites provides new insights to caffeine metabolism and dietary caffeine-consumption behavior. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 24, p. 5472–5482, 2016.

DALMÁZIO, I. et al. Advanced oxidation of caffeine in water: On-line and real-time monitoring by electrospray ionization mass spectrometry. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 16, p. 5982–5988, 2005.

DMITRIENKO, S. G. et al. Preconcentration of methylxanthines on hyper-cross-linked polystyrene followed by their determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 95–99, 2013.

DO PHAM, D. D. et al. Studies on the oxidative N-demethylation of atropine, thebaine and oxycodone using a FeIII-TAML catalyst. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1399–1409, 2014.

GANZENKO, O. et al. Removal of psychoactive pharmaceutical caffeine from water by electro-Fenton process using BDD anode: Effects of operating parameters on removal efficiency. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 987–995, 2015.

GEORGA, K. A.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Improved micro-method for the HPLC analysis of caffeine and its demethylated metabolites in human biological fluids after SPE. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 23, n. 10, p. 1523–1537, 2000.

GEORGAKOPOULOS, C. et al. Direct injection liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric horse urine analysis for the quantification and confirmation of threshold substances for doping control. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1020–1028, 2009.

GRACIA-LOR, E. et al. Estimation of caffeine intake from analysis of caffeine metabolites in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 609, n. June, p. 1582–1588, 2017.

GRIERSON, D. The Polonovski Reaction. In: PAQUETE, L. A. (Ed.). . **Organic Reactions**. Cedex, France: John Wiley & Sons, 1990. p. 85–289.

HE, K. et al. Determination of caffeine and its metabolites in wastewater treatment plants using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 3, p. 349–354, 2018.

INDERMUHLE, C. et al. Degradation of caffeine by conductive diamond electrochemical oxidation. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1720–1725, 2013.

JERKOVIĆ, I. et al. Screening of Coffea spp. honey by different methodologies: Theobromine and caffeine as chemical markers. **RSC Advances**, v. 4, n. 105, p. 60557–60562, 2014.

JIN, L. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for caffeine and theobromine production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–11, 2014.

KANG, Y. et al. Quantum chemical exploration on the metabolic mechanisms of caffeine by flavin-containing monooxygenase. **Tetrahedron**, v. 72, n. 22, p. 2858–2867, 2016.

KIM, J. H. et al. Structural and Mechanistic Insights into Caffeine Degradation by the Bacterial N-Demethylase Complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 19, p. 3647–3661, 2019.

KOK, G. B. et al. Two-step iron(0)-mediated N-demethylation of N-methyl alkaloids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 14, p. 4806–4811, 2010.

KOK, G. B.; SCAMMELLS, P. J. Polonovski-type N-demethylation of N-methyl alkaloids using substituted ferrocene redox catalysts. **Synthesis (Germany)**, v. 44, n. 16, p. 2587–2594, 2012.

LEÓN-CARMONA, J. R.; GALANO, A. Free radical scavenging activity of caffeine's

metabolites. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 112, n. 21, p. 3472–3478, 2012.

LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: Strategies, advantages and limitations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 1, p. 79–96, 2008.

LOPEZ-SANCHEZ, R. D. C. et al. HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fetal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, 2018.

MONTEIRO, J. et al. Pharmacological potential of methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2597–2625, 2019.

MONTEIRO, J. P. et al. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. **Molecules**, v. 21, n. 8, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NEVES, C. M. B. et al. Oxidation of caffeine with hydrogen peroxide catalyzed by metalloporphyrins. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 22, p. 2898–2902, 2011.

NIST Livro de Química na Web. Disponível em:
<<https://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

OLIVEIRA, T. D. DE et al. Caffeine Oxidation in Water by Fenton and Fenton-Like Processes: Effects of Inorganic Anions and Ecotoxicological Evaluation on Aquatic Organisms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 1, p. 178–184, 2015.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 2. ed. [s.l.] Cengage Learning, 2015.

RODRIGUEZ, A. et al. Quantification of xanthine- and uric acid-related compounds in urine using a “dilute-and-shoot” technique coupling ultra-high-performance liquid chromatography and high-resolution Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1067, n. September, p. 53–60, 2017.

Scientific Instrument Services. Disponível em:

<<https://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>>. Acesso em: 26 ago. 2021.

SIMÕES, M. M. Q. et al. Mimicking P450 processes and the use of metalloporphyrins. **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 1671–1681, 2013.

STADLER, R. H. et al. Oxidation of caffeine and related methylxanthines in ascorbate and polyphenol-driven Fenton-type oxidations. **Free Radical Research**, v. 24, n. 3, p. 225–240, 1996.

STADLER, R. H.; FAY, L. B. Antioxidative Reactions of Caffeine: Formation of 8-Oxocaffeine (1,3,7-Trimethyluric Acid) in Coffee Subjected to Oxidative Stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1332–1338, 1995.

TELO, J. P.; VIEIRA, A. J. S. C. Mechanism of free radical oxidation of caffeine in aqueous solution. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 9, p. 1755–1758, 1997.

TROVÓ, A. G. et al. Degradation of caffeine by photo-Fenton process: Optimization of treatment conditions using experimental design. **Chemosphere**, v. 90, n. 2, p. 170–175, 2013.

VIEIRA, A. J. S. C.; GASPAR, E. M.; SANTOS, P. M. P. Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 174, n. March, p. 6, 2020.

WANG, Z. Traube Purine Synthesis. In: **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2010. p. 2789–2792.

ZARRELLI, A. et al. Ecotoxicological evaluation of caffeine and its derivatives from a simulated chlorination step. **Science of the Total Environment**, v. 470–471, p. 453–458, 2014.

ZBAIDA, S. et al. Reactions of theophylline, theobromine and caffeine with fenton's reagent-simulation of hepatic metabolism. **Xenobiotica**, v. 17, n. 5, p. 617–621, 1987.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Referente ao Capítulo 2

Figura 1 - Imagem do sistema de CCD adotado em capela de exaustão, compreendendo a cuba cromatográfica e a câmara de revelação em iodo.



Tabela 1 - Teste de solubilidade da teobromina em solventes com variadas polaridades (N- imiscível, S - miscível).

Solvente	PE (°C)	Dens. (g.mL ⁻¹)	M Dipolo	Miscibilidade	Log P
Clorofórmio	61,1	1,48	1,04	N	1,97
Acetato de etila	77,1	0,89	1,78	N	0,68
Metanol	64,7	0,79	1,69	S	-0,77
Acetona	56	0,79	2,88	S	-0,23
Acetonitrila	82	0,78	3,91	S	
Éter dietílico	35	0,71	1,15	N	
Água	100	1,00	1,85	-	
Diclorometano	40	1,32	1,60	N	0,85

Tabela 2 - Parâmetros de desempenho do modelo PLS para região fingerprint e ligação dupla.

