

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

RENAN SILVA MARIANO

**DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM BEBIDAS ESTIMULANTES
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E ESPECTROFOTOMETRIA
UV-Vis**

LONDRINA

2018

RENAN SILVA MARIANO

**DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM BEBIDAS ESTIMULANTES
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E ESPECTROFOTOMETRIA
UV-Vis**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Kienen

LONDRINA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM BEBIDAS ESTIMULANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

por

RENAN SILVA MARIANO

Este projeto de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 07 de dezembro de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciatura em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Professora Orientadora
Prof^a. Dra. Vanessa Kienen

Membro 1
Prof^a. Dra. Amélia Elena Terrile

Membro 2
Prof^a. Dra. Alessandra Stevanato

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus por ter me guiado nos momentos mais difíceis dessa caminhada acadêmica.

Ao meu pai Reginaldo Mariano e à minha mãe Ionice Pereira da Silva que desde a infância me incentivaram os estudos à qualquer custo independente das dificuldades.

À professora Dra. Vanessa Kienen por ter me orientado e colaborado para o desenvolvimento desse trabalho acadêmico e ter contribuído de maneira construtiva com seus conhecimentos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Londrina por ter me promovido novas amizades e ter sido lócus de aprendizado acadêmico e científico.

MARIANO, Renan S. **Determinação de cafeína em bebidas estimulantes por cromatografia líquida e espectrofotometria UV-Vis.** 2018. 66 p. Trabalho de conclusão de curso de Licenciatura em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, PR.

RESUMO

A cafeína é considerada uma das drogas legais mais consumidas no mundo e sua composição está presente em algumas plantas como guaraná, mate, café e ervas, no entanto, desempenhou um papel importante na produção de bebidas desde a antiguidade. Nesse contexto, esse trabalho tem como objetivo determinar concentrações de cafeína, em amostras de café solúvel, chá, bebidas energéticas, refrigerante e suplemento à base de cafeína. O consumo excessivo desses alimentos que contém cafeína pode acarretar riscos à saúde humana e, frente essa problemática, três bebidas energéticas de marcas diferentes (E_1 , E_2 e E_3), três amostras de café solúveis, comum, *gourmet* e descafeinado (C_1 , C_2 e C_3), duas marcas de chá, mate e preto (T_1 e T_2), dois refrigerantes à base de cola, comum e cafeinado (R_1 e R_2), e um suplemento à base de cafeína (S) foram analisadas por meio de duas metodologias analíticas: Cromatografia Líquida e Espectrofotometria UV-Vis. Em relação às análises cromatográficas as amostras E_1 , E_2 e E_3 apresentaram concentrações de cafeína de 50,300; 53,316 e 55,256 mg/200mL, respectivamente. As amostras de C_1 , C_2 e C_3 apresentaram 5,520; 5,160 e 1,190 mg.g⁻¹. As amostras de chá (T_1 e T_2) apresentaram 22,135 e 76,320 mg.L⁻¹. As amostras de refrigerante à base de cola preto (R_1 e R_2) apresentaram 21,886 e 32,438 mg/220 mL e o suplemento à base de cafeína apresentou 468,65 mg/530mg. Para as análises espectrofotométricas apenas foram analisadas as amostras C_1 , E_1 e R_1 , tendo em vista a necessidade de uma grande utilização de clorofórmio nas análises. Na determinação espectrofotométrica a amostra C_1 apresentou concentração de cafeína de 6,692 mg.g⁻¹, a bebida energética E_1 de 66,500 mg/200 mL e o chá preto T_2 de 86,77 mg.L⁻¹. A metodologia mais viável e que necessitou de um menor número de etapas para a preparação da amostra foi a Cromatografia Líquida, uma vez que as amostras foram o tratadas com MgO para a redução de interferentes que pudessem comprometer a análise.

MARIANO, Renan S. **Determinação de cafeína em bebidas estimulantes por cromatografia líquida e espectrofotometria UV-vis.** 2018. 66 p. Trabalho de conclusão de curso de Licenciatura em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, PR.

ABSTRACT

Caffeine is one of the most legal drugs consumed in the world and its composition is present in some plants like guarana, mate, coffee and herbs, however, played an important role in producing beverages from an antiquity. In this context, this work aims to determine concentrations of caffeine, in samples of soluble coffee, tea, energy drinks, soft drink and caffeine supplement. Excessive consumption of these foods containing caffeine may pose risks to human health and, in the face of this problem, three energy drinks of different brands (E_1 , E_2 and E_3), three coffee samples, coffee common, *gourmet* and decaffeinated (C_1 , C_2 and C_3), two brands of tea, mate and black (T_1 and T_2), two common and caffeinated cola (R_1 and R_2), and a supplementation based on caffeine (S) were analyzed using two analytical methodologies: Liquid Chromatography and UV-Vis Spectrophotometry. In relation to the chromatographic analyzes the samples E_1 , E_2 and E_3 presented caffeine concentrations of 50,300; 53.316 and 55.256 mg / 200 mL, respectively. The samples of C_1 , C_2 and C_3 presented 5.520; 5,160 and 1,190 mg.g⁻¹. Tea samples (T_1 and T_2) presented 22,135 and 76,320 mg.L⁻¹. Black cola (R_1 and R_2) samples showed 21.886 and 32.438 mg / 220 mL and the caffeine supplement presented 468.65 mg / 530 mg. For the spectrophotometric analyzes only the C_1 , E_1 and R_1 samples were analyzed, considering the necessity of a great use of chloroform in the analyzes. In the spectrophotometric determination the sample C_1 presented a caffeine concentration of 6,692 mg.g⁻¹, the energy drink E_1 of 66,500 mg/200 mL and that of cola-based refrigerant of 86.77 mg.L⁻¹. The most feasible methodology was which required less work was that of Liquid Chromatography, since in the preparation of the samples there was the treatment with MgO for the reduction of interferes that could compromise the analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de Cafeína	16
Figura 2 - Estrutura química das xantinas	17
Figura 3 - Componentes de um equipamento para CL.....	21
Figura 4 - Passagem de radiação em uma amostra	23
Figura 5 - Diagrama esquemático espectrofotométrico	25
Figura 6 - Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000.....	29
Figura 7 - Espectrofotômetro Libra S60.....	30
Figura 8 - Amostras de refrigerante à base de cola (R1 e R2) após o tratamento com MgO.....	32
Figura 9 - Amostras de bebidas energéticas (E1, E2 e E3) após o tratamento com MgO.....	33
Figura 10 - Amostras de suplemento à base de cafeína (S) após o tratamento com MgO.....	33
Figura 11 - Amostras café solúvel (C1, C2 e C3) após o tratamento com MgO	34
Figura 12 - Amostras de chá após o tratamento com MgO	34
Figura 13 - Funil de separação entre a fase aquosa da fase orgânica da bebida energética.....	36
Figura 14 - Funil de separação entre a fase aquosa da fase orgânica de chá preto.	36
Figura 15 - Curva de calibração da cafeína para CL	39
Figura 16 - Cromatograma 20 mg L ⁻¹ do padrão de cafeína. Condições: Fase móvel água /metanol (65:35), injeção de 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18.....	40
Figura 17 - Cromatograma da amostra C ₁ . Condições: Fase móvel água /metanol (65:35), injeção de 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18.....	41
Figura 18 - Cromatograma da amostra C ₂ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	42
Figura 19 - Cromatograma da amostra C ₃ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	42
Figura 20 - Cromatograma da amostra E ₁ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	44

Figura 21 - Cromatograma da amostra E ₂ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	45
Figura 22 - Cromatograma da amostra E ₃ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	45
Figura 23 - Cromatograma da amostra R ₁ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	47
Figura 24 - Cromatograma da amostra R ₂ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	47
Figura 25 - Cromatograma da amostra T ₁ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	49
Figura 26 - Cromatograma da amostra T ₂ . Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	49
Figura 28 - Curva de calibração da cafeína para Espectrofotometria.....	53
Figura 29 - Espectro da solução padrão de cafeína 1,0 mg L ⁻¹	54
Figura 30 – Espectro da amostra de café solúvel C ₁	55
Figura 31 - Espectro da amostra de bebida energética E ₁	56
Figura 32 - Espectro da amostra de chá preto (T ₂).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de cafeína em alimentos.....	18
Tabela 2 - Faixa de comprimento de onda para cubetas.....	26
Tabela 3 - Dados para construção da curva de calibração.....	39
Tabela 4 - Relação da área do pico com as concentrações	41
Tabela 5 – Concentrações de cafeína nas amostras de café solúvel	43
Tabela 6 - Concentrações de cafeína nas amostras de bebidas energéticas..	46
Tabela 7 - Concentrações de cafeína nas amostras de refrigerantes à base de cola.....	48
Tabela 8 - Concentrações de cafeína nas amostras chá.....	50
Tabela 9 - Concentrações de cafeína na amostra de suplemento a base de cafeína.....	51
Tabela 10 - Dados para construção da curva analítica espectrofotométrica....	52
Tabela 11 - Concentração obtida por espectrofotometria de cafeína	55
Tabela 12 - Comparação de metodologias analíticas para determinação da concentração de cafeína	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	JUSTIFICATIVA.....	14
4	REFERENCIAL TEÓRICO	15
4.1	A HISTÓRIA DA CAFEÍNA	15
4.2	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA CAFEÍNA	17
4.3	EFEITOS DA CAFEÍNA NA SAÚDE.....	17
4.4	ALIMENTOS QUE CONTÉM CAFEÍNA.....	18
4.5	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA.....	19
4.5.1	Cromatografia.....	19
4.5.2	Espectroscopia.....	23
4.5.3	Limites de Detecção e Limite de Quantificação.....	26
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	MATERIAIS	28
5.1.1	Amostras.....	28
5.1.2	Reagentes.....	28
5.1.3	Vidrarias	28
5.1.4	Materiais diversos	28
5.1.5	Equipamentos.....	29
5.2	MÉTODOS	30
5.2.1	Curva de calibração	30
5.2.2	Preparo de amostras	31
5.2.3	Determinação de cafeína – Cromatografia.....	37
5.2.4	Determinação de cafeína – Espectrofotometria.....	37
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6.1	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CAFEÍNA - CL.....	38
6.1.1	Café solúvel.....	41
6.1.2	Bebidas Energéticas.....	44
6.1.3	Refrigerantes à base de cola	46

6.1.4	Chá em sachê.	48
6.1.5	Suplemento energético.....	50
6.2	Curva de Calibração – Espectrofotometria	52
6.2.1	Café solúvel.....	55
6.2.2	Bebida Energética.....	56
6.2.3	Chá preto	56
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Muitas substâncias estimulantes são consumidas há séculos. A cafeína é considerada uma das drogas legais mais consumidas no mundo e com aceitação social em cerca de 90% dos adultos consumindo em seus hábitos alimentícios. Sua composição está presente em algumas plantas como guaraná, mate, café e ervas, no entanto, desempenhou um papel importante na produção de bebidas desde a antiguidade (BURKE, 2008).

Há algumas décadas, bebidas estimulantes que contém cafeína como o chá e o café têm sido consumidas por muitas pessoas, seja para incrementar a resistência física e maior concentração ou para evitar o sono (BELLISTRERI; CORRADI-WEBSTER, 2008).

A cafeína é considerada uma droga do grupo dos estimulantes do sistema nervoso central. Seu efeito sobre o organismo baseia-se em aumentar o estado de alerta e reduzir a sensação de fadiga, além de ser um estimulante diurético. A ingestão em dose elevada de cafeína pode causar excitação, irritabilidade ansiedade e insônia nos indivíduos (GUERRA; BERNARDO; GUTIÉRREZ, 2000).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018), doses únicas de 200 mg/dia (aproximadamente 3 mg/kg para um adulto de 70 kg) até 400 mg/dia (5,7 mg/kg), a partir de todas as fontes alimentares, são seguras para uma população adulta, exceto pra mulheres grávidas, que devem consumirem doses em torno de 200 mg/dia.

Segundo Buergue et al (2003) na indústria farmacêutica a cafeína tem contribuído no efeito de alguns analgésicos que são utilizados no combate à gripe, dores de cabeça e também como estimulante cardíaco, cerebral e diurético.

Em relação às determinações analíticas, existem vários métodos de quantificação da cafeína e outros alcaloides. O método mais antigo adotado para análise de produtos alimentícios foi a gravimetria. A técnica baseia-se na extração do produto com água e metanol e limpeza do filtrado com óxido de magnésio seguida da extração com clorofórmio. Entretanto, além de ser um

método de longa duração, nem todos os interferentes são removidos (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

A espectrofotometria UV-Vis também é um método analítico de determinação de cafeína, e apresenta um limite máximo de absorção no comprimento de onda entre 271 e 275 nm. A quantificação da cafeína é conduzida com base na análise da absorbância no comprimento de onda na faixa de 272 à 275 nm (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é atualmente chamada de Cromatografia Líquida (CL) e é o método analítico mais utilizado para determinação de cafeína em alimentos, uma vez que esse método apresenta, além da eficiência, sensibilidade, especificidade e rapidez nas análises. A identificação desse composto é realizada por meio de comparação dos tempos de retenção das amostras com seus padrões (NAIKE, 2001).

Tendo em vista a cafeína estar presente em distintas bebidas e alimentos muito consumidos no mundo inteiro, esse trabalho verificou os teores de cafeína em bebidas estimulantes. Tais teores foram quantificados por meio de dois métodos: Cromatografia Líquida (CL) e Espectrofotometria UV-Vis. Dessa forma avaliou-se qual a metodologia mais eficiente e economicamente viável para a quantificação da cafeína.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Quantificar e comparar o teor de cafeína em bebidas estimulantes por Cromatografia Líquida e por Espectrofotometria UV-Vis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar quantitativamente o teor de cafeína em energéticos, refrigerantes a base de cola, chás (preto e de erva mate), suplemento à base de cafeína e café solúvel (comum e descafeinado) por Cromatografia Líquida e por Espectrofotometria UV-Vis.

