

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

SINARA QUELI WELTER

**EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA EM ENERGÉTICOS
ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
ESPECTROFOTOMETRIA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2011**

SINARA QUELI WELTER

**EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA EM ENERGÉTICOS
ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
ESPECTROFOTOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Bacharelado em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Professora Orientadora: Profa. Dra. Sirlei Dias
Teixeira

Professor Coorientador: Prof. Dr. Marcio Barreto
Rodrigues

PATO BRANCO
2011

À minha mãe Hedi R. Welter, que apoiou e incentivou a realização deste sonho.

À memória de meu pai, Arlindo Z. Welter, pelo exemplo de vida.

À Cleidimar Nardi, pelo carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos professores Sirlei Dias Teixeira e Marcio Barreto Rodrigues pela dedicação em orientar este trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Câmpus Pato Branco e Francisco Beltrão, e à Central de Análises do Câmpus Pato Branco que disponibilizaram os laboratórios para a realização das análises.

Aos professores da banca examinadora, Dr. Edimir Andrade Pereira e Dr. Marcio Barreto Rodrigues, pela atenção e contribuição dedicadas a este trabalho.

À minha família, pois sem o seu apoio e incentivo, a realização deste sonho não seria possível.

À Cleidimar Nardi, pelo seu carinho, amor e compreensão.

RESUMO

WELTER, Sinara Q. Extração e quantificação de cafeína em energéticos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrofotometria. 2011. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

A cafeína é um alcaloide, um composto contendo nitrogênio, que apresenta propriedades básicas. A cafeína é um dos principais ingredientes das bebidas energéticas, que segundo seus produtores, foram criadas para incrementar a resistência física, aumentar o estado de alerta mental, evitar o sono, entre outros. O presente trabalho relata a extração e quantificação de cafeína em diferentes marcas de energéticos encontradas no mercado através de dois métodos: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrofotometria. Os resultados de concentração de cafeína não apresentaram diferença significativa quando determinados pelos dois métodos em questão.

Palavras-chave: Cafeína. Energéticos. CLAE. Espectrofotometria.

ABSTRACT

WELTER, Sinara Q. Extraction and quantification of caffeine in energy drinks by High Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometry. 2011. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

Caffeine is an alkaloid, a compound containing nitrogen, which has basic properties. Caffeine is one of the main ingredients of energy drinks, which according to its producers, are designed to increase endurance, increase mental alertness, prevent sleep, among others. This paper describes the extraction and quantification of caffeine in different brands of energy found in the market through two methods: High Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometry. The results of caffeine showed no significant difference was determined by two methods in question.

Keywords: Caffeine. Energy drink. HPLC. Spectrophotometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmulas estruturais da xantina e seus derivados	12
Figura 2 – Cromatograma do padrão de cafeína.....	18
Figura 3 - Cromatograma do padrão de cafeína a 1,0 ppm em 272 nm.....	21
Figura 4 - Cromatograma do padrão de cafeína a 5,0 ppm em 272 nm.....	21
Figura 5 - Cromatograma do padrão de cafeína de 10 ppm a 272 nm.....	22
Figura 6 - Cromatograma do padrão de cafeína de 25 ppm a 272 nm.....	22
Figura 8 - Curva padrão de cafeína obtida através de CLAE	23
Figura 7 - Cromatograma do padrão de cafeína de 50 ppm a 272 nm.....	23
Figura 9 - Replicata 1 da análise do energético A 10% em CLAE	24
Figura 10 - Replicata 2 da análise do energético A 10% em CLAE	24
Figura 11 - Replicata 3 da análise do energético A 10% em CLAE	25
Figura 12 - Replicata 1 da análise do energético B 10% em CLAE	25
Figura 13 - Replicata 2 da análise de energético B 10% em CLAE	26
Figura 14 - Replicata 3 da análise do energético B 10% em CLAE	26
Figura 15 - Replicata 1 da análise do energético C 10% em CLAE	27
Figura 16 - Replicata 2 da análise do energético C 10% em CLAE	27
Figura 17 - Replicata 3 da análise do energético C 10% em CLAE	28
Figura 18 - Curva de calibração obtida através de espectrofotômetro	29
Figura 19 - Pico que representa a cafeína no energético B	33
Figura 20 - Pico que representa a substância interferente.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de cafeína encontradas nas diferentes marcas de energéticos analisados através do método cromatográfico (CLAE).....	29
Tabela 2 - Valores de absorbância a 272 nm correspondente ao extrato de cada replicata dos energéticos	30
Tabela 3 - Concentrações de cafeína encontradas nas diferentes marcas de energéticos analisados através do método espectrofotométrico.....	31
Tabela 4 - Comparação entre as concentrações de cafeína quantificadas pelos dois métodos em estudo e comparação com os dados fornecidos na embalagem do produto	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 CAFEÍNA: ORIGEM E DESCRIÇÃO	11
3.2 ADMINISTRAÇÃO DE CAFEÍNA	12
3.3 USO DE BEBIDAS ENERGÉTICAS	13
3.4 LEGISLAÇÃO	14
3.5 MÉTODOS DE ANÁLISE	14
3.5.1 Cromatografia	14
3.5.2 Espectrofotometria	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	18
4.2 ESPECTROFOTOMETRIA	19
4.2.1 Extração	19
4.2.2 Espectrofotometria	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A cafeína é um alcalóide de grande uso, sendo consumida pela população principalmente através de chás, café, bebidas energéticas e de fármacos, como antigripais (DE MARIA, MOREIRA, 2007). É encontrada naturalmente, em grande quantidade, nas sementes de café e folhas de chá verde. Esta substância atinge o Sistema Nervoso Central aumentando a capacidade de alerta e melhorando o desempenho de atividades que exijam vigilância (DE MARIA, MOREIRA, 2007). Mas em excesso, esta substância pode causar insônia, nervosismo, palpitação do coração, entre outros sintomas desconfortáveis (ALTIMARI, CYRINO, ZUCAS, 2001; BRENELLI, 2003; DE MARIA, MOREIRA, 2007).

A cafeína é um dos principais ingredientes das bebidas energéticas, os quais são denominados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como “composto líquido pronto para consumo”, e são fiscalizados, dentre outros fatores, segundo o teor de cafeína, o qual não deve ultrapassar 350mg/L (BRASIL, 1998).

Este trabalho tem por objetivo a quantificação de cafeína de diferentes marcas de energéticos, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrofotometria, verificando as quantidades obtidas, comparando os métodos e os valores relatados no rótulo de cada produto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o teor de cafeína em diversas marcas de energéticos, para posterior comparação entre os métodos utilizados e com a legislação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar diferentes métodos de determinação de cafeína em alimentos;
- Determinar o teor de cafeína dos energéticos analisados através dos métodos escolhidos;
- Comparar os resultados encontrados entre os dois métodos e com os teores de cafeína determinados pela ANVISA.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CAFEÍNA: ORIGEM E DESCRIÇÃO

A cafeína é um alcalóide, um composto contendo nitrogênio, que apresenta propriedades básicas (BRENELLI, 2003). Segundo De Maria e Moreira (2007), este alcalóide é encontrado em grande quantidade nas sementes de café e nas folhas de chá verde. Esta molécula também pode ser encontrada em outros produtos vegetais, como o cacau, o guaraná e a erva-mate. Mesmo que uma pequena parcela da população consuma cafeína na forma de fármacos, como os antigripais, grande parte desta substância é ingerida na forma de bebidas (DE MARIA, MOREIRA, 2007).

O uso da cafeína vem de muitos séculos, e atualmente é a droga mais consumida no mundo. A cafeína tem sido utilizada desde o período paleolítico (ALTIMARI, CYRINO, ZUCAS, 2000, 2001; MELLO, KUNZLER, FARAH, 2007), provavelmente devido aos seus efeitos do Sistema Nervoso Central (SNC) (MELLO, KUNZLER, FARAH, 2007).

Quimicamente, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) pertence ao grupo das metilxantinas (derivadas da xantina), do qual também fazem parte a teofilina, a teobromina, a teína e o guaraná (Figura 1) (ALTIMARI, CYRINO, ZUCAS, 2000, 2001). Estes compostos são alcaloides estreitamente relacionados pois todos tem ação farmacológica sobre o SNC, mas com intensidades diferentes (ALTIMARI, CYRINO, ZUCAS, 2000, 2001).