Parâmetros	Cafeína (mol %)	Teobromina (mol %)
RMSEc	1,4442	1,4442
R ² cal	0,9975	0,9975
RMSE y-rand	10,3878	10,3878
R ² y-rand	0,8522	0,8522
cR ² p (y-rand)	0,3807	0,3807
RMSEcv	4,2475	4,2475
R ² cv	0,9819	0,9819

Figura 2 - Espectro de IR obtidas da água (a), das soluções aquosa de cafeína (b), teobromina (c) e mistura C T (1:1) (d). Em (b e c) também foi registrado o espectro obtido após realização de branco com água.

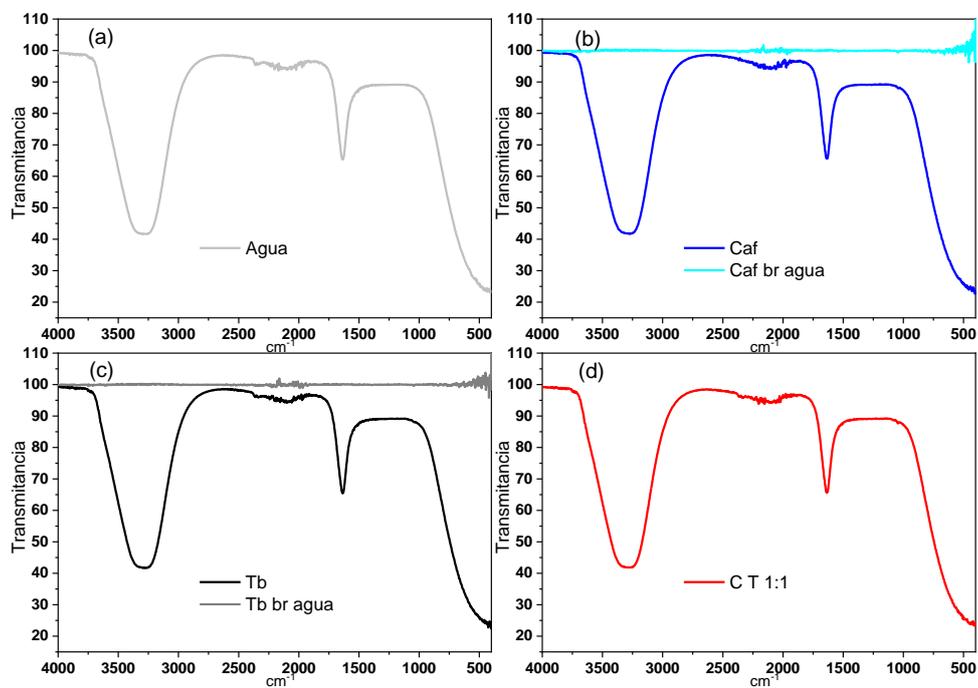


Figura 3 - Espectros de IR com correção de linha base: (a) espectro metanol; (b, c, d, e) espectro das amostras reacionais teste 1, 2, 3, 4; (f) exemplo de subtração do espectro de metanol no teste 1.

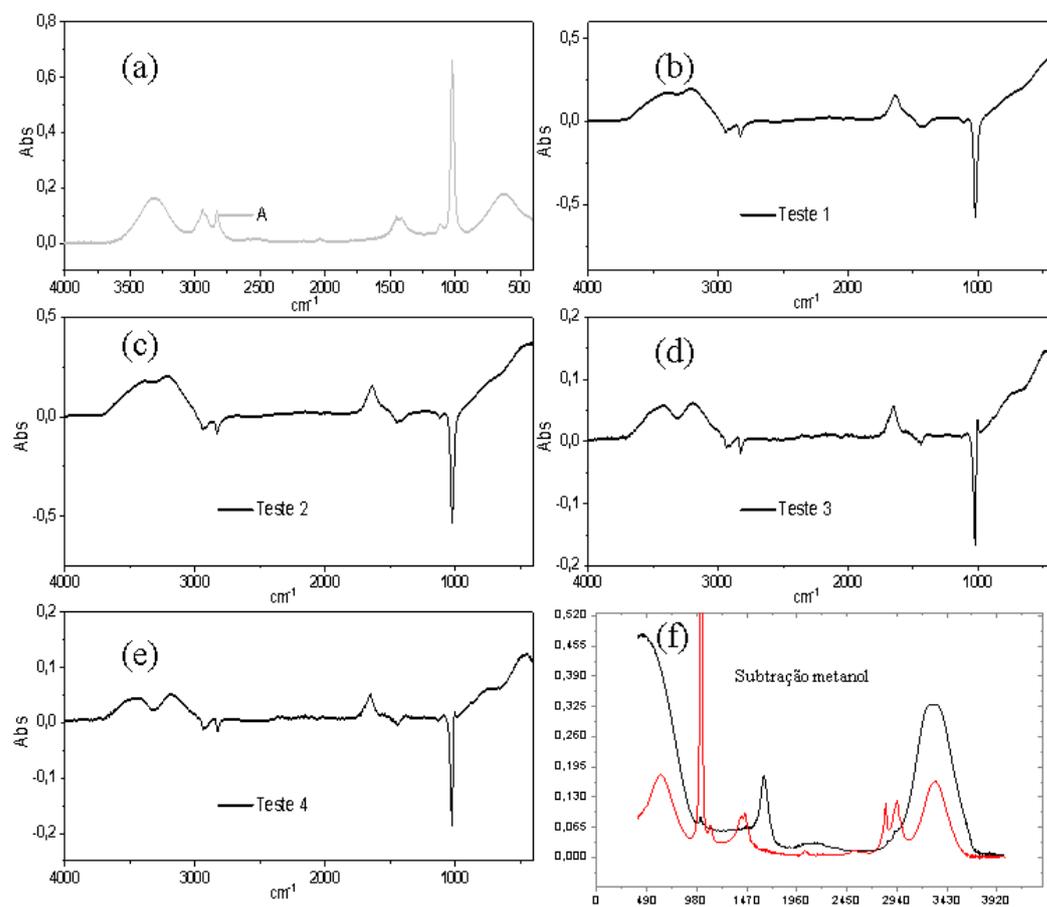


Figura 4 - Cromatogramas obtidos de cafeína e subprodutos na etapa desenvolvimento. Coluna Varian, FM: solução aquosa acidificada (pH3)/Metanol (7:3) Rt teobromina 3,3', cafeína 9,2' (a); Coluna Kromasil, FM: solução aquosa acidificada (pH3)/Metanol (85:15), Rt teobromina 3,9', cafeína 12,1' (b).

