

Extração líquido-líquido assistida por salting out da cafeína em amostras urina por cromatografia a gás**Liquid-liquid extraction assisted by salting out of caffeine in urine samples by gas chromatography**

DOI:10.34117/bjdv6n7-332

Recebimento dos originais: 10/06/2020

Aceitação para publicação: 14/07/2020

Leandro Oka Duarte

Mestrando no Programa de Pós-Graduação da USP - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Instituição: USP - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras

Endereço: Departamento de Química. Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre

CEP: 14040-901, Ribeirão Preto - SP

E-mail: leandro.oka@usp.br

Karla da Silva Malaquias

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal de São Carlos

Instituição: Universidade Federal de Jataí - Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas

Endereço: Campus Jatobá, BR 364, Km 195, CEP: 75801-615, Jataí-GO, Brasil

E-mail: ksmalaquias@ufg.br

RESUMO

A cafeína é um composto alcaloide com efeito estimulante semelhante a outras drogas psicoativas como a cocaína e as anfetaminas. A proposta deste trabalho foi desenvolver um método por GC-MS para detecção de cafeína em amostras de urina, por meio da extração líquido-líquido assistida por salting out (SALLE). A determinação foi realizada em coluna OPTIMA-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) programada por meio de duas rampas de temperatura, entre 130 e 170 °C (10°C min⁻¹) e entre 170 e 250 °C (20°C min⁻¹). O método apresentou linearidade na faixa de 5,0 a 60 µg/mL ($r^2 > 0,99$) e limites de detecção e quantificação de 3,31 e 5,00 µg/mL, respectivamente, com valores de precisão ($CV \leq 10,5 \%$) e exatidão ($-5,57 \% < DPR < 3,56 \%$) dentro dos requisitos exigidos. O método foi aplicado com sucesso em 06 amostras reais de urina, o que demonstra a potencialidade desta metodologia.

Palavras-chave: Cafeína, Urina, Extração líquido-líquido**ABSTRACT**

The caffeine is a alkaloid with stimulant effects likewise another psychoactive drugs as cocaine and amphetamines. The proposal this paper was to develop a GC-MS method to detect caffeine from urine samples, by salting out assisted liquid-liquid extraction. The determination was carried out in a OPTIMA-5 (5 % phenyl, 95 % dimethylpolisiloxane) column, programmed in two temperature ramps, between 130 - 170 °C (10°C min⁻¹) and 170 - 250 °C (20°C min⁻¹). The method exhibited linearity in the range 5,0 - 60 µg/mL ($r^2 > 0,99$) and limits of detection and quantification of 3,31 and 5,00 µg/mL, respectively, with precision ($CV \leq 10,5 \%$) and accuracy ($-5,57 \% < DPR < 3,56 \%$) according to required. The method was sucessfully applied in six real urine samples, which demonstrates the potentiality of this methodology.

Keywords: Caffeine; Urine; Liquid-liquid extraction

1 INTRODUÇÃO

A cafeína é um composto alcaloide derivado de diversas espécies de plantas. Apesar de ser relacionada principalmente às espécies de cafeeiro (*Coffea arabica*), também se consideram fontes primária desta substância a noz-de-cola (*Cola acuminata*), chá-da-índia (*Thea sinensis*) e o cacau (*Cocoa bean*).¹⁻² É uma das substâncias mais consumidas a nível mundial, estando presente em quantidades variadas em diversos alimentos e bebidas, como no café, cacau, refrigerantes, chás, energéticos, além dos medicamentos e suplementos alimentares.¹⁻⁴

Devido seu efeito estimulante, suas propriedades farmacológicas se mostram semelhantes a outras drogas que se enquadram nessa categoria, como é o caso da cocaína e das anfetaminas, cujos efeitos incluem euforia, melhora no estado de alerta e efeitos de reforço (ergogênico).⁵ Devido essas características e sua rápida metabolização no corpo humano, esteve presente na lista de compostos proibidos pela *World Anti-doping Agency* (WADA) e cujo limite de concentração urinária era de 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após 2004, decidiram removê-la da lista.⁶