- Comparar a eficiência dos métodos de determinação analítica.
- Analisar e comparar os resultados obtidos com a legislação determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

- Comparar os resultados obtidos com a quantidade fornecida na embalagem.

3 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas tem se observado um aumento considerável no consumo de bebidas estimulantes industrializados (café, energéticos, chás e cápsulas de cafeína), seja para aumentar o estado de alerta, ou para melhorar o desempenho em exercícios físicos.

Segundo Arruda et al (2009), o café é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Já no Brasil, em 2007, o mercado representou 14% da demanda mundial, com um consumo de cerca de 4,42 kg de café torrado por habitante por ano, ou seja, em média 70 L por pessoa.

Uma pesquisa mais recente registra que o consumidor brasileiro não reduziu o consumo de café em 2017, mesmo diante da crise econômica. O crescimento de 3,6% é o dobro do crescimento médio mundial e significa que a indústria consumiu mais 771.800 sacas do que em 2016 (ABIC, 2017).

O café, é o principal alimento fornecedor de cafeína, possuindo de 1 a 2,5% do composto. Possui também ácidos clorogênicos responsáveis pela atividade antioxidante da bebida. Em razão do consumo cada vez maior nos últimos anos, a análise quantitativa desses componentes ganha mais importância em estudos científicos (ABIC, 2017).

Dessa maneira, a determinação da concentração de substâncias componentes é de fundamental importância na indústria de alimentos, uma vez que diversos componentes alimentares, caso sejam consumidos de maneira excessiva, podem acarretar problemas à saúde (KNUPP, 2015).

Em função desse consumo, o presente trabalho visa à quantificação de cafeína em bebidas estimulantes, tanto por meio da Cromatografia Líquida (CL) quanto para a Espectrofotometria UV-Vis, para que se possam analisar as eficiências dos métodos e compará-los com as determinações pré-estabelecidas pela ANVISA e também com os valores disponibilizados na embalagem das bebidas analisadas.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

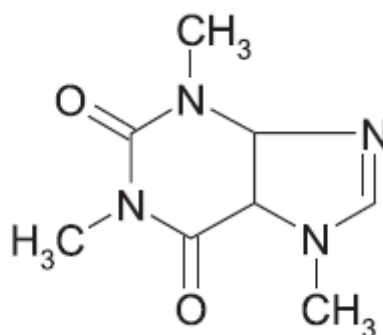
4.1 A HISTÓRIA DA CAFEÍNA

A cafeína está presente em mais de 60 espécies de plantas distribuídas por diversas regiões do planeta. Dentre essas plantas as principais são: grãos de café e cacau, folhas de chá verde, as sementes de cola e guaraná e erva-mate. Relatos constam que a cafeína é consumida há vários milênios por chineses. De acordo com uma lenda popular chinesa, acidentalmente o imperador Shennong descobriu que folhas que caíam em recipientes com água fervente originavam em uma bebida perfumada e estimulante, o chá (MENDES; GALACHO, 2012).

Quando relacionada ao café, sua fonte mais conhecida, acredita-se que o efeito da cafeína foi detectado quando um pastor de cabras etíope percebeu que seu rebanho ficava mais agitado após o consumo do fruto do café. Na Europa, o café surgiu no século XVI, com os espanhóis e holandeses em suas rotas de descobrimento, comercializando e disseminando para o resto da Europa. O processo de descafeinação foi descoberto na Alemanha em 1903 quando alguns pesquisadores visaram obter processos de remoção da cafeína sem que o sabor do café sofresse alterações. Tal processo foi importantíssimo para a produção de cafeína na indústria (MENDES; GALACHO, 2012).

A cafeína foi separada pela primeira vez do café em 1819 pelo químico alemão Frielieb Ferdinand Runge que denominou o composto isolado por *kaffebase* (a base que vem do café). Anos depois, os químicos e pesquisadores franceses Pierre Jean Robiquet e Joseph Bienaimé Caventou, isolaram o composto em questão e o termo *cafféine* foi designado pela primeira vez (MENDES; GALACHO, 2012).

Entre os anos 1893 e 1895 entrou em cena o químico alemão Hermann Emil Fischer, prêmio Nobel da Química em 1902, no qual descobriu o processo de síntese total e determinação da fórmula estrutural da cafeína (Figura 1) (MENDES; GALACHO, 2012).

Figura 1 - Molécula de Cafeína

Fonte: (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Segundo Neves (2010), as primeiras pesquisas sobre a cafeína no Brasil ocorrem no início do século XX, período de grande expansão do comércio do café. Um artigo científico publicado na “Revista Médica de São Paulo” de autoria do Dr. Mathias Valladão, abordou aspectos bioquímicos da cafeína com base nos trabalhos de Fischer.

De acordo Neves (2010), Mathias Valladão cita em seu artigo:

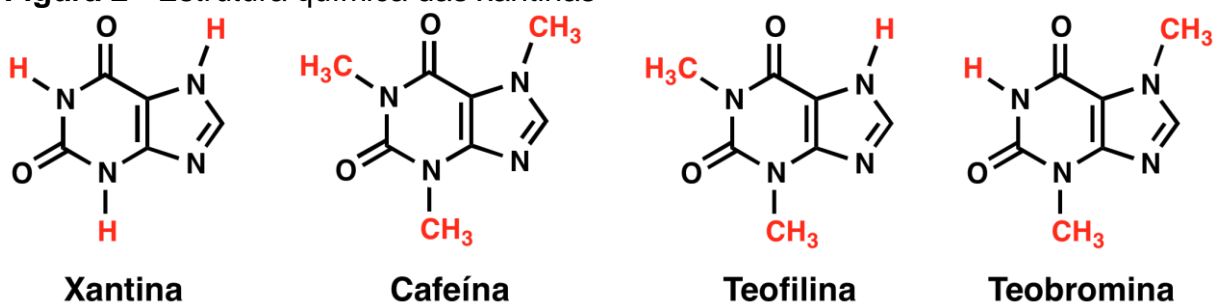
“Provaram os trabalhos de Emil Fischer não ser a cafeína um elemento de todo estranho ao organismo. E as suas relações com a xantina, a guanina e adenina, com as substâncias mais características que entram na composição química do núcleo celular, que é morfológicamente a parte mais importante da célula viva, já deixam entrever a sua influência sobre as funções vitais. É, sobretudo pelas suas propriedades em relação com as células nervosas das camadas corticais do cérebro, como estimulante cerebral, que adquire a cafeína uma grande importância. Ela ocupa mesmo um lugar inteiramente a parte entre os excitantes encefálicos. Só ela atua como um verdadeiro estimulante, por ação direta sobre os centros nervosos, e é susceptível de produzir um melhoramento real das funções cerebrais. Todos os demais agentes químicos da estimulação cerebral são substâncias que, graças a sua volatilidade, exercem um efeito local irritante muito intenso.”

4.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA CAFEÍNA

A cafeína é um composto químico presente em alimentos comumente consumidos em todo mundo. Refrigerantes, energéticos, chocolates, chás, e claro, o café, são os alimentos que contém quantidade significativa de cafeína. É usada também na forma de suplementos alimentares, utilizados normalmente por atletas para melhorar o desempenho nos exercícios físicos (LOPES, 2015).

Segundo a IUPAC a nomenclatura da cafeína é 1,3,7-trimetilxantina e assim como a teobromina e a teofilina são alcaloides da família das metilxantinas. Tem massa molecular 194 g mol^{-1} e é conhecida também usualmente como dioxipurina, teína, guaranina e metilteobromina. Possui aspecto branco e amargo, sem aroma, com solubilidade variável em água. Uma xícara de café de aproximadamente 150 mL de infusão contém entre 100 e 250 mg de cafeína. Sua estrutura química, assim como a teobromina e teofilina, é denominada de xantina, representadas na Figura 2 (FILHO, 2010).

Figura 2 - Estrutura química das xantinas



Fonte: (PIRES, 2013).

4.3 EFEITOS DA CAFEÍNA NA SAÚDE

Segundo Burke (2008) a cafeína é uma substância de caráter estimulante que contribui na redução de algumas fadigas musculares, no aumento da concentração e melhoria no rendimento em atividades físicas.

A cafeína, além de possuir características estimulantes, possui também propriedades diuréticas e relaxadoras de músculos lisos, além de serem altamente exploradas na indústria farmacêutica (ACHESON et al, 2004).

É considerada uma droga psicotrópica que age no sistema nervoso central e seu consumo pode contribuir no aumento do estado de alerta. Ao nível celular, a cafeína age como um aceptor de adenosina e o consumo em doses elevadas pode levar o indivíduo a ter excitação, ansiedade e insônia (GUERRA; BERNARDO; GUTIÉRREZ, 2000).

4.4 ALIMENTOS QUE CONTÉM CAFEÍNA

Como mencionado, de maneira natural, a cafeína está presente no café, cacau e algumas ervas. Entretanto a cafeína é adicionada artificialmente em diversos produtos como refrigerantes de cola, bebidas energéticas e formulações farmacêuticas. A Tabela 1 apresenta alguns alimentos e seus respectivos teores aproximados de cafeína.

Tabela 1 - Teor de cafeína em alimentos.

Bebida/Alimento	Quantidade	Teor de cafeína (mg)
Café filtrado	150 mL	50 – 175
Café solúvel	150 mL	40 – 120
Café descafeinado	150 mL	1 – 6
Chá preto (infusão 1 – 5 minutos)	150 mL	30 – 50
Chá (folhas)	150 mL	20 – 30
Refrigerante de cola	150 mL	15 – 24
Refrigerante tipo cola diet	150 mL	13 – 26
Energético	150 mL	45
Chocolate	30 g	20 - 120

Fonte: (Adaptado de MENDES; GALACHO, 2012).

4.5 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA

Diversos são os métodos utilizados e encontrados na literatura científica para determinação de cafeína. Os principais métodos são: Gravimetria, Espectrofotometria UV-Vis, Eletroforese Capilar, Eletroanálise, Espectroscopia de Infravermelho, Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Os métodos mais eficientes, encontrados na literatura foram a Cromatografia Líquida e a Espectrofotometria UV-Vis.

4.5.1 Cromatografia

A cromatografia compreende um grupo de métodos que permitem separação, identificação e determinação de diversas substâncias de complexidades diversas. Basicamente existem dois tipos de cromatografia, a planar e a em coluna. Na primeira uma fase estacionária é suportada sobre uma placa plana ou nos poros de um papel. Nas separações cromatográficas em coluna a amostra é transportada por uma fase móvel. Essa fase móvel é forçada a ser transportada através de uma fase estacionária imiscível fixa colocada em uma coluna ou sobre uma superfície sólida. As duas fases são selecionadas de modo que os componentes da amostra organizem-se entre as fases móvel e estacionária em diferentes graus. Os componentes que são retidos na fase estacionária movem-se lentamente pela fase móvel. Já os componentes que têm interação mais fraca com a fase estacionária movem-se de maneira mais rápida. Em virtude dessas distintas velocidades de migração, os componentes da amostra são separados por bandas ou zonas que podem ser analisadas e determinadas quantitativamente e qualitativamente (SKOOG et al, 2009).

Três são os métodos cromatográficos em coluna. O quadro 1 registra as classificações e seus métodos específicos.

Quadro 1 - Classificação dos métodos cromatográficos em coluna.

Classificação geral	Método específico	Fase estacionária	Tipo de equilíbrio
Cromatografia em fase gasosa	Gás-líquido	Líquido adsorvido ou ligado a uma superfície sólida	Partição entre gás e líquido
	gás-sólido	Sólido	Adsorção
Cromatografia líquida	Líquido-líquido (fase quimicamente ligada)	Líquido adsorvido ou ligado a uma superfície sólida	Partição entre líquidos imiscíveis
	Líquido-sólido	Sólido	Adsorção
	Troca iônica	Resina de troca iônica	Troca iônica
	Exclusão por tamanho	Líquidos dos interstícios de um sólido polimérico	Partição/exclusão
	Afinidade	Grupo específico ligado a uma superfície sólida	Partição entre um líquido na superfície e líquido da fase móvel
Cromatografia com fluido supercrítico		Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Partição entre fluido supercrítico e espécies líquidas ligadas à superfície

Fonte: (SKOOG et al, 2009).