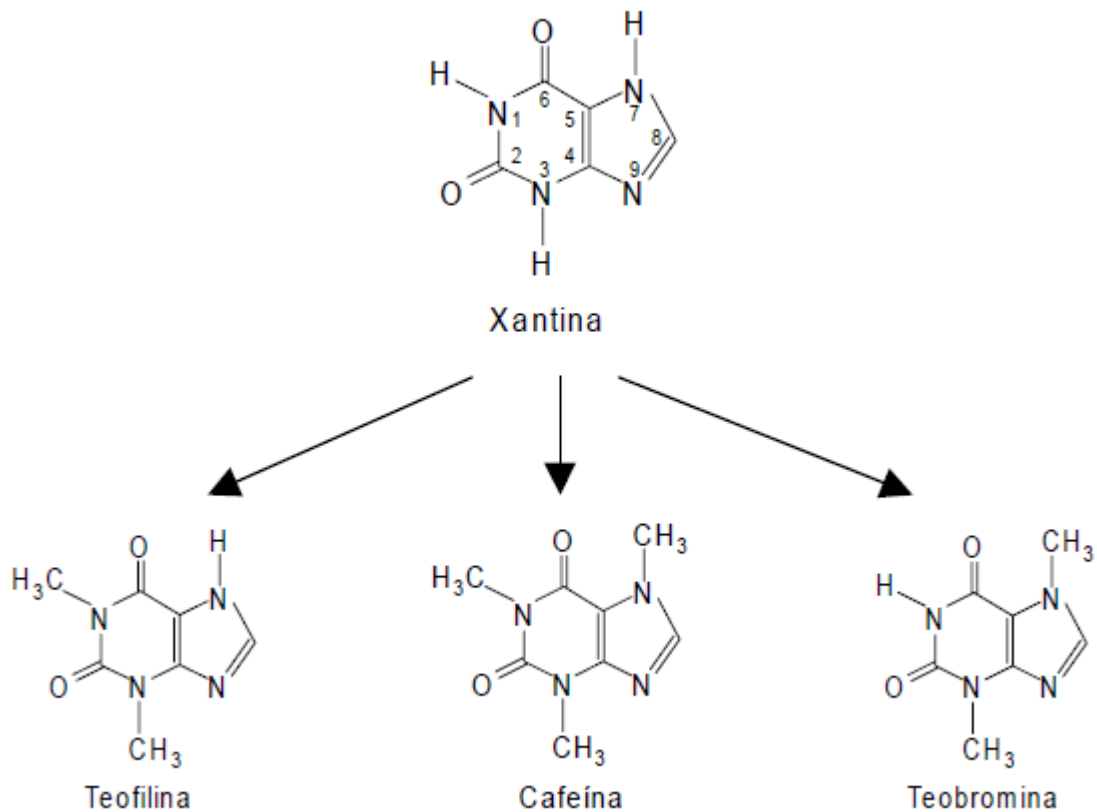


Figura 1 - Fórmulas estruturais da xantina e seus derivados
 Fonte: ALTIMARI, CYRINO, ZUCAS, 2001.

3.2 ADMINISTRAÇÃO DE CAFEÍNA

Conforme Altimari, Cyrino, Zucas (2000, 2001), a administração de cafeína pode ser feita de diversas formas, mas a mais comum é a via oral, devido a sua fácil aplicabilidade. A sua absorção pode atingir todos os tecidos, devido ao fato de que sua distribuição pelo organismo ser feita pela corrente sanguínea, posteriormente é degradada pelo fígado e excretada pela urina.

Embora a maior parte da metabolização da cafeína ocorra no fígado, outros tecidos, incluindo o cérebro e os rins, desempenham papel importante no metabolismo deste alcaloide (MELO, 2007).

A cafeína é absorvida de modo rápido e eficiente, principalmente via administração oral, através do trato gastrointestinal, e possui aproximadamente 100% de disponibilidade. Alcança a concentração máxima na corrente sanguínea

após 15 a 120 minutos de sua ingestão (ALTIMARI, CYRINO, ZUCAS, 2000, 2001, 2006).

Segundo Mello e colaboradores (2007), o uso crônico da cafeína é geralmente associado à habituação e à tolerância. Numa pessoa que não faz uso regular de cafeína, esta substância pode causar um aumento dos níveis de alguns hormônios, como as catecolaminas, a renina e mesmo insulina e o hormônio da paratireoide. Entretanto, estes efeitos não são detectados na pessoa que faz uso regular de cafeína, pois seu organismo já está adaptado a essa substância, não mais havendo estes aumentos.

Os principais efeitos colaterais da ingestão de cafeína ocorrem no sistema nervoso central e cardiovascular (MELLO, KUNZLER, FARAH, 2007). Os efeitos fisiológicos principais da cafeína nos seres humanos são o efeito estimulante, o efeito diurético e a dependência química (BRENELLI, 2003). Esta substância causa o aumento da taxa metabólica, o relaxamento da musculatura lisa dos brônquios, do trato gastrointestinal, do trato biliar, e de partes do sistema vascular (BRENELLI, 2003). Gera redução da fadiga e um aumento da capacidade de alerta, e também, melhora no desempenho de atividades que necessitam maior vigilância (DE MARIA, MOREIRA, 2007).

3.3 USO DE BEBIDAS ENERGÉTICAS

Segundo Ballistreri e Corradi-Webster (2008), há no mercado bebidas denominadas energéticas, que segundo seus produtores, foram criadas para incrementar a resistência física, aumentar o estado de alerta mental, proporcionar sensação de bem estar, evitar o sono, estimular o metabolismo e ajudar a eliminar substâncias nocivas ao corpo. Os principais ingredientes da maioria destas bebidas são: taurina, cafeína, guaraná, ginseng, glucuronolactona e vitaminas. Algumas possuem minerais, inositol e carnitina, entre outras substâncias.

As pessoas têm acesso livre a estas bebidas em vários lugares, como em danceterias, clubes, bares, academias, centros esportivos, etc., onde são vendidas separadamente ou junto com bebidas alcoólicas (BALLISTRERI, CORRADI-WEBSTER, 2008). O principal intuito das bebidas energéticas é estimular o cérebro

para que este entre em estado de alerta, até pouco tempo atrás eram utilizados para se obter um aumento da capacidade mental, devido ao cansaço (ZENI, 2009).

Ballistreri e Corradi-Webster (2008) afirmam que, uma questão que surge é a utilização de energéticos juntamente com bebidas alcoólicas, principalmente entre os jovens, já que, com a mistura e a melhora do sabor, maiores quantidades de álcool estariam sendo consumidas.

De acordo com um estudo feito pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), o energético mascara o gosto do álcool, o que incentiva uma maior ingestão de bebidas alcoólicas e promove uma falsa sensação de bem estar, o que faz a pessoa se sentir mais “ligada” e muitas vezes se considerando capaz de dirigir (ZENI, 2009).

3.4 LEGISLAÇÃO

Segundo BRASIL (1998), em compostos líquidos pronto para consumo (energéticos), é permitida a adição de cafeína como ingrediente no limite máximo de 350 mg/L. É obrigatório informar no rótulo do produto o teor de cafeína, quando presente. O composto líquido pronto para consumo, objeto deste Regulamento, deve indicar obrigatoriamente, a seguinte advertência em destaque e negrito: "Idosos e portadores de enfermidades: consultar o médico antes de consumir este produto" (BRASIL, 1998).

3.5 MÉTODOS DE ANÁLISE

3.5.1 Cromatografia

Segundo Holler (2009) e colaboradores, a cromatografia é um método de separação muito eficiente que se aplica a muitos ramos da ciência. Compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem a separação e

identificação de componentes muito semelhantes entre si (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Em toda análise cromatográfica, a amostra é transportada por uma *fase móvel*, que pode ser um gás ou um líquido (em outras palavras, é o solvente que se move através da coluna). Essa fase móvel é forçada a passar por uma *fase estacionária* imiscível e fixa, no interior de uma coluna ou sobre uma superfície sólida. É a distribuição dos solutos entre as fases móvel e estacionária que provoca a separação dos compostos, pois as duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra distribuam-se entre as fases móvel e estacionária em graus distintos (HARRIS, 2008; HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Segundo Holler e colaboradores (2009), os compostos que são retidos mais fortemente na fase estacionária movem-se mais lentamente pela coluna. Em contrapartida, os compostos que interagem mais fracamente com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. Em função dessas velocidades de migração diferentes os componentes da amostra são separados em bandas ou zonas discretas, que podem ser analisadas tanto qualitativamente como quantitativamente.

3.5.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Segundo Cienfuegos e Vaitsman (2000) a cromatografia líquida é aquela em que a fase móvel é líquida. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), utiliza pequenas colunas cheias de materiais especialmente preparados, capazes de proporcionar separações muito eficientes; e fase móvel submetida a altas pressões para forçar sua passagem pela coluna (CIENFUEGOS, VAITSMAN, 2000; HARRIS, 2008).

O dispositivo para CLAE consiste, basicamente, em um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para controlar o sistema e apresentar os resultados (HARRIS, 2008).

Conforme o mesmo autor, os resultados podem ser observados através de cromatogramas que são gráficos que mostram a resposta do detector em função do tempo de eluição (passagem do líquido pela coluna cromatográfica). Um dos parâmetros utilizados nos cálculos deste trabalho é o tempo de retenção, que é o

tempo necessário, a partir da injeção da mistura na coluna, para que cada componente alcance o detector.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência tem como vantagem a rapidez de análise, alta eficiência, reprodutibilidade e sensibilidade, mas possui algumas limitações como o alto custo de equipamento, a necessidade de operador experiente e solventes de alta pureza (CIENFUEGOS, VAITSMAN, 2000).

3.5.2 Espectrofotometria

Segundo Vinadé e Vinadé (2005), os métodos espectroscópicos de análise têm como característica comum a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Existe uma relação de proporcionalidade entre a quantidade de radiação absorvida por uma espécie química e a concentração dessa espécie. Essa relação é que permite a quantificação nas amostras.

Quando a radiação eletromagnética atravessa uma amostra, certas frequências podem ser seletivamente removidas por absorção, um processo pelo qual a energia eletromagnética é transferida para os átomos, íons ou moléculas que compõe a amostra (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Cienfuegos e Vaitsman (2000) afirmam que a relação existente entre a luz transmitida e a luz incidente (pela amostra), chama-se *transmitância* (T) e o valor máximo que pode ser transmitido é 100%. Segundo Holler (2009) e colaboradores, a *absorbância* é a fração da radiação que é absorvida pela amostra e é definida pela equação:

$$A = - \log T$$

Para uma radiação monocromática (apenas um comprimento de onda), a absorbância é diretamente proporcional ao caminho *b*, percorrido pela radiação através do meio, e à concentração *c* da espécie absorvente (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009). Essas relações são dadas pela Lei de Beer:

$$A = a.b.c$$

onde a é uma constante chamada de *absortividade molar*, característica de cada substância e em cada comprimento de onda (HARRIS, 2008; HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

A espectrofotometria UV-Vis (ultravioleta-visível) é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm, e a região do visível entre 400 a 800 nm (VINADÉ, VINADÉ, 2005).