Assim como as substâncias consideradas proscritas, seu consumo em quantidades excessivas pode causar efeitos colaterais no organismo, como insônia, tremores, dores de cabeça, taquicardia e problemas digestivos.⁷⁻⁸ Ademais, no âmbito forense, a cafeína é comumente empregada como adulterante para potencializar os efeitos da droga principal e/ou como diluente para dar volume e lucro ao vendedor.⁹ Desta forma, seja em casos de intoxicação, efeitos adversos ou como componente secundário em amostras apreendidas e formulações farmacêuticas, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas que sejam capazes de determinar (detectar e quantificar) tais substâncias em amostras complexas de forma que, por meio dessas, seja possível obter informações o suficiente para fornecer pareceres com alta confiabilidade.

Diversas metodologias instrumentais já foram reportadas na literatura para a cafeína, e incluem principalmente as técnicas cromatográficas¹⁰⁻¹⁵, acopladas a diversos detectores, como o Massas (MS) e arranjo por diodos (DAD). Outras técnicas incluem espectroscopia de infravermelho, ultravioleta, eletroforese capilar e técnicas eletroanalíticas.¹⁶

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PADRÃO E SOLVENTES

Os padrões analíticos de cafeína e acetanilida foram obtidos de uma Farmácia de manipulação e da Vetec (Duque de Caxias, SP, BRA), respectivamente. O solvente acetato de etila grau HPLC foi obtido da Vetec para o preparo das soluções analíticas. Outros reagentes e solventes foram obtidos dos seguintes fornecedores: clorofórmio da Dinâmica (Indaiatuba, SP, BRA), sulfato de amônio e hidróxido de sódio da Synth (Diadema, SP, BRA).

2.2 AMOSTRAS DE URINA

Amostras de urina controle e positivas foram obtidas de voluntários que não fizeram uso de qualquer alimento contendo cafeína nas últimas nove horas e que consumiram a substância sob investigação no mesmo prazo especificado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG), sob o Parecer 54.2016.

2.3 INSTRUMENTAÇÃO

Cromatógrafo a Gás da Perkin Elmer Clarus 580 equipado com injetor split/splitless (Waltham, MA, USA) acoplado ao detector por Espectrometria de Massas Perkin Elmer Clarus SQ8 S (Waltham, MA, USA) foi empregado para a análise quantitativa. A separação cromatográfica foi realizada através de uma coluna capilar OPTIMA-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 μm ; Düren, NW, DEU). Hélio foi empregado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL min^{-1} .

2.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Soluções estoque de cafeína e acetanilida, ambas a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram preparadas pela dissolução de 10 mg dos padrões em 50 mL de acetato de etila. As soluções para confecção da curva analítica foram preparadas em balões volumétricos (10 mL) pela diluição de volumes apropriados das soluções estoque para obter concentrações de 5, 10, 20, 50 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cafeína e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do padrão interno. Todo procedimento foi realizado em triplicata.

2.5 PREPARO DAS AMOSTRAS E METODOLOGIA SALLE

Para cada alíquota de 2,0 mL das amostras de urina, adicionou-se 250 mg de sulfato de amônio e quantidade suficiente de hidróxido de sódio na concentração de 5,0 mol L^{-1} para alcançar pH; seguido de centrifugação a 4000 rpm durante 20 min. A camada superior foi transferida para um funil de separação e extraída por três vezes com 5,0 mL de clorofórmio. A fase orgânica foi então evaporada e o resíduo reconstituído em 750 μL de acetato de etila e 250 μL de padrão interno 200 mg mL^{-1} . O método extrativo foi baseado no trabalho de Garcia e colaboradores, com modificações.¹⁷

2.6 MÉTODO CROMATOGRÁFICO GC-MS

O volume de injeção de 1 μL foi na razão split de 1:20. A temperatura do injetor e interface GC-MS foram ambas de 250 °C. A temperatura inicial do forno foi de 130 °C seguido de aquecimento a uma taxa de 10 °C min^{-1} até 170 °C, com posterior aquecimento a 20 °C min^{-1} até temperatura final de 250 °C. O modo de ionização por elétrons a 70 eV foi usado para o detector, a uma temperatura

de 250 °C. A quantificação foi realizada através do modo de monitoramento de íons (SIR) para os íons de razão m/z 93 (acetanilida, padrão interno) e 194 (cafeína). O espectro de massas obtido pelo modo FullScan foi medido no intervalo entre 40 e 400 unidades de massa atômica (u.m.a.).