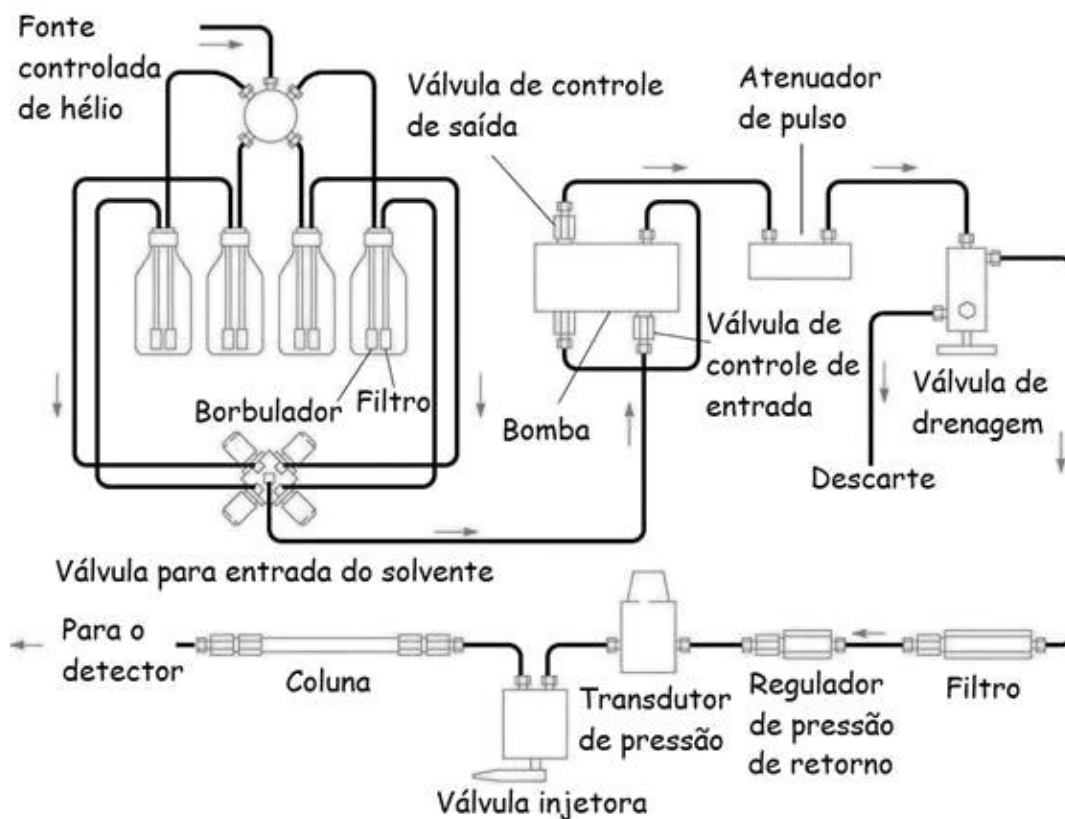
4.5.1.1 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é a mais utilizada dentre os métodos analíticos de separação em função de sua detectabilidade e adaptabilidade às determinações analíticas com exatidão, de sua adequação para separação de compostos não voláteis e sua aplicação em compostos de interesse para a indústria (SKOOG et al, 2009).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou do inglês *High-Performace Liquid Chromatography* (HPLC) atualmente vem sendo denominada simplesmente de Cromatografia Líquida (CL) e seu funcionamento utiliza elevadas pressões para que o solvente passe através de colunas fechadas que contém partículas capazes de realizar separações muito eficientes. Basicamente, um equipamento de CL (Figura 3) possui um amostrador automático, um sistema de distribuição do solvente, uma válvula de

injeção da amostra, uma coluna de alta pressão e um detector (HARRIS, 2013).

Figura 3 - Componentes de um equipamento para CL



Fonte: (SKOOG et al, 2009).

Segundo Collins et al. (p. 361, 2006) “a coluna de separação é considerada o coração do sistema cromatográfico, uma vez que é responsável pela separação dos componentes presentes na amostra”.

As colunas utilizadas na CL degradam com certa facilidade pela ação de partículas sólidas presentes na amostra ou no solvente, para tanto, é importante que as amostras sejam centrifugadas e filtradas antes de serem introduzidas nos sistemas de injeção (HARRIS, 2013).

Para utilização do equipamento da CL é necessário que se tenha uma fase móvel e estacionária. A fase estacionária mais comum é constituída por partículas microporosas de sílica, que são permeáveis ao solvente e possuem área superficial de centenas de metros quadrados por grama. A fase móvel compreende uma série de solventes que são capazes de deslocar (eluir) solutos. Os solventes utilizados para eluição devem ter alto grau de pureza

para evitar possíveis degradações das colunas cromatográficas e minimizar o sinal de fundo do detector causado por contaminantes (HARRIS, 2013).

Segundo Lanças (2009), uma fase móvel ideal deveria possuir ao menos alguns requisitos: solubilizar completamente todos os componentes da amostra, apresentar baixa reatividade, viscosidade e toxicidade além de estar disponível em elevado grau de pureza e, quando possível, baixo custo.

Difícilmente é utilizado apenas um solvente para separações em CL, em função das dificuldades em otimizar a força do solvente e a seletividade dentro da faixa de solventes normalmente empregadas na técnica (LANÇAS, 2009).

Dessa forma, é possível haver dois tipos de fases móveis de acordo com a cadeia alifática ligada à sílica. Se no final dessa cadeia alifática existir um grupo polar, tem-se uma cromatografia de fase normal, em que a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. Caso a cadeia alifática seja apolar, tem-se a cromatografia de fase reversa, no qual a fase estacionária possui polaridade menor que a fase móvel. Assim, em fase reversa, quanto maior o comprimento da cadeia, maior o fator de retenção. Dentre as fases estacionárias a mais utilizada é a de Octadecilsilano (C18), uma fase estacionária de baixa polaridade, utilizada na fase reversa além dos grupos octil (-C₈H₁₇) e fenil (-C₆H₅) (COLLINS et al, 2006).

Com relação à detecção de sinais em cromatografia líquida, os detectores espectrofotométricos UV-Vis são os mais utilizados, pois a maioria dos solutos absorve radiação ultravioleta (HARRIS, 2013).

O detector de absorção no UV-Vis possui um arranjo de fotodiodos e consiste em um detector de absorção com duplo feixe no qual um dos feixes passa por uma célula do eluente e o outro através da célula de referência. Esses feixes de luz são analisados por meio de detectores fotoelétricos e em conjunto com um fototransdutor. A partir dessa detecção, é possível gerar um gráfico da absorbância em função do tempo (SKOOG et al, 2009).

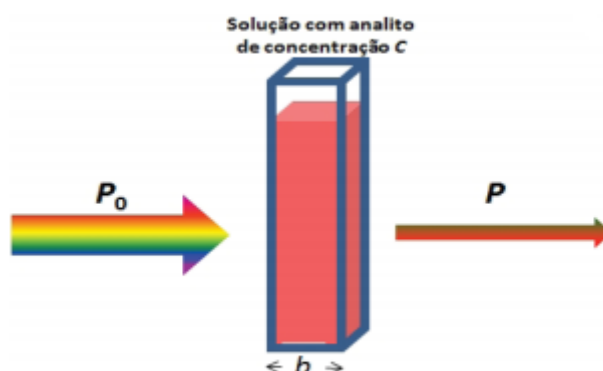
4.5.2 Espectroscopia

Os métodos espectroscópicos de análise são caracterizados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida por espécies químicas de interesse. A espectroscopia desempenhou também um papel fundamental no desenvolvimento da teoria atômica moderna além de ter aberto possibilidades para as ferramentas mais amplamente empregadas para a elucidação de estruturas moleculares, bem como determinações qualitativas e quantitativas tanto de compostos orgânicos como de compostos inorgânicos (SKOOG et al, 2009).

No processo de absorção da radiação a lei de Lambert-Beer é obedecida e tal lei elucida quantitativamente como a grandeza de atenuação da radiação eletromagnética depende da concentração de moléculas absorventes e da extensão do caminho ótico sobre o qual ocorre absorção (SKOOG et al, 2009).

A função das interações entre os fótons e as partículas absorventes a potência radiante do feixe decresce de P_0 (radiação incidente) a P (radiação transmitida), de acordo com a Figura 4.

Figura 4 - Passagem de radiação em uma amostra



Fonte: (PASSOS, 2011)

De acordo com Skoog et al (2009) a transmitância T de uma solução corresponde à fração da radiação incidente pela radiação transmitida, dado por:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (\text{Equação 1})$$

Ainda segundo Skoog et al (2009) a absorbância A de uma solução está relacionada com a transmitância de forma logarítmica, segundo a equação:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad (\text{Equação 2})$$

E, definitivamente, a lei de Lambert-Beer diz que a absorbância é diretamente proporcional à concentração de uma espécie absorvente c e ao caminho ótico b do meio absorvente, expresso por:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (\text{Equação 3})$$

No qual ϵ é a constante de proporcionalidade chamada absorvidade molar, com unidade $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.5.2.1 Espectrofotometria UV-Vis

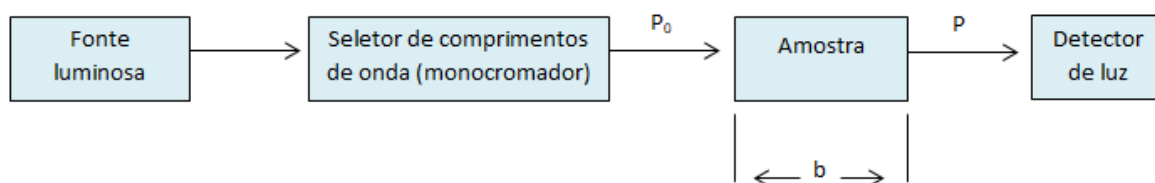
Segundo Vinadé et al (2005), a espectrofotometria consiste em um dos métodos analíticos mais usados em determinações e quantificações analíticas em múltiplas áreas. Na região ultravioleta do espectro é considerada entre a faixa de 200 a 400 nm e a região do visível entre 400 a 800 nm, aproximadamente.

A absorção da radiação por moléculas ocorre entre uma ou mais bandas de absorção eletrônicas e cada uma delas é composta de muitas linhas discretas mais próximas das outras. Cada uma das linhas se origina da transição de um elétron de um estado fundamental para estados vibracionais e rotacionais vinculadas com cada estado excitado de energia (SKOOG et al, 2009).

A absorção por moléculas orgânicas na região de comprimento de onda entre 180 e 780 nm ocorre em função das interações entre os fótons e elétrons que participam da formação de uma ligação química. Para uma correta avaliação da região do espectro, é imprescindível que se elabore um espectro de absorção que relaciona as absorbâncias em função dos comprimentos de onda. Desta forma, por meio do espectro de absorção é possível determinar o comprimento de onda em que o analito absorve a maior radiação. O espectro de absorção é uma identidade de cada espécie química e pode ser traduzido como uma impressão digital desse composto. (VINADÉ et al, 2005).

Para que as medidas de absorbância sejam feitas alguns requisitos devem ser obedecidos. De acordo com a Figura 5, a luz, proveniente de uma fonte com emissão espectral contínua passa por um monocromador que seleciona uma faixa de comprimentos de onda do feixe existente. (HARRIS, 2013).

Figura 5 - Diagrama esquemático espectrofotométrico



Fonte: (HARRIS, 2013).

A luz monocromática passa pela amostra com um determinado caminho óptico. Na espectroscopia na região do ultravioleta e do visível, uma amostra líquida é colocada em uma célula denominada cubeta. As cubetas (Figura 6) possuem faces planas paralelas são feitas de plástico, vidro ou de quartzo ou de sílica fundida (HARRIS, 2013).

As cubetas, que contém a amostra e o solvente, devem ser construídas com um material com determinadas faixas de comprimento de onda (Tabela 2) que permita a passagem da radiação na região espectral de interesse.

Tabela 2 - Faixa de comprimento de onda para cubetas.

Material	Comprimento de onda (nm)
Quartzo fundido	190- 800
Vidro	380 – 780
Plástico	380 – 780

Fonte: (BARRON, 2012).

Os espectros de absorção correspondem a um gráfico de absorbância versus o comprimento de onda ou número de onda, apesar de alguns espectrofotômetros modernos produzirem espectros de absorbância diretamente (SKOOG et al, 2009).

Dessa maneira, de acordo com Skoog et al (p. 688, 2009) “a absorção molecular nas regiões do ultravioleta e visível consiste em bandas de absorção constituídas por linhas próximas entre si”.

Algumas moléculas não são capazes de absorverem na região do UV-Vis, ou seja, não possuem grupos cromóforos, que são grupos que possuem elétrons capazes de ser promovidos para outro nível de energia quando absorvem luz UV ou visível, conferindo cor. Para tanto, é necessário que se faça uma reação de complexação para que se forme um complexo capaz de absorver luz na região UV-Vis (HIGSON, 2009).

Com relação às extrações líquido-líquido para determinações espectrofotométricas é imprescindível que se escolha solventes com elevadas afinidades com o soluto para que haja uma extração eficiente (QUEIROZ, 2001). Nesse contexto, o clorofórmio e o diclorometano são uns dos principais solventes utilizados em espectrofotometria UV-Vis. Estudos relatam que na extração da cafeína, matrizes interferentes são mais extraídas com clorofórmio em relação ao diclorometano (BELAY et al, 2008).

4.5.3 Limites de Detecção e Limite de Quantificação

Uma das validações analíticas mais utilizadas em análises quantitativas são o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). O primeiro corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada por um

equipamento. O LD pode ser determinado por meio de uma sinal/ruído, o desvio padrão da resposta do coeficiente angular. A razão sinal ruído considerada aceitável para estimar o limite de detecção é de 3:1 (BRITO et al, 2013).

Já o limite de quantificação equivale à menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra sob condições experimentais que garantam exatidão e precisão aceitáveis. Para o cálculo do LQ é efetuado a determinação da razão sinal/ruído (10:1) através da comparação dos sinais do analito com as do branco, medidos de uma amostra com baixas concentrações conhecidas (BRITO et al, 2013).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Amostras

As amostras selecionadas para análise foram 03 energéticos de marcas distintas, refrigerantes a base de cola (comum e cafeinado), chás (preto e de erva mate), café solúvel (comum, *gourmet* e descafeinado) e um suplemento à base de cafeína. Todas analisadas e adquiridas no comércio da cidade de Londrina (PR).

5.1.2 Reagentes

Para a análise quantitativa de energéticos, refrigerantes de cola, chás e café solúvel foram utilizados os seguintes reagentes: água destilada, água ultra pura (Milli-Q), metanol (CH₃OH) grau HPLC, padrão de cafeína, permanganato de potássio (KMnO₄), sulfito de sódio (Na₂SO₃), tiocianato de potássio (KSCN), ácido fosfórico (H₃PO₄), hidróxido de sódio (NaOH), triclorometano ou clorofórmio (CHCl₃) e sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄).