Para avaliar a região espectral correta, deve-se elaborar o espectro de absorção, que consiste em relacionar as absorbâncias em função dos respectivos comprimentos de onda. Através do espectro de absorção é possível determinar o comprimento de onda em que o analito absorve melhor a radiação; o espectro de absorção é característico de cada espécie química e pode ser traduzido como a impressão digital desse composto (VINADÉ, VINADÉ, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado utilizando duas técnicas para a quantificação de cafeína (cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria) em 03 (três) marcas de energéticos. As análises foram realizadas em triplicata.

4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Inicialmente, utilizou-se um cromatograma de cafeína (fornecido pelo laboratório), onde pode-se identificar qual o comprimento de onda (λ_{\max}) em que a cafeína tem a sua melhor absorção e o tempo de retenção da cafeína indicado no canto superior direito da Figura 2.

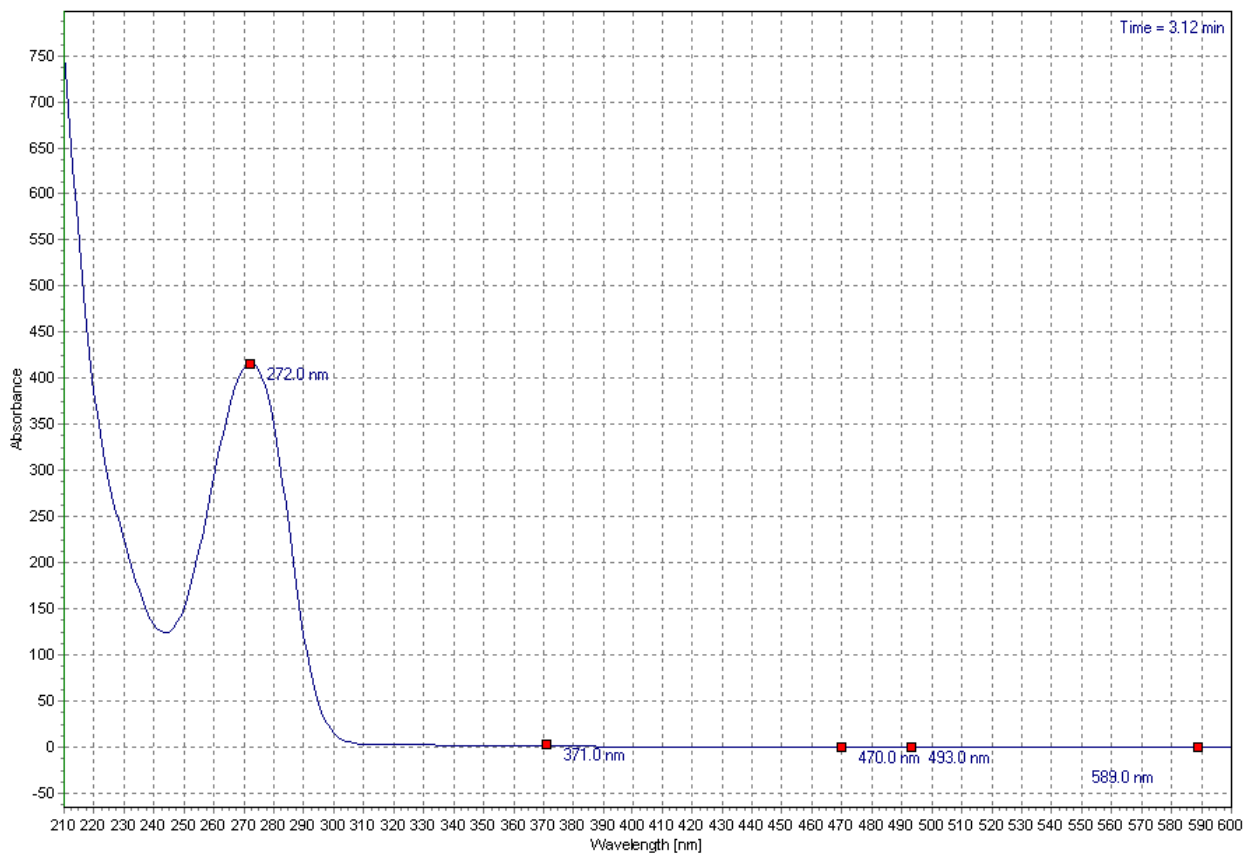


Figura 2 – Cromatograma do padrão de cafeína
Fonte: Central de Análises da UTFPR Campus Pato Branco.

Em seguida, foram feitas soluções padrão de cafeína em água ultrapura (obtida por filtração membrana) de concentrações 1,0 ppm, 5,0 ppm, 10 ppm, 25 ppm e 50 ppm. Estas soluções foram analisadas no CLAE por um tempo de 15 minutos a 272 nm, e pode-se obter uma curva padrão e a equação da reta, que indicam a relação entre a concentração de cafeína e a área do pico no cromatograma.

Para a determinação da concentração de cafeína nas bebidas energéticas, estas foram homogeneizadas e transferidas para bquer de 250 mL e submetidas a ultrassom por 5 minutos para a eliminação do gás carbônico. Em seguida, foram diluídos a 10% e analisados no CLAE em triplicata.

4.2 ESPECTROFOTOMETRIA

4.2.1 Extração

O método espectrofotométrico utilizado para a extração de cafeína foi adaptado de Alves e Bragagnolo (2002). Dissolveu-se, num erlenmeyer, 5 g de óxido de magnésio no energético a ser analisado (frasco de aproximadamente 250 mL). Em seguida, aqueceu-se a mistura em chapa de aquecimento e agitação constante, por 45 minutos. Após o resfriamento, filtrou-se a mistura para um funil de separação, através de um funil de vidro com papel filtro, adicionou-se este 4 mL de ácido sulfúrico 10% e o sistema foi homogeneizado.

Extraiu-se a cafeína com 20 mL de clorofórmio, agitando vigorosamente o sistema, deixando a fase clorofórmica separar e transferindo-a para outro funil de separação. Esta extração foi repetida 5 vezes, sempre transferindo a fase clorofórmica para o mesmo funil de separação. Na fase de clorofórmio, foi adicionado 5 mL de hidróxido de potássio a 1%, agitou-se a mistura por 1 minuto e deixou-se separar as fases. A fase clorofórmica foi filtrada, através de um funil de vidro com algodão, para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com clorofórmio. O extrato foi guardado em geladeira até ser analisado no espectrofotômetro.

4.2.2 Espectrofotometria

Preparou-se 5 soluções padrão de cafeína em clorofórmio, em balões volumétricos de 50 mL com as seguintes concentrações: 4,64 ppm, 9,28 ppm, 13,92 ppm, 18,56 ppm e 23,2 ppm. Calibrou-se o espectrofotômetro com um branco de clorofórmio e construiu-se a curva de calibração à 272 nm (λ_{max} da cafeína), da absorbância em função da concentração dos padrões. Fizeram-se as leituras das amostras, também contra um branco de clorofórmio, e foi calculada a concentração de cafeína através da equação da reta encontrada na curva de calibração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões de cafeína de 1,0 ppm, 5,0 ppm, 10 ppm, 25 ppm e 50 ppm foram analisados no CLAE por 15 minutos no comprimento de onda de 272 nm (λ_{max} da cafeína). Nas Figuras 3, 4, 5, 6, 7 são apresentados os cromatogramas dos respectivos padrões de cafeína.

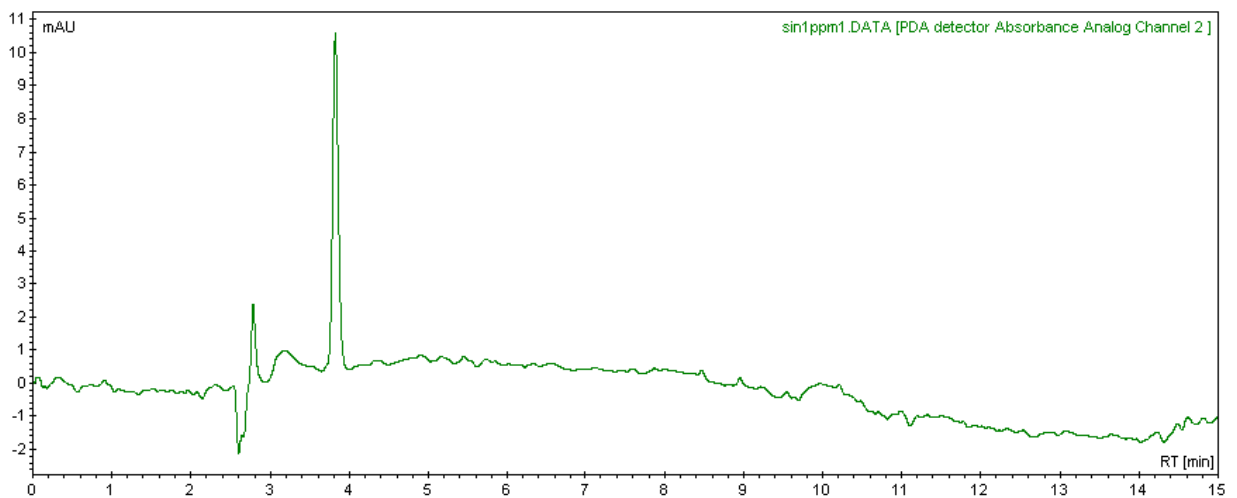


Figura 3 - Cromatograma do padrão de cafeína a 1,0 ppm em 272 nm
Fonte: Própria.