2.7 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE, SELETIVIDADE E SENSIBILIDADE

As figuras de mérito avaliadas neste trabalho foram baseadas no guia de validação descrito na Resolução Nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ¹⁸. A seletividade foi obtida comparando os cromatogramas obtidos das soluções padrão de cafeína e acetanilida com aquelas provenientes das amostras negativas de urina, por meio da detecção de ou não de possíveis interferentes provenientes da matriz biológica.

A linearidade do método foi avaliada através da construção da curva analítica a partir de quinze soluções de acetato de etila nas concentrações de 5, 10, 20, 50 e 60 $\mu\text{g/mL}$ (triplicatas). A razão entre as áreas cromatográficas do analito e do padrão interno, $(A_{CAF}/A_{PI}) = y$, foram medidas e plotadas em função da razão das concentrações entre o analito e o padrão interno, $(C_{CAF}/C_{PI}) = x$, para gerar a equação da reta.

A sensibilidade foi determinada através dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Definiu-se o LD através do cálculo $3,3 \cdot \sigma/IC$, onde IC é a inclinação da curva e σ o desvio padrão do coeficiente linear, e o LQ como sendo o primeiro nível da curva analítica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através de metodologias encontradas na base de dados de diversos periódicos acerca da quantificação de drogas, como o de Magalhães ¹⁹, otimizou-se o método por meio da avaliação prévia de variáveis como pH da amostra biológica, método de extração, temperatura do forno do CG e modo de aquisição do espectro de massas.

3.1 EFEITO SALTING OUT

Um problema comum quando se trabalha com a extração líquido-líquido convencional em matrizes biológicas é a baixa recuperação do analito devido a presença de compostos exógenos (e.g., proteínas) presentes na amostra, que podem vir a interagir de forma significativa com o analito. Outra dificuldade associada é a relativa solubilidade no meio aquoso, o que compromete sua extração por solventes orgânicos apolares e imiscíveis (éter, diclorometano, clorofórmio), comumente empregados pela técnica. ²⁰

Sabe-se que, entre os vários efeitos promovidos pelo fenômeno salting out, a adição de sais inorgânicos em sistemas biológicos também favorece a precipitação de proteínas, aumentando a

eficiência de extração²¹⁻²³. Essa observação pode ser explicada pela maior afinidade entre os íons provenientes do sal com as moléculas de água, que passam a hidrata-los. Com o aumento da concentração do sal (força iônica), as proteínas deixam de ser solvatadas e sua solubilidade diminui drasticamente, o que resulta na sua precipitação.

Dentre os sais empregados na técnica SALLE, o sulfato de amônio tem sido empregado por apresentar vantagens como a alta solubilidade no meio aquoso e por seus efeitos favorecerem a diminuição da solubilidade proteica, favorecendo o particionamento do analito da fase aquosa para a fase orgânica.²³⁻²⁴

3.2 EFEITO DO PH SOBRE A AMOSTRA BIOLÓGICA

A cafeína é uma base relativamente fraca ($pK_a = 10,0$) e, em sua forma neutra, solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio, acetato de etila e éter etílico. No entanto, em meio ácido ($pH < 8$), sua forma catiônica predomina e desta forma sua solubilidade no meio aquoso aumenta. Como o pH ótimo da urina varia entre 5,5-7,0, levemente ácida, fez-se necessário a adição de hidróxido de sódio para basificar a solução e então neutralizar o analito. Esse processo permitiu que a cafeína pudesse ser extraída através do funil de separação através do clorofórmio.

