

DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM BEBIDAS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Jailson B. de Andrade*, Heloisa Lúcia Castellar Pinheiro, Wilson Araújo Lopes, Solange Martins, Adelaide Maria Mendonça Amorim e Aldy Maria Brandão

Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia - Campus Universitário de Ondina - 40170-290 - Salvador - BA

Recebido em 12/9/94; aceito em 30/1/95

A method based on reversed-phase (C18) HPLC was used for identification and quantitation of caffeine. Methanol: water (40:60, v/v), as a mobile phase at 0.7mL/min and absorbance detection at 273nm was used. The detection limit (S/N=3) was 1ng/mL and the precision for ten different injections was under 3.2%. Caffeine levels found in brazilian cola-beverages (2 - 41mg/can), tea (2 - 40mg/150 mL) and coffee (0.2 - 109mg/150 mL) were lower than the reported in the literature for the corresponding products available in the U.S.A or Europe. The method proposed here is suitable for quantitation of caffeine in beverages with the advantages of the fact that no pretreatment or derivatization of the samples is required. In addition, it can also be used as an HPLC experiment in courses related to chromatography or food control.

Keywords: caffeine; 1,3,7- trimethylxanthine; beverages.

INTRODUÇÃO

A cafeína é um alcalóide encontrado em uma grande variedade de bebidas (café, chás, refrigerantes etc). Quando ingerida atua como diurética e como estimulante dos sistemas nervoso central e cardiovascular¹. Devido às suas propriedades estimulantes também é bastante utilizada como "doping" por atletas². Pela sua popularidade, a cafeína tem sido uma droga largamente consumida e o seu papel na saúde humana tem recebido uma considerável atenção nas últimas duas décadas.

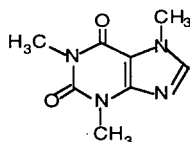


Figura 1. Cafeína (1,3,7-Trimetilxantina).

Quantidades excessivas de cafeína podem causar uma síndrome chamada de "cafeinismo", cujos sintomas incluem ruídos no ouvido, mudanças de temperamento, diarreia, delírios, aceleração da respiração, tensão muscular, tremores etc. A dose letal de cafeína é de 10 gramas, quantidade contida em aproximadamente 100 xícaras de café³.

Existe um grande interesse em identificar as fontes e níveis de cafeína em alimentos comercialmente disponíveis, pois os limites de tolerância variam com os indivíduos e, deste modo, torna-se necessário o conhecimento da quantidade contida nos produtos que estes consomem. Também, estudos recentes demonstraram sua atividade teratogênica em ratos, o que levou a U.S. Food and Drug Administration a sugerir, em 1980, que mulheres grávidas diminuam o consumo desta substância até que novos estudos estabeleçam a relevância para o ser humano¹.

Devido à complexidade e variedade de substâncias contidas nos alimentos, torna-se necessária a separação da cafeína antes de sua quantificação. Duas técnicas são bastante utilizadas: Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Neste trabalho, descrevemos uma metodologia utilizando a CLAE na determinação de cafeína em refrigerantes,

chás e cafés. O procedimento, o qual necessita de uma manipulação mínima da amostra, é simples, rápido e exato. Deste modo, é bastante apropriado para utilização em laboratórios de controle de alimentos, bem como no ensino de CLAE⁴.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e Materiais

Foi utilizado metanol PA Merck (filtrado em membrana HA 0,45 m); cafeína Carlo Erba, purificada por sublimação, pf: 234-236°C (lit 238°C)⁵; microcolunas SEP-PAK C18 10mm x 10mm de diâmetro interno (Waters Associates). A água foi purificada por destilação e por passagem em um sistema E-Pure da Alltech. Foram analisadas amostras de refrigerante, chá e café de diferentes tipos e marcas disponíveis no mercado.

Aparelhagem

Sistema de cromatografia a líquido Intralab (Varian), bomba isocrática (modelo 5010), detector UV/VIS (modelo 5100), injetor "Rheodyne" (modelo 7125) com alça de 10µL e um registrador/integrador Varian (modelo 4290). A coluna analítica usada foi C18 (Econosphere), fase reversa, 5µm, 25cm, 4 mm de diâmetro interno.

As condições utilizadas no sistema de CLAE foram vazão de 0,7mL/min em eluição isocrática da fase móvel metanol/água (40/60 v/v) e detecção da absorvância em 273nm.

TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Refrigerantes

Foram filtrados (membrana HA 0,45µm) e desgaseificados, sob vácuo e sonicação. Em seguida, 10µL de amostra foram injetados diretamente no sistema CLAE.

Quando a cafeína estava em baixos níveis de concentração (< 10ppm), foi feita uma pré-concentração utilizando microcolunas SEP-PAK C18, previamente ativadas com metanol e lavadas com água, do seguinte modo: 25mL do refrigerante foram passados através da microcoluna e o material retido foi

eluído com metanol e diluído a 5mL com o eluente e, então, 10µL desta solução foi injetada no sistema de CLAE.