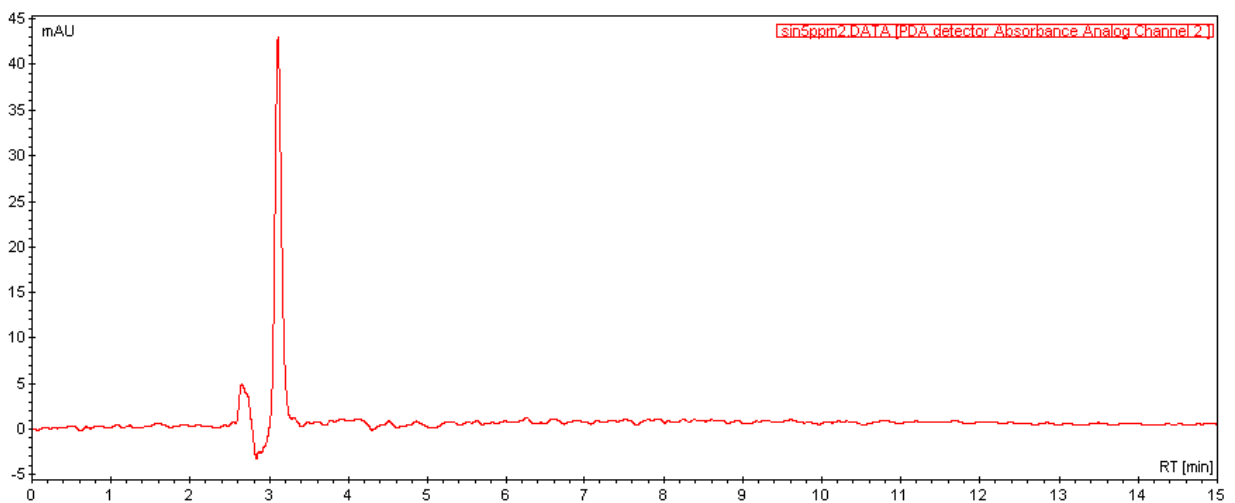


Figura 4 - Cromatograma do padrão de cafeína a 5,0 ppm em 272 nm
Fonte: Própria.

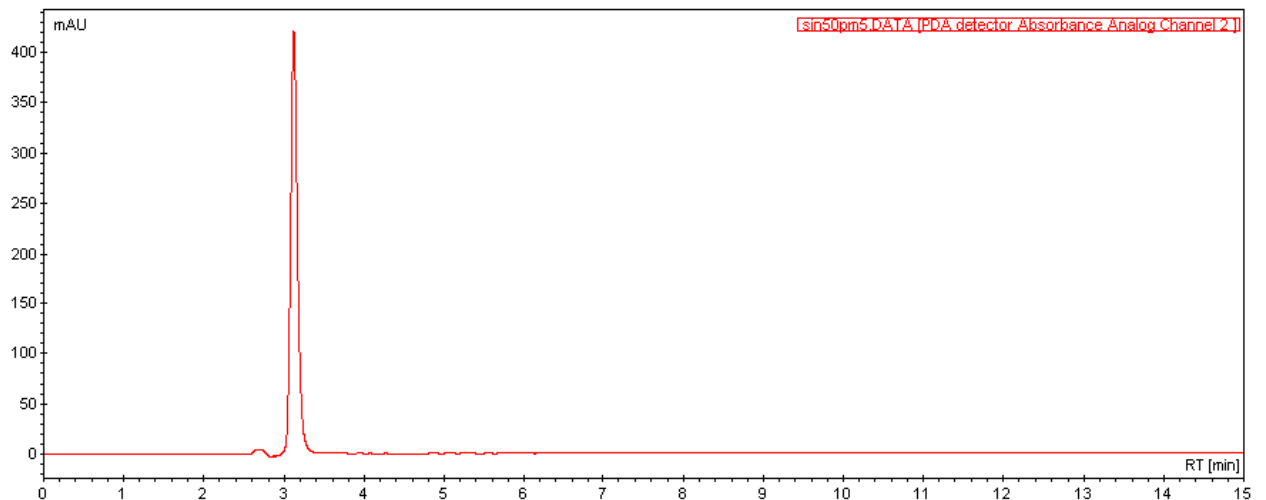


Figura 7 - Cromatograma do padrão de cafeína de 50 ppm a 272 nm
Fonte: Própria.

Através dos cromatogramas acima pode-se verificar que o tempo de retenção da cafeína é de aproximadamente 3,1 minutos, e que quanto maior a concentração de cafeína, maior será a área do pico, ou seja, maior é a intensidade do sinal.

A partir dos relatórios de cada solução padrão gerados por CLAE, pode-se obter os valores exatos da área do pico, e com esses dados pode-se construir uma curva padrão de cafeína (Figura 8) na qual se apresentam a área do pico do cromatograma em função da concentração de cafeína.

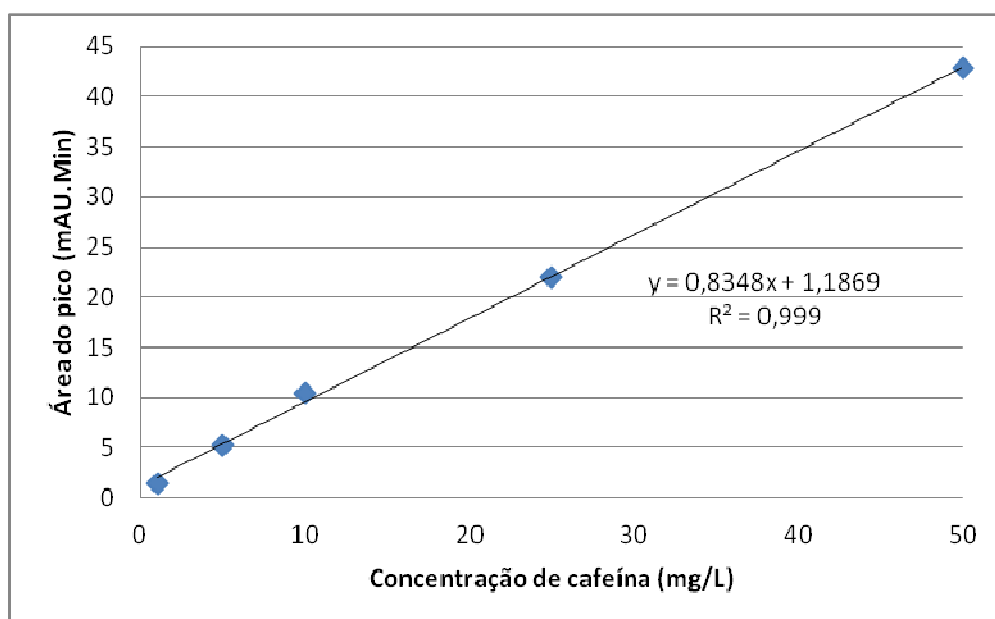


Figura 8 - Curva padrão de cafeína obtida através de CLAE
Fonte: Própria.

Em seguida, analisaram-se os energéticos A, B e C no CLAE por 10 minutos, em triplicata, no comprimento de onda de 272 nm (λ_{\max} . da cafeína). Nas figuras abaixo, são apresentados os cromatogramas dos respectivos energéticos.

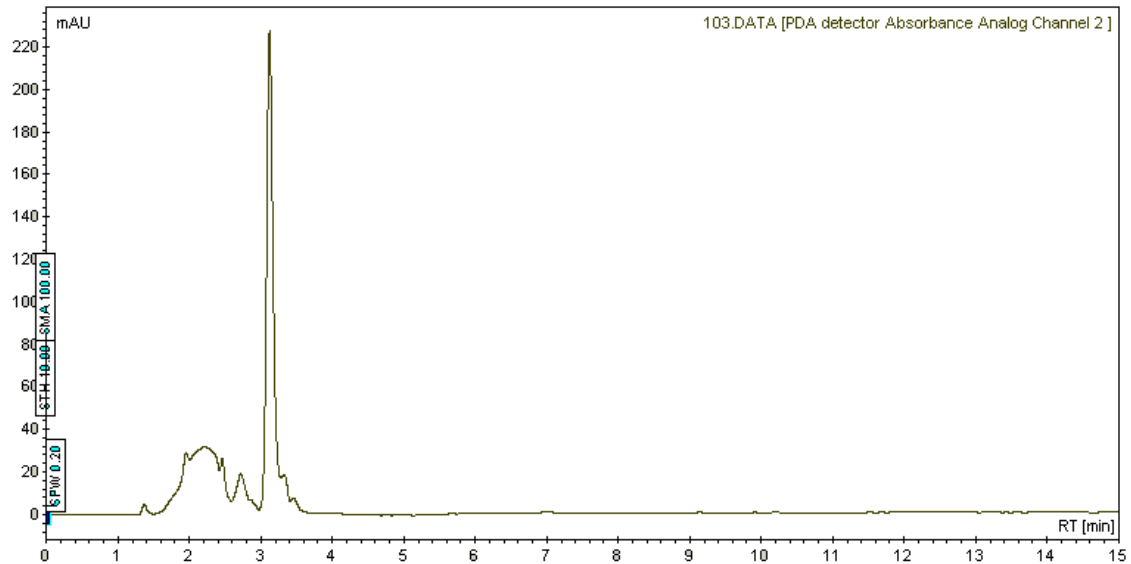


Figura 9 - Replicata 1 da análise do energético A 10% em CLAE

Fonte: Própria.