3.3 EFEITO DA TEMPERATURA DO SISTEMA GC-MS

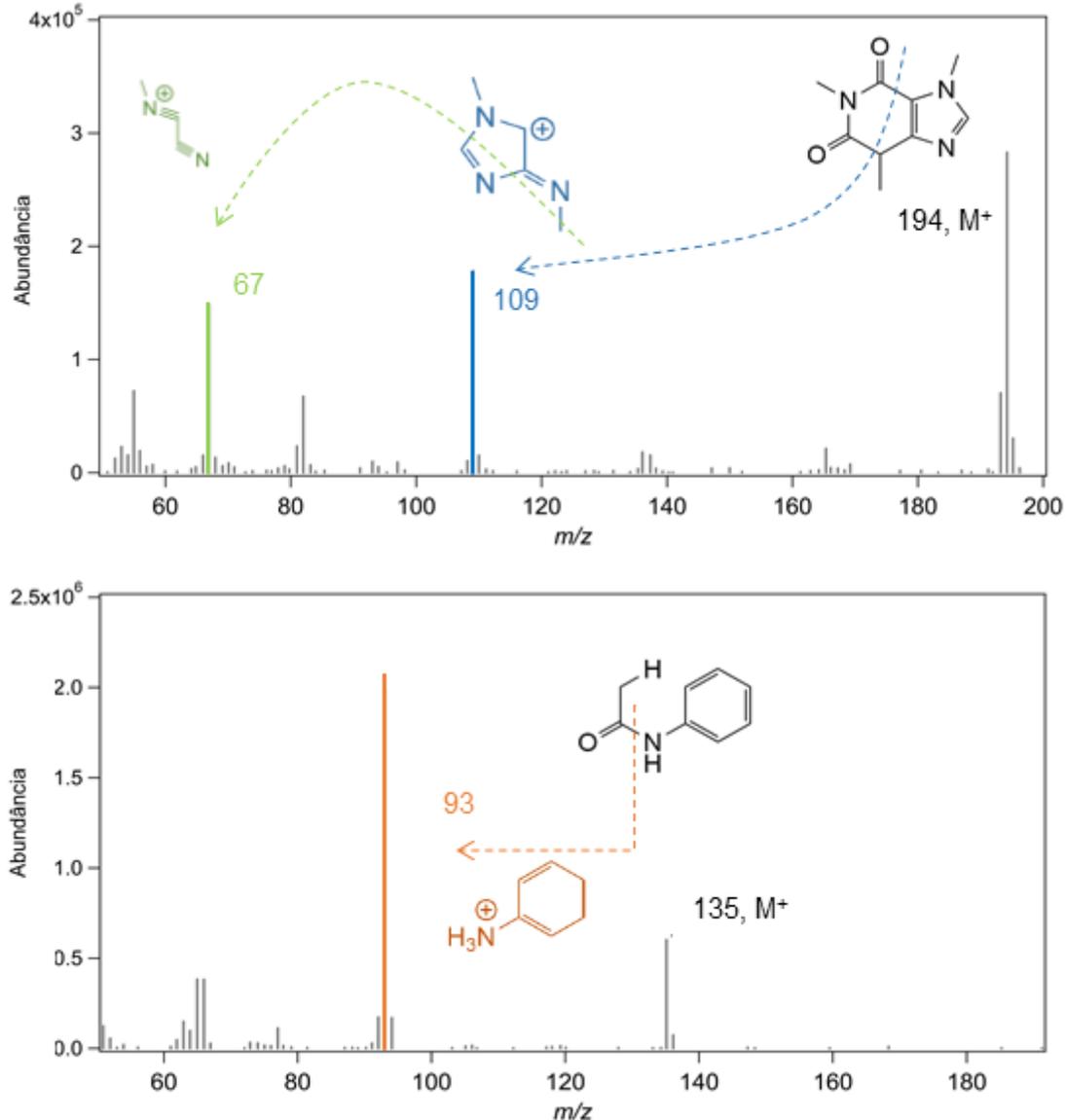
A corrida cromatográfica foi otimizada para um tempo total de oito minutos, sendo três minutos para o atraso do solvente. Recomenda-se que a temperatura do injetor esteja pelo menos a 50 °C acima do ponto de ebulição do analito. Como esta temperatura é de 178 °C para a cafeína, utilizou-se a temperatura de 250 °C para o sistema de injeção. A resolução dos Cromatogramas não teve resultados significativos para temperaturas mais elevadas. A temperatura da fonte iônica e da interface foram configuradas para o valor igual à do injetor, evitando problemas de condensação que podem vir a acontecer se a temperatura desses parâmetros for menor do que a do injetor.