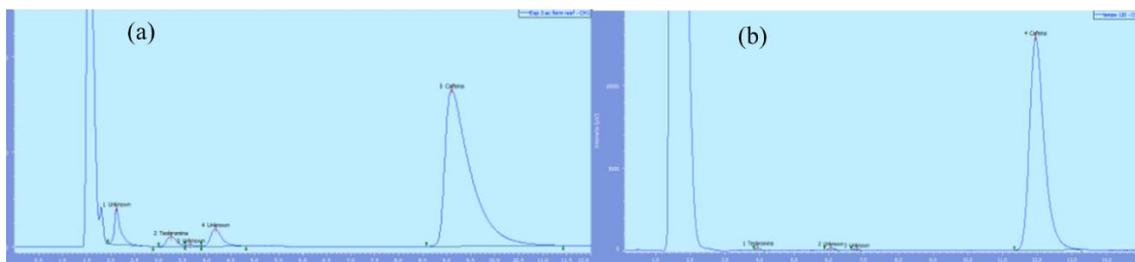


Figura 5 - Cromatograma com os padrões de teobromina e cafeína obtidos com o método desenvolvido: Kromasil C18 150 x 4,6 mm 5 μ m; solução de ácido acético 0,5% (pH 3,0) /acetonitrila (9:1), 1,0 mL.min⁻¹, 272 nm.

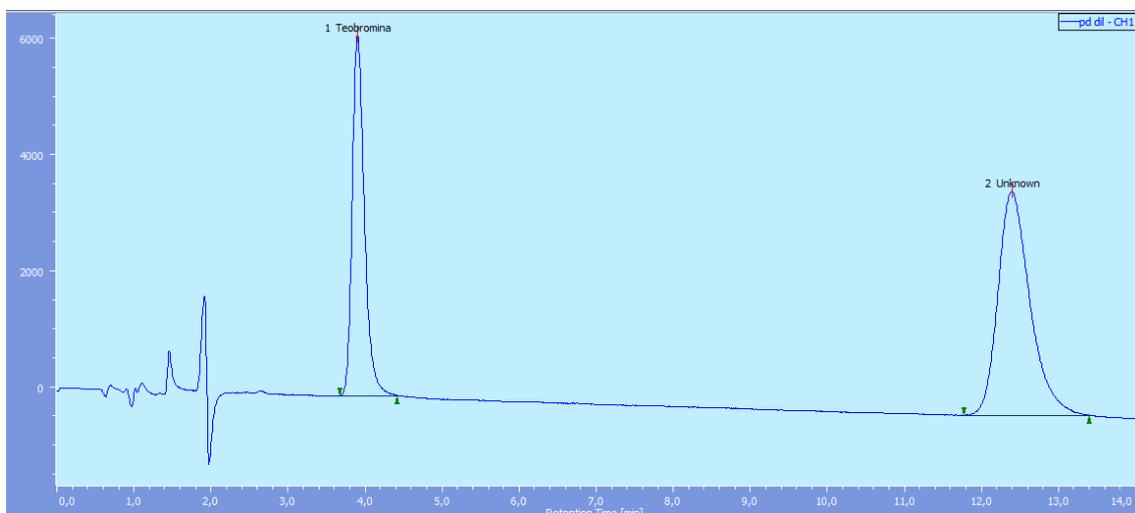


Figura 6 - Cromatograma apresentando produtos de degradação da cafeína, FM água/acetonitrila (9:1).

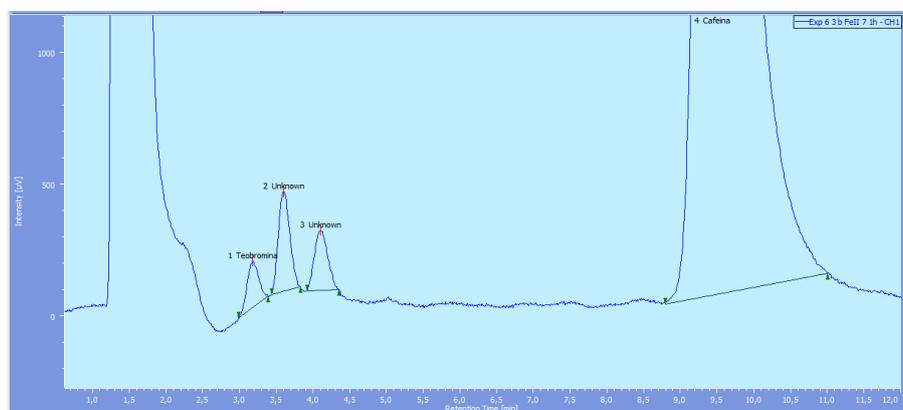


Figura 7 - Cromatograma de amostras contendo cafeína e produtos de degradação a diminuição da força de eluição. FM água/acetonitrila (92:8).

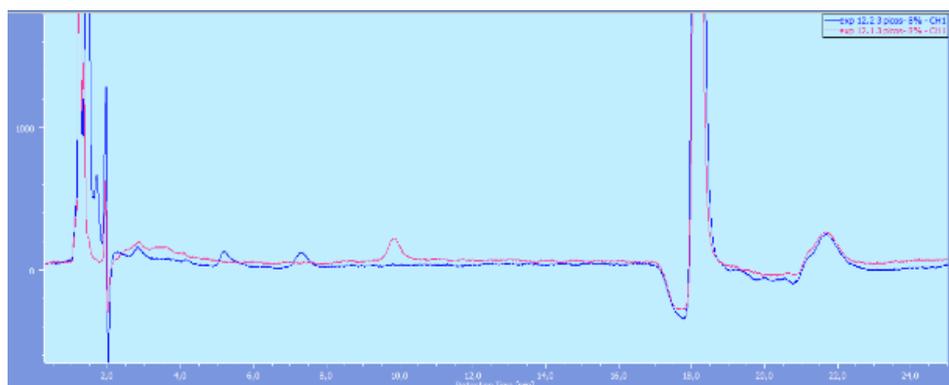


Figura 8 - Cromatogramas das amostras contendo diferentes produtos de degradação utilizando mistura de água e acetonitrila (9:1) como FM e mantendo a coluna Kromasil. (a - e) diferentes condições reacionais.

