

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
CURSO DE TECNOLOGIA EM GESTÃO AMBIENTAL**

WILLIAN BOGLER DA SILVA

**PROPOSIÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM MATRIZES AMBIENTAIS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEDIANEIRA

2014

WILLIAN BOGLER DA SILVA

**PROPOSIÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM MATRIZES AMBIENTAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado a disciplina de trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador: Prof. Me. Ismael Laurindo Costa Junior

Co-orientadora: Prof. Dra. Leidi Cecilia Friedrich

MEDIANEIRA

2014



TERMO DE APROVAÇÃO

PROPOSIÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM MATRIZES AMBIENTAIS

WILLIAN BOGLER DA SILVA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 25 de Novembro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Gestão Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Ismael Laurindo Costa Junior
Prof. Orientador

Leidi Cecilia Friedrich
Profª Co-orientadora

Carlos Alberto Mucelin
Membro titular

Thiara Reis Lopes
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso

Dedico este trabalho a todos que me auxiliaram ao longo da vida acadêmica mas principalmente à minha família pelo longo período ausente.

AGRADECIMENTO

Não será possível expressar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal, profissional e intelectual mas saibam que mesmo não citados alguns nomes estas pessoas estão presentes em minhas memórias, lembranças e em minha história.

Agradeço a minha mãe Iolanda Bogler pelo total apoio e auxílio nesta longa jornada.

A minha família pois mesmo estando ausente sempre se preocupou e me cobrou as visitas, nunca esqueceram ou desistiram.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná e a todos os servidores pelo auxílio.

A Thais Lisboa pelo apoio e auxílio durante parte da graduação e por ajudar nas práticas laboratoriais.

Aos meus amigos por estarem sempre comigo em todos os momentos, pois mesmo a distância não desfaz amizades verdadeiras.

Ao meu Orientador Prof. Me. Ismael Laurindo Costa Junior e minha Co-orientadora Prof. Dra Leidi Cecilia Friedrich por aceitarem o desafio do Trabalho de Conclusão de Curso e por serem facilitadores, assim como me acompanharam nesta caminhada árdua.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mucelin por auxiliar minha vida acadêmica.

A química que produz a vida é reproduzida facilmente por todo o cosmo. Parece improvável que sejamos os únicos seres inteligentes. É possível mas improvável (SAGAN, Carl, 1982).

Resumo

SILVA, Willian Bogler da. Proposição e validação de metodologia analítica para determinação de cafeína em matrizes ambientais. 2014. 43 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso Tecnologia em Gestão Ambiental- Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2014.

O crescimento populacional aliado a elevada demanda por serviços e produtos contribui com a intensificação dos processos de desenvolvimento de novos compostos. Conseqüentemente, diversas substâncias, até então despercebidas, ou consideradas inofensivas passam a figurar como de grande importância no cenário das preocupações ambientais. Xenobióticos são compostos emergentes que merecem atenção, pois apresentam riscos em potencial quando em contato com a biota, mesmo em concentrações traço. Existem poucas competências analíticas disponíveis para monitorar tais poluentes e avaliar efetivamente seus efeitos no ambiente. Uma alternativa é realizar o monitoramento de alguns compostos como indicadores de contaminação. Estudos recentes indicam que a cafeína é eficaz marcador de atividades antropogênicas. A determinação desta substância, quando não envolve um método instrumental de difícil acesso, se dá por procedimentos complexos e demorados, baseado em técnicas de extração com solventes e purificação. Sendo assim, este trabalho visa a proposição e validação de uma metodologia analítica, contribuindo assim para a detecção e quantificação da cafeína. O Método utilizado consiste basicamente na extração por solvente orgânico e detecção por espectrofotometria UV-VIS. Após o tratamento dos dados e otimização das condições o método foi considerado válido para matrizes aquosas.

Palavras-chave: Validação de Metodologia. Poluentes Emergentes. Determinação de Cafeína.

ABSTRACT

SILVA, Willian Bogler da. Proposition and validation of analytical methodology for determination of caffeine in environmental matrices. 2014. 43 pages. Trabalho de Conclusão de Curso Tecnologia em Gestão Ambiental- Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2014.

Population growth coupled with high demand for services and products contribute to the intensification of new compounds development processes. Consequently, a number of substances, hitherto unnoticed, or regarded as inoffensive now be found as critical in the context of environmental concerns. Xenobiotic compounds are emerging that deserve attention because they present potential risks when in contact with the biota, even at trace concentrations. There are few analytical skills available to monitor such pollutants and effectively evaluate their effects on the environment. An alternative is to monitor some of some compounds as contamination indicators. Recent studies indicate that caffeine is effective marker of anthropogenic activities. The determination of this substance, if not instrumental method involves a difficult to access, is given by complex and time-consuming procedures, based on extraction with solvents and purification techniques. Thus, this paper aims to propose and validation of an analytical methodology, thus contributed to the detection and quantification of caffeine. The method used is basically the extraction by organic solvent and detection by UV-VIS spectrophotometry. After the processing and optimization of the conditions the method was considered valid for aqueous matrices.

Keywords: Validation Methodology. Emerging pollutants. Determination of caffeine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da cafeína.	16
Figura 2 - Estação de tratamento de efluente. a) Pontos de coleta, b) Ralf	21
Figura 3 - Pontos de Coleta das amostras. a) ponto 1, b) ponto 2, c) ponto 3.	21
Figura 4 - Fluxograma resumido das principais etapas e procedimentos empregados.	22
Figura 5 - a) Etapa de Filtragem a vácuo, b) Etapa de extração líquido-líquido, c) Etapa de recuperação do solvente, d) Etapa de acondicionamento no balão.....	24
Figura 6 - Espectrofotômetro UV-VIS Lambda 4S PerkinElmer	24
Figura 7 - Relação entre a absorvância e concentração fortificada de cafeína em amostras de efluente, sedimento e água destilada, considerando o volume amostral de 10mL e $\lambda=272\text{nm}$	29
Figura 8 - Curvas de adição do padrão cafeína. CI (Intervalo de Confiança) 95%, PI (Intervalo de Predição), R-Sq (Coeficiente de Correlação Linear) e R-Sq (adj.) (Coeficiente de Correlação Linear Ajustado).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros para determinação e análise de cafeína	20
Tabela 2 - Respostas do sinal analítico em cada ensaio de otimização.	28
Tabela 3 - Valores de fortificação empregados e intensidade do sinal.	29
Tabela 4 - Parâmetros utilizados no Espectrofotômetro UV-VIS.....	30
Tabela 5 - Dados da Regressão linear das curvas de adição de padrão no nível de 95% de confiança.....	31
Tabela 6 - Valores de LD e LQ.....	32
Tabela 7 - Valores de repetibilidade.....	32
Tabela 8 - Valor da precisão intermediária do método.....	33
Tabela 9 - Adição e recuperação de cafeína em amostras fortificadas com cafeína em água destilada,	33
Tabela 10 - Concentrações médias.....	34
Tabela 11 - Concentração de cafeína em efluente reportadas em estudos anteriores	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. POLUENTES EMERGENTES.....	13
2.2. INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO ANTRÓPICA	14
2.3 CAFEÍNA.....	15
2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	17
2.5 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	18
2.6 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS	18
3 METODOLOGIA	20
3.1 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA	20
3.2 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS	20
3.3 DETERMINAÇÃO DA CAFEÍNA.....	22
3.4 ESTUDO DE VALIDAÇÃO.....	25
3.4.1 Seletividade	25
3.4.2 Linearidade	25
3.4.3 Limites de Quantificação e Detecção.....	25
3.4.4 Precisão.....	26
3.4.5 Exatidão.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	28
4.2 ESTUDO DE VALIDAÇÃO.....	29
4.2.1 Seletividade.....	29
4.2.1 Linearidade	30
4.2.2 Limite de Detecção e Quantificação	32
4.2.3 Precisão.....	32
4.2.4 Exatidão.....	33
4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM AMOSTRAS AQUOSAS	34
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O crescimento significativo da população humana no planeta Terra ocasiona diversos agravantes tais como o consumo elevado de recursos naturais, espaço e contaminação do meio ambiente. Um fator agravante que acompanha tal crescimento é a quantidade de novos compostos, como fármacos, produtos de higiene e beleza, dentre outras categorias, amplamente utilizados e dispostos no meio ambiente.