5.1.3 Vidrarias

Para as análises foram utilizadas as vidrarias: béqueres 50, 100 e 250 mL, pipetas volumétricas 1, 2, 5, 10 mL, proveta 50 e 100 mL, bastão de vidro, funil de separação e balão volumétrico com capacidade de 10, 50, e 100 mL.

5.1.4 Materiais diversos

Foram utilizados alguns materiais, tais como: espátula, pera, papel filtro descartável, filtro de membrana de 0,45 µm (acetato de celulose), pipeta automática com ponteira capacidade de 100-1000µL, pipetas Pasteur, filtro de

seringa de 13 mm com partículas de 0,45µm (acetato de celulose), coluna de fase reversa C18 (Terumo) (150mm x 4,6mm com partículas de 5µm).

5.1.5 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica (Shimadzu), Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000 – Thermo Scientific com detecção UV-Vis e Espectrofotômetro Libra S60 (190-1100 nm) - duplo feixe.

Para a obtenção dos cromatogramas, utilizou-se uma Estação de Trabalho Cromatográfica Ultimate 3000 da Thermo Scientific (Figura 6), com programa de gerenciamento Chromeleon contendo: bomba de pistão recíprocante com quatro vias; injetor automático com alça de amostragem de 20 µL; detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos e coluna cromatográfica C18 (150mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm). O equipamento cromatográfico pertence à UTFPR Câmpus Londrina sob vigência do Departamento de Química (DAQUI)

Figura 6 - Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000



Fonte: (Thermo Fischer Scientific).

Para as determinações via espectrofotometria UV-Vis utilizou-se o e Espectrofotômetro Libra S60 (190-1100 nm) - duplo feixe, com varredura do comprimento de onda entre 200 à 400 nm. (Figura 7). Possui faixa de detecção entre 190 e 1100 nm, e pertence à UTFPR Câmpus Londrina sob vigência do Departamento Acadêmico de Alimentos (DAALM).

Figura 7 - Espectrofotômetro Libra S60



Fonte: (HAVARD BIOSCIENCE, 2018).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Curva de calibração

Para a determinação por Cromatografia Líquida e para Espectrofotometria UV-Vis foram construídas curvas de calibração a partir da solução padrão de cafeína.

Para o tratamento analítico cromatográfico construiu-se a curva padrão com as áreas dos picos nas ordenadas e as concentrações de cafeína nas abscissas. Foram preparados padrões de cafeína nas concentrações 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60 mg.L⁻¹. O solvente utilizado em CL foi água Mili-Q.

Já para Espectrofotometria UV-Vis utilizou-se o clorofórmio para a extração de cafeína. Para tratamento analítico espectrofotométrico a curva padrão foi construída com os valores de absorbância nas ordenadas e as concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg.L⁻¹ de cafeína nas abscissas.

5.2.2 Preparo de amostras

Selecionou-se três energéticos de marcas distintas (E_1 , E_2 e E_3), dois refrigerantes à base de cola de mesma marca, comum (R_1) e cafeinado (R_2), dois chás, erva-mate (T_1) e preto (T_2), de mesma marca, um suplemento à base de cafeína (S) e três cafés solúveis: comum (C_1), *gourmet* (C_2) e descafeinado (C_3).

5.2.2.1 Preparo de amostras – Cromatografia Líquida

- Bebida Energética e refrigerante à base de cola:

Foram selecionadas três bebidas energéticas de marcas distintas (E_1 , E_2 e E_3) e dois refrigerantes à base de cola, sendo um tradicional (R_1) e o outro contendo maior quantidade de cafeína, segundo o rótulo (R_2). As amostras foram submetidas à desgaseificação por meio do ultrassom (Cristófoli) durante 20 minutos.

- Café solúvel

Foram selecionados três tipos de café solúvel: café comum (C_1), café *gourmet* (C_2) e café descafeinado (C_3). Para C_1 e C_2 foram utilizados 0,200 g e para C_3 , 0,400 g, ambos transferidos para um balão de 100 mL.

- Chá

Foram selecionados dois tipos de Chá em sachê: chá mate (T_1) e chá preto (T_2). Utilizou-se um sachê e 150 mL de água ultra pura aquecida em chapa de aquecimento e após o chá foi adicionado e deixado em infusão durante 5 minutos a 100 °C.

- Suplemento à base de cafeína

Foi selecionado um suplemento energético de cafeína e utilizou-se 0,200 g em balão de 100 mL.

A extração da cafeína das amostras de bebidas energéticas (E_1 , E_2 , E_3) (Figura 9), de refrigerante à base de cola (R_1 e R_2) (Figura 8), de chá (T_1 e T_2) (Figura 12), de café solúvel (C_1 , C_2 , C_3) (Figura 11) e suplemento à base de cafeína (Figura 10) foi baseada e adaptada de Brenelli (2013) no qual utilizou-se 2,00 g de óxido de magnésio (MgO) e uma alíquota de 20 mL de amostra, colocadas em um balão volumétrico de 100 mL. Estas foram submetidas a aquecimento sob agitação magnética por dez minutos. O MgO faz com que alguns taninos (substâncias naturais) formem sais insolúveis em água, promovendo a precipitação e a diminuição da carga de interferentes das amostras. Para a decantação dos sais insolúveis, as amostras ficaram em repouso por 20 minutos. Em seguida, uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi centrifugada por 10 minutos.

Figura 8 - Amostras de refrigerante à base de cola (R_1 e R_2) após o tratamento com MgO.



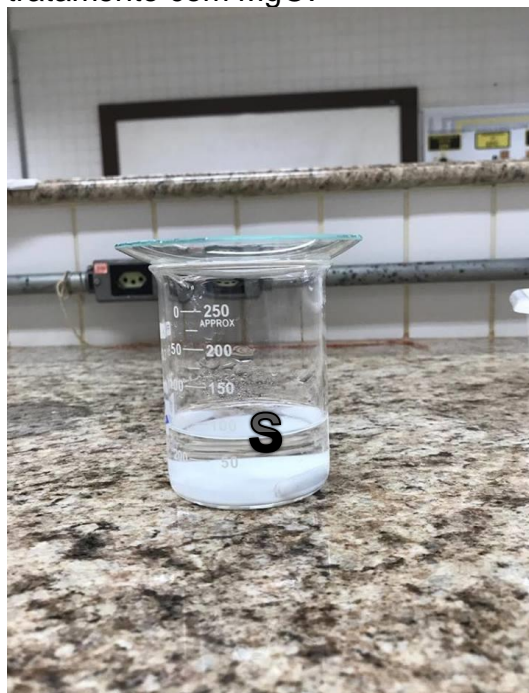
Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 9 - Amostras de bebidas energéticas (E_1 , E_2 e E_3) após o tratamento com MgO.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 10 - Amostras de suplemento à base de cafeína (S) após o tratamento com MgO.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 11 - Amostras café solúvel (C₁, C₂ e C₃) após o tratamento com MgO.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 12 - Amostras de chá após o tratamento com MgO (T₁ e T₂)



Fonte: (AUTOR, 2018).

Após a centrifugação das amostras, estas foram filtradas em filtro de membrana e acondicionadas nos vials. Posteriormente foram levadas ao amostrador para as injeções no Cromatógrafo Líquido.

5.2.2.2 Preparo de amostras – Espectrofotometria

- Café solúvel comum

Pesou-se 0,2000 g de café solúvel comum e transferiu-se para um balão de 100 mL.

- Bebida energética

Aproximadamente 100 mL da amostra foi desgaseificada em ultrassom por 15 minutos.

- Chá preto

Foi selecionado o chá preto (T₂) e Utilizou-se um sachê e 150 mL de água destilada aquecida em chapa de aquecimento e após o chá foi adicionado e deixado em infusão durante 5 minutos.

Seguindo a metodologia de Knupp (2015), 20 mL de cada amostra preparada foi pipetada para um funil de separação junto com 10 mL de permanganato de potássio (1,5% m/v). Após 5 minutos, 20 mL de uma solução redutora (5,00 g de sulfito de sódio e 5,00 g de tiocianato de potássio diluídos em um balão volumétrico de 100 mL) foi adicionada ao funil. Em seguida 2 mL de ácido fosfórico e 2 mL de hidróxido de sódio (25% m/v) foram adicionados no funil (Figuras 13 e 14).

Para a extração da cafeína nessa metodologia, 20 mL de clorofórmio foram transferidos no funil e após a separação da fase orgânica, por duas vezes, para garantir uma melhor extração do analito. Esta fase foi transferida para um béquer, com sulfato de sódio anidro. Com auxílio de um funil e

algodão as amostras foram filtradas e coletadas em um balão volumétrico de 50 mL para o café solúvel e bebidas energéticas e em um balão de 100 mL para o chá preto completados com clorofórmio até o menisco.

Figura 13 - Funil de separação entre a fase aquosa da fase orgânica da bebida energética.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 14 - Funil de separação entre a fase aquosa da fase orgânica de chá preto.



Fonte: (AUTOR, 2018).

5.2.3 Determinação de cafeína – Cromatografia

Para análise cromatográfica foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 com comprimento (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m de tamanho da partícula). Foram testadas a fase móvel, água-metanol, na proporção de 80:20, 75:25, 70:30, 65:35 e 50:50 (v/v) a fim de obter a separação da cafeína dos interferentes presentes nas amostras e com um perfil do pico cromatográfico adequado às condições de análise pois quanto maior o tempo para a eluição da amostra, maior o alargamento de banda. Dessa forma a fase móvel que apresentou o tempo de retenção adequado para análise foi composta por água-metanol (65:35) (v/v), com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e com detecção de 272 nm. O tempo de análise foi de 10 minutos e com temperatura do forno da coluna de 25°C e o volume de injeção foi de 20 μ L da solução padrão.

5.2.4 Determinação de cafeína – Espectrofotometria

Inicialmente foi preparada uma solução estoque 100,0 mg.L⁻¹ do padrão de cafeína e armazenada em um balão volumétrico de 100 mL, utilizando clorofórmio como solvente. A partir da solução estoque 100,0 mg.L⁻¹ foram preparadas soluções padrão nas concentrações: 1,0 ; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.L⁻¹, em um balão de 10 mL.

Os padrões foram colocadas em cubetas de quartzo e realizadas as leituras no espectrofotômetro foi utilizado como branco clorofórmio e a faixa de varredura utilizada para análise foram de 200 à 400 nm, uma vez que de acordo com De Maria e Moreira (2007) o máximo de absorção da cafeína é entre 272 e 275 nm.

Logo após, foram realizadas as leituras espectrofotométricas das amostras de café solúvel, bebida energética e chá preto. Realizou-se a análise destas três amostras apenas, na tentativa de se verificar se o processo de extração utilizado seria eficiente para a extração de cafeína destas amostras.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As determinações analíticas foram realizadas em três energéticos de marcas distintas (E_1 , E_2 e E_3), dois refrigerantes à base de cola de mesma marca, comum (R_1) e cafeinado (R_2), dois chás, erva-mate (T_1) e preto (T_2), de mesma marca, um suplemento à base de cafeína (S) e três cafés solúveis: comum (C_1), *gourmet* (C_2) e descafeinado (C_3). Primeiramente foi verificado o perfil de separação da cafeína utilizando padrão e posteriormente foi verificado se as concentrações experimentalmente encontradas estavam de acordo com a curva de calibração analítica. Após a otimização e adequação à curva as amostras foram injetadas no cromatógrafo.

6.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CAFEÍNA - CL

Para o tratamento analítico das determinações por Cromatografia Líquida foram preparados padrões de cafeína nas concentrações 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 mg.L⁻¹.

Segundo Cassiano et al (2009) uma curva de calibração corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. Frente ao exposto, o modelo de calibração deve ser construído a partir da análise de, no mínimo, 6 a 8 concentrações conhecidas do analito (padrões de calibração).

Dessa maneira, construiu-se a curva de calibração, por meio de um *software*, (Figura 15) da concentração dos padrões (mg.L⁻¹) em relação à área do pico (mAU.min) detectada pelo equipamento. Os valores das áreas dos picos em função das concentrações de cafeína estão organizados na Tabela 3.

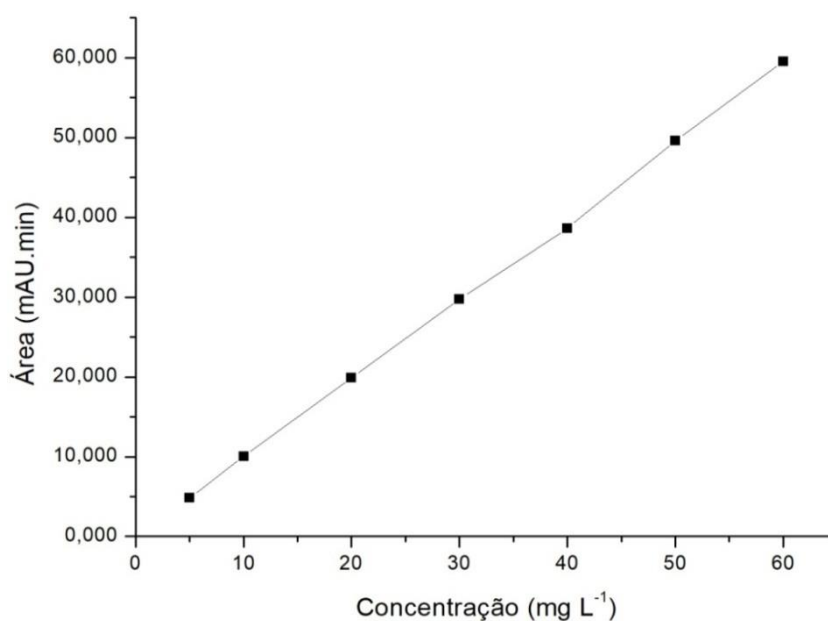
Tabela 3 - Dados para construção da curva de calibração para CL

Concentração (mg L ⁻¹)	Área (mAU.min)
5,0	4,868
10,0	10,028
20,0	19,866
30,0	29,762
40,0	38,611
50,0	49,582
60,0	59,534

Limite de Detecção	Limite de Quantificação
6,390 x 10 ⁻³ mAU	0,0213 mAU
0,014 mg L ⁻¹	0,047 mg L ⁻¹

Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 15 - Curva de calibração da cafeína para CL nas concentrações 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 mg.L⁻¹.