3.4 MODO DE AQUISIÇÃO DO DETECTOR

O espectrômetro de massa geralmente é ajustado para realizar uma varredura dos íons fragmentos em intervalo pré-especificado de razão m/z . Essa varredura em unidades de massa atômica pode ser ampla, como na análise FullScan, ou pode ser específica, como no monitoramento de íons (Modo SIR) empregado neste trabalho. O espectro SIR é um gráfico que detecta somente compostos com a massa selecionada e, portanto, apresenta maior capacidade de detecção. A Figura 1 mostra os espectrogramas de massa experimentais do analito (cafeína) e padrão interno (acetanilida)

com seus íons e m/z característicos, obtidos pelo modo Full Scan. Através deste foram escolhidos os íons base (m/z 93 e 194) para o parâmetro de aquisição SIR das análises posteriores.

Figura 1. Espectrograma obtido para a cafeína e acetanilida (PI) no modo FullScan de aquisição. O íon base para a cafeína é o íon fragmento de m/z 109 e para a acetanilida, íon molecular de m/z 135.



Os espectros estabelecidos para a cafeína e acetanilida foram comparados com dados de referência da biblioteca mantida pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) disponibilizada pelo próprio software do equipamento. É interessante notar que o íon de maior abundância para a cafeína é o próprio íon molecular, enquanto que para o PI, é o íon fragmento.

3.5 LINEARIDADE, SELETIVIDADE E SENSIBILIDADE

Nenhum interferente proveniente da amostra de urina foi observado pela coeluição no mesmo tempo de retenção da cafeína e padrão interno, demonstrando a seletividade do método.

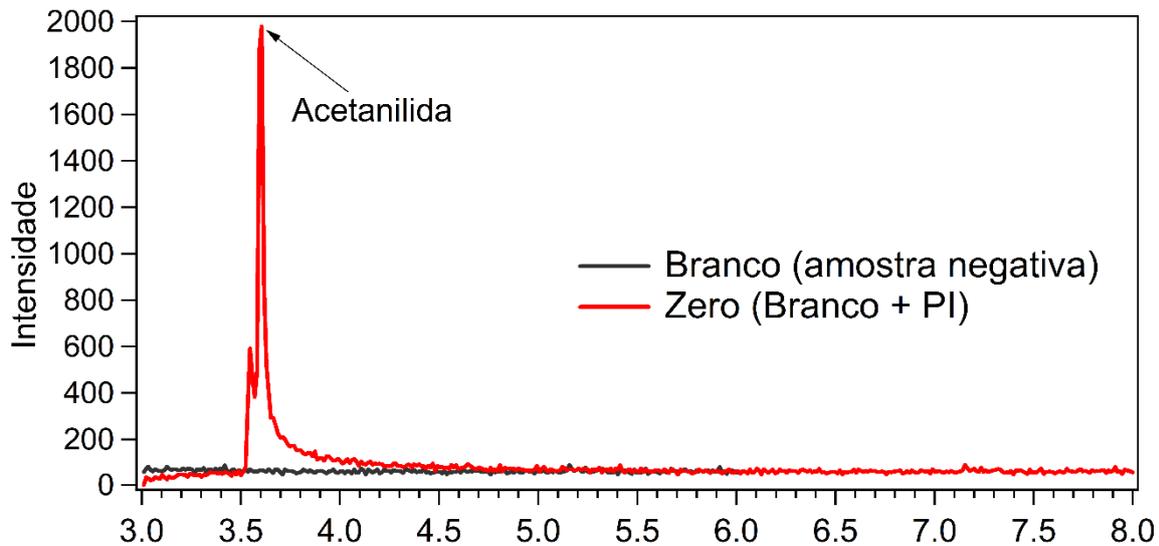
A quantificação foi realizada através do método de padronização interna devido esse corrigir os erros provenientes da injeção manual. Um PI adequado ao método foi a acetanilida, por possuir semelhança de fragmentação com o analito submetido à investigação. Ressalta-se que, embora o padrão apresente dois picos no cromatograma, se devem à degradação do PI em acetato e anilina. No entanto, não ocorre a interferência desse processo no método uma vez que a área de ambos foi somada e usada para o cálculo.