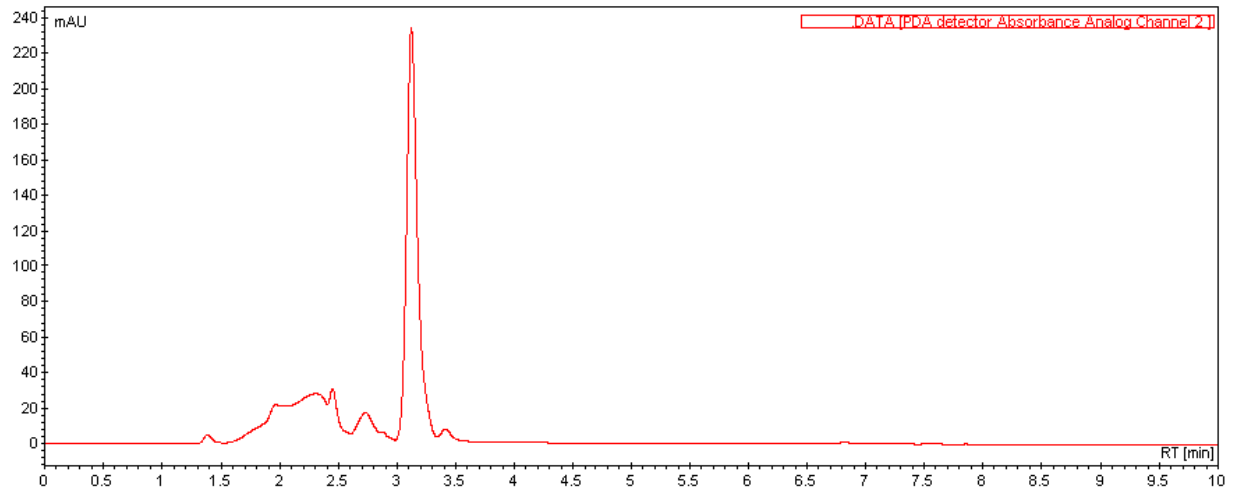


Figura 10 - Replicata 2 da análise do energético A 10% em CLAE

Fonte: Própria.

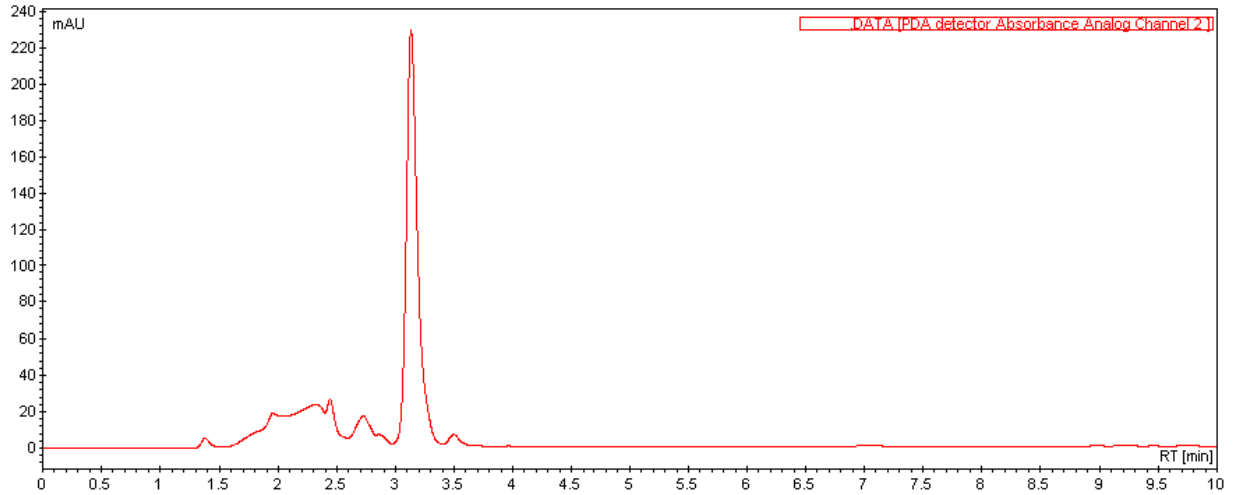


Figura 11 - Replicata 3 da análise do energético A 10% em CLAE
Fonte: Própria.

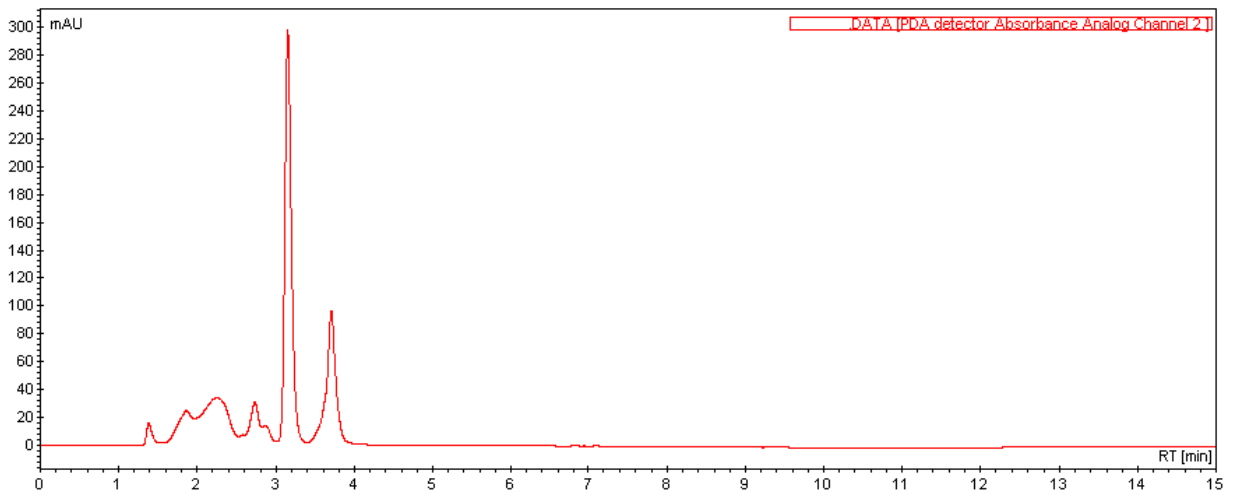


Figura 12 - Replicata 1 da análise do energético B 10% em CLAE
Fonte: Própria.

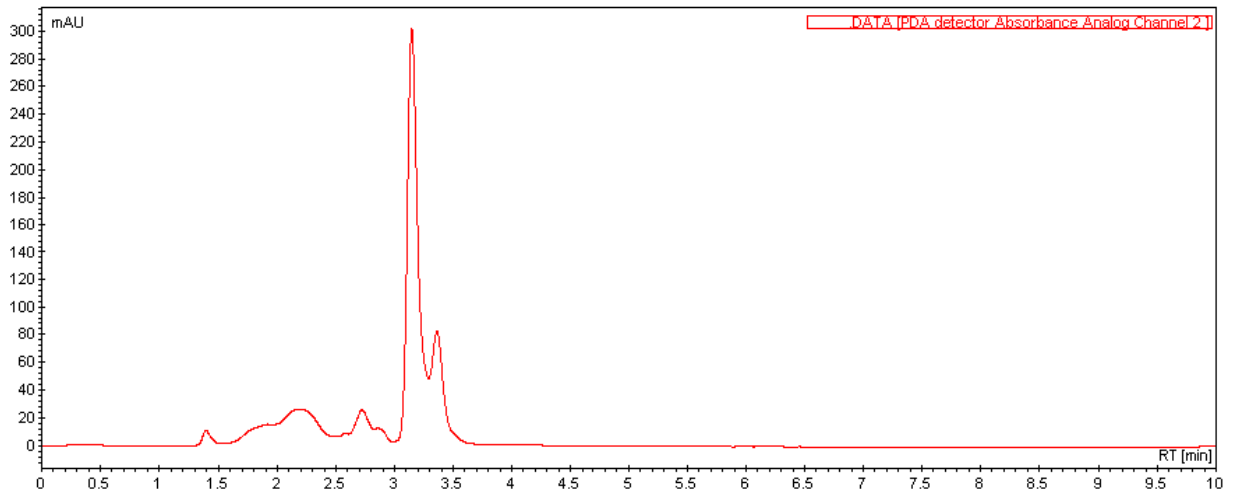


Figura 13 - Replicata 2 da análise de energético B 10% em CLAE
Fonte: Própria.