Chá

Foi feita infusão com 150mL de água (aproximadamente 1 xícara) por 3 minutos e quantidades variáveis de massa visando reproduzir as condições mais comuns de consumo.

Para o Chimarrão, após a primeira infusão o líquido sobrenadante foi analisado e, então, desprezado. Em seguida, foram feitas mais 8 infusões sucessivas usando-se, em cada uma, 50mL de água. Foram analisadas a segunda, a quarta e a oitava infusões.

Café

Foram adotados diferentes procedimentos de preparo de acordo com o tipo do café visando reproduzir as condições mais comuns de consumo.

Café "cafeteira elétrica"
150mL de água para 4g de café

Café solúvel
150mL de água para 1g de café (aproximadamente 1 colher de chá).

Café "cozido"
150mL de água fervente para 4g de café, em "cozimento" por 5min.

Os extratos foram filtrados em papel Whatman 41 (2 vezes, filtro duplo). Em seguida foi adotado o mesmo procedimento descrito para refrigerantes.

Foram utilizadas três amostras de cada marca de refrigerante, café e chá, e de cada amostra foram feitas três injeções no sistema cromatográfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições cromatográficas utilizadas, obteve-se uma boa separação da cafeína dos demais componentes das amostras, em 8 minutos (Figura 2). A curva de calibração obtida (Figura 3) para concentrações de cafeína entre 10 e 50µg/mL ($n = 5$ pontos) foi $A = 2020,1C - 1252,1$ ($r^2 = 0,9995$), onde A = área do pico, C = concentração (µg/mL) e r = coeficiente de correlação

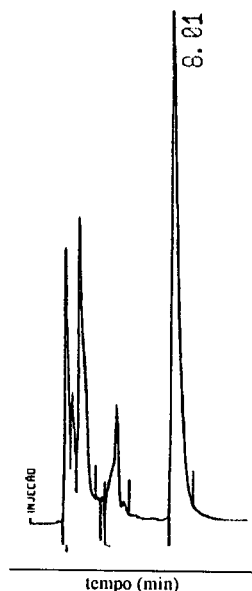


Figura 2. Cromatografia da Coca-Cola dietética.

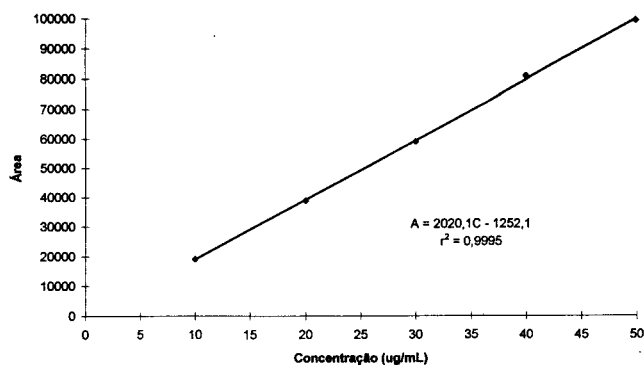


Figura 3. Curva de calibração.

linear. O limite de detecção do método é 1ng/mL ($S/R=3$), na sensibilidade do detector de 0,005 AUFS e o limite de quantificação é de 3,3ng/mL. A repetibilidade, para 10 injeções do padrão de 30µg/mL, apresentou um coeficiente de variância de 0,88% e, para o padrão de 68 ng/mL (0,07µg/mL) de 3,2%. A eficiência de recuperação das microcolunas SEP-PAK C18 foi maior do que 98%.

Durante as análises foi observada uma instabilidade dos padrões de cafeína preparados em água. A Figura 4 representa o acompanhamento por um período de 32 dias de padrões na concentração de 30µg/mL preparados apenas em água e em solução aquosa contendo 1% de metanol. Observa-se que o

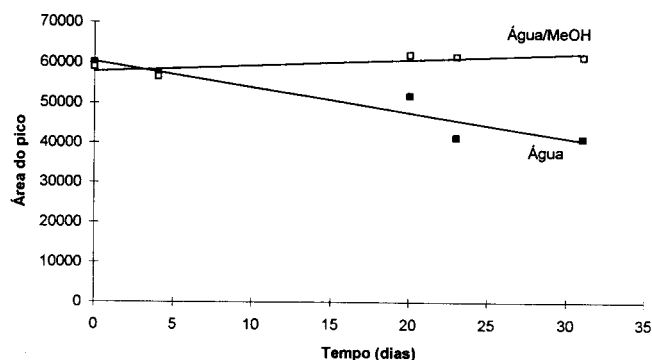


Figura 4. Estabilidade das Soluções Padrão.

padrão em metanol/água pode ser utilizado com segurança por cerca de 30 dias enquanto que o preparado em água apresenta uma redução de sinal de 4% em 4 dias, atingindo um decaimento de cerca de 32% em 32 dias. Deste modo, os padrões utilizados neste estudo foram preparados em solução aquosa contendo 1% de metanol.