Existe uma vasta gama de substâncias químicas e estas são constantemente utilizados para diversas finalidades, seja de uso externo, em atividades cotidianas ou de aplicação interna, como fármacos e conservantes alimentares. Este último grupo assume um caráter de preocupação ambiental por seus efeitos endócrinos apresentarem risco aos seres vivos mesmo após seu descarte, visto que o composto original ou seu metabólito pode ser eliminado do organismo como devido ao fato deste não o consumir por completo.

Existem técnicas utilizadas para se determinar a presença de compostos emergentes em corpos hídricos, entre tais métodos pode-se citar a espectrofotometria UV-VIS e a Cromatografia Líquida e Gasosa, porém tais métodos de determinação são financeiramente elevados provocando restrições em suas aplicações. Através da Espectrofotometria UV-VIS é possível determinar e quantificar os compostos emergentes e determinar a contaminação do corpo hídrico, esta técnica é viável financeiramente pois seu custo é pequeno e seu desenvolvimento é de fácil realização.

Além dos compostos emergentes que apresentam riscos em potencial à biota, existem outros compostos presentes no meio ambiente que tem sua origem de forma antrópica. Por serem substâncias que acompanham diversas formulações em que poluentes mais graves estão presentes, podem ser utilizados como marcadores ou indicadores da presença de contaminantes emergentes mais severos. Dentre estas substâncias destacam-se a cafeína, os detergentes, biocidas e hormônios.

O uso destas substâncias no monitoramento ambiental é baseado no fato do organismo humano não consumi-las por completo. Após a eliminação da

substância está será disposta na rede de coleta de Esgoto ou em foças sépticas, tais substâncias ou seus metabólitos por não terem uma forma de destinação ideal, foças sépticas, ou tratamento adequado, estação de tratamento de esgoto, são eliminadas no meio ambiente atingindo lenções freáticos e corpos hídricos podendo alcançar diversos compartimentos no meio ambiente, tal como o sedimento.

A pesquisa realizada teve como objetivo validar uma metodologia de determinação e quantificação de cafeína e aplica-la em matrizes ambientais para se determinar a presença do analito em estudo e se o método utilizado nas estações de tratamento de efluente removem o composto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLUENTES EMERGENTES

A denominação “poluentes emergentes” pode ser substituída por contaminantes emergentes e estes não são regulamentados (GAFFNEY *et al.*, 2014) pois tais poluentes com o desenvolvimento das ciências e suas aplicações na indústria começaram a ser utilizados, distribuídos e eliminados na natureza. Alguns desses novos compostos não são necessariamente novos pois estavam presentes na natureza a muito tempo. Porém não existem muitas pesquisas e estudos acerca dos danos ambientais e não existe também uma legislação referente ao controle desses poluentes (DURIGAN; VAZ; PERALTA-ZAMORA, 2012).

Os poluentes emergentes podem ser desenvolvidos em laboratório ou através de processos básicos obtidos de forma natural portanto pode-se classifica-los como naturais ou sintéticos (COSTA JUNIOR; PLETSCH; TORRE, 2014). Os poluentes emergentes são diversos, como por exemplo, analgésicos, antiinflamatórios, antibióticos, drogas psiquiátricas, contrastes para exames radiológicos (REIS FILHO; LUVIZZOTO-SANTOS; VIEIRA, 2007), tais medicamentos são eliminados do organismo, como o sistema de tratamento de esgoto utilizado no Brasil não trata tais contaminantes estes são eliminados em corpos hídricos. Estes contaminantes têm sua origem através das atividades antrópicas e por não estarem presentes na natureza podem ser utilizados como marcadores de contaminação antropogênica.

Bila e Dezotti, 2003 afirmam que após a administração, uma parte dos fármacos é excretada por humanos no esgoto doméstico e como o sistema de tratamento convencional não trata tais compostos estes são eliminados no meio ambiente, provocando efeitos adversos na natureza e contaminando não somente a saúde humana e a toda biota (COSTA JUNIOR; PLETSCH; TORRE, 2014). Os poluentes estão presentes em baixas concentrações nos ecossistemas (ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$), porem, constituem uma fonte de potencial

contaminação e danos à saúde humana (COSTA JUNIOR; PLETSCH; TORRE, 2014).

2.2. INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO ANTRÓPICA

A contaminação do meio ambiente por ações antrópicas é uma das causas de grandes danos ao meio ambiente, para determinar a presença de contaminantes específicos ou determinar a presença de despejo de poluentes em rios, solos e na atmosfera se faz o uso de indicadores e bioindicadores, Arias *et al.* (2007) define bioindicadores como:

[...] qualquer resposta a um contaminante ambiental ao nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do status normal que não pode ser detectado no organismo intacto. (ARIAS *et al.*, 2007)

Além da determinação das mudanças físicas dos organismos é possível considerar o fator mortalidade de espécies, a partir do qual a morte de vários indivíduos é o resultado de alterações no meio ambiente, tornando-o inviável a sustentar a biota.

Os bioindicadores além de serem organismos identificados com alguma modificação físico-química por resposta de contaminantes, também podem ser organismos encontrados em áreas diferentes de sua natureza. Como indicador biológico pode-se citar a *E. coli*, organismo presente nas fezes de animais de sangue quente, o qual sua presença em corpos hídricos é um indicador da ocorrência de lançamento de esgoto sanitário ou contaminação por fezes de animais, indicando a possível presença de organismos patogênicos (SCHOLTEN, 2009).

Além da *E. coli*, as algas, as leveduras, os coliformes fecais, os coliformes totais, os Enterococos são indicadores biológicos utilizados na determinação da ocorrência de algum tipo de despejo/efluente e, portanto, é uma forma de caracterizar a existência de patógenos no ambiente.

Os indicadores químicos ganharam destaque nos últimos 10 anos, não por atuarem sobre os organismos, mas por correlacionarem a sua presença há compostos com potencial ecotoxicológico. Alguns desses compostos não estão de forma livre no meio ambiente, ou seja, são processados e despejados por ações antropogênicas.

Estudos de Scholten (2009) indicaram que o nitrogênio amoniacal pode ser utilizado como um indicador de contaminação, porém este pode ter sua fonte através da emissão de efluente ou por lixiviação, pois tal composto está presente em fertilizantes.

Outros indicadores que determinam a contaminação de corpos hídricos por despejos humanos são os compostos exógenos, sintetizados na cadeia produtiva dos diversos produtos existentes no mercado e com considerável persistência nos ecossistemas. Seu uso é desejável pois, compostos emergentes como fármacos e os produtos de higiene pessoal ainda não apresentam dados acerca dos danos que os mesmos causam para o meio ambiente.

2.3 CAFEÍNA

A cafeína, composto encontrado no grão de café é utilizada para elaborar diversos produtos alimentares, assim como ingrediente de diversas formulações farmacológicas é excretada na urina e fezes após o consumo. Com isso, possui elevada representatividade nos esgotos e, por extensão, adentram nos sistemas aquáticos.

A cafeína é um alcaloide, um composto contendo nitrogênio, que apresenta propriedades básicas. Ela pertence a uma classe de compostos de ocorrência natural chamada xantina. Possivelmente, as xantinas são os estimulantes mais antigos conhecidos sendo que, neste contexto, a cafeína é um dos mais potentes (IKAN, 1991).