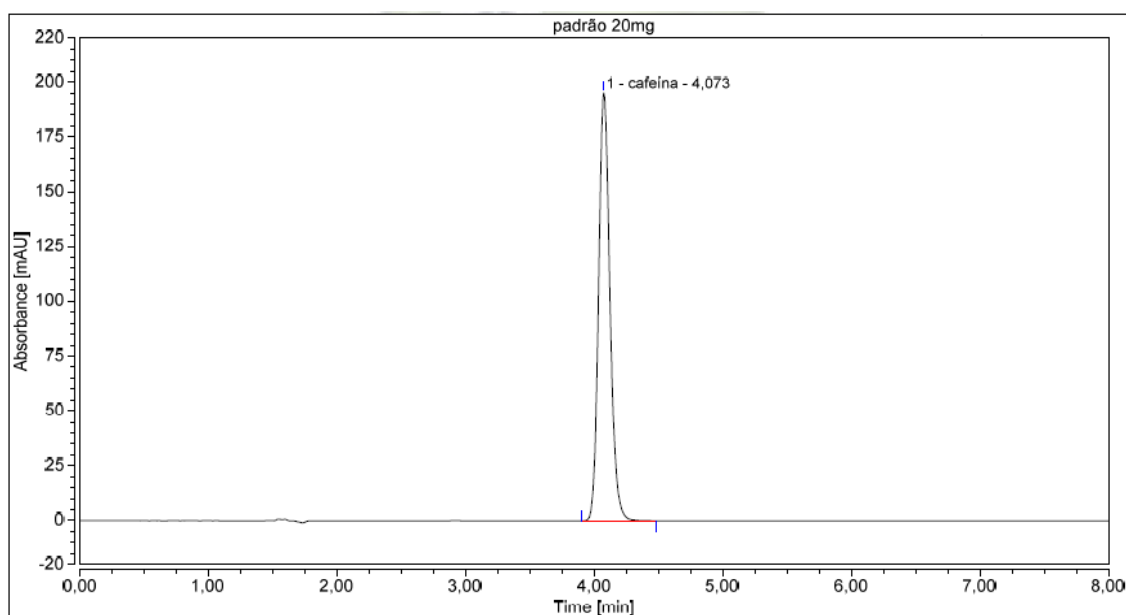


Fonte: (AUTOR, 2018).

O valor de 0,9996 para R^2 comprova os ajustes da equação da reta às análises realizadas. Por meio da equação da reta, determinou-se as concentrações reais das amostras analisadas.

A Figura 16 representa um cromatograma de um dos pontos utilizados para a construção da curva de calibração.

Figura 16 - Cromatograma 20 mg L⁻¹ do padrão de cafeína. Condições: Fase móvel água /metanol (65:35), injeção de 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

O cromatograma representa o sinal obtido em relação à concentração de 20 mg. L⁻¹ de cafeína com tempo de retenção de 4,073 minutos. Com relação às amostras, o *software* acoplado ao cromatógrafo forneceu as áreas dos picos e as concentrações das amostras analisadas em mg.L⁻¹. Essas concentrações foram calculadas através da equação (Equação 4) obtida pela curva de calibração:

$$Y = 0,988 X - 0,025, R^2 = 0,9996 \text{ (Equação 4)}$$

No qual X representa a concentração real das amostras e estas estão organizadas na Tabela 4.

Tabela 3 - Relação da área do pico (mAU.min) com as concentrações de cafeína (mg.L⁻¹)

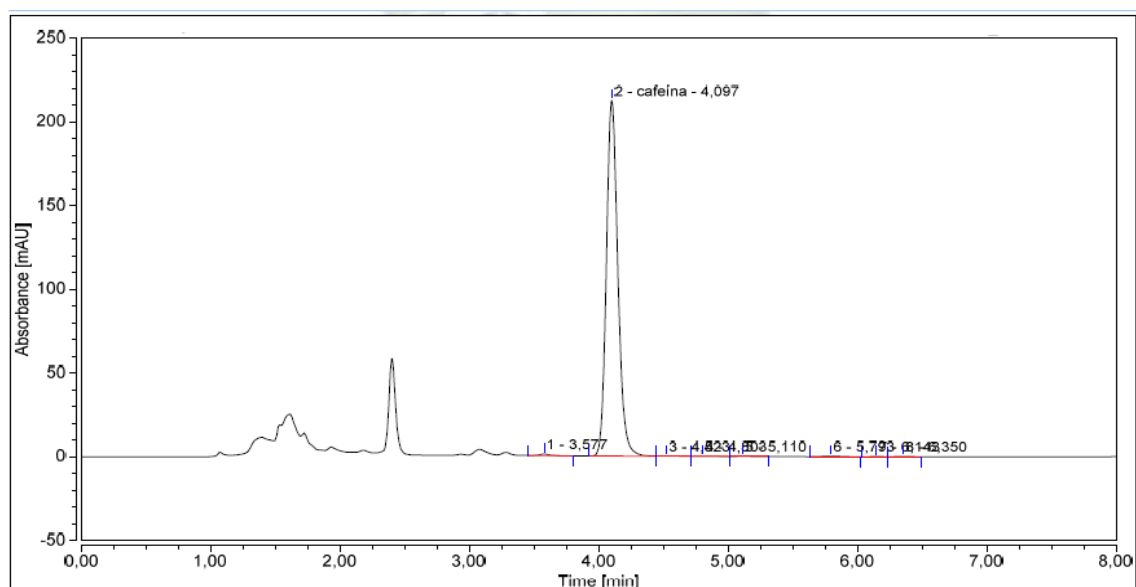
Amostra	Área do pico (mAU.min)	Concentração real (mg.L ⁻¹)
C ₁	21,805	22,095
C ₂	20,401	20,674
C ₃	2,178	2,330
E ₁	12,400	12,576
E ₂	13,145	13,333
E ₃	13,623	13,814
R ₁	19,633	19,897
R ₂	29,111	29,490
T ₁	21,844	22,135
T ₂	18,887	19,142
S	46,294	46,881

Fonte: (AUTOR, 2018).

6.1.1 Café solúvel

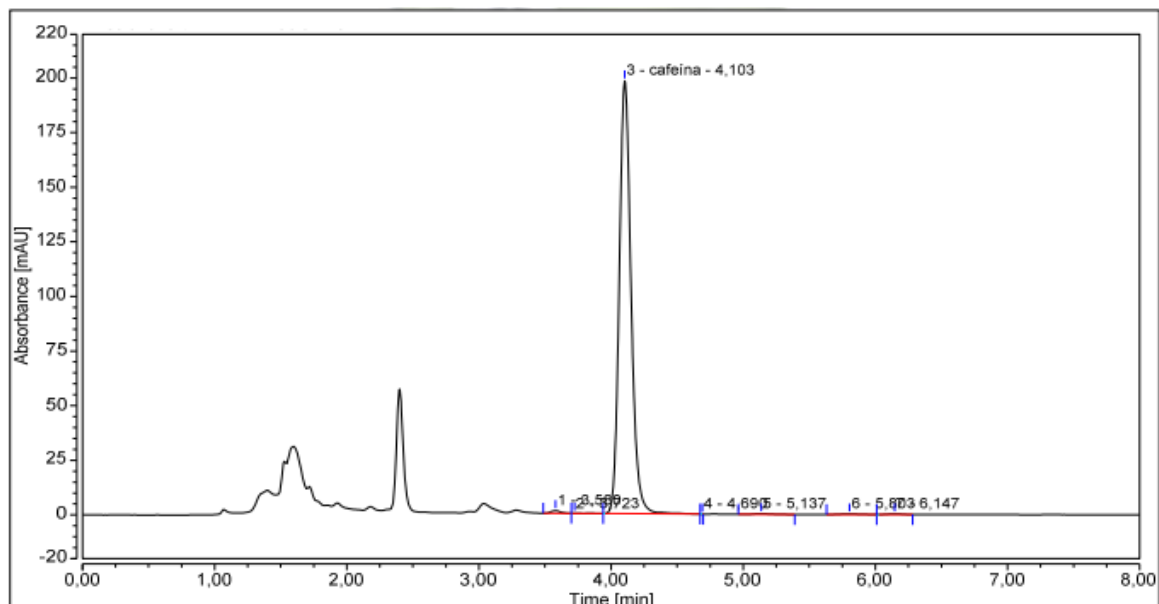
As amostras de café solúvel selecionadas para análise foram o café comum (C₁), o *gourmet* (C₂) e o descafeinado (C₃). As Figuras 17, 18 e 19 representam respectivamente as amostras C₁, C₂ e C₃.

Figura 17 - Cromatograma da amostra C₁. Condições: Fase móvel água /metanol (65:35), injeção de 20 µL, 25°C e coluna cromatográfica C18.



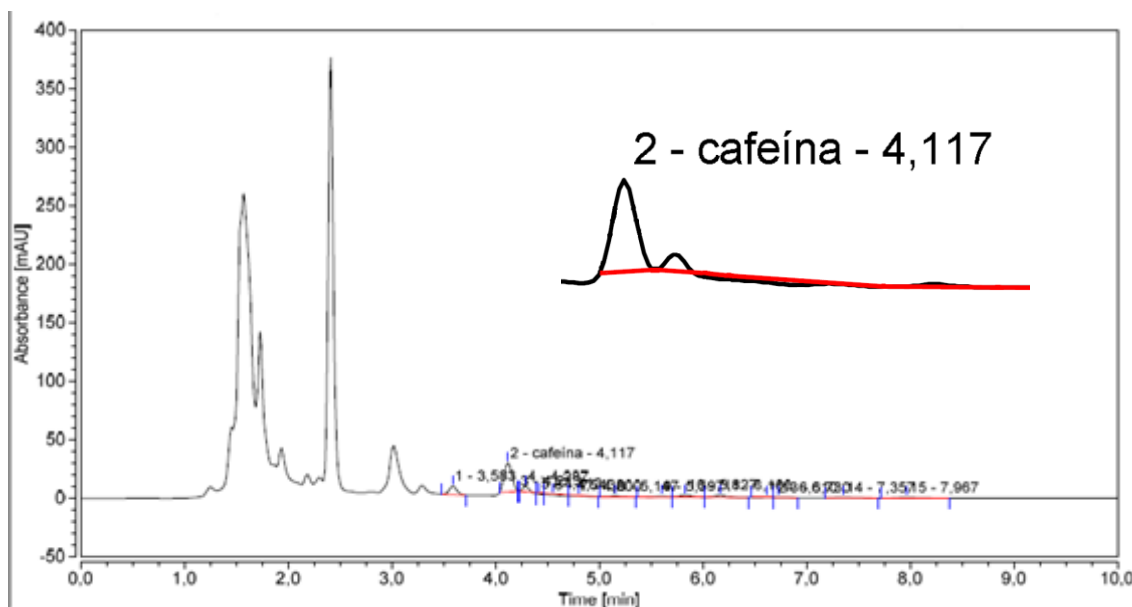
Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 18 - Cromatograma da amostra C₂. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (Autor, 2018).

Figura 19 - Cromatograma da amostra C₃. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Com base nos cromatogramas das amostras de café, a Tabela 5 compara as concentrações obtidas experimentalmente com as concentrações encontradas na literatura e nos rótulos das embalagens.

Tabela 4 – Concentrações de cafeína nas amostras de café solúvel

Amostra	Concentração Experimental (mg.L ⁻¹)	Concentração da amostra (mg.g ⁻¹)	Faixa de Concentração encontrada na literatura
C ₁	22,095	5,520 mg.g ⁻¹	3,34 à 7,59 mg.g ⁻¹
C ₂	20,674	5,160 mg.g ⁻¹	
C ₃	2,379	1,19 mg.g ⁻¹ (0,12%)	Máximo de 0,30%

Fonte: (AUTOR, 2018).

As amostras de café comum e café *gourmet* apresentaram concentrações com valores próximos e dentro da faixa de concentração encontrada na literatura, ainda que segundo Silva et al (2018) nas embalagens de café solúvel não se registra a quantidade de cafeína presente no preparo da bebida uma vez o café solúvel provém de distintas misturas de grãos de café, o que dificulta uma quantificação precisa (SILVA et al, 2018).

Frente a essa dificuldade encontrada na literatura, determinou-se experimentalmente que a amostra C₁ e C₂ apresentaram concentrações de 5,520 mg.g⁻¹ e 5,160 mg.g⁻¹. Ainda que a literatura científica ilustre faixas de concentrações de cafeína no café solúvel, a proximidade dos valores das duas amostras dá evidências ambas possuem matéria-prima semelhantes. A maior concentração de cafeína na amostra C₁ deve-se ao fato deste ser um café do tipo *blend*, ou seja é um produto feito de café do tipo *conilon* e *arábica*. Segundo Ormond (1999), o café *arábica* é um produto mais fino, de alta qualidade enquanto que o *conilon* apresenta um aspectos menos refinados. Em relação às concentrações de cafeína nesses tipos de café, segundo a Organização Internacional do Café (OIC), o café *arábica* possui de 0,8 a 1,4% de cafeína enquanto que o *conilon* possui 1,7 à 4,0%. No rótulo da amostra C₂ vem informado que o produto é 100% *arábica*, ou seja, possui uma melhor qualidade, já que é um café *gourmet*.