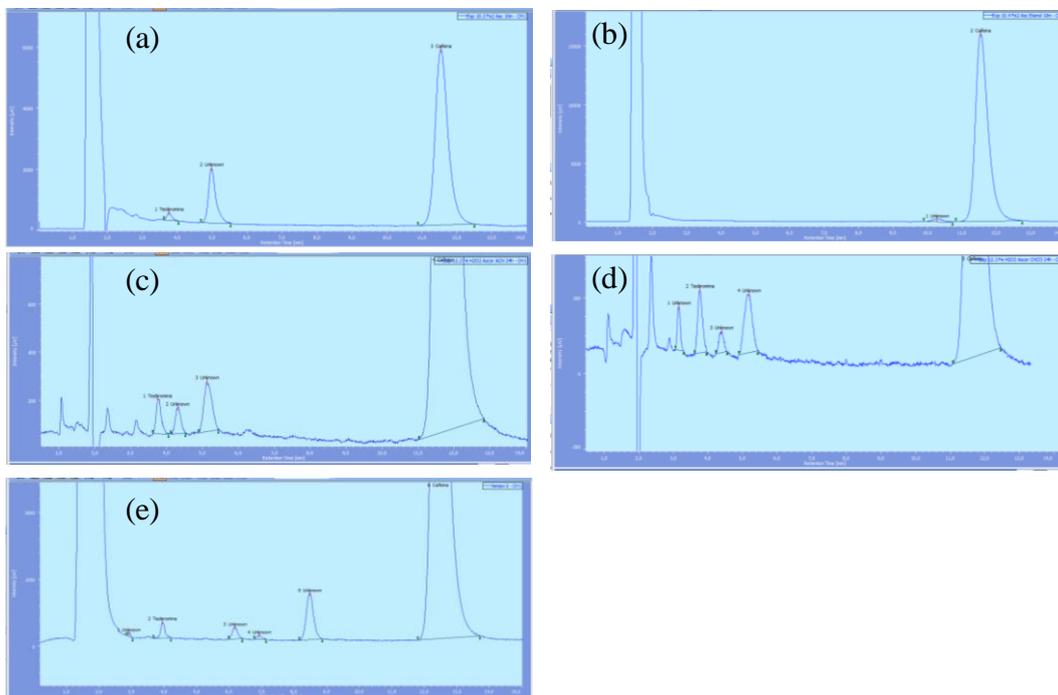
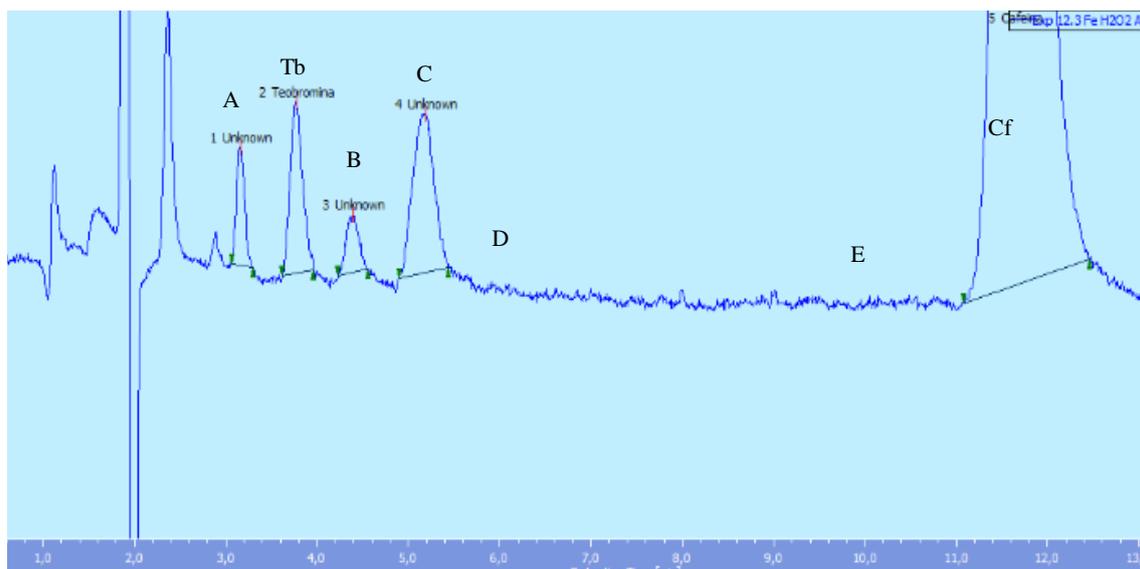


Figura 9 - Cromatograma das condições cromatográficas otimizadas, com indicação dos picos eluídos.



Nota: Nem todos picos estão presentes numa mesma amostra, assim alguns picos foram indicados (visando facilitar a visualização da eluição) embora ausentes pois estão presentes apenas em outras condições.

APÊNDICE 2 – Referente ao capítulo 4

Figura 1 – Cromatograma da degradação de cafeína a $20,0 \text{ g L}^{-1}$ ($10,3 \text{ mM}$) na condição Fenton (10 mM de H_2O_2 , 3 mM de Fe^{2+} , em pH neutro) por 24 horas, obtido no HPLC-DAD com coluna C18 $250 \times 4,6 \text{ mm}$ e mistura de água e acetonitrila como fase móvel.