A linearidade, determinada através da curva analítica pelo método dos mínimos quadrados a partir dos dados experimentais para a curva, apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,9970 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,9940, com uma equação de reta representada pela equação $y = 0,413x - 0,0261$. Com os dados brutos, verificou-se a presença de *outliers* pelo teste de Huber e os resultados demonstraram precisão e exatidão de 0,64 e 0,50 % para o limite inferior de quantificação e valores de precisão e exatidão menor ou igual a 10,5 e entre -5,57 e 3,56 % para os outros níveis. Os dados estão de acordo com os requisitos. Os limites de detecção e inferior de quantificação, determinado através da curva analítica, foram $3,31 \pm 0,33$ e $5,0 \mu\text{g/mL}$.

3.6 AMOSTRAS REAIS

Após otimização do método GC-MS, 06 (seis) amostras obtidas de voluntários, sendo 01 (um) negativa e 05 positivas, foram avaliadas pelo método de extração citado na seção 2.5. O cromatograma para a amostra negativa (branco) e amostra zero (branco + PI) estão representadas na Figura 2. A partir deste é possível observar a seletividade do método pela não aparecimento de nenhum componente exógeno da matriz.

Figura 2. Cromatogramas da amostra branco e zero (branco + PI). Não se observa interferência de componentes da matriz biológica.



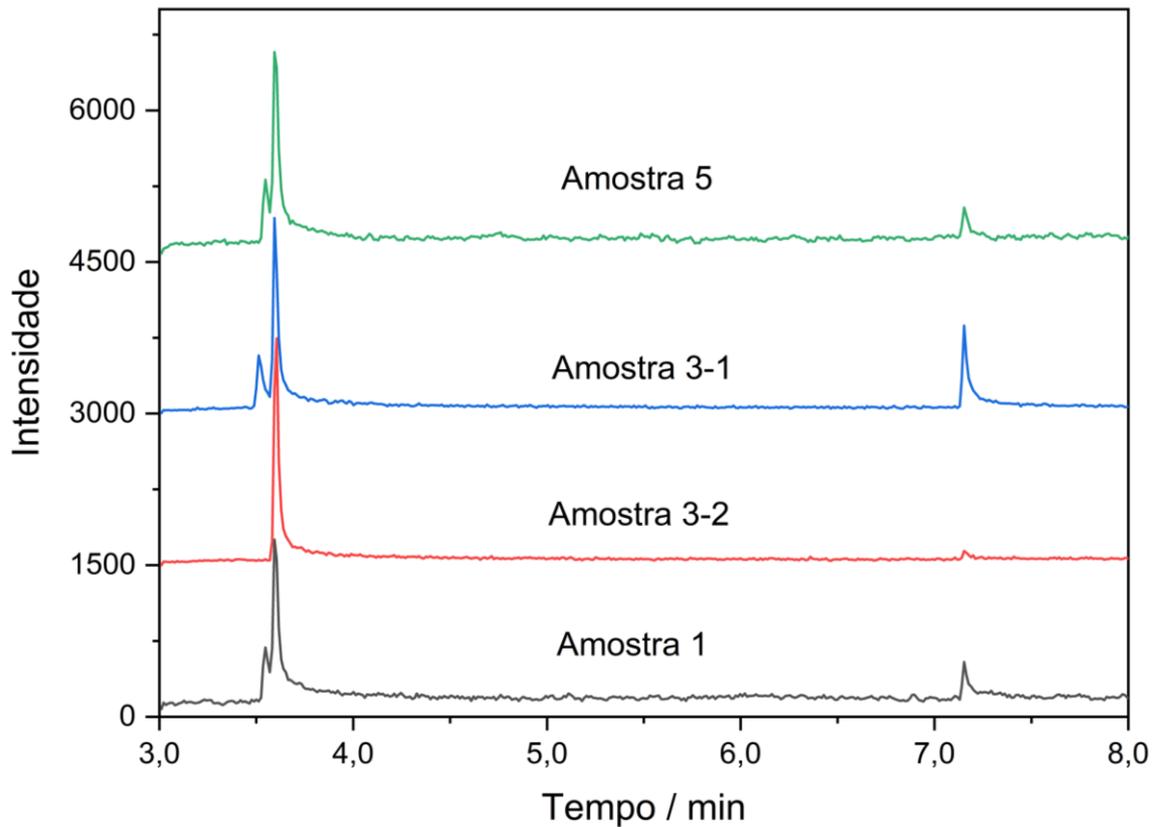
A Figura 3, por sua vez, demonstra o perfil cromatográfico das amostras de urina positivas para o analito. A identificação foi confirmada pelo tempo de retenção e pelos íons monitorados. As amostras coletadas dos voluntários foram selecionadas a partir de pessoas que relataram uso constante ou possibilidade de ingerir a bebida contendo cafeína antes de nove horas da coleta.