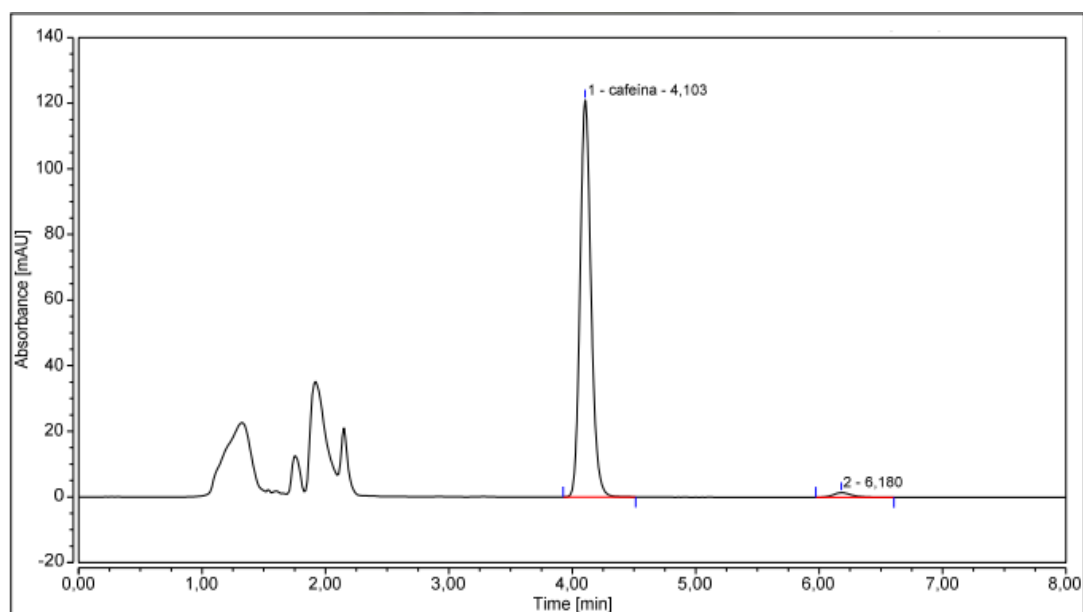
A amostra de café solúvel descafeinada C₃ possui em seu rótulo a informação de que contém no máximo 0,30% de cafeína. Experimentalmente foi encontrado uma concentração de 1,19 mg g⁻¹, ou seja, em relação a massa

utilizada de 0,400 g, o café possui 0,12% de cafeína, porcentagem na faixa da informação do rótulo.

6.1.2 Bebidas Energéticas

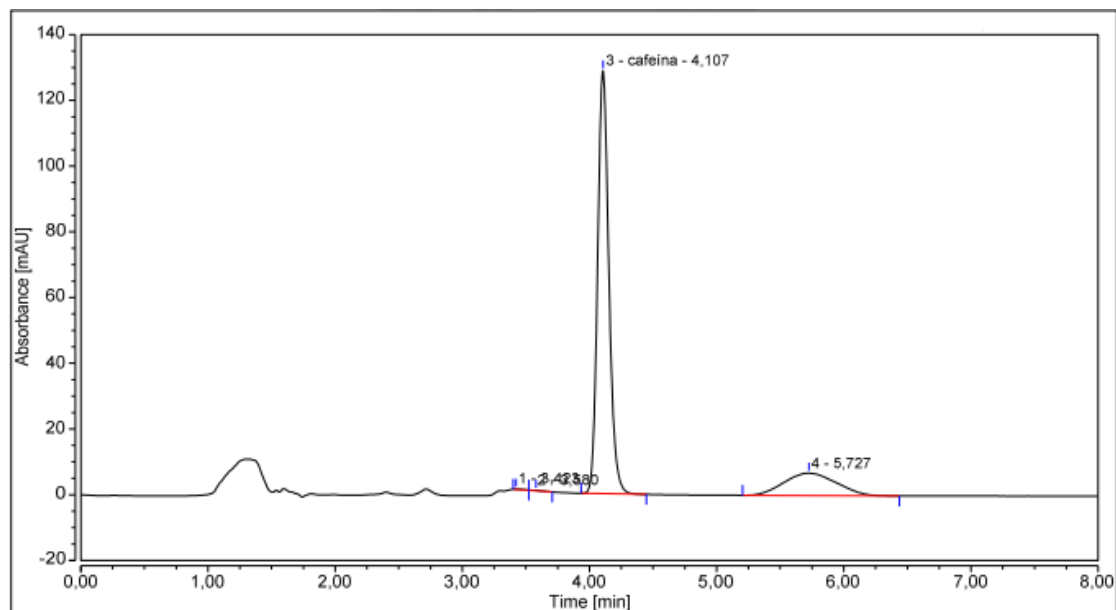
Três bebidas energéticas de marcas distintas foram selecionadas para as determinações: E₁, E₂ e E₃. Os cromatogramas estão respectivamente representados pelas Figuras 20, 21 e 22 e as concentrações na Tabela 6.

Figura 20 - Cromatograma da amostra E₁. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



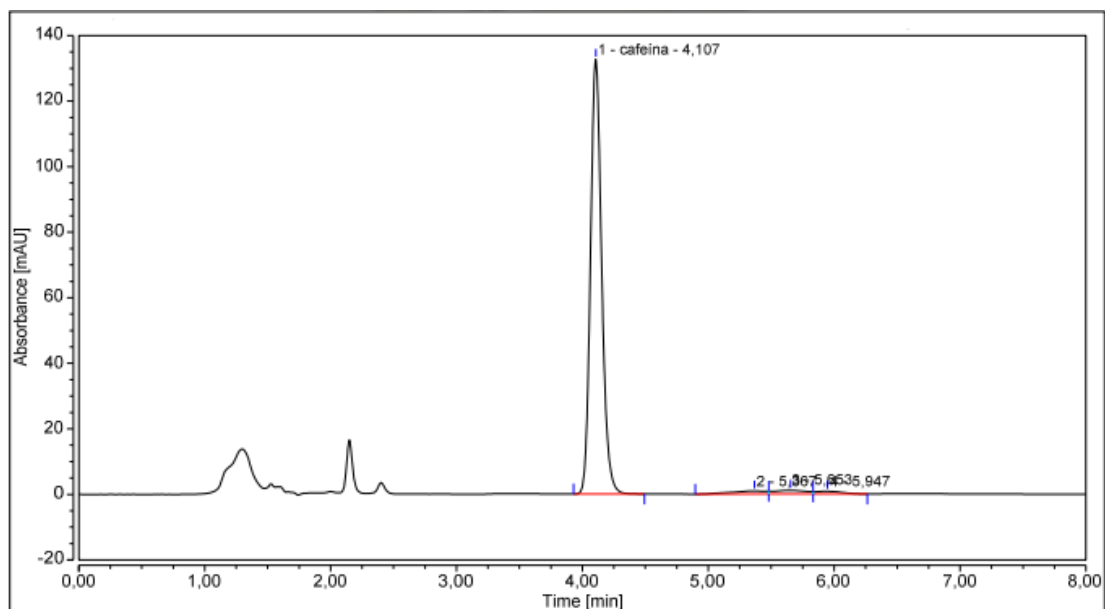
Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 21 - Cromatograma da amostra E₂. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 22 - Cromatograma da amostra E₃. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Tabela 5 - Concentrações de cafeína nas amostras de bebidas energéticas

Amostra	Concentração Experimental (mg.L⁻¹)	Concentração da amostra (mg/200mL)	Concentração encontrada no rótulo(mg/200mL)
E₁	12,576	50,300	70
E₂	13,333	53,316	70
E₃	13,814	55,256	64

Fonte: (Autor, 2018).

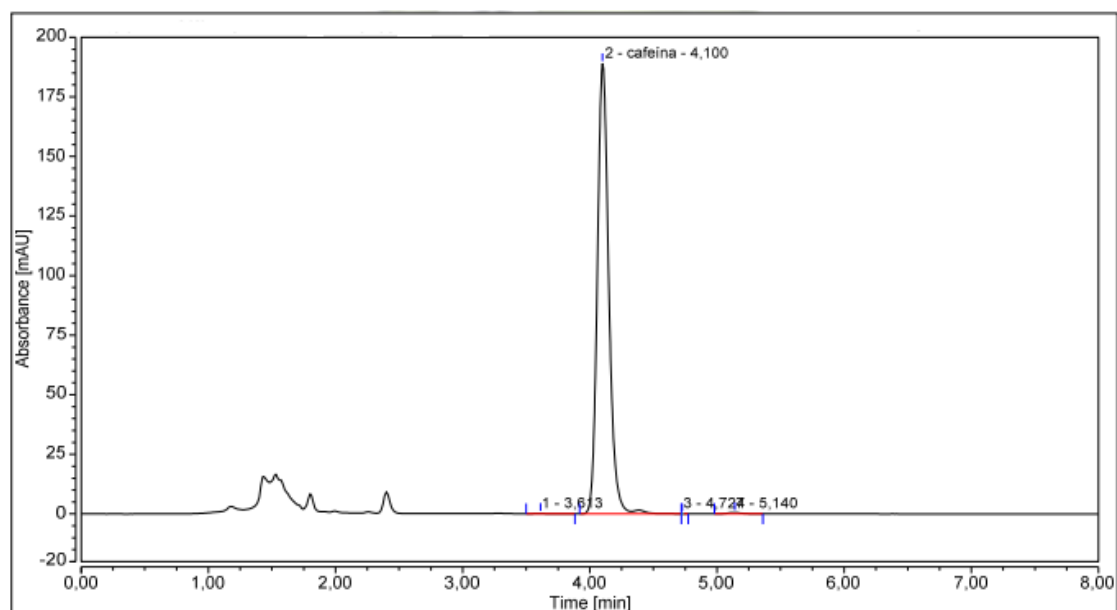
Os cromatogramas de bebidas energéticas apresentaram sinais evidentes e livres de interferentes, o que dá indícios que o tratamento das amostras com MgO diminuiu a carga de compostos que poderiam comprometer a análise.

Nas análises das amostras de bebidas energéticas a que mais apresentou concentração próxima a descrita no rótulo foi a E₃, apesar de as bebidas apresentarem concentrações mais próximas entre si do que a relação às concentrações do rótulo.

6.1.3 Refrigerantes à base de cola

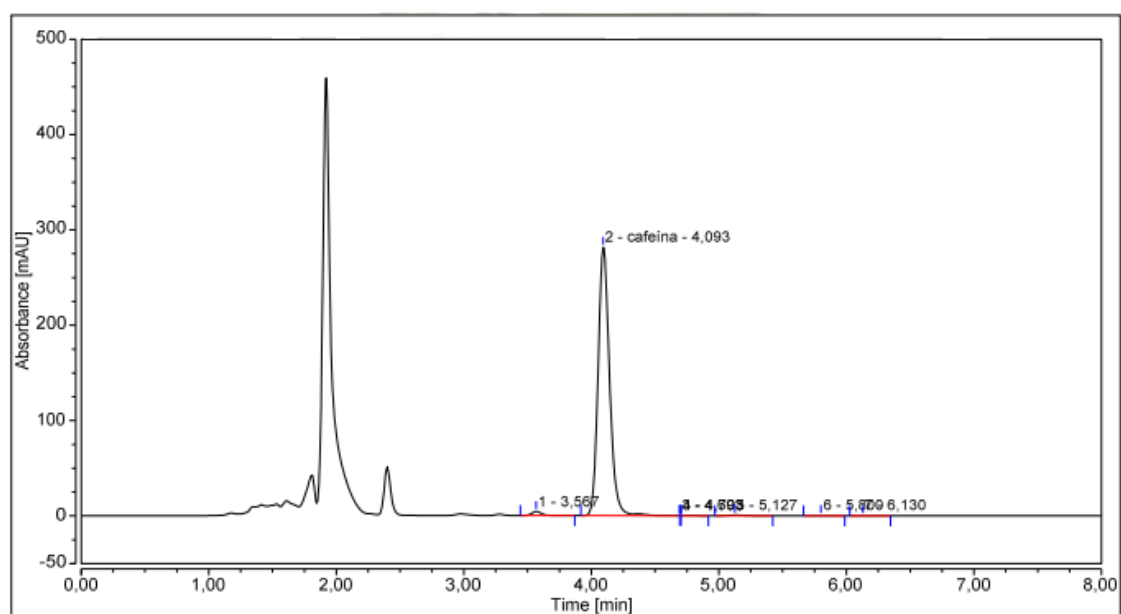
Dois refrigerantes à base de cola de mesma marca foram selecionados para análise, o comum (R₁) e um dito como cafeinado (R₂), conforme informações da embalagem da bebida. Os cromatogramas estão representados respectivamente nas Figuras 23 e 24 e as concentrações na Tabela 7.

Figura 23 - Cromatograma da amostra R₁. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 24 - Cromatograma da amostra R₂. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Tabela 6 - Concentrações de cafeína nas amostras de refrigerantes à base de cola.