Na Tabela 1 estão os valores de concentração de cafeína determinados nas amostras de refrigerante, chá e café. Comparando-se os resultados da literatura^{1,3,6,7} para Coca-Cola dietética, Coca-Cola, Pepsi-Cola e Pepsi-Cola dietética com aqueles determinados neste estudo, verifica-se que os similares brasileiros apresentam menor teor de cafeína, além de não excederem o teor máximo desta substância permitido em refrigerantes¹ (0,02%p/p, 45mg/lata - 350 mL)^{1,3,6,7}.

Nos sete diferentes tipos de chás analisados, incluindo a erva chimarrão, as concentrações de cafeína estão na faixa de 2 - 40mg/xícara (Tabela 1). Considerando que a forma de preparação do chá, neste estudo, foi semelhante àquela descrita na literatura, observa-se que os teores de cafeína para os chás nacionais estão abaixo dos valores registrados^{1,3,8,9}.

O chimarrão, pelo seu uso característico, foi submetido a várias infusões seguidas. Na Tabela 2 encontram-se as concentrações

Tabela 1. Concentrações médias de cafeína determinadas em refrigerantes, chás e cafés.

Bebida	Este Estudo	Lit. (ref.)
Refrigerante (mg/lata)		
Coca-Cola	34	32-46(1,3,6,7)
Coca-Cola dietética	41	46-56(1,3,6,7)
Guaraná Antártica	2	
Guaraná Antártica dietético	4	
Soda Limonada Antártica	n. d.	
Sukita Brahma	n. d.	38(1,3,6,7)
Pepsi-Cola	23	36-38(1,3,6,7)
Pepsi-Cola dietética	22	
Chá (mg/150mL)		
Camomila	n. d.	
Erva Cidreira	n. d.	
Hortelã	2	
Boldo	2	
Erva Mate	17	
Chá Preto	40	
Chimarrão	8-27	
Café (mg/150mL)		
		110 - 180 (1,3,9,10)
Estrela ^c	97	
Estrela ^a	109	
Do coronel ^c	68	
Rio Branco ^c	73	
América ^c	58	
Melitta descafeinado	0,2	0,2
Nescafé ^b	31	

^a = café cozido, ^b = café solúvel, ^c = café "cafeteira", n.d.= não detectado.

Tabela 2. Concentração de cafeína em chimarrão utilizando seguidas infusões.

Infusão	Concentração (mg/150mL)
primeira	16
segunda	27
quarta	10
oitava	8

de cafeína determinadas nas diversas infusões. Observa-se um máximo de concentração (27mg/xícara) na segunda infusão.

Os vários tipos de café foram submetidos ao processo usual de preparação para consumo (cafeteira elétrica ou através de

cozimento). Os valores encontrados para produtos nacionais variaram de 58 a 97mg/xícara e, também, estão abaixo daqueles encontrados nas marcas estrangeiras^{1,3,9,10}.

Não são encontrados nos rótulos dos refrigerantes, cafés e chás brasileiros a composição qualitativa e/ou quantitativa desses produtos. Apenas o *café descafeinado* é especificado como isento de cafeína, o que é confirmado por este estudo considerando os baixos níveis encontrados, 0,2mg/xícara.

CONCLUSÕES

A metodologia proposta é adequada para a quantificação de cafeína em bebidas. As principais vantagens do método são a simplicidade, as amostras não precisaram de pré-tratamento ou derivatização; a rapidez, ocorre uma boa separação em 8 minutos; e o baixo limite de detecção de 1ng/mL. Devido a suspeita da cafeína apresentar atividade teratogênica, torna-se necessário um controle da quantidade desta substância nas bebidas e alimentos, bem como a indicação de sua quantidade nos respectivos rótulos. Adicionalmente, esta metodologia é também adequada como um experimento didático para o ensino da CLAE nos cursos de Graduação e Pós-Graduação ou em disciplinas relacionadas ao controle de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FINEP e CAPES pelo suporte financeiro e bolsas de pesquisa e pós-graduação.

REFERÊNCIAS

- Gennaro, M. C.; Abrigo, C.; *Fresenius J. Anal. Chem.* (1992), **343**, 523.
- Delbeke, F. T.; Debackere, M.; *Chrom.* (1985), **17**, 646.
- Eaton, D. C.; *Laboratoy Investigations in Organic Chemistry*, McGrall-Hill; New York (1989).
- Sawyer, D. T.; Heineman, W. R.; Beebe, J. M.; *Chemistry Experiments for Instrumental Methods*, John Wiley; New York (1984).
- Handbook of Chemistry and Physics*, Ed. Robert C. Weast, 57th ed., CRC Press, Cleveland (1977).
- Strohl, A. N.; *J.Chem. Ed.* (1985), **62**, 447.
- Bidlingmeyer, B. A.; Schmitz, S.; *J.Chem. Ed.* (1991), A195.
- Dulitzky, M.; Teja, E. de la; Lewis, H.F.; *J. Chromatogr.* (1984), 403.
- Wolford, J. C.; Dean, J.A.; Goldstein, G.; *J. Chromatogr.* (1971), **62**, 148.
- DiNunzio, J. E.; *J. Chem. Ed.* (1985), **62**, 446.