

PRÁTICA 2

ANÁLISE DE CAFEÍNA EM ALIMENTOS

OBJETIVO: Identificação e quantificação de cafeína em bebidas.

INTRODUÇÃO TEÓRICA^[1]

A **cafeína** (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide do grupo das xantinas apresentando-se na forma de um pó branco, caracterizando-se por ser extremamente solúvel em água quente, não ter cheiro e apresentar sabor amargo. É encontrada em uma grande quantidade de alimentos, tais como: o chá-mate (*Ilex paraguariensis*), café (*Coffea arábica*), cacau (*Theobroma cacao*), cola (*Cola acuminata*) e guaraná (*Paulinia cupana*), geralmente consumida como estimulante. A cafeína também é constituinte de diversos remédios do tipo analgésico, medicamentos contra a gripe e inibidores de apetite, fazendo com que seja um dos alcalóides com atividade biológica mais ingeridos no mundo.

Com relação à quantidade de cafeína, uma xícara média de café expresso contém, em média, de 130 a 160 miligramas, entre 20 a 90 mg no café tradicional coado, e no café solúvel de 15 a 60 mg. Outras bebidas como o chá e alguns refrigerantes possuem de 2 a 100 miligramas de cafeína.

Das principais xantinas (que incluem a teofilina e a teobromina), a cafeína é a que mais atua sobre o sistema nervoso central. Também aumenta a produção de suco gástrico, o que pode aumentar o risco de úlceras.

O consumo excessivo pode provocar, dependendo da pessoa, efeitos negativos como irritabilidade, ansiedade, agitação, tremores, insônia e mesmo um quadro de pânico. Altas doses de

cafeína excitam demasiadamente tanto o sistema nervoso central como os reflexos medulares, podendo ser letal com doses superiores a 10 gramas.

A cafeína é uma droga que causa dependência física e psicológica, similar às anfetaminas e à cocaína. Seus efeitos são mais fracos do que estas drogas, mas ela age nos mesmos receptores do sistema nervoso central.

A cafeína faz parte da lista de substâncias analisadas nos exames de doping em todos os esportes, devendo ter concentração inferior a 12 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Além disso, o Conselho Médico dos EUA recomenda a ingestão máxima diária de 250 mg de cafeína.

UTILIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA NA IDENTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi usada pela primeira vez na identificação da cafeína no café no início dos anos 70^[2], mas o grande sucesso neste tipo de análise ocorreu com o aparecimento da coluna de fase reversa, o qual permitiu a identificação da cafeína em diversas matrizes alimentícias, tais como o café^[3], o chocolate^[4] e o chá^[5].

Muhtadi et al.^[6] analisaram metil xantinas (inclusive cafeína) em diversos produtos alimentícios, tanto por cromatografia de fase reversa quanto por cromatografia a gás, determinando que é possível obter maior eficiência por CLAE.

Propriedades da cafeína:

- **Fórmula molecular:** $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$
- **Peso molecular:** 194,19
- **Número de registro CAS:** 58-08-2
- **P.E:** 238°C
- **P.F:** 178°C

Fórmula estrutural (Figura 1)

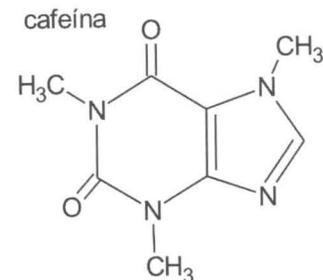


Figura 1 – Fórmula estrutural da cafeína.

PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático, usando metanol (grau HPLC – TEDIA BRAZIL): água com 0,05% de TFA (grau HPLC – TEDIA BRAZIL): (30:70 v/v) em fluxo de 1 mL.min^{-1} com um volume de injeção de 20 μL (loop). O detector usado foi um arranjo de diodo com monitoramento em 272 nm. A coluna foi uma Zorbax C18 (150 x 4,6 mm e 5 μm de espessura do filme).

A determinação quantitativa de cafeína (TEDIA BRAZIL) foi feita pelo método de padrão externo. Para tal, uma curva analítica foi construída com as seguintes concentrações: 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg.L^{-1} , utilizando-se metanol como solvente. As análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS

A Figura 2 mostra o cromatograma e o respectivo UV-Vis

do padrão de cafeína na concentração de 30 mg.L⁻¹, sendo que o tempo de retenção foi de 6,17 minutos.