Seu nome oficial segundo as regras da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) é 1,3,7-trimetilxantina (Figura 1), é um composto amplamente utilizado na sociedade pois está presente em comprimidos para resfriados, dores, inibidores de apetite e estimulantes (SOUZA; SICHIERI, 2005). Após o consumo o organismo por não utilizar o composto em sua totalidade o elimina através da urina (SINCLAIR; GEIGER, 2000) e fezes. Portanto a cafeína pode ser considerada um indicador de contaminação antrópica. Mesmo que o analito em questão não provoque danos severos ao meio ambiente e a saúde humana, este pode ser um indicador de poluentes nocivos a biota.

A determinação da concentração da cafeína pode ser empregada com maior eficiência que análises microbiológicas, devido a sua natureza antrópica confirmando a entrada de águas residuárias domésticas nos ambientes (GARDINALI ; ZHAO, 2002; FERREIRA, 2005; PELLER et al., 2006). A cafeína pode ser facilmente detectada na água, como consequência da sua alta solubilidade ($13,5 \text{ g L}^{-1}$), baixo coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow} = 0,01$) (GOSSETT; BROWN; YOUNG, 1983) e volatilidade insignificante, constituindo desta forma, um marcador, diretamente relacionado a atividades humanas (GARDINALI; ZHAO, 2002).

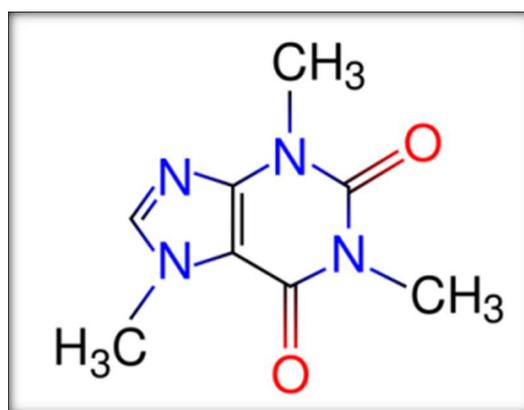


Figura 1 - Estrutura química da cafeína.

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação. (RIBEIRO *et al.*, 2008)

Valentini (2002) afirma que “o conceito do termo validação era utilizado em análises na química analítica inorgânica, a fim de assegurar que o elemento químico analisado correspondia ao da questão”. Portanto, métodos de validação correspondem a desenvolver técnicas para determinação de compostos químicos em resposta a algum evento. Freire *et al.* (2008) define a validação de metodologia como uma “adaptação de metodologias já validadas onde se incluiu novas técnicas e diferentes equipamentos”, com o intuito de se facilitar as análises. Pereira *et al.* (2007) definem a validação como:

Essencial para definir se uma metodologia desenvolvida está completamente adequada aos objetivos a que se destina, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados.

A validação metodológica é crucial, pois determina o melhor método a ser utilizado em um experimento ou detecção de substâncias. Os parâmetros de validação empregados para métodos analíticos incluem seletividade, linearidade e faixa de aplicação, exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) (FREIRE *et al.*, 2008).

2.5 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Para a realização de análises de poluentes ambientais tem-se uma vasta gama de metodologias. Estes métodos podem ser gravimetria, espectrofotometria, cromatografia de adsorção e camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, espectroscopia de infravermelho e eletroanálise (MARIA; MOREIRA, 2007). Entre os métodos existentes a espectroscopia UV-VIS tem um custo baixo comparado aos outros (ALVES *et al.*, 2010) e os resultados são considerados de fácil interpretação. O conceito através do método é descrito por Valentini (2002) como:

[...] a energia eletromagnética luminosa atravessa uma solução contendo átomos e moléculas, parte desta radiação é absorvida e o restante é transmitido. A radiação absorvida, por sua vez, depende da quantidade de moléculas presente, ou seja, da concentração da solução e da estrutura destas moléculas.

Quanto maior a concentração do composto menor a intensidade luminosa que atravessa a amostra, conseqüentemente apresenta um valor de absorbância maior. O método UV-VIS é utilizado em laboratório para quantificação de moléculas através da Lei de Beer-Lambert, que relaciona concentração com uma medida de absorbância (GALO; COLOMBO, 2009). Além das vantagens citadas acerca do método de determinação de cafeína Maria e Moreira (2007) afirmam que o método não destrói a matriz e não gera resíduo.

2.6 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS

A água foi o primeiro solvente utilizado pela ciência para extração que analitos, porém, o mesmo não era efetivo em outras substâncias, sendo assim,

tem-se a descoberta do segundo solvente denominado álcool, a partir do álcool a possibilidade de extração de diversos analitos teve um avanço significativo (DIAS; COSTA; GUIMARÃES, 2004), a química não cessou a descoberta de solventes gerando outros mais eficientes para determinados analitos, como o diclorometano (CH_2Cl_2), que é um composto menos tóxico a saúde humana, útil para extração de analitos polares, e o Clorofórmio (CHCl_3), que é útil para extração de analitos polares (MARQUES; BORGES, 2007) porem tem uma grau de toxicidade maior que o diclorometano e existe estudos que determinam que o clorofórmio é carcinogênico, além dos 2 compostos citados existem diversos outros, como exemplos o éter etílico, o pentano, hexano, tetracloreto de carbono, benzeno e o tolueno.

Uma forma de se extrair o analito em estudo é através da extração líquido-líquido no qual [...] se deseja extrair, continuamente, uma ou mais substâncias de um material líquido” (DIAS *at al*, 2004), este método possibilita determinar a diferença dos compostos, uma vez que o solvente fica na parte inferior do reservatório e a água superior ao solvente, ou seja, demonstra como o solvente é imiscível em água sendo possível separá-lo juntamente com o analito. A extração do analito só é realizada se o composto for solúvel no solvente, portanto é necessário identificar qual o melhor solvente a ser utilizado. A extração de analitos orgânicos é mais efetiva com solventes orgânicos pelo fato do semelhante dissolver o semelhante, o analito orgânico é de fácil arraste para o solvente, portanto, é extraído da água.

O método é realizado armazenando a amostra preparada em um balão de separação, na sequência o solvente é adicionado e sob agitação ocorre a lavagem da amostra pelo solvente acarretando no arraste do analito, após agitação e separação de fases, o solvente é separado e recuperado.

3 METODOLOGIA

3.1 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA

A otimização da metodologia analítica engloba mudanças nos parâmetros usuais para determinação e análise de cafeína. Os testes foram baseados na mudança do solvente e sua quantidade, determinação do pH de extração e tempo de aquecimento. Os parâmetros utilizados estão registrados na Tabela 1.

O estudo de otimização foi realizado com um planejamento fatorial 2^3 como ferramenta para definição das condições ideais de extração. Foram testadas 8 combinações. As respostas foram avaliadas em termos de intensidade do sinal analítico.

Tabela 1 - Parâmetros para determinação e análise de cafeína

Fatores	Limite inferior	Limite superior
Solvente	Clorofórmio (A)	Diclorometano (B)
Meio	Ácido (A)	Neutro (B)
Tempo	15min	30min

A amostra usada da otimização foi uma solução contendo cafeína na concentração de $3,0\text{mg L}^{-1}$.

3.2 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

A coleta das amostras foi realizada em uma estação de tratamento de esgoto, localizada no município de Medianeira –PR, Figura 2. As coletas foram realizadas na calha Parshall (esgoto bruto) (Ponto 1), na saída do Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente - Ralf (esgoto tratado) (Ponto

2) e no corpo receptor (Ponto 3), tais pontos podem ser observados na Figura 2 e Figura 3.