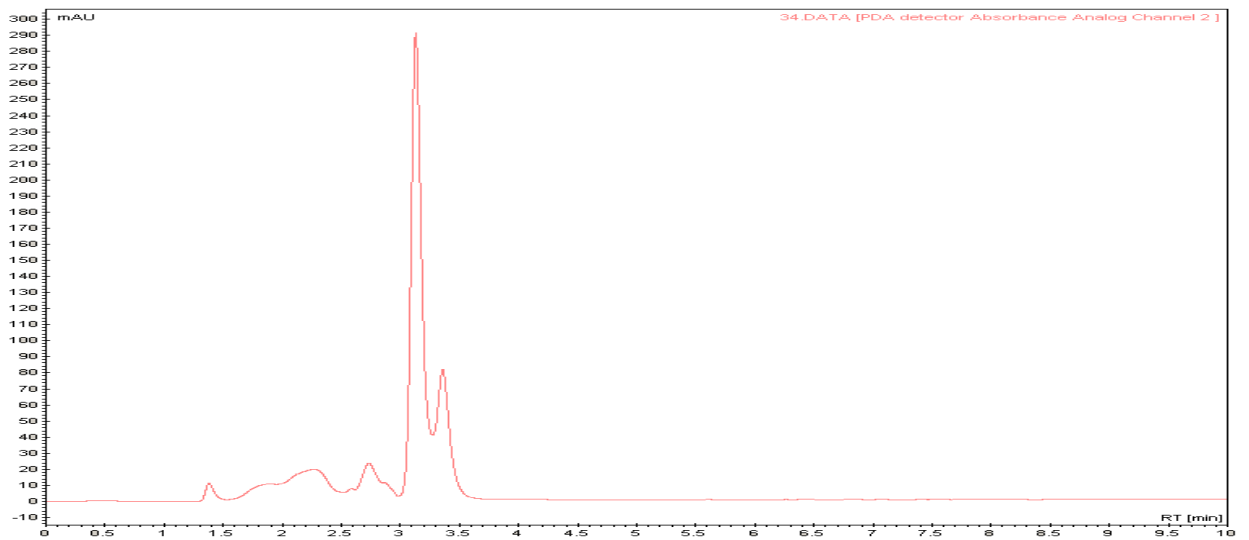


Figura 14 - Replicata 3 da análise do energético B 10% em CLAE
Fonte: Própria.

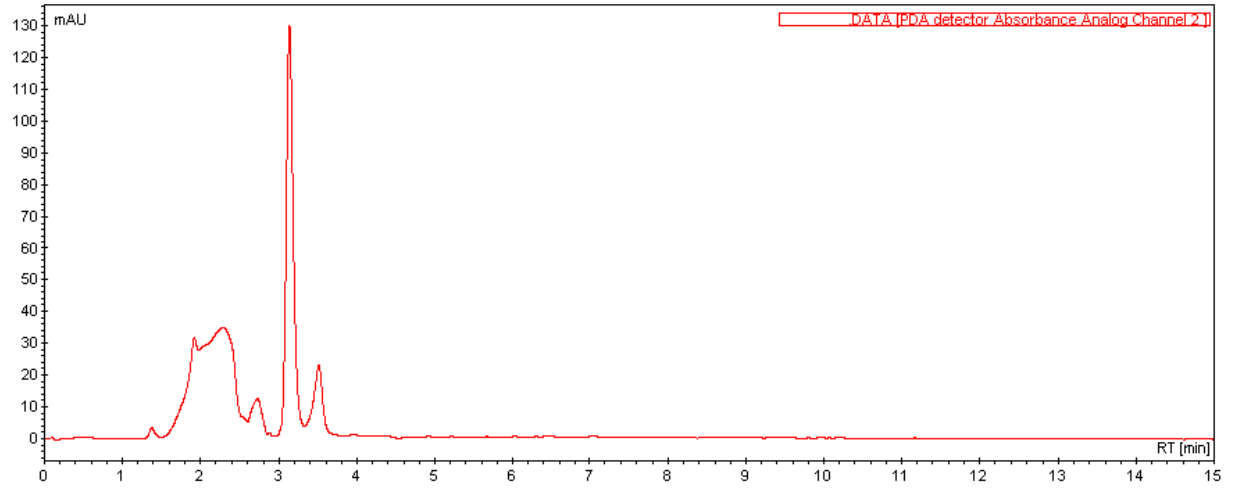


Figura 15 - Replicata 1 da análise do energético C 10% em CLAE
Fonte: Própria.

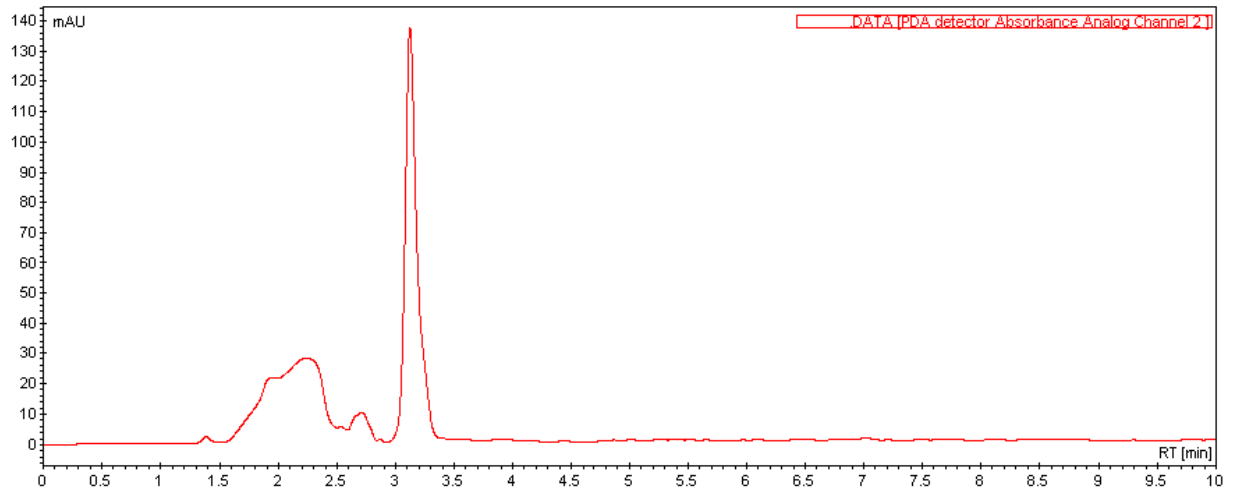


Figura 16 - Replicata 2 da análise do energético C 10% em CLAE
Fonte: Própria.

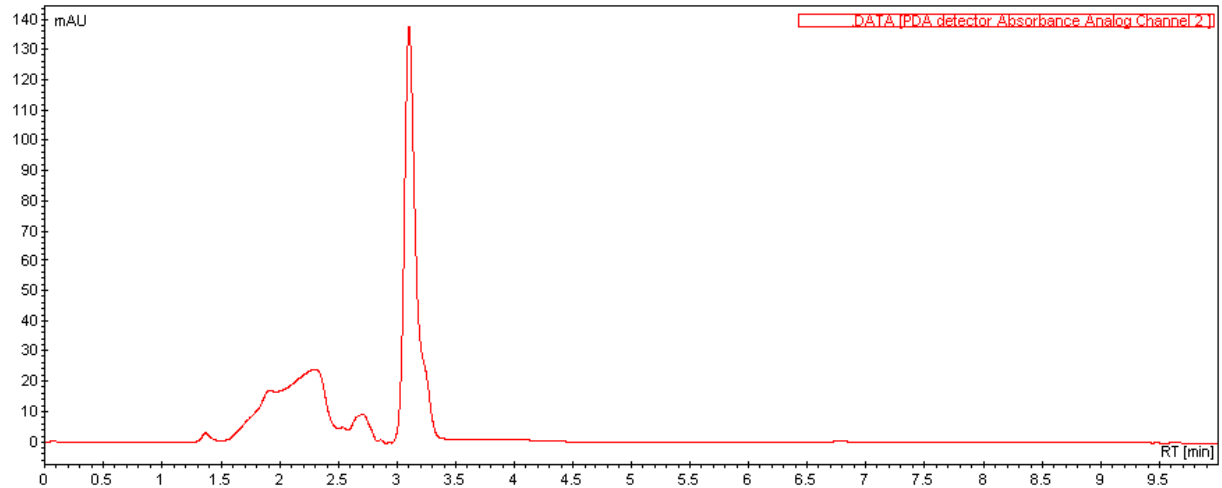


Figura 17 - Replicata 3 da análise do energético C 10% em CLAE
Fonte: Própria.

Nos cromatogramas apresentados pode-se observar claramente o pico que representa a cafeína presente nas amostras, no tempo de retenção aproximado de 3,1 minutos. As concentrações de cafeína presentes nos energéticos A, B e C, foram calculadas utilizando a equação da reta da curva padrão de cafeína (Figura 8), $y = 0,8348x + 1,1869$, na qual y representa a área do pico e x representa a concentração de cafeína. Os valores de área do pico de cada replicata dos energéticos utilizados nos cálculos foram retirados dos relatórios gerados pelo cromatógrafo.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das análises com CLAE, cujos dados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey tendo sido obtido uma diferença mínima significativa (Δ) de 40,2179 que aplicada as médias de concentração de cafeína obtidas pelo método cromatográfico geraram os coeficientes de diferenciação conforme notação indicada na Tabela 1. De uma forma geral, segundo o teste de Tukey as concentrações de cafeína nos produtos analisados diferiram significativamente entre si tendo o energético A e C apresentado a maior e a menor concentração de cafeína respectivamente.

Tabela 1 - Concentrações de cafeína encontradas nas diferentes marcas de energéticos analisados através do método cromatográfico (CLAE)

Energético	Concentração de cafeína (mg/L)			Média	Desvio padrão
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3		
A	280,46	290,05	296,04	288,85 ^a	7,85
B	337,96	376,30	354,73	356,33 ^b	19,22
C	153,49	189,42	184,63	175,84 ^a	19,50

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Própria.

Com relação ao método espectrofotométrico, foram realizadas as extrações da cafeína nos três energéticos em triplicata. Os extratos foram obtidos em balões volumétricos de 100 mL e completados os seus volumes com clorofórmio.

Para a determinação da concentração de cafeína nos extratos foi construída uma curva de calibração (Figura 18) com cinco padrões de diferentes concentrações de cafeína e medindo suas respectivas absorbâncias em espectrofotômetro a 272 nm (λ_{\max} . da cafeína).