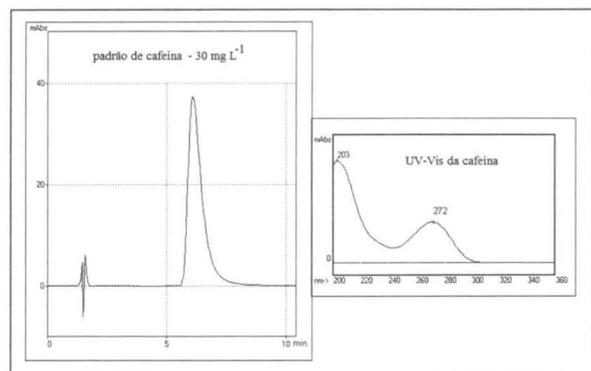


Figura 2 – Cromatograma e espectro de UV-Vis do padrão de cafeína a 30 mg.L⁻¹.

No espectro de UV-Vis do padrão de cafeína pode-se observar que ela apresenta duas bandas de absorção, sendo que a de 272 nm foi escolhida devido ao fato da primeira banda ficar muito próxima da banda de absorção do solvente (metanol).

Na Tabela 1 estão indicadas as concentrações e as médias das suas respectivas áreas.

Tabela 1 – Área média em função das diferentes concentrações das soluções padrão de cafeína.

Concentração em mg.L ⁻¹	Área	Equação da reta
1	40.338	Y = -5825,769 + 50143,743 X
5	236.819	Coefficiente linear
10	497.346	R = 0,99984
15	732.626	Desvio padrão
20	1.028.291	DP = 16294,564
30	1.500.055	
50	2.492.575	

1 ANÁLISE DA CAFEÍNA NO CAFÉ

Uma xícara de café coado foi preparada diluindo-se 3 colheres de pó em 600 mL de água fervente. O extrato foi diluído 25 vezes para que a concentração de cafeína ficasse dentro da faixa de linearidade da curva analítica. A concentração de cafeína no café foi de 1.250 mg.L⁻¹ (Figura 3).

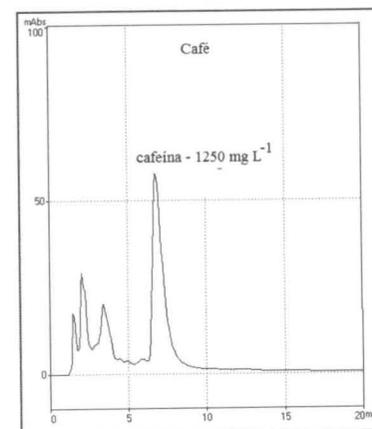


Figura 3 – Cromatograma da cafeína na matriz de café.

2 ANÁLISE DA CAFEÍNA NO REFRIGERANTE DE GUARANÁ

Pegou-se uma amostra de refrigerante sabor guaraná e desgaseificou-se por ultra-som para a retirada total de CO₂ presente. A concentração de cafeína presente no guaraná foi de 7,2 mg.L⁻¹, sendo que não foi necessário diluir a amostra (Figura 4).

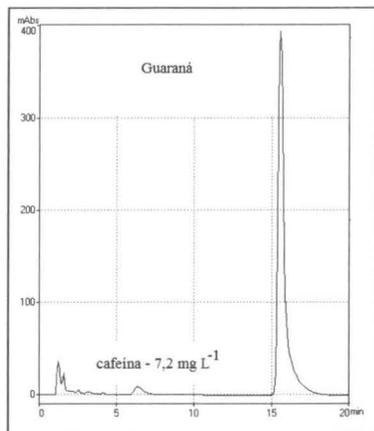


Figura 4 – Cromatograma da cafeína na matriz de refrigerante de guaraná.

3 ANÁLISE DA CAFEÍNA EM REFRIGERANTE DE COLA

Duas amostras de refrigerante, uma de cola e uma de cola light, foram separadas e, em seguida, desgaseificadas por ultra-som para a total retirada de CO_2 . Foi necessária uma diluição de 10 vezes. A concentração obtida de cafeína no refrigerante de cola foi de $93 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $102 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para a cola light. A Figura 5 mostra os cromatogramas para o refrigerante de cola e de cola light.