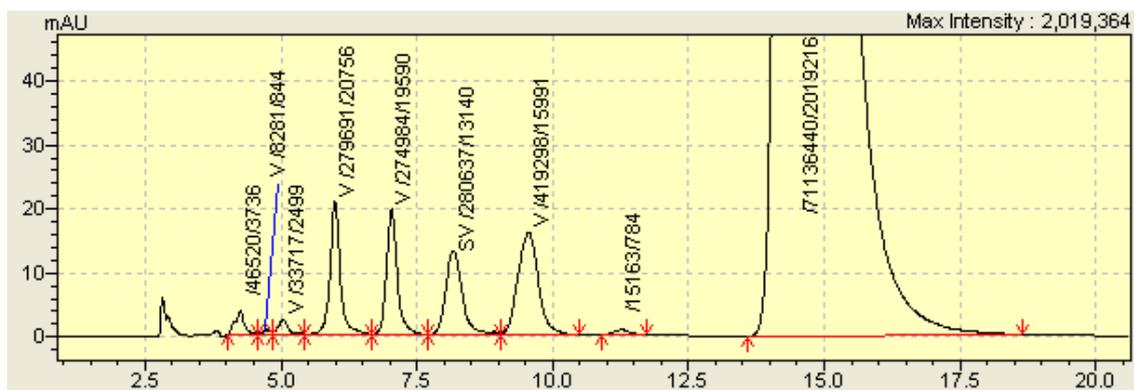
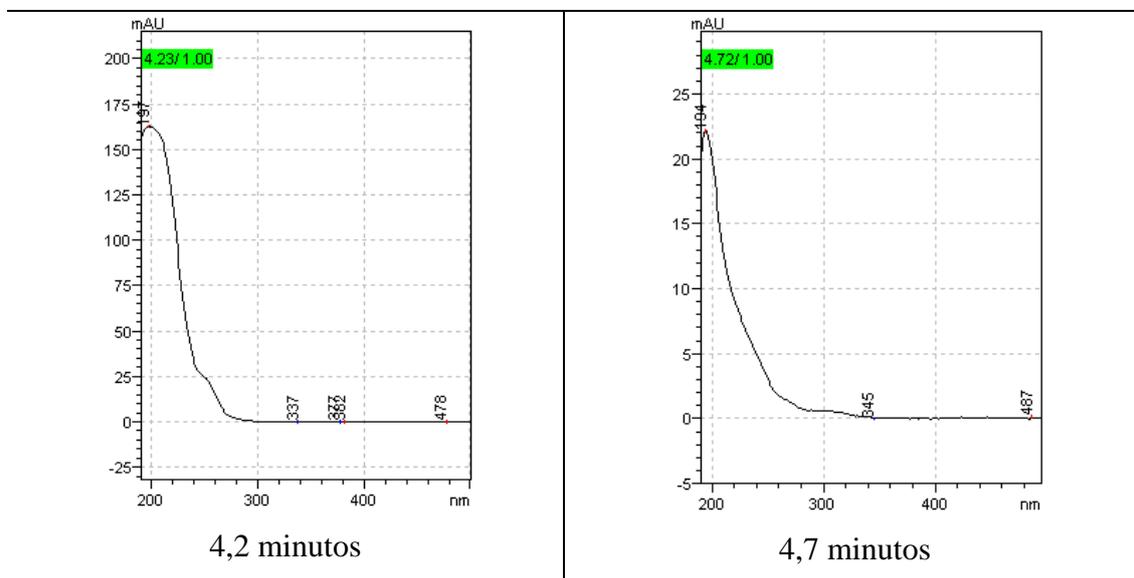
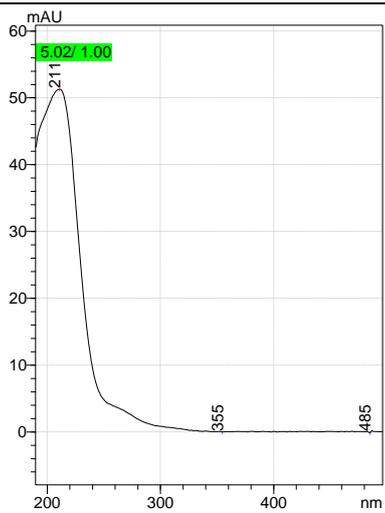


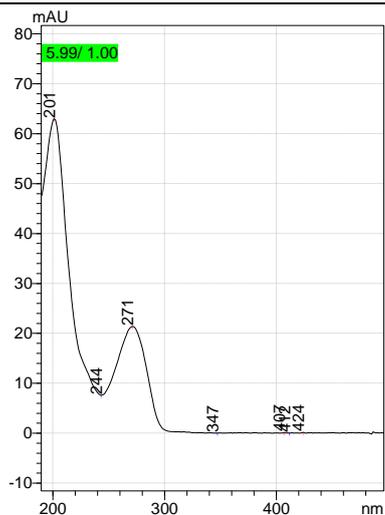
Tabela 1 – Avaliação dos espectros no UV referente aos picos da condição Fenton utilizando $20,0 \text{ g L}^{-1}$ de cafeína.