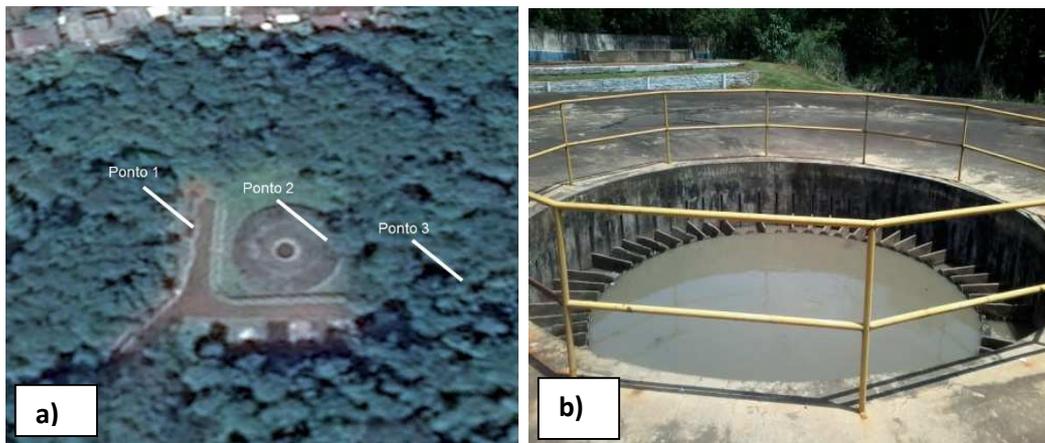


Figura 2 - Estação de tratamento de efluente. a) Pontos de coleta, b) Ralf



Figura 3 - Pontos de Coleta das amostras. a) ponto 1, b) ponto 2, c) ponto 3.

A coleta das amostras nos pontos foi realizada com o auxílio de um recipiente adaptado. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar de 250mL e dispostas em caixa térmica com gelo para preservação das amostras.

3.3 DETERMINAÇÃO DA CAFEÍNA

Na figura 4 o fluxograma representa de forma resumida o método utilizado para se extrair a cafeína.

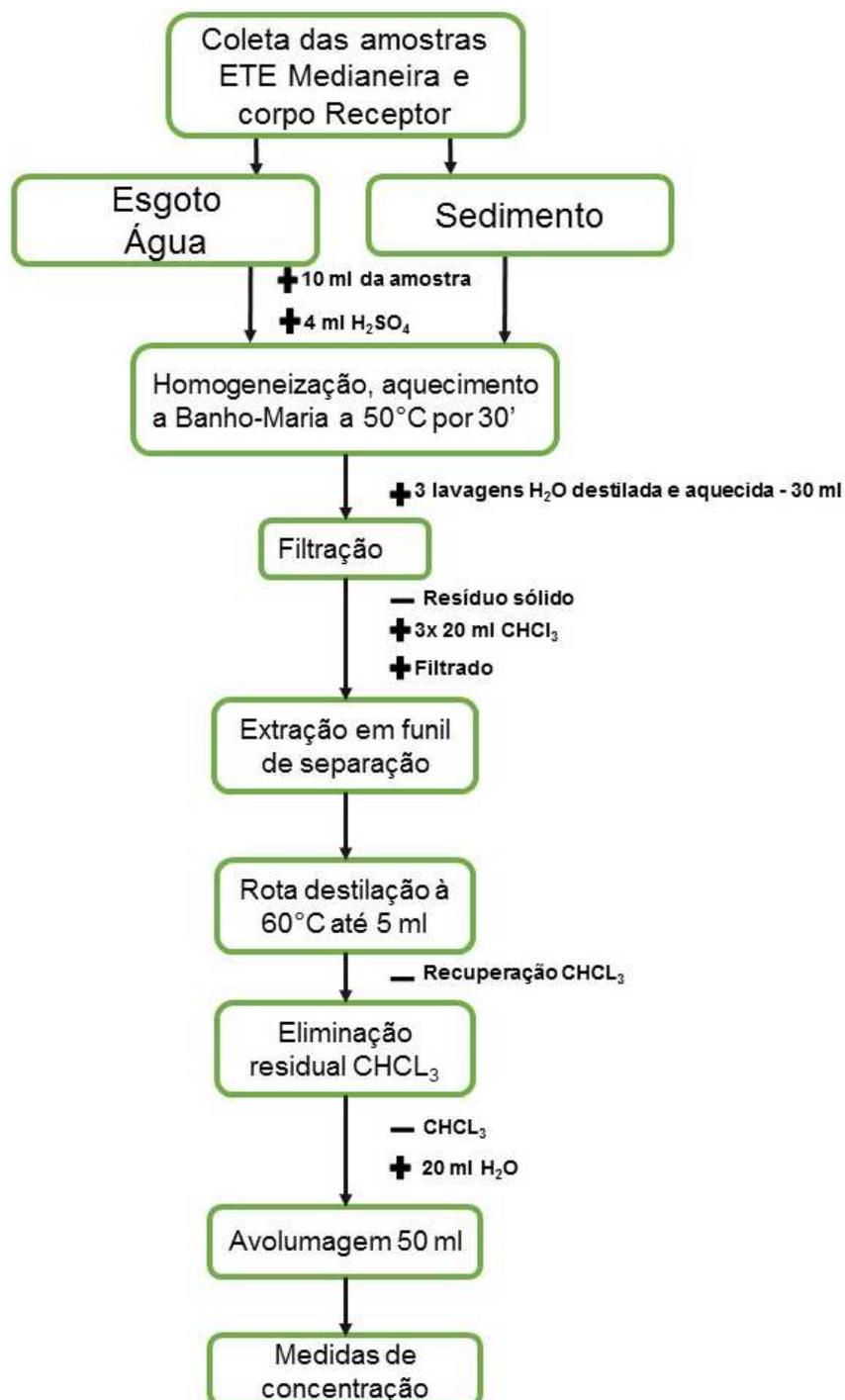


Figura 4 - Fluxograma resumido das principais etapas e procedimentos empregados.

Para o processamento das amostras foram preparadas alíquotas de água destilada fortificada com concentrações conhecidas de cafeína. Obteve-se um total de 10mL de amostra para posterior realização dos ensaios de otimização e validação. O sedimento utilizado foi obtido de uma nascente livre de poluentes e localizada em uma propriedade privada, o sedimento foi seco em temperatura ambiente por 1 semana, desagregado, peneirado, do qual foi separado 1 grama para cada fortificação. Para se determinar a cafeína no esgoto e no corpo receptor foram utilizadas 10 ml de esgoto bruto (Parshall) coletadas na entrada do reator anaeróbio, na saída do reator e no corpo hídrico e dispostas em tubos de ensaio, tanto as amostras fortificadas quanto nas amostras de esgoto, tratado e do corpo receptor se adicionou 4 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 10%, após a homogeneização o tubo foi aquecido a $50^\circ C$ em Banho-Maria por 30 minutos.

Decorrido o tempo de aquecimento as amostras foram filtradas em papel filtro com gramatura igual a 80 g.m^{-2} , espessura $205\ \mu\text{m}$ e poros de $14\ \mu\text{m}$. O processo de filtração foi realizado com água destilada aquecida a aproximadamente $60^\circ C$, 3 enxagues de 30 mL, após os enxagues a amostra foi transferida para funis de separação de 500 mL.

Para tornar o meio neutro, foi adicionado 5mL de Hidróxido de Potássio (KOH) promovendo a agitação da solução, para extração da cafeína foi realizado 3 lavagens de 10mL de clorofórmio ($CHCl_3$) obtendo um volume final total de solvente igual a 30 mL, após o processo de arraste o solvente foi recuperado no rota destilador através do processo de rotação e aquecimento a aproximadamente $60^\circ C$, após evaporação do solvente, foi realizado 2 lavagens com 10mL de água destilada aquecida a $60^\circ C$ para remoção do analito do balão.

A fração de 20ml de água destilada com o analito foi acondicionada em balões de 50mL e mais 2 lavagens de 10mL de água destilada aquecida é realizada e disposta no balão e avolumado a posteriori, as etapas podem ser observadas na Figura 5.