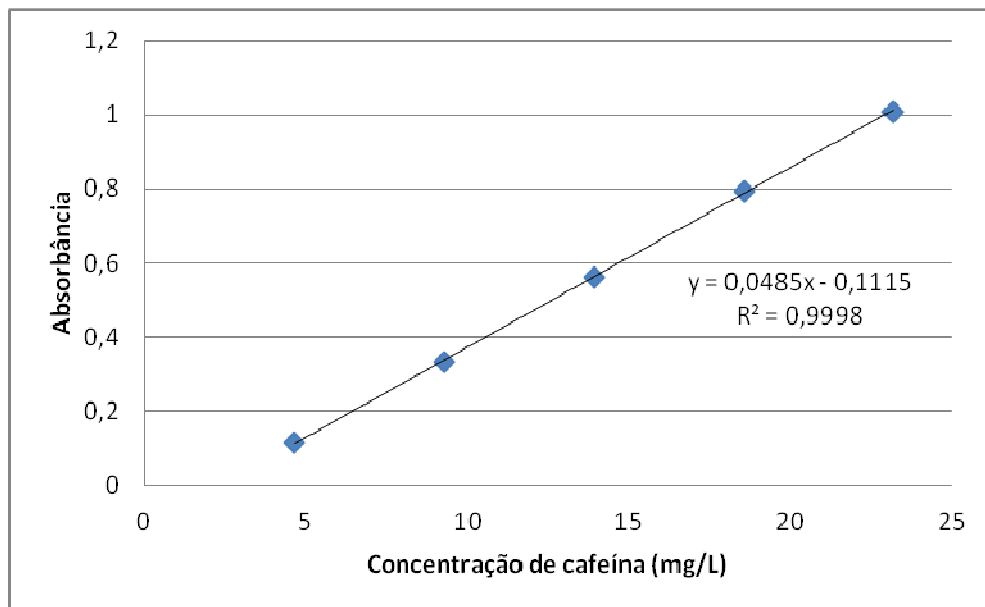


Figura 18 - Curva de calibração obtida através de espectrofotômetro

Fonte: Própria.

Em seguida, foram feitas as leituras dos extratos de cafeína dos energéticos A, B e C em espectrofotômetro no mesmo comprimento de onda. Na Tabela 2 são mostrados os valores de absorvância de cada extrato.

Tabela 2 - Valores de absorvância a 272 nm correspondente ao extrato de cada replicata dos energéticos

Energético	Replicata	Absorvância a 272 nm
A	1	0,25
A	2	0,241
A	3	0,233
B	1	0,183
B	2	0,184
B	3	0,186
C	1	0,072
C	2	0,07
C	3	0,068

Fonte: Própria.

As concentrações de cafeína nos energéticos analisados foram determinadas através da equação da reta da curva de calibração de cafeína (Figura 18), $y = 0,0485x - 0,1115$, na qual y representa a absorvância e x a concentração de cafeína em mg/L.

Na Tabela 3, são apresentados os resultados para as concentrações de cafeína nos energéticos através do método espectrofotométrico. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey tendo sido obtido uma diferença mínima significativa (Δ) de 10,5607 que aplicada as médias geraram os coeficientes de diferenciação conforme notação indicada. De uma forma geral, segundo o teste de Tukey as concentrações de cafeína nos produtos analisados diferiram significativamente entre si tendo o energético A e C apresentado a maior e a menor concentração de cafeína, respectivamente.

Tabela 3 - Concentrações de cafeína encontradas nas diferentes marcas de energéticos analisados através do método espectrofotométrico

Energéticos	Conc. de cafeína (mg/L)			Média	Desvio padrão
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3		
A	298,14	290,72	284,12	290,99 ^a	7,01
B	242,89	243,71	245,36	243,98 ^b	1,25
C	145,52	143,93	142,35	143,93 ^a	1,58

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Própria

Através da Tabela 4, pode se observar que, em comparação aos dois métodos de quantificação de cafeína em energéticos, apenas para o energético A o método espectrofotométrico apresentou um valor maior de cafeína, para B e C o método CLAE se sobressaiu apresentando resultados mais satisfatórios. Observando os resultados encontrados, pode-se concluir que nos energéticos B e C, a concentração de cafeína encontrada excede o valor prescrito no rótulo do produto, e que para o energético A, este valor se encontra a baixo do prescrito. Após aplicação do mesmo tratamento estatístico antes mencionado (análise de variância seguido do teste de Tukey) foram obtidas as diferenciações indicadas na Tabela 4. Segundo estes resultados é possível inferir que o método de referência (CLAE) e o método em estudo (espectrofotométrico) concordam entre si para a análise do analito para o caso dos energéticos A e C e discordam apenas para o caso do energético B

Tabela 4 - Comparação entre as concentrações de cafeína quantificadas pelos dois métodos em estudo e comparação com os dados fornecidos na embalagem do produto

Energéticos	Média das concentrações de cafeína (mg/L)		
	Espectrofotômetro	CLAE	Rótulo do energético
A	290,9933 ^{aA}	288,8500 ^{aA}	320
B	243,9867 ^{bA}	356,3300 ^{bB}	320
C	143,9333 ^{aA}	175,8467 ^{aA}	146,15

Letras minúsculas seguidas de letras iguais nas colunas e letras maiúsculas seguidas de letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Própria.

O teste de Tukey aplicado aos resultados apresentados na tabela 4, mostra que para os energéticos A e C, as concentrações de cafeína determinada pelos dois métodos de análise, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. O mesmo foi observado por Alves e Bragagnolo (2002), quando da quantificação de cafeína por espectrofotometria e cromatografia em amostras de chás.

Já para o energético B pode-se observar diferença nos resultados entre os dois métodos, isso se deve ao fato de que, nos cromatogramas do energético B, nas replicatas 2 e 3, pode se observar a interferência de outra substância que possui um tempo de retenção muito próximo ao da cafeína ocasionando uma sobreposição entre dois picos. Nas Figuras 19 e 20 pode-se observar o pico de cafeína e do suposto alcaloide, respectivamente. Pode-se confirmar que o pico apresentado no tempo de retenção de 3,1 minutos é o da cafeína, pois este indica uma substância que possui um λ_{max} de 272 nm característico da cafeína. O pico que se apresenta sobreposto ao da cafeína, representa uma substância que possui um λ_{max} de 226 nm, dentro da faixa de absorção de compostos aromáticos.

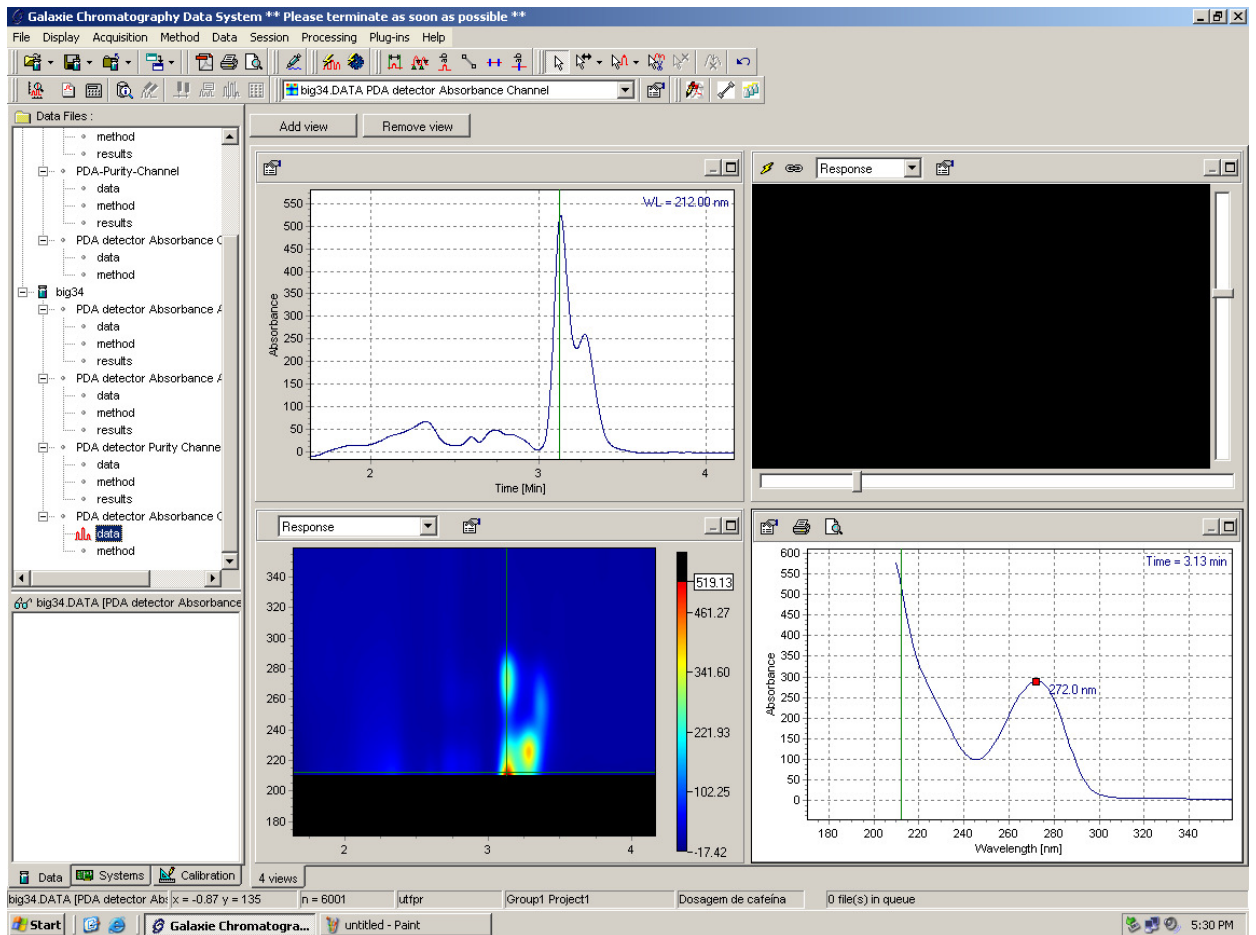


Figura 19 - Pico que representa a cafeína no energético B
Fonte: Própria.