Tempos de retenção e espectros no UV dos analitos

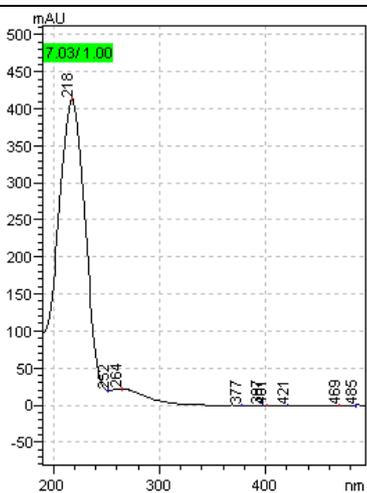




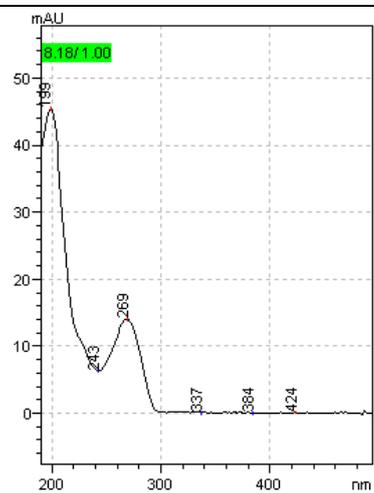
5,0 minutos



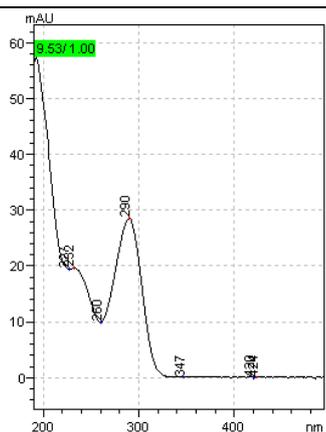
Teobromina - 6,0 minutos



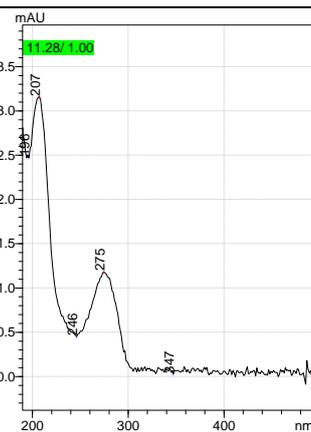
7,0 minutos



8,2 minutos



9,5 minutos



11,3 minutos

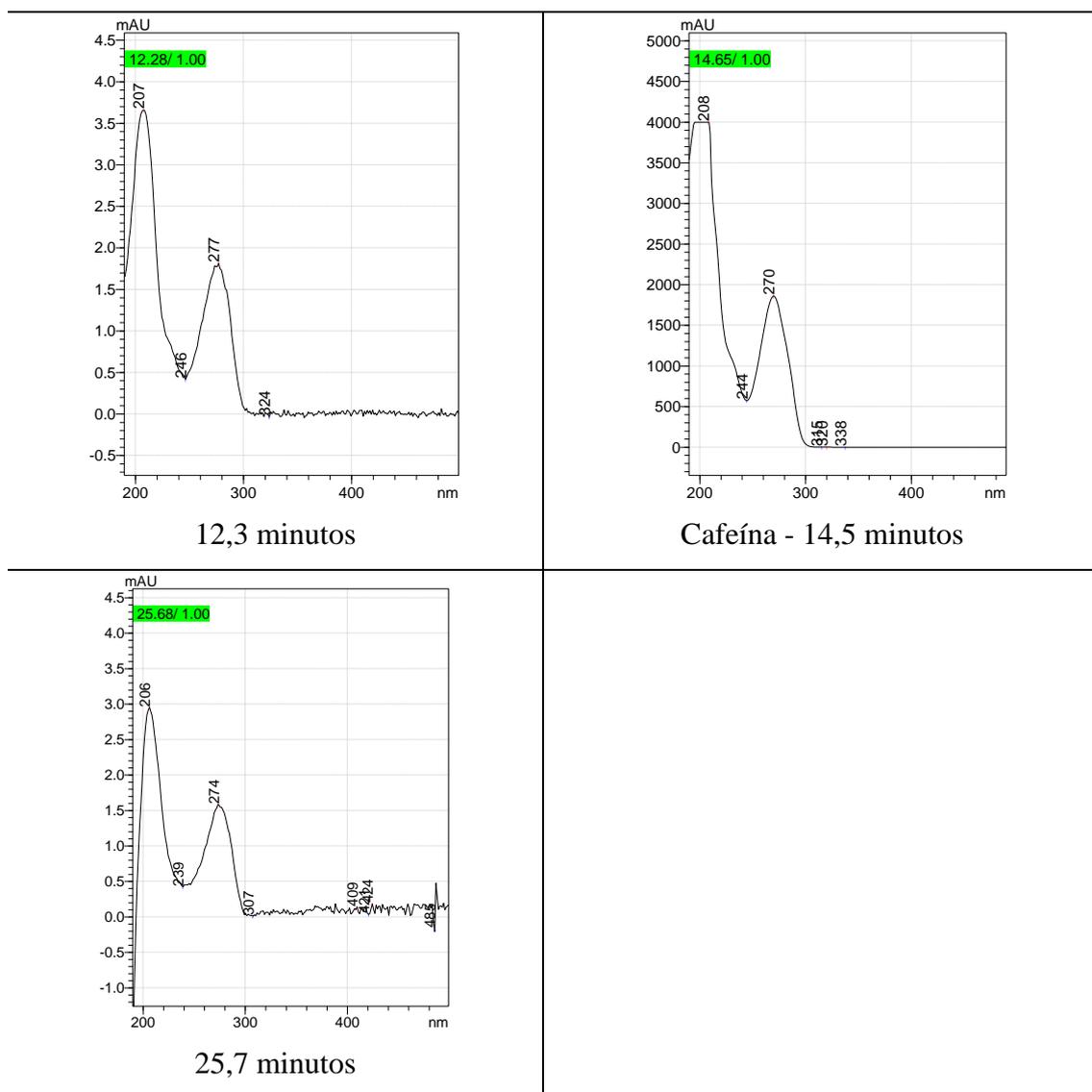


Figura 2 – Cromatograma obtido do padrão de cafeína e teobromina injetado no sistema HPLC-MS/TOF evidenciando os espectros no UV e de massa com picos em m/z 181 e m/z 195, respectivamente.

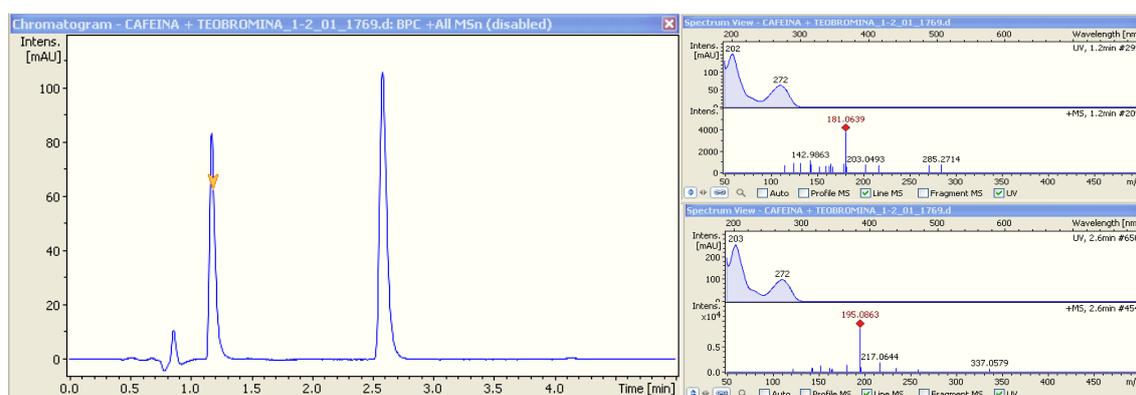


Figura 3 - Dados da amostra 1, coleta entre 1,7 e 1,9 minutos. a) Cromatograma contendo 2 picos em 1,6 e 4,4 minutos; b) Espectros no UV (231 e 267 nm) e de massas m/z 144 referente ao pico 1,6 minutos; c) Espectros no UV (190, 220 e 270 nm) e de massas m/z 181 e 144 referente ao pico 4,4 minutos.