Amostra	Concentração Experimental (mg.L⁻¹)	Concentração da amostra (mg/220mL)	Concentração encontrada na literatura (mg/220mL)
R ₁	19,658	21,886	22
R ₂	29,490	32,438	31

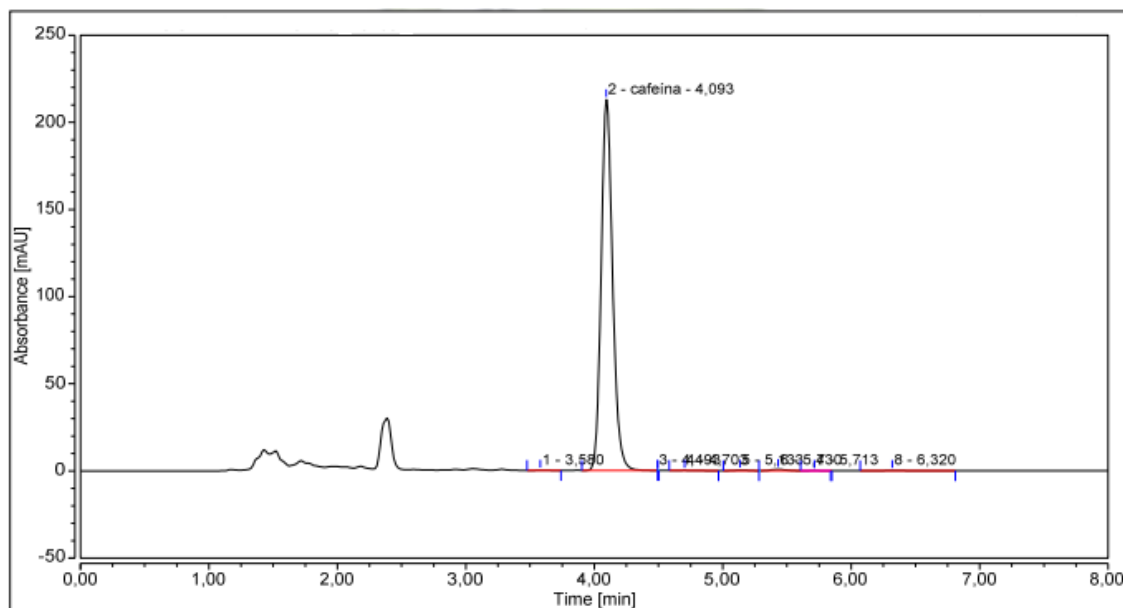
Fonte: (AUTOR, 2018)

Os refrigerantes à base de cola foram as amostras que mais apresentaram concentrações próximas da literatura. O tratamento com MgO foi mais eficiente em R₁ quando comparado com R₂, comprovado pelo intenso sinal detectado no tempo de retenção de 2,0 minutos, porém não interferiu na determinação. A amostra R₂ possui, segundo suas especificações, 40% a mais de cafeína quando comparado a R₁. Em relação às análises, R₂ apresentou 32,53% a mais de cafeína em relação à R₁, o que mostra que a análise apresentou resultado próximo à informação do produto.

6.1.4 Chá em sachê.

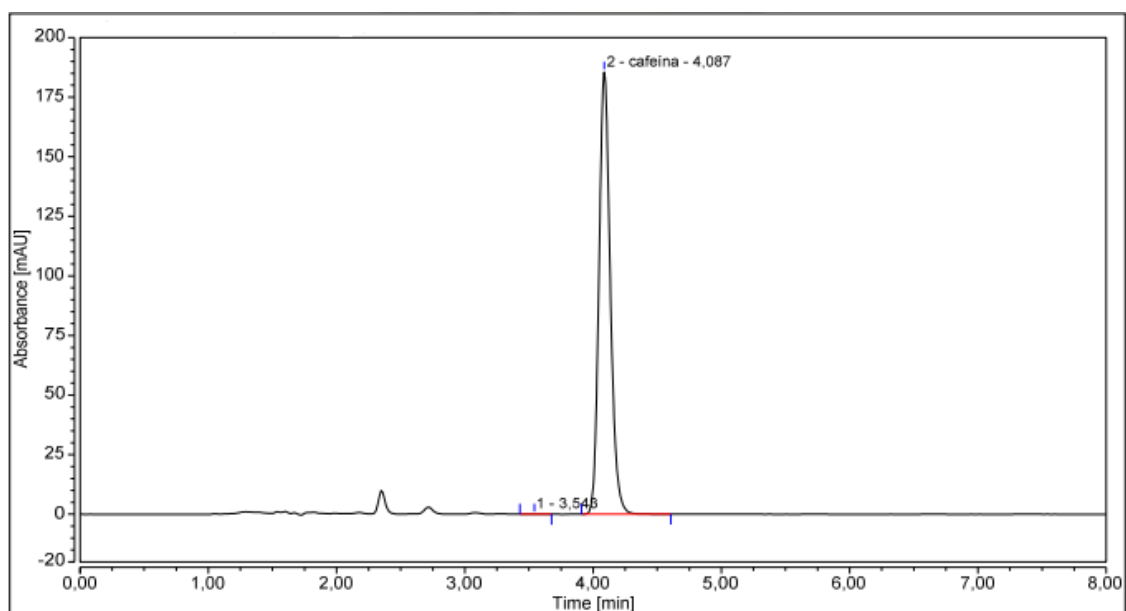
Dois chás de sachê foram selecionados para as análises: chá erva mate (T₁) e chá preto (T₂) e os cromatogramas estão representados respectivamente nas Figuras 25 e 26 e as concentrações na Tabela 8.

Figura 25 - Cromatograma da amostra T₁. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Figura 26 - Cromatograma da amostra T₂. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Tabela 7 - Concentrações de cafeína nas amostras de chá.

Amostra	Concentração Experimental (mg.L⁻¹)	Concentração da amostra diluída	Faixa de Concentração encontrada na literatura (mg.L⁻¹)
T ₁	22,135	22,135	27
T ₂	19,142	76,320	74

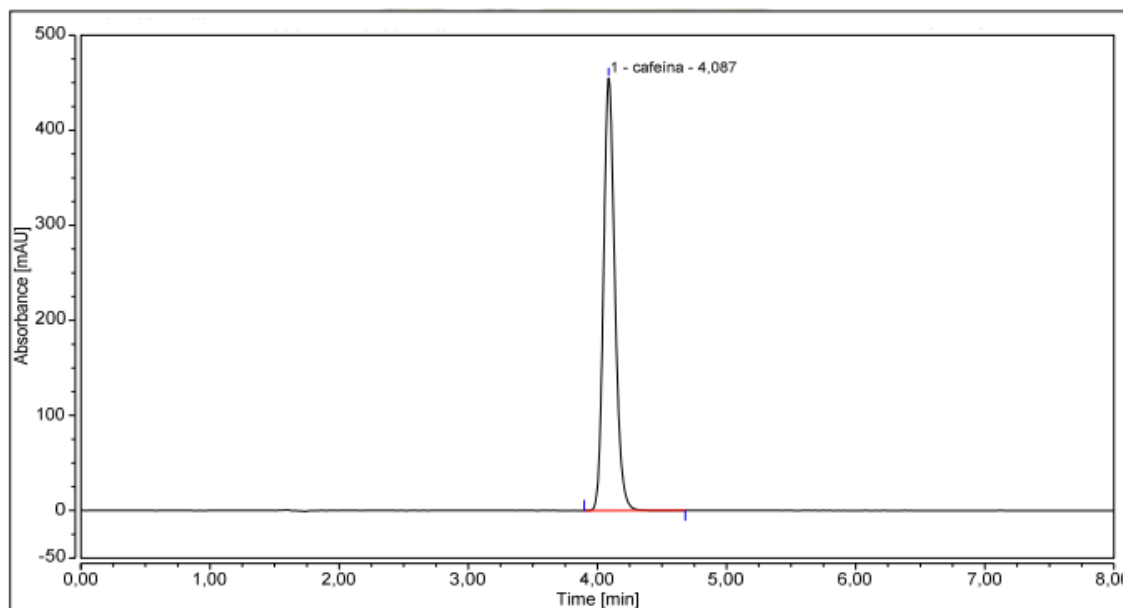
Fonte: (AUTOR, 2018).

A determinação de cafeína por CL mostrou-se ser eficiente, uma vez que a divergência com aos dados da literatura é pequena. O tempo de infusão e a temperatura das amostras de chá são determinantes na quantificação e para extração de cafeína, o que pode ser sido motivo da pequena divergência dos resultados. Para que se tenha uma quantidade de cafeína que se adeque à curva de calibração, a água deve ser aquecida a 100°C por dez minutos e logo após cessar o aquecimento e realizar a infusão por cinco minutos. De acordo com Quadros e Maia (2018) uma infusão de 5, 3 e 1 minutos acarretam em uma extração de cafeína de, respectivamente de De 74, 67 e 45 mg.L⁻¹.

6.1.5 Suplemento energético

Uma amostra de suplemento energético (S), utilizado frequentemente por atletas foi selecionado para análise, com cromatograma representado na Figura 27 e as concentrações de cafeína na Tabela 9.

Figura 27 - Cromatograma da amostra S. Condições: Fase móvel água mili-Q/metanol (65:35), injeção de 20 μ L e coluna cromatográfica C18.



Fonte: (AUTOR, 2018).

Tabela 8 - Concentrações de cafeína na amostra de suplemento a base de cafeína

Amostra	Concentração Experimental (mg.L ⁻¹)	Concentração da amostra (mg/530mg)	Concentração encontrada no rótulo (mg/530mg)
S	46,881	468,65	420,0

Fonte: (AUTOR, 2018).

O rótulo do suplemento à base de cafeína contém a informação de que a porção contida na cápsula possui massa de 530 mg e que nessa porção há 420 mg de cafeína.

A análise cromatográfica determinou que a concentração de cafeína no suplemento foi de 468,65mg/530mg enquanto que no rótulo a informação registrada foi de 420mg/530mg, ou seja, a suplementação apresenta uma massa maior (11,55%) de cafeína do que a especificada no rótulo do amostra .

6.2 Curva de Calibração – Espectrofotometria

Para o tratamento analítico das determinações por espectrofotométricas foram preparados padrões de cafeína nas concentrações 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg.L⁻¹ em balão de 10 mL.

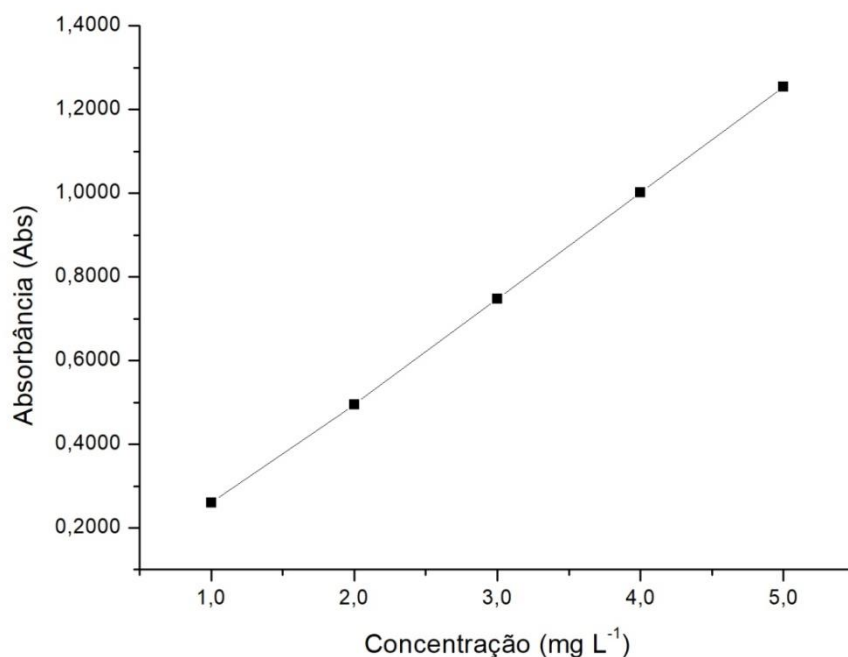
Dessa maneira, construiu-se a curva de calibração, por meio de um *software* (*ORIGIN*), (Figura 28) da concentração dos padrões (mg.L⁻¹) em relação à absorbância (A) (mAU.min) detectada pelo espectrofotômetro. Os valores das absorbâncias em função das concentrações de cafeína a 272 nm estão organizados na Tabela 10.

Tabela 9 - Dados para construção da curva analítica para a espectrofotometria UV-Vis.

Concentração (mg L ⁻¹)	Absorbância (Abs)
1,0	0,260
2,0	0,495
3,0	0,748
4,0	1,002
5,0	1,255
Limite de Detecção	Limite de Quantificação
3,09 x 10 ⁻³ Abs	0,0103 Abs
0,015 mg L ⁻¹	0,050 mg L ⁻¹

Fonte: (AUTOR, 2018).