Das cinco amostras de urina (Tabela 1), uma não foi possível detectar o analito e outras três apresentaram valores de concentração abaixo do limite de detecção. Apenas a primeira amostra do voluntário permitiu, a nível de 5% de significância, confirmar as quantidades detectadas. Segundo Sawynok e Yaksh ²⁵, a cafeína na urina é totalmente eliminada na urina em até 9,0 horas, e a concentração da mesma é de apenas 5,0% na matriz. Ademais, essa diferença entre as amostras se deve ao metabolismo de cada voluntário que pode diferir significativamente na velocidade de degradação do analito.

Tabela 1. Valores de cafeína detectados nas amostras de urina submetidas ao método de análise por GC-MS

Amostra	Valor detectado (µg/mL)	Tempo da coleta após ingestão da bebida (h)	Bebida consumida
A1	< LD (0,71)	7	Energético
A3-1	3,86	4	Energético/Café
A3-2	< LD (0,23)	9	Energético/Café
A4	N.D.	3	Energético
A5 ^v	< LD (1,31)	5	Café

Figura 3. Perfil representativo dos cromatogramas GC-MS para amostras reais de urina.



4 CONCLUSÃO

O emprego da técnica de extração líquido-líquido assistida por salting out acoplada a metodologia GC-MS para extração e determinação de cafeína mostrou-se adequada. Apesar dos limites de detecção apresentarem valores razoavelmente altos, a proposta foi aplicada com sucesso nas amostras reais de urina obtidas de voluntários em curto tempo de corrida cromatográfica (8 min).

REFERÊNCIAS

- ¹ Patay, E. B.; Fritea, L.; Antonescu, A.; Antonescu, A.; Dobjanschi, L. Em *The Question of Caffeine*; Latosinska, J. N.; Latosinska, M., eds.; IntechOpen: London, 2017, cap. 2. [CrossRef]
- ² Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. *Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations*. National Academies Press: Washington (DC), 2001. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Cappelletti, S.; Daria, P.; Sani, G.; Aromatario, M. Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? *Current Neuropharmacology* 2015, 13, 71. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Nehlig, A. Effects of coffee/caffeine on brain health and disease: What should I tell my patients? *Practical Neurology* 2015, 16, 89. [CrossRef]

Ferré, S. Caffeine and Substance Use Disorders. *Journal of Caffeine Research* 2013, 3, 57. [CrossRef] [PubMed]

⁵ Ferré, S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010, 20, S35. [CrossRef] [PubMed]

⁶ Aguilar-Navarro, M.; Muñoz, G.; Salinero, J. J.; Muñoz-Guerra, J.; Fernández-Álvarez, M.; Plata, M. M.; Del Coso, J. Urine Caffeine Concentration in Doping Control Samples from 2004 to 2015. *Nutrients* 2019, 11, 286. [CrossRef] [PubMed]

⁷ Willson, C. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports* 2018, 5, 1140. [CrossRef] [PubMed]

⁸ Temple, J. L.; Bernard, C.; Lipshultz, S. T.; Czachor, J. D.; Westphal, J. A.; Mestre, M. A. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Frontiers in Psychiatry* 2017, 8, 80. [CrossRef] [PubMed]

⁹ Maldaner, A. O.; Botelho, E. D. Em *Fundamentos de Química Forense: Uma análise prática da química que soluciona crimes*; Bruni, A. T.; Velho, J. A.; Oliveira, M. F., eds.; Millennium:Campinas, 2018, cap. 3.