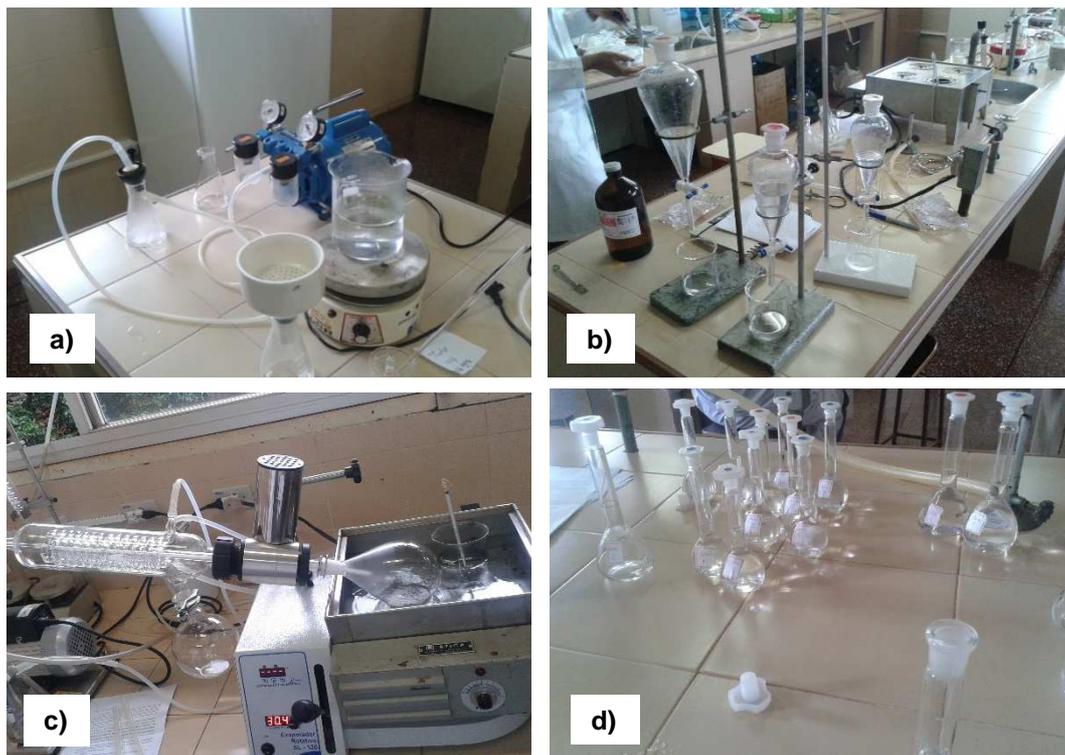


Figura 5 - a) Etapa de Filtragem a vácuo, b) Etapa de extração líquido-líquido, c) Etapa de recuperação do solvente, d) Etapa de acondicionamento no balão.

O processo da leitura e determinação da absorbância foi realizado através do espectrofotômetro UV-VIS Lambda 4S da marca PerkinElmer (Figura 6), no comprimento de onda igual a 272nm. A equação para se determinar a massa do analito foi elaborada através da fortificação de cafeína com concentrações diferentes e leitura no aparelho para se determinar a absorbância e elaboração da curva de calibração



Figura 6 - Espectrofotômetro UV-VIS Lambda 4S PerkinElmer

3.4 ESTUDO DE VALIDAÇÃO

3.4.1 Seletividade

A seletividade segundo ANVISA (2003) é [...] a capacidade que o método possui de medir exatamente um analito em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

O processo de fortificação para validação metodológica para as amostras foram 0,8; 2,5 e 5 mg.L⁻¹, as fortificações foram adicionadas em 10 ml de água destilada e 1 grama de sedimento obtido diretamente de uma nascente livre de poluição.

3.4.2 Linearidade

Segundo a PEREIRA *et al.* (2007) a linearidade é "... É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado."

A ANVISA (2003) determina que em caso da existência da relação linear após constatação visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, é necessário realizar transformação matemática.

3.4.3 Limites de Quantificação e Detecção

O limite de quantificação (LQ) é determinado pela menor quantidade do analito presente em uma amostra e que possa ser determinada com precisão e exatidão aceitável sob as condições experimentais estabelecidas, este limite é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível detectável com precisão e exatidão

aceitável (ANVISA, 2003), o limite de quantificação foi determinado pela equação 1.

$$LQ = \frac{10S_b}{b} \quad (1)$$

Sebben *et al.* (2010) definem o limite de detecção (LD) como [...] a menor concentração do analito que o procedimento analítico consegue diferenciar. Para se determinar o limite de detecção é necessário estabelecer por meio Uma análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (ANVISA, 2003), o valor obtido para o limite de detecção pode ser observado na equação 2.

$$LD = \frac{3S_b}{b} \quad (2)$$

No qual, S_B é o desvio padrão da absorbância média do branco, no comprimento de onda $\lambda=272\text{nm}$ e b o valor do coeficiente angular da curva analítica.

3.4.4 Precisão

A ANVISA (2003) define a precisão como “avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra”. É necessário observar 3 níveis, são eles, repetibilidade, precisão intermediária e a reprodutibilidade. Para Brito *et al* (2003) [...] os parâmetros de precisão constituem a chave para o processo de validação, sendo requeridos para todos os estudos de validação de métodos”.

A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo contemplando concentrações baixas, médias e altas com 3 réplicas cada, já a precisão intermediária foi determinada realizando o experimento estabelecido em 2 dias alternados (ANVISA, 2003), com triplicadas amostrais, para se determinar a precisão intermediária e a repetibilidade foi

utilizado o Desvio Padrão Relativo (RSD) ou Coeficiente de variação calculado através da equação 3.

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3)$$

No qual s é o desvio padrão dos valores de concentrações aferidos, \bar{x} a média da concentração de cafeína na amostra considerando as triplicatas.

3.4.5 Exatidão

A ANVISA (2003) explana que a exatidão é [...] a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro”. LEITE (2008) define a exatidão como “a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro”, portanto a exatidão do método analítico pode ser compreendida sendo qual a aproximação dos valores obtidos durante o experimento e os valores fornecidos como referência. Para se determinar a exatidão do método analítico foram considerados amostras com concentrações conhecidas do analito em três níveis e em triplicatas, os percentuais de recuperação foram determinados através da equação 4

$$\%R = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

Na qual c_1 é a concentração do analito fortificado, c_2 a concentração do analito na amostra sem fortificação e c_3 a concentração do analito adicionado na amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDIÇÕES OTIMIZADAS

A Tabela 02 apresenta os valores médios de absorvância obtidos em cada ensaio.

Tabela 2 - Respostas do sinal analítico em cada ensaio de otimização.

Ensaio	Absorvância Média
1	0,029
2	0,021
3	0,032
4	0,016
5	0,035
6	0,051
7	0,042
8	0,037

A absorvância média da solução padrão na concentração de 3,0mg L⁻¹, usada nos ensaios de otimização foi de 0,018. Com isso, podem ser considerados adequados os ensaios cujas respostas foram próximas a este valor. Isto sugere valores de recuperação do analito próximo ao fortificado.

O processo de otimização metodológica para extração e determinação da cafeína apresentou como melhor combinação os ensaios 2 e 4, no qual o tempo de aquecimento foi 30 minutos, utilizando clorofórmio como solvente orgânico em meio neutro.

Isto pode ser interpretado pelo fato de que neste pH a cafeína não está protonada, diminuído a solubilidade em água e transferindo-se para o solvente orgânico na etapa de extração líquida.

4.2 ESTUDO DE VALIDAÇÃO

4.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi determinada através da inclinação de reta resposta entre a relação absorvância e concentração fortificada nas matrizes. A Figura 7 apresenta a inclinação da reta para ensaios com água destilada e sedimento. A Tabela 3 refere-se aos valores de fortificação empregados.