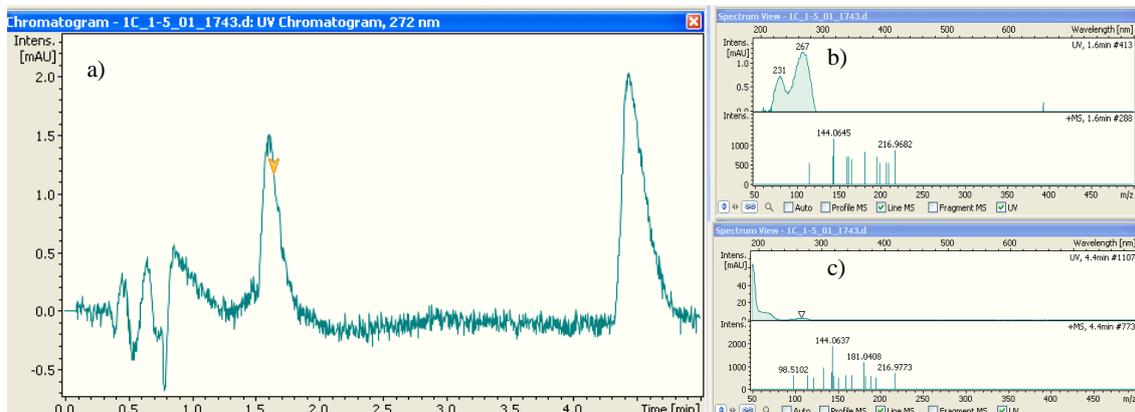


Figura 4 - Dados da amostra 1, coleta entre 2,1 e 2,3 minutos. a) Cromatograma contendo 2 picos em 1,5 e 4,4 minutos; b) Espectros no UV (205 nm) e de massas m/z 181, 144 e 122 referente ao pico 1,6 minutos; c) Espectros no UV (190, 220 e 270 nm) e de massas m/z 181 e 144 referente ao pico 4,4 minutos.

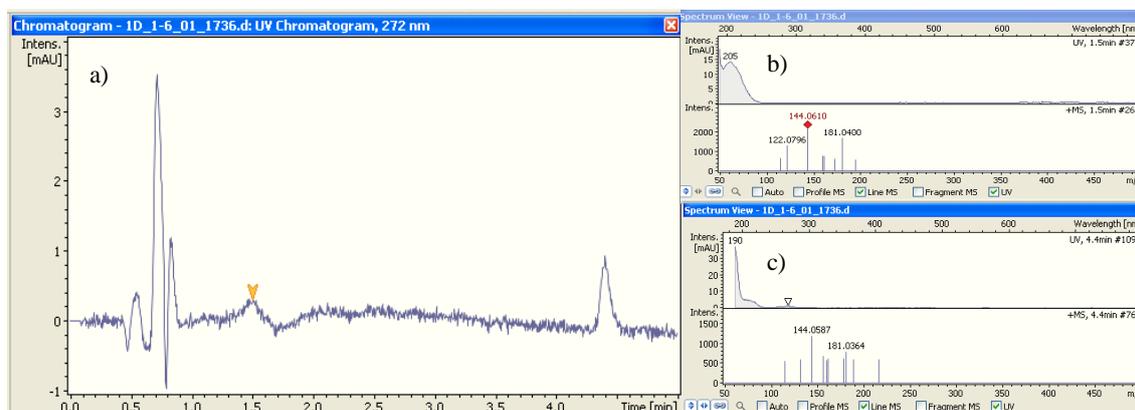


Figura 5 - Dados da amostra 2, coleta entre 1,7 e 1,9 minutos. a) Cromatograma contendo 1 picos em 4,4 minutos; b) Espectros no UV (190, 220 e 270 nm) e de massas m/z 195 e 144; c) Cromatograma TIC.

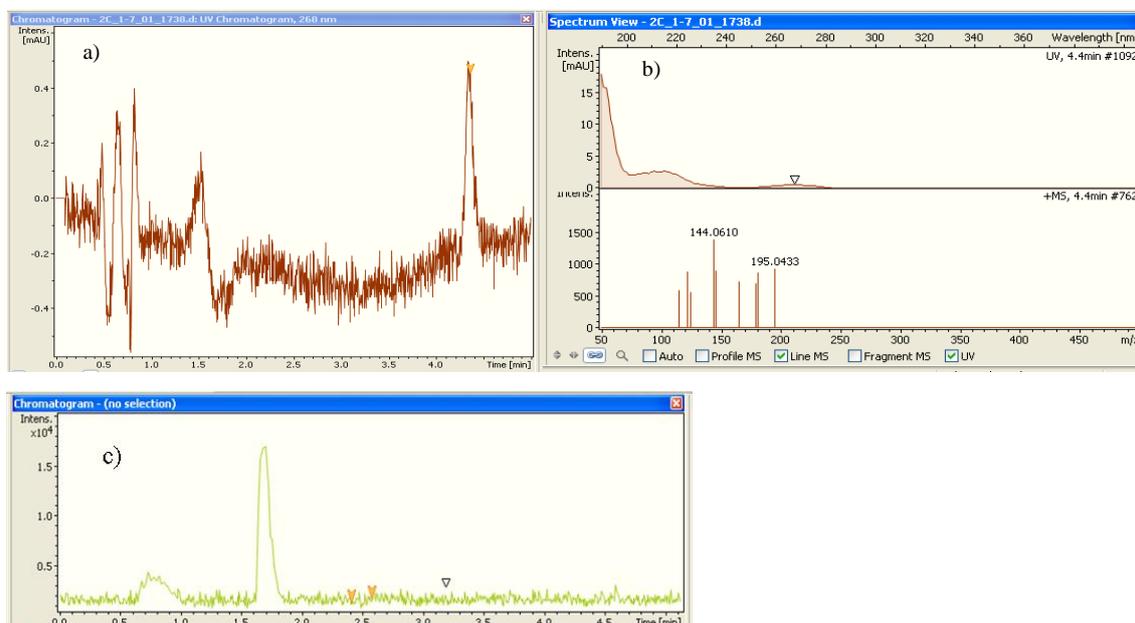
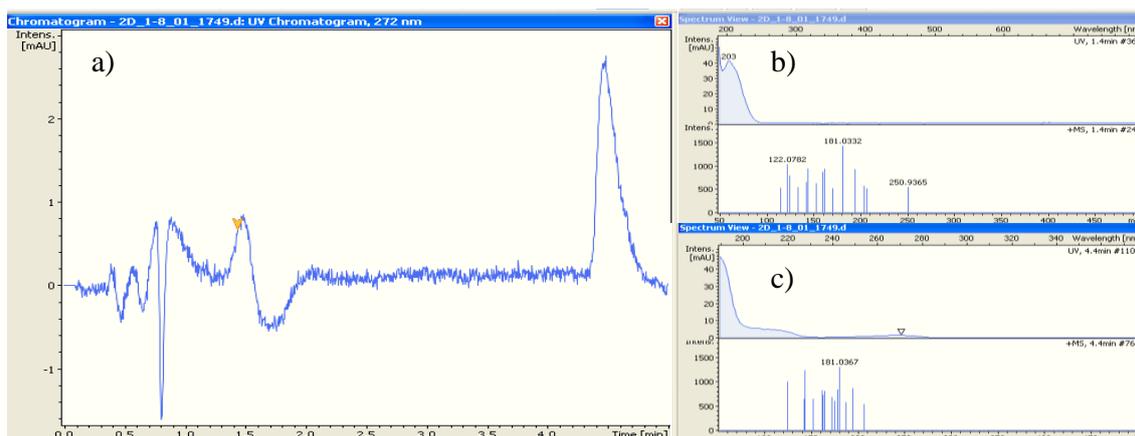


Figura 6 - Dados da amostra 2, coleta entre 2,1 e 2,3 minutos. a) Cromatograma contendo 2 picos em 1,4 e 4,4 minutos; b) Espectros no UV (203 nm) e de massas m/z 181 e 122 referente ao pico 1,4 minutos; c) Espectros no UV (190, 220 e 270 nm) e de massas m/z 181 referente ao pico 4,4 minutos.