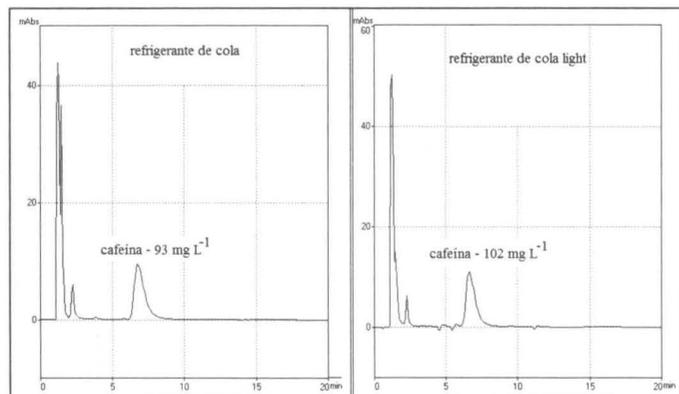


Figura 5 – Cromatograma da cafeína na matriz de refrigerante de cola e cola light.

4 ANÁLISE DA CAFEÍNA NO CHÁ-MATE

Pegou-se um sachê de chá-mate e fez-se uma infusão em uma xícara com 150 mL de água fervente. Em seguida, fez-se uma diluição de 5 vezes. A concentração de cafeína no chá-mate foi de $84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 6).

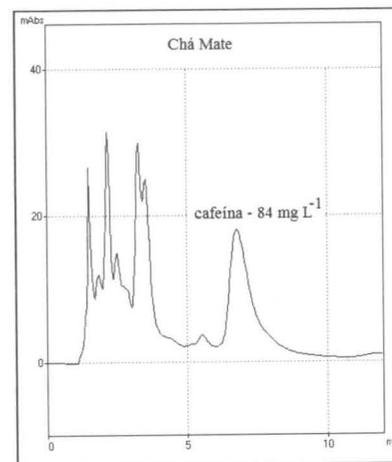


Figura 6 – Cromatograma da cafeína na matriz de chá-mate.

5 ANÁLISE DA CAFEÍNA NO ACHOCOLATADO

Pesou-se uma colher de achocolatado (aproximadamente 12g) e agitou-se em 100 mL de água. Em seguida, a mistura foi sonicada e filtrada em membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

A concentração de cafeína no achocolatado foi de $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 7).

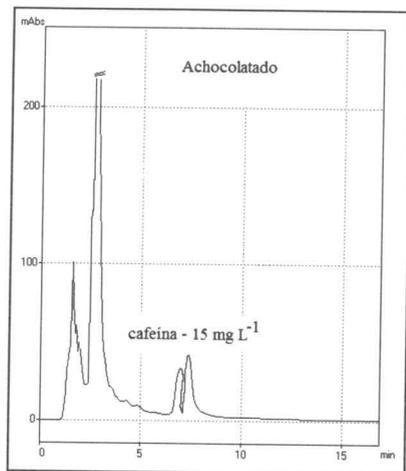


Figura 7 – Cromatograma da cafeína na matriz de achocolatado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 CORDEIRO, Paulo Jorge Marques. **Detecção e caracterização dos constituintes químicos (xantinas, alcalóides e terpenóides) em extratos aquosos de espinheira santa por técnicas cromatográficas acopladas a métodos espectrométricos (hplc-dad e hr-gc-ms)**. 1996. 135f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.
- 2 MURGIA, E.; RICHARDS, P.; WALTON, H. F. **Journal of Chromatography**, v. 87, p. 523-33, 1973.
- 3 MADISON, B. L.; KOZAREK, M. J.; DAMO, C. P. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 59, p. 1258, 1976.
- 4 KREISER, W.R.; MARTIN JUNIOR, R. A. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 61, p. 1424, 1978.
- 5 ASHOOR, S. H.; SEPERICH, G. J.; MONTE, W. C.; WELTY, J. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 66, p. 606, 1983.
- 6 MUHTADI, F. J.; EL-HAWARY, S.S.; HIFNAWY, M.S. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 1013, 1990.