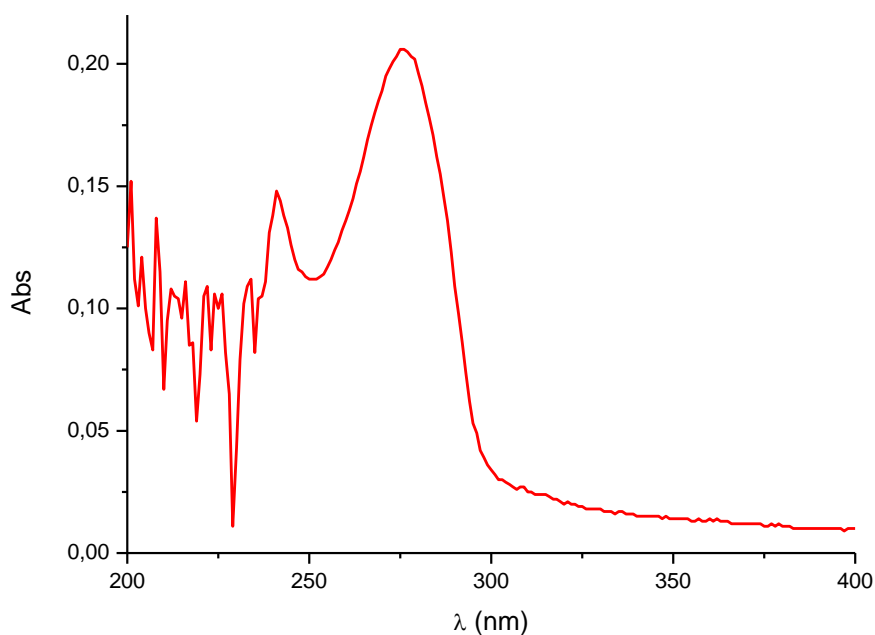
Figura 27 - Curva de calibração da cafeína para Espectrofotometria nas concentrações 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg.L⁻¹



Fonte: (AUTOR, 2018).

O valor de 0,9993 para R^2 comprova os ajustes da equação da reta às análises realizadas. Por meio da equação da reta, determinou-se as concentrações reais das amostras analisadas.

A Figura 29 representa um espectro de um dos pontos utilizados para a construção da curva de calibração.

Figura 28 - Espectro da solução padrão de cafeína 1,0 mg L⁻¹

Fonte: (AUTOR, 2018).

O espectro representa a absorbância (Abs) obtida em relação à concentração de 1,0 mg. L⁻¹ de cafeína com máximo de absorção no comprimento de onda de 272 a 275 nm. Com relação às amostras, o espectrofotômetro forneceu as absorbâncias (Abs) e as concentrações das amostras analisadas em mg.L⁻¹. Essas concentrações foram calculadas através da Equação 5 obtida pela curva de calibração:

$$Y = 0,2605X - 0,0403, R^2 = 0,9993 \text{ (Equação 5)}$$

No qual X representa a concentração real das amostras e estas estão organizadas na Tabela 11.

Tabela 10 - Concentração de cafeína das amostras pela análise espectrofotométrica.

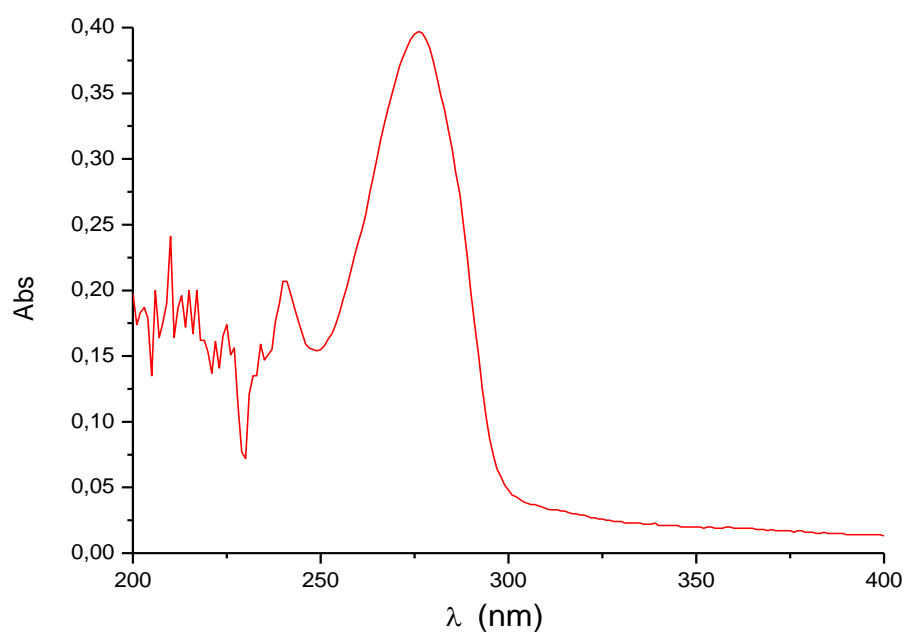
Amostra	Absorbância (Abs)	Concentração real (mg.L ⁻¹)
Café solúvel comum (C ₁)	0,378	1,606
Bebida energética (E ₁)	0,307	1,333
Chá preto (T ₂)	0,261	1,157

Fonte: (AUTOR, 2018).

6.2.1 Café solúvel

Uma amostra de café solúvel (C₁) comum foi utilizada para análise e seu espectro está representado na Figura 30.

Figura 29 – Espectro da amostra de café solúvel C₁



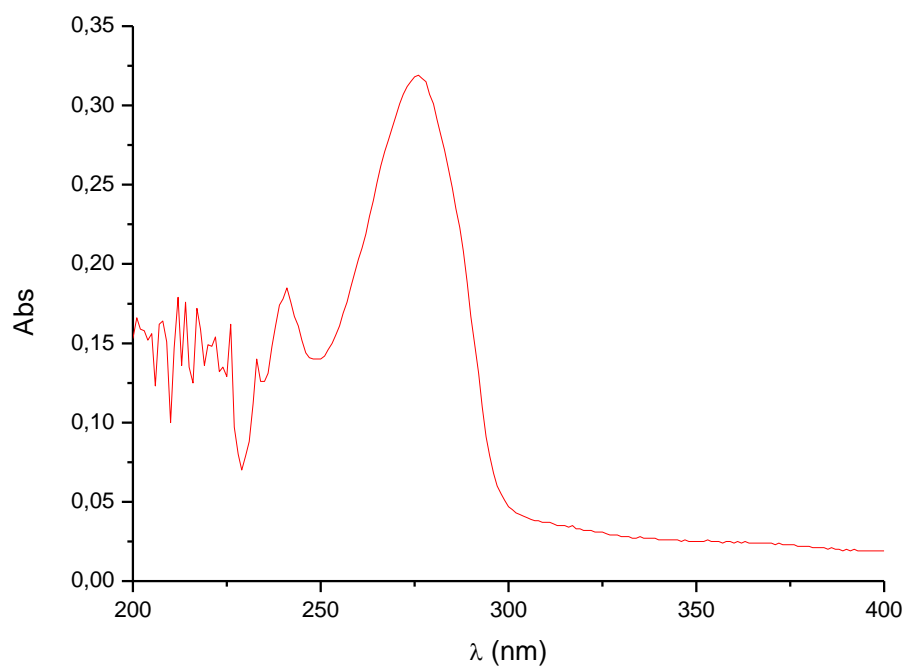
Fonte: (AUTOR, 2018).

A concentração de cafeína para o café solúvel encontrada foi de 6,692 mg.g⁻¹, valor dentro da faixa de concentração encontrada na literatura.

6.2.2 Bebida Energética

Uma amostra de bebida energética E_1 foi utilizada para análise e seu espectro está representado na Figura 31.

Figura 30 - Espectro da amostra de bebida energética E_1

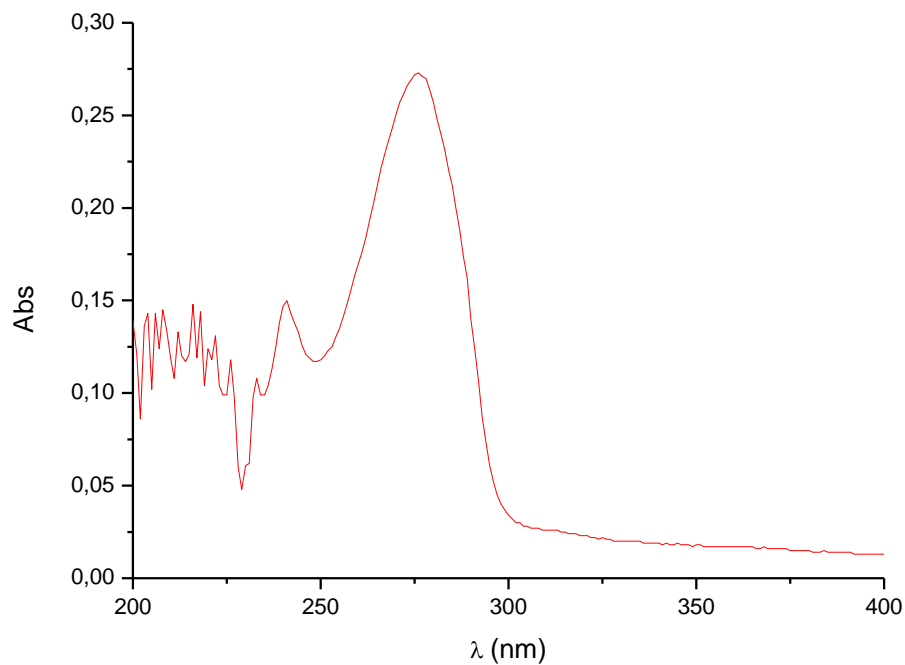


Fonte: (AUTOR, 2018).

A concentração encontrada para bebida energética foi de 66,500 mg /200mL. Foi feita a conversão para a concentração em mg/200mL, conforme descrita no rótulo.

6.2.3 Chá preto

Uma amostra chá preto (T_2) foi utilizada para análise e seu espectro está representado na Figura 32.

Figura 31 - Espectro da amostra de chá preto (T₂)

Fonte: (AUTOR, 2018).

A concentração de cafeína, sob infusão de 5 minutos encontrada de acordo com o espectro foi de 86,677 mg.L⁻¹, superior a encontrada na literatura.

Assim, foi possível comparar as metodologias analíticas em três amostras: café solúvel comum (C₁), bebida energética E₁ e chá preto T₂ na Tabela 12.

Tabela 11 - Comparação de metodologias analíticas para determinação da concentração de cafeína.

Amostra	Concentração de cafeína obtida por CL	Concentração de cafeína obtida por Espectrofotometria UV-Vis	Concentração de cafeína do rótulo ou em uma faixa de concentração da literatura
Café solúvel comum (C ₁)	5,520 mg.g ⁻¹	6,692 mg.g ⁻¹	3,34 à 7,59 mg g ⁻¹
Bebida energética (E ₁)	50,300 mg /200 mL	66,500 mg /200mL	70 mg /200mL
Chá preto (T ₂)	76,320 mg.L ⁻¹	86,677 mg.L ⁻¹	74 mg

Fonte: (AUTOR, 2018)

O café solúvel possui uma faixa de concentração de cafeína variável como já mencionado. Entretanto ambas as metodologias analíticas apresentaram concentrações de cafeína dentro da faixa encontrada na literatura.

Em relação à bebida energética E₁, a determinação espectrofotométrica mostrou-se mais eficiente quando comparada com a cromatográfica, fato que pode ser justificado por uma melhor extração da cafeína com o clorofórmio.

Já o chá preto (T₂) apresentou melhor quantificação por CL, quando comparado com a concentração de cafeína encontrada na literatura com infusão de 5 minutos. O cromatograma de chá preto apresentou sinal em um tempo de retenção adequado e livre de interferentes enquanto que o espectro apresentou espectros evidentes em comprimentos de onda entre 200 e 250 nm.

Segundo Vogel (1981) a extração fundamenta-se no fato de que algumas substâncias são solúveis em compostos orgânicos e pouco solúveis em água. Nesse sentido outros compostos orgânicos foram extraídos com clorofórmio e comprometeram a análise, fato observado na divergência da na

determinação espectrofotométrica com concentrações superiores à cromatográfica. Para melhor verificar as diferenças entre as metodologias o ideal seria que as análises para determinação espectrofotométrica fossem realizadas em replicatas.

7 CONCLUSÃO

As determinações analíticas pelo método cromatográfico e pelo método e espectrofotométrico apresentaram resultados satisfatórios em relação à rotulagem dos alimentos selecionados e aos resultados encontrados na literatura científica. Ambas as metodologias são de baixo custo e foram eficientes quanto à comparação das concentrações de cafeína dos alimentos a seus rótulos e dados da literatura científica. As determinações cromatográficas na maioria das amostras mostrou ser mais eficiente em relação à determinação espectrofotométrica, ainda que apenas três amostras foram analisadas por meio desta última. A menor eficiência do método espectrofotométrico deve-se à extração de outras moléculas orgânicas além da cafeína, o que pode ter comprometido as análises.

Os refrigerantes à base de cola foram os resultados mais próximos da literatura, o que comprova que a determinação cromatográfica para essa bebida é eficaz e de baixo custo.

Os cafés solúveis foram as amostras que mais gerou dificuldades quanto às concentrações de cafeína, uma vez que a literatura traz faixas de concentração e o rótulo não registra quaisquer concentrações de cafeína. Apesar da falta de informações tanto as concentrações quantificadas por CL quanto por Espectrofotometria encontraram-se na faixa encontrada na literatura.

Em relação às bebidas energéticas e o suplemento à base de cafeína, esperava-se que as concentrações de cafeína determinadas por CL apresentassem valores mais próximos à rotulagem, uma vez que os cromatogramas exibiram sinais livres de interferentes.

No que se diz respeito aos limites de cafeína em alimentos, a Portaria nº 868/1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece um limite de 350 mg L⁻¹ de cafeína em quaisquer alimentos, sejam eles líquidos ou sólidos. Frente a essa determinação, as amostras analisadas nesse trabalho não excederam aos limites estabelecidos pela ANVISA.

As duas metodologias analíticas se mostram adequadas para a determinação de cafeína em alimentos. Entretanto o processo de extração para a via espectrofotometria é mais trabalhosa, uma vez que apresenta várias

etapas além de utilizar grande quantidade de solvente orgânico como o clorofórmio. Quantidade esta que não se adequa aos princípios da Química Limpa, cujo objetivo é minimizar