APÊNDICE 3 – Artigo publicado na revista *Technology Environmental & Innovation*

Environmental Technology & Innovation

Available online 23 September 2021, 101984

In Press, Journal Pre-proof

Kinetic insights on wet peroxide oxidation of caffeine using EDTA-functionalized low-cost catalysts prepared from compost generated in municipal solid waste treatment facilities

Jose L. Diaz de Tuesta^a, Flávio V.M. de Almeida^{a, b}, Jessica R.P. Oliveira^{a, c}, Paulo Praça^d, Mário C. Guerreiro^b, Helder T. Gomes^a

Show more

Outline | Share | Cite

<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101984>

[Get rights and content](#)

Highlights

- Catalysts are prepared from matured compost.
- Catalytic activity is enhanced by functionalization with EDTA.
- A stable EDTA-functionalized catalyst is developed.
- Caffeine, as model micro-pollutant, is completely removed from aqueous solutions.
- The kinetics of CWPO of caffeine is modelled.

Full Text

Help

APÊNDICE 4 – Referente a trabalho em fase de escrita

Título: Compostos bioativos na casca de café: extração “verde” otimizada por metodologia de superfície de resposta

Resumo:

O consumo de componentes fitoquímicos, seja de alimentos derivados das plantas ou seu emprego nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, tem crescido decorrente de suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. A cafeína é uma substância ativa muito consumida pela população em parte devido a seus efeitos estimulantes do SNC, sendo incorporada em alimentos e medicamentos. A principal fonte de cafeína para suprir essa demanda industrial é decorrente da descafeinação do grão do café. Uma alternativa para a obtenção da cafeína é sua extração a partir da casca de café, que é pouco aproveitada sendo um rejeito agrícola, e seu teor de cafeína é semelhante ao grão de café, cerca de 1 a 4% (m/m). Esse trabalho visa desenvolver um método de extração ambientalmente correto para obtenção de cafeína e demais componentes fitoquímicos do café como compostos fenólicos e ácidos clorogênicos, que apresentam efeitos benéficos para a saúde humana, a partir da casca do café. Procedeu-se o planejamento experimental tipo CCD considerando os parâmetros: diferentes proporções de etanol e água (0 a 100%) como solvente extrator, temperatura (20 a 70 °C) e tempo (0,6 a 17,4 horas) de extração. Os resultados foram utilizados para obtenção do gráfico de superfície de resposta para verificação da condição ótima de extração utilizando o modelo quadrático. Verificou-se que a solução etanólica 30% promove a maior recuperação com aproximadamente 0,7 g de cafeína em 100 g de casca de café em 40 minutos de extração a temperatura ambiente.

APÊNDICE 5 – Participação em eventos

- XXXI Encontro Regional da SBQ-MG – Itajubá/MG, realizado entre 24 a 26 de novembro de 2017.

Workshop “Discentes do PPGMQ-MG”

- XXIV Encontro Luso Galego de Química - Porto / Portugal, realizado entre 21 a 23 de novembro de 2018.

Apresentação de pôster:

Química Analítica: **Avaliação de métodos analíticos para determinação de teobromina em presença de cafeína.**

Química e Ambiente: **Monitoramento de grupos funcionais oxigenados na superfície de hydrochars por espectroscopia no infravermelho.**

- 20º Congresso Brasileiro de Catálise - São Paulo/ SP, realizado entre 01 a 05 de setembro de 2019.

Apresentação de pôster: **Síntese de materiais derivados de resíduos orgânicos aplicados na remoção de cafeína com peróxido de hidrogênio.**

- XXVIII Congresso da Pós-Graduação da Universidade Federal de Lavras – Lavras/MG, realizado entre 4 a 7 de novembro de 2019.

Apresentação de trabalho oral: **Avaliação da catálise oxidativa na conversão da cafeína a teobromina.**

APÊNDICE 6 – Participação em trabalhos apresentados em outros eventos



Environmental

Catalytic wet peroxide oxidation of caffeine over functionalized biochar materials developed from compost obtained from municipal solid waste

Oliveira JRP^a, Almeida FVM^a, Díaz de Tuesta JL^{a,c}, Praça P^a, Guerreiro MC^b, Barreiro MF^{a,c}, Silva AMT^c, Faria JL^c, Gomes HT^{a,c}

24, 25 E 26 DE JULHO DE 2019
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO



ANO INTERNACIONAL
DA TABELA PERIÓDICA



SLOVENIAN CHEMICAL SOCIETY
Hajdrihova 19, P.O. Box 660
SI-1001 Ljubljana, Slovenia



APPLICATION OF CATALYSTS DEVELOPED FROM COMPOST DERIVED FROM MUNICIPAL SOLID WASTE IN THE REMOVAL OF CAFFEINE BY WET PEROXIDE OXIDATION

F.V.M. Almeida^{a,b}, J.R.P. Oliveira^a, J.L. Díaz de Tuesta^{a,c}, P. Praça^d,
M.C. Guerreiro^b, M.F. Barreiro^{a,c}, A.M.T. Silva^c, J.L. Faria^c, H.T. Gomes^{a,c}

^aCentro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

^bDepartamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, LavrasMG, 37200-000, Brasil

^cLaboratory of Separation and Reaction Engineering - Laboratory of Catalysis and Materials (LSRE-LCM), Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, 4200-465 Porto, Portugal

^dResíduos do Nordeste, EIM, S.A. Empresa Intermunicipal, Mirandela, 5370-340, Portugal

Book of Abstracts

6th European Conference on Environmental Applications of
Advanced Oxidation Processes, Portorož – Portorose, Slovenia, 26-30 June 2019