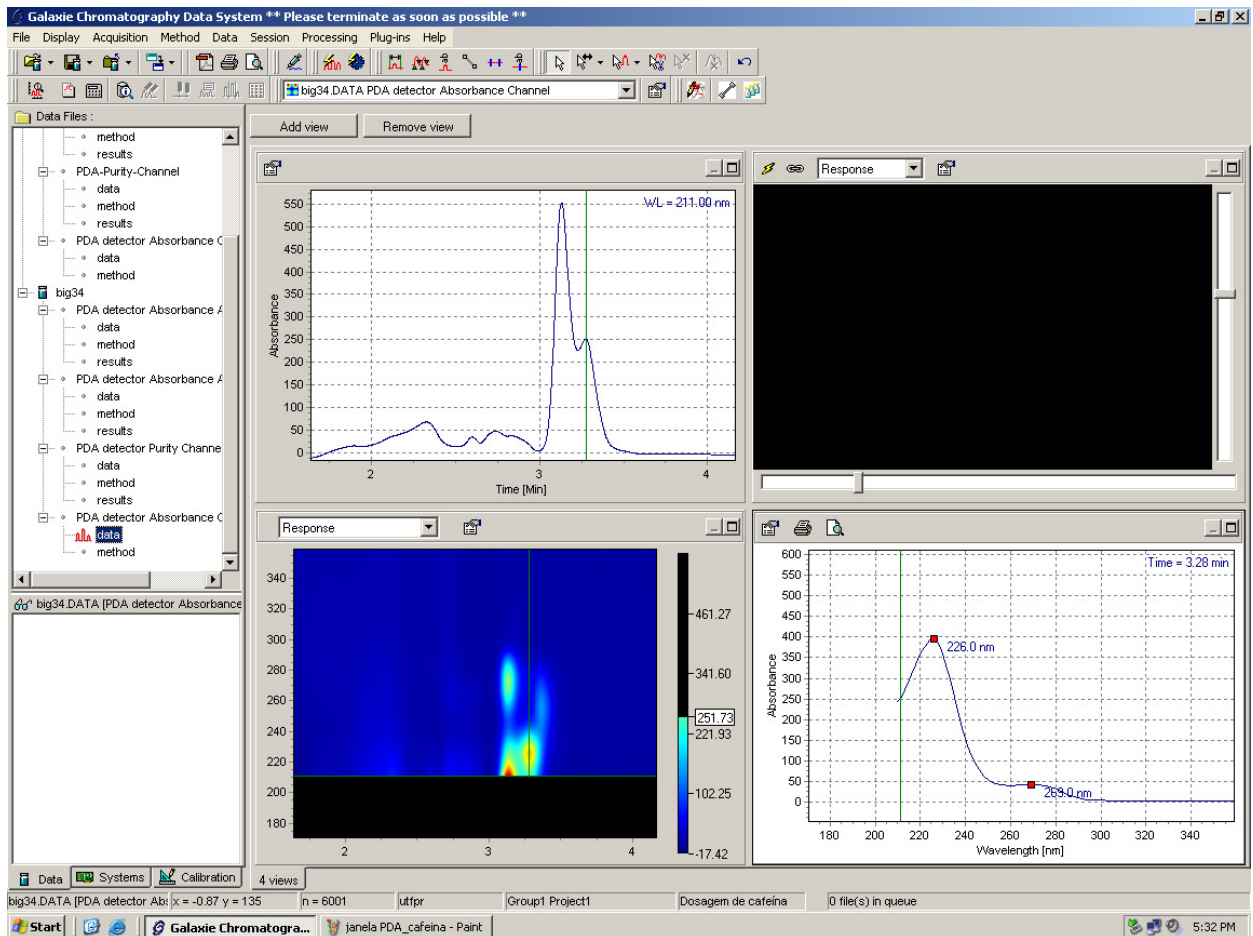


Figura 20 - Pico que representa a substância interferente
Fonte: Própria.

Esse fato indica a provável presença de outro alcaloide na composição do energético B e justifica a diferença nos resultados encontrados nos dois métodos para o energético em questão, pois para o método espectrofotométrico foi necessário um procedimento de extração da cafeína, e durante esta etapa, além da cafeína, pode ter sido extraído outra substância que, mesmo utilizando um comprimento de onda máximo para a absorção de radiação pela cafeína, pode ter interferido no valor da absorbância e conseqüentemente no valor da concentração de cafeína.

Portanto, considerando a boa aproximação dos resultados dos dois métodos para os energéticos A e C, e a justificável diferença para o energético B, pode-se afirmar que o método espectrofotométrico também pode ser utilizado como um método alternativo de quantificação de cafeína em laboratórios que não tem equipamentos mais sofisticados. Mas este método possui uma seletividade limitada,

pois outras metilxantinas ou outras substâncias aromáticas podem influenciar no resultado final, o que também foi observado por Alves e Bragagnolo (2002), quando da quantificação de cafeína por espectrofotometria e cromatografia em amostras de chás.

CONCLUSÃO

Através deste estudo pode-se concluir que os resultados apresentados para a concentração de cafeína nos energéticos analisados indicaram grande aproximação entre os resultados do método espectrofotométrico e o cromatográfico, mesmo com a justificável diferença para uma das amostras. Portanto, o método espectrofotométrico apresenta-se como um método alternativo de quantificação de cafeína em laboratórios de ensino e pesquisa que ainda não possuem um método padrão, mas apresenta uma baixa seletividade com relação a CLAE, pois outras substâncias aromáticas podem interferir nos resultados de quantificação do alcaloide estudado.

Ao analisarmos os valores detectados em relação à legislação, que prevê a adição de cafeína como ingrediente no limite máximo de 350 mg/L, verificamos que apenas uma amostra de energético (B), está ligeiramente acima do valor permitido (356,33 mg/L).

REFERÊNCIAS

ALTIMARI, Leandro R.; CYRINO, Edilson S.; ZUCAS, Sérgio M.; et al. Cafeína: ergogênico nutricional no esporte. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 57-64, jul. 2001. Disponível em: <<http://portalrevistas.ucb.br/index.php/RBCM/article/viewFile/395/448>> Acessado em: 11 out. 2010.

ALTIMARI, Leandro R.; CYRINO, Edilson S.; ZUCAS, Sérgio M.; et al. Efeitos ergogênicos da cafeína sobre o desempenho físico. **Rev. Paul. Educ. Fís.**, São Paulo, 14(2):141-58, jul./dez. 2000. Disponível em: <<http://edulife.com.br/dados/Artigos/Nutricao/Nutricao%20Esportiva%20e%20Suplementacao/Efeitos%20dos%20ergogenicos%20da%20cafeina.pdf>> Acessado em: 11 out. 2010.

ALTIMARI, Leandro R.; MORAES, Antonio C.; TIRAPEGUI, Julio; et al. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 1, jan/mar, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v42n1/29856.pdf>> Acessado em: 14 out. 2010.

ALVES, Adriana B.; BRAGAGNOLO, Neura. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 38, n. 2, abr./jun., 2002. Disponível em: <<http://www.cban.com.br/pdfs/teobromina.pdf>> Acessado em: 02 nov. 2010.

BALLISTRERI, Martha C.; CORRADI-WEBSTER, Clarissa M. O uso de bebidas energéticas entre estudantes de Educação Física. **Rev Latino-am Enfermagem**, mai./jun. 2008, 16(especial). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rlae/v16nspe/pt_09.pdf> Acessado em: 15 nov. 2011.

BRENELLI, Eugênia C. S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes – uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Quím. Nova** v. 26, n.1 São Paulo, jan./fev. 2003. Disponível em: <<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2003/vol26n1/22.pdf>> Acessado em: 20 out. 2010.

CIENFUEGOS, Freddy; VAITSMAN, Delmo. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

DE MARIA, Carlos A. B.; MOREIRA, Ricardo F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Quím. Nova** v. 30 n. 1, São Paulo, jan./fev. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n1/20.pdf>> Acessado em: 20 out. 2011.

HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HOLLER, F. J.; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

MELLO, Daniëlle; KUNZLER, Djuna K.; FARAH, Michelle. A cafeína e seu efeito ergogênico. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo v. 1, n. 2, p. 30-37, mar/abr. 2007. Disponível em: <http://rbne.com.br/wp-content/uploads/2008/10/ne_14_n2v1_30_37.pdf> Acessado em: 11 out. 2010.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Portaria n. 868, de 3 de novembro de 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/868_98.htm> Acessado em: 21 out. 2010.

VINADÉ, Maria E. C.; VINADÉ, Elsa R. C. **Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa**. Santa Maria: UFSM, 2005.

ZENI, Ana. Os perigos das bebidas energéticas em crianças e adolescentes. **Artigonal: Diretório de Artigos Gratuitos**, 2009. Disponível em: <<http://www.artigonal.com/medicina-alternativa-artigos/os-perigos-das-bebidas-energeticas-em-criancas-e-adolescentes-960513.html>> Acessado em: 15 nov. 2010.