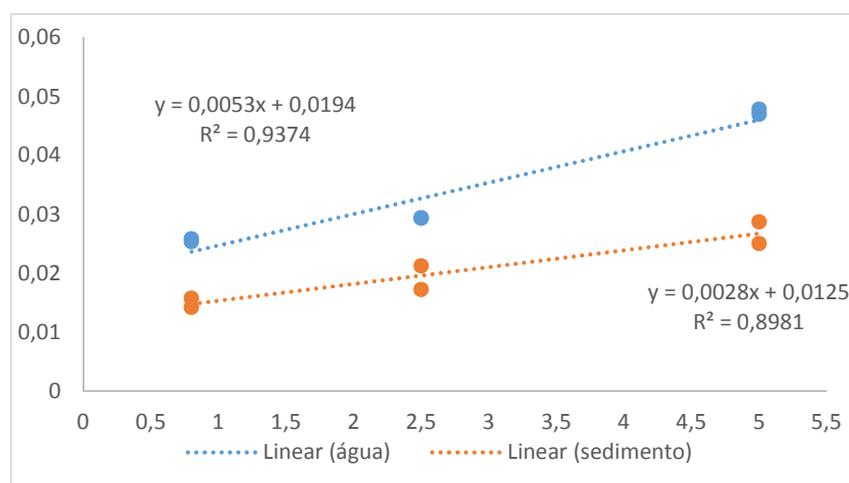


Figura 7 - Relação entre a absorvância e concentração fortificada de cafeína em amostras de efluente, sedimento e água destilada, considerando o volume amostral de 10mL e $\lambda=272\text{nm}$.

Tabela 3 - Valores de fortificação empregados e intensidade do sinal.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Água destilada (Abs)	Sedimento (Abs)
0,8	0,0254	0,01421
0,8	0,0259	0,01578
2,5	0,294	0,017252
2,5	0,295	0,021244
5	0,047	0,025038
5	0,0478	0,028728

Pode-se observar que as determinações em água possuem maiores valores de absorvância em comparação ao sedimento. Isto também pode

comparado ao se analisar as inclinações das curvas, sugerindo que o analito está mais disponível nas amostras em água.

Uma possível justificativa para este comportamento é que a cafeína apresenta maiores interações com a matriz complexa (argila, ácidos húmicos e outros compostos de cadeia longa e dotados de sítios ativos) que existem no sedimento dificultando sua extração, apesar do analito apresentar uma solubilidade significativa em água e outros solventes. O método desenvolvido é considerado seletivo para meios aquosos, necessitando de redução do efeito matriz para estudos em sedimentos.

4.2.1 Linearidade

Para a avaliação da linearidade foi realizado o estudo de regressão na curva de calibração. O sinal analítico foi obtido em espectrofotômetro PERKINELMER UV-VIS Lambda 4S, os parâmetros utilizados nos ensaios são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados no Espectrofotômetro UV-VIS.

Parâmetro	Valores
Varredura	200 a 300 nm
Velocidade	2800 nm s ⁻¹
Intervalo	1,2 nm
Comprimento (λ)	272,72nm

A curva preparada para determinação das concentrações do analito foi obtida pela plotagem das medidas de absorvância em função da concentração de cafeína. A faixa de trabalho foi composta de cinco pontos equidistantes compreendidos de 0,25 a 1,05mg.L⁻¹, A figura 8 apresenta a curva de ajuste

A validação da curva de trabalho ocorreu por procedimentos estatísticos, envolvendo a verificação do coeficiente de correlação e realização do Teste F para a regressão e para a falta de ajuste, os dados obtidos podem ser observados na Tabela 5.

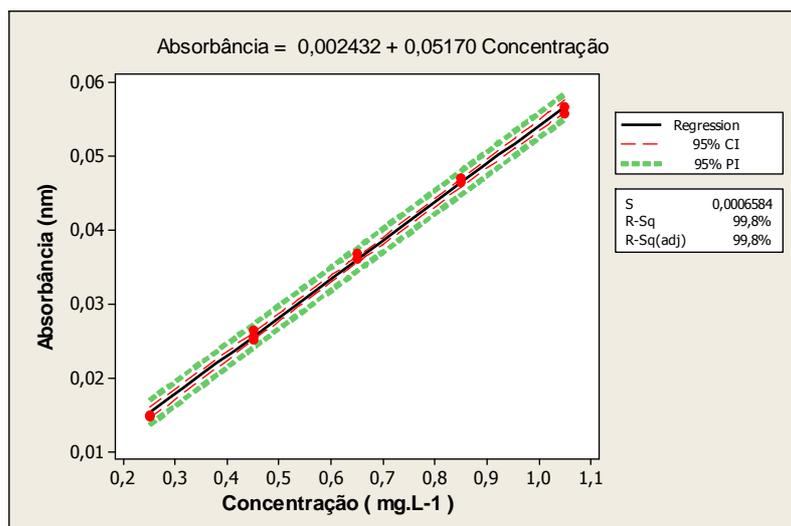


Figura 8 - Curvas de adição do padrão cafeína. CI (Intervalo de Confiança) 95%, PI (Intervalo de Predição), R-Sq (Coeficiente de Correlação Linear) e R-Sq (adj.) (Coeficiente de Correlação Linear Ajustado).

Tabela 5 - Dados da Regressão linear das curvas de adição de padrão no nível de 95% de confiança.

Dados de Regressão				
Fonte de variação	SQ	g.l	QM	F _{regressão}
Regressão	0,002235	1	0,0022352	5155,73
Resíduo	0,0000039	9	0,0000004	
Total	0,0022391	10		R²=0,98
Equação	A = 0,00243 + 0,0517[cafeína].			

Análise da Regressão					
Regressão		Falta de ajuste		r	R ²
F _{calculado}	Valor de p	F _{calculado}	Valor de P		
5155,73	0,000	1,94	0,224	0,998	99,8%
F_{Crítico} (0,05;1;10)	-	F_{crítico} (0,05;1;10)	-		
5,12	-	4,76	-		
Intercepto	0,000	-	-		
Inclinação	0,000	-	-		

A análise de regressão obteve valor r igual a 0,998 e o valor calculado para F foi superior ao tabelado aos níveis de significância de a 95% ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$) portanto o método se ajusta bem aos dados experimentais ($F_{\text{calculado}} = 5155,73 > F_{\text{crítico}} = 4,96$). O método indica que a curva possui ajuste adequado pois o $F_{\text{calculado}}$ é inferior ao $F_{\text{crítico}}$ ($F_{\text{calculado}} = 1,94 < F_{\text{crítico}} = 4,76$).

4.2.2 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pelas equações 1 e 2 utilizando as inclinações da curva e os sinais do branco.

Na Tabela 6 são expressos os valores obtidos para o método em estudo.

Tabela 6 - Valores de LD e LQ.

Limites	
LD	0,185 mg L ⁻¹
LQ	0,617 mg L ⁻¹

Os valores reportados são considerados satisfatórios (suficientemente baixos), cabe ressaltar que o procedimento é indicado para a determinação dentro do limite de detecção por considerar não apenas a capacidade do equipamento em detectar a quantidade de composto, mas todas as etapas do processo analítico, desde a extração até a detecção.

4.2.3 Precisão

Para se determinar a precisão do método foi necessário verificar a repetibilidade dos resultados. Foram realizados ensaios com concentrações fortificadas de analito previamente definidas em dias alternados.

A Tabela 7 demonstra os valores médios de repetibilidade, em uma mesmo dia, concentração (\bar{x}), desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV) para as amostras.

Tabela 7 - Valores de repetibilidade.

Amostra	\bar{x} (mg L ⁻¹)	s (mg L ⁻¹)	CV (%)
Água Destilada	3,41577	0,067532	1,977

Na Determinação da precisão intermediária foi utilizado os valores de duplicadas amostrais em água destilada em 3 dias distintos, os valores são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valor da precisão intermediária do método.

Amostra	\bar{x} (mg L ⁻¹)	s (mg L ⁻¹)	CV (%)
Água Destilada	3,173454	0,098438	3,1019

\bar{x} – média, s – desvio padrão e CV coeficiente de variação

Como pode ser observado o método possui repetibilidade e precisão intermediária abaixo de 5%, valor recomendando pela ANVISA (2003) e portanto, a determinação de cafeína pode ser considerada satisfatória.