¹⁰ Takayama, M.; Water, B.; Hara, K.; Kashwagi, M.; Matsusue, A.; Ikematsu, N.; Kubo, S. I. An autopsy case of caffeine intoxication related by energy drink. *Japanese Journal of Alcohol Studies & Drug* 2016, 51, 228. [PubMed]

¹¹ Lizot, L. F.; da Silva, L. L.; Spaniol, B. S.; Antunes, M. V.; Linden, R.; Lanaro, R. Determinação rápida de fármacos básicos em plasma por cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo. *Química Nova* 2012, 35, 1222. [CrossRef]

¹² Lima, I. M.; Frota, M. N. O enfoque da metrologia química em análises toxicológicas na atividade turfística: Validação de método analítico para determinação de cafeína em matrizes biológicas. *Química Nova* 2007, 30, 1820. [CrossRef]

¹³ Ponce-Rodríguez, H. D.; García-Robles, A. A.; Sáenz-González, P.; Verdú-Andrés, J.; Campíns-Falcó, P. On-line in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography-diode array detection for the analysis of caffeine and its metabolites in small amounts of biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2019, 178, 112914 [CrossRef]

¹⁴ Grapp, M.; Maurer, H. H.; Desel, H. Systematic forensic toxicological analysis by GC-MS in serum using automated mass spectral deconvolution and identification system. *Drug Testing and Analysis* 2015, 8, 816 [CrossRef]

¹⁵ Clausen, D. N.; Oliveira, M. F.; Casarin, J.; Sartori, E. R.; Tarley, C. R. T. Desenvolvimento de Método por CLAE para Quantificação de Orfenadrina, Paracetamol e Cafeína em Formulações Farmacêuticas. *Revista Virtual de Química* 2015, 7, 2066. [CrossRef]

¹⁶ De Marla, C. A. B.; Moreira, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre Métodos de Análise. *Química Nova* 2007, 30, 99. [CrossRef]

- ¹⁷ Garcia, P. R.; Yonamine, M.; Moreau, R. L. M. Determinação de efedrinas em urina por cromatografia em fase gasosa (CG/DNP) para o controle da dopagem no esporte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2005, 41, 351. [CrossRef]
- ¹⁸ Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RDC N° 166/17. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de julho de 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 25 outubro 2019.
- ¹⁹ Magalhães, E. J.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. [Link]
- ²⁰ Majors, R. E. Salting-out liquid-liquid extraction (SALLE). *LCGC North America* 2009, 27, 526. [Link]
- ²¹ Hyde, A. M.; Zultanski, S. L.; Waldman, J. H.; Zhong, Y-L.; Shevlin, M.; Peng, F. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Organic Process Research & Development* 2017, 21, 1355. [CrossRef]
- ²² Salis, A.; Ninham, B. W. Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. *Chemical Society Reviews* 2014, 43 (21), 7358. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Chaplin, M. *Hofmeister Series*. Disponível em: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/hofmeister_series.html>. Acesso em: 30 outubro 2019.
- ²⁴ Alshishani, A. A.; Saad, B.; Semail, N. F.; Salhimi, S. M.; Talib, M. K. M. Salting-out assisted liquid-liquid extraction method coupled to gas chromatography for the simultaneous determination of thujones and pulegone in beverages. *International Journal of Food Properties* 2017, 20, S2776. [CrossRef]
- ²⁵ Sawynok, J.; Yaksh, T. L.; Caffeine as na analgesic adjuvant: Review of Pharmacology and Mechanisms of Action. *Pharmacological Reviews* 1993, 45, 43. [PubMed]