4.2.4 Exatidão

Para determinar a exatidão do método foram realizados ensaios com as fortificações das amostras de água destilada em três níveis com concentrações diferentes. Os dados das concentrações nas amostras, as fortificações, as determinações e o percentual de recuperação podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 - Adição e recuperação de cafeína em amostras fortificadas com cafeína em água destilada,

Matriz	Cafeína*	Níveis		
		1	2	3
Água Destilada	C ₁ (mg L ⁻¹)	0,87	2,71	4,45
	C ₂ (mg L ⁻¹)	0,00	0,00	0,00
	C ₃ (mg L ⁻¹)	0,80	2,50	5,00
	R (%)	109	108	89

* C₁ a concentração do analito fortificado, C₂ a concentração do analito na amostra sem fortificação, C₃ a concentração do analito adicionado na amostra e R a percentagem de recuperação.

O percentual de recuperação corresponde ao que a AOAC (2002) determina como satisfatório, pois esta entre a faixa de 80 a 115%, portanto o método é satisfatório para as amostras de água destilada.

4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM AMOSTRAS AQUOSAS

Após a otimização e validação da metodologia para determinação de cafeína, o método foi aplicado em amostras de esgoto bruto e tratado de uma ETE assim como em amostras do corpo receptor. Foi possível detectar a presença de cafeína, no esgoto bruto, esgoto tratado e no corpo receptor. Os valores médios em miligramas por litro encontrados nas amostras estudadas podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações médias.

Amostra	Concentração de cafeína (mg L ⁻¹)
Efluente <i>in natura</i>	2,62±0,06
Efluente tratado	1,37±0,20
Corpo Receptor	0,91±0,11

Os resultados obtidos permitem verificar que o esgoto bruto, apresentou concentração de cafeína maior em comparação com os outros 2 pontos. O processo de tratamento do esgoto não é totalmente eficaz na remoção da cafeína sendo que do total que entra 52,3% do analito é eliminado com o efluente tratado diretamente no corpo hídrico onde o total detectável no corpo receptor é igual a 0,91 mg.L⁻¹ que equivale a 34,8% do total de cafeína determinada no esgoto bruto. O percentual de degradação do analito é possível pois os reatores anaeróbios são altamente recomendados para a remoção da cafeína sendo possível obter porcentagem de degradação de 47% a 96% (IDE; ARTIGAS, 2011).

Os valores encontrados em trabalhos pioneiros são inferiores aos valores de cafeína obtida no esgoto estudado, a Tabela 11 apresenta as concentrações determinadas em alguns estudos realizados em grande parte com amostras de águas superficiais de rios de porte médio e grande, nos quais ocorre a diluição das concentrações ou passam a constituir o sedimento onde a partição dessa fase com a aquosa é menor, justificando assim os valores em quantidades inferiores aos portados.

Tabela 11 - Concentração de cafeína em efluente reportadas em estudos anteriores

Referência	Local	Concentração (mg L ⁻¹)*
PESCARA <i>et al</i> (2011)	Campinas (SP)	0,18
FERREIRA (2005)	Rio de Janeiro (RJ)	0,357
GHISELLI (2006)	Campinas (SP)	0,0013
HEINTZE (2011)	São Miguel do Iguaçu (PR)	0,001**

*Valores detectados em corpos hídricos **Valor estimado em sedimentos.

A concentração de cafeína determinada no esgoto bruto coletado na calha Parshall foi igual a 2,62 mg.L⁻¹. Segundo a Tabela 11 é notável que outros autores identificaram em efluentes concentrações de cafeína muito reduzidos. Uma possível afirmativa que corrobora com tal valor é o alto consumo de produtos que contenham o composto, entre tais produtos pode-se citar o alto consumo, por questões tradicionais, da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na qual o teor de cafeína varia de 0,97 a 1,79% (BELTRAME; BRITO; COTTICA, 2009). Além das taxas serem menores por questões de hábitos alimentares outra afirmativa a respeito dos pontos de coletas. Os autores referenciados, através de suas pesquisas, obtiveram valores de cafeína em corpos hídricos em pontos distantes ao de lançamento do efluente provocando assim a diluição do analito e resultado em menor concentração. Outra questão é acerca da análise de cafeína em sedimentos, por ser um composto polar este encontra-se facilmente diluído em água, portanto a concentração de cafeína em sedimentos é menor em comparação a matrizes aquosas.

5 CONCLUSÃO

O método otimizado apresentou bons resultados em matrizes aquosas, no qual foi possível determinar a quantidade de cafeína presente nas amostras elaboradas ou coletadas em pontos estratégicos. A validação realizada, com base em elementos da estatística permitiu considerar que o método otimizado nas condições apresentadas como ideais é significativo. A metodologia é viável para extração da cafeína em matrizes aquosas apresentando um percentual de detecção significativo, porém, não é muito expressivo em sedimento, evidenciando a necessidade de desenvolver outra otimização e validação para extração do analito, uma possível explicação para que a extração não tenha sido muito eficiente é que o sedimento retém o composto o que dificulta a extração.

Através do método foi possível determinar o composto em matrizes ambientais aquosas, tais matrizes foram obtidas na estação de tratamento de esgoto de Medianeira e no corpo receptor, apresentaram um alto teor de cafeína entrada do sistema e uma redução de 50% do analito no esgoto tratado sendo possível inferir que o tratamento de esgoto realizado nesta estação por reator anaeróbio é eficiente para a remoção de 50% de cafeína. Como o sistema de tratamento não elimina por completo o analito, este é lançado no corpo receptor, Rio Alegria. Através do método proposto, foi possível determinar a presença do analito, afirmando que a cafeína pode ser considerada como um marcador de contaminação antropogênica.

REFERÊNCIAS

ALTIMARI, L. R. *et al.* **Cafeína E Performance Em Exercícios Anaeróbios.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* Vol. 42, N^o, jan./mar., 2006.

ALVES, Lariza Darlene Santos *et al.* **Desenvolvimento De Método Analítico Para Quantificação Do Efavirenz Por Espectrofotometria No UV-Vis.** *Quím. Nova*, São Paulo, v. 33, n. 9, 2010.

ANVISA. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. **Guia Para Validação De Métodos Analíticos E Bioensaios.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re899_03re.htm>. Acesso em 01/11/2014.

ARIAS, Ana Rosa Linde *et al.* **Utilização De Bioindicadores Na Avaliação De Impacto E No Monitoramento Da Contaminação De Rios E Córregos Por Agrotóxicos.** *Ciênc. saúde e Revista Ciência & Saúde Coletiva* oletiva, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, Mar. 2007.

ARIAS. A. R. L. *et al.* **Utilização De Bioindicadores Na Avaliação De Impacto E No Monitoramento Da Contaminação De Rios E Córregos Por Agrotóxicos.** *Revista Ciência & Saúde Coletiva* vol. 12 N^o 1, Jan./Mar. 2007.

BARCELÓ, D. *et al.* **Aguas Continentales – Gestion De Recursos Hídricos, Tratamiento Y Calidad Del Agua.** Consejo superior de investigaciones científicas – Informes CSIC, 2008.

BELTRAME, Jeovandro M.; BRITO, Tiago O.; COTTICA, Solange M.. **Caracterização Química e Físico-Química do Produto Erva-Mate:** Teores de Umidade, Cinzas, Cafeína, Glicose e Sacarose. Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente, UNIOESTE, Cascavel – Pr. 28 – 30 Abril de 2009.

BILA, D.M; DEZOTTI, M. **FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE.** *Química Nova*, Vol. 26, N^o 4, 523-530, 2003.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. **Fármacos No Meio Ambiente. Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, Agos. 2003.

BRITO, Natilene Mesquita; JUNIOR, Ozelito Possidônio de Amarante; POLESE, Luciana; RIBEIRO, Maria Lúcia. **Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. Revista Ecotoxicol e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129, Jan./Dez. 2003.

CLEMENTE, Ainhoa Rubio; CHICA ARRIETA, Edwin Lenin; PENUELA MESA, Gustavo Antonio. **Procesos De Tratamiento De Aguas Residuales Para La Eliminación De Contaminantes Orgánicos Emergentes. Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v. 8, n. 3, Dec. 2013.

COSTA JUNIOR, I.L.; PLETSCH, A.L.; TORRES, Y.R. **Ocorrência de Fármacos Antidepressivos no Meio Ambiente – Revisão. Rev. Virtual Quim.**, 2014 edi. 6. Publicação 15/09/2014.

DIAS, Ayres Guimarães; COSTA, Marco Antonio da; GUMARÃES, Pedro Ivo Canesso. **Guia Prático de Química Orgânica**. Editora interciência, Rio de Janeiro – 2004.

DURIGAN, Marco A. Benedetti; VAZ, Sergio Renato; PERALTA-ZAMORA, Patricio. **Degradação De Poluentes Emergentes Por Processos Fenton E Foto-Fenton. Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 7, 2012.

FERREIRA, Aldo Pacheco. **Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro v. 21, n. 6, Dec. 2005.

FREIRE, Maria Teresa de Alvarenga *et al.* **Contaminantes Voláteis Provenientes De Embalagens Plásticas: Desenvolvimento E Validação De Métodos Analíticos. Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, 2008.

GAFFNEY, Vanessa de Jesus et al. **Análise De Fármacos Em Águas Por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, 2014.

GALO, André Luiz; COLOMBO, Márcio Francisco. **Espectrofotometria De Longo Caminho Óptico Em Espectrofotômetro De Duplo-Feixe Convencional: Uma Alternativa Simples Para Investigações De Amostras Com Densidade Óptica Muito Baixa.** *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, n. 2, 2009.

GAMA,H. **Drug utilization studies.** *Arquivos de Medicina Scielo Portugal*, 2008.

GHISELLI, G. **Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas: Ocorrência e Determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP).** Campinas, 2006. 181 f. Tese de Doutorado em Química Analítica. Universidade de Campinas.

GODOI. I. *et al.* **Indicadores microbiológicos da água e solo.** Artigo. *Anais Universidade Estadual do Oeste do Paraná.*

GOMES, P. C. F. L. **Desenvolvimento E Aplicação De Técnicas Miniaturizadas De Preparo De Amostras Na Determinação De Fármacos No Ambiente.** Trabalho de Conclusão de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2012.

GOSSETT, R. W.; BROWN, D. A.; YOUNG, D. R. **Predicting The Bioaccumulation Of Organic Com-Pounds In Marine Organisms Using Octanol/Water Partition Coefficients.** *Marine Pollution Bulletin.* v. 14, p. 387—392, 1983.

HEINTZE, Carla Regina. **Detecção e Quantificação de Cafeína e Tetraciclinas em Sedimentos do Rio Ocoy, tributário do Lago de Itaipu – Município de São Miguel do Iguçu, PR.** Programa Institucional De Iniciação Científica – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira, Agosto de 2011.

IDE, A. H.; ARTIGAS, A. V. **Utilização da cafeína como traçador da atividade antrópica na Bacia do Alto Iguçu.** Trabalho de conclusão de curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2011.

IDE, Alessandra H., CARDOSO, Fernanda D.; SANTOS, Mauricius M. dos; MACHADO, Karina S.; AZEVEDO, Júlio César R. de. **Determinação da Concentração de Cafeína no Rio Atuba, PR.** 34º Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Química, 23 a 26 de Maio de 2011. Florianópolis – SC.

IDE, Alessandra Honjo; CARDOSO, Fernanda Dittmar; SANTOS, Mauricius Marques dos; AZEVEDO, Júlio César Rodrigues de. **Eficiência de Remoção de Cafeína por uma Estação de Tratamento de Esgotos com Sistemas Anaeróbios.** XIX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. 27 a 01 de Dezembro de 2011.

IKAN, R.; **Natural Products: A Laboratory Guide,** Harcourt Brace Jovanovich Publishers: New York, 1991, p. 226.

LEITE, Flávio. **Validação em Análise Química.** Editora Átomo, 2008. Pg.175. Campinas – SP.

MARIA, C. A. B; MOREIRA, R. F. A. **CAFEÍNA: REVISÃO SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISE.** *Química Nova.* Vol. 30, N° 1, 99-105, 2007.

MARQUES, Jacqueline Aparecida; BORGES, Christiane Philippini Ferreira. **Práticas de Química Orgânica.** Editora Átomo, Campinas, São Paulo - 2007.

MORENO, R. A. *et al* **Psicofarmacologia De Antidepressivos.** *Revista Brasileira de psiquiatria.* Vol. 21 – Maio de 1999.

PELLER, K. A.; OPSAHL, S. P.; CHANTON, J. P. **Tracking anthropogenic inputs using caffeine, indicator bacteria, and nutrients in rural freshwa-ter and urban marine systems.** *Environmental Science & Technology*, v. 40, n. 24, p. 7616-22, 2006.

PEREIRA, Aline; SCHESHOWITSCH, Karin; CRUZ, Ariane; SILVA, Marcos Antonio Segatto; STULZER, Hellen Karina. **Validação de Metodologia Analítica para Quantificação de Piroxicam em Cápsulas de Gelatina por Espectrofotometria Ultravioleta (UV).** *Visão Acadêmica*, V.8, n.2, Jul. – Dez./2007. Curitiba – Pr.

PESCARA, Igor C; JARDIM, Wilsin F. **Remoção de Cafeína em Estações de Água e Esgoto**. 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23 a 26 de Maio de 2011. Florianópolis – SC.

RAIMUNDO, Cassiana Carolina Montagner. **Ocorrência De Interferentes Endócrinos E Produtos Farmacêuticos Nas Águas Superficiais Da Bacia Do Rio Atibaia**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas – 2007.

REIS FILHO, R. W; LUVIZZOTO-SANTOS, R; VIEIRA, E.M. **Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos**. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, V. 2, n.3, 2007.

RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima *et al.* **Planilha De Validação: Uma Nova Ferramenta Para Estimar Figuras De Mérito Na Validação De Métodos Analíticos Univariados**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 31, n. 1, 2008.

SAMPAIO, N.M.F.M. *et al.* **Determinação de Cafeína em Águas da Bacia do Alto Iguaçu**. *XVII SICITE, Curitiba – PR, 2012*.

SCHOLTEN, Cláudia. **Dinâmica Temporal da Poluição Fecal nas Águas do Córrego Rico, Manancial de Abastecimento da Cidade de Jaboticabal – SP**. Tese de Mestrado, Unesp, São Paulo – 2009.

SEBBEN, Viviane Cristina *et al.* **Validação De Metodologia Analítica E Estudo De Estabilidade Para Quantificação Sérica De Paracetamol**. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 46, n. 2, Apr. 2010.

SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; COLLINS, Carol H. **Aplicações De Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Para O Estudo De Poluentes Orgânicos Emergentes**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 34, n. 4, 2011.

SINCLAIR, C.J.D.; GEIGER, J.D. **Caffeine Use In Sports. A Pharmacological Review**. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, v.40, n.1, p.71-79, 2000.

Soares, B.G; Souza, N.A; Pires, D.X- **Química Orgânica**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 1988, pg. 62 a 65, 75 e 76.

SOUZA, Rita Adriana Gomes de; SICHIERI, Rosely. **Consumo De Cafeína E Prematuridade**. *Rev. Nutrição*, Campinas, v. 18, n. 5, Out. 2005.

TAVARES, C; SAKATA, R. K. **Cafeína Para Tratamento De Dor**. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. Vol. 62 N°3 Mai./Jun., 2012.

VALENTINI, Sóstenes Rosa. **Atributos da Validação da Metodologia Analítica do Captopril num Programa de Garantia de Qualidade**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. Florianópolis – SC.

VALENTINI, Sóstenes Rosa; SOMMER, Willy Arno; MATIOLI, Graciette. **Validação de Métodos Analíticos**. *Arq. Mundi*. 2007; 11 (2): 26 – 31. Maringá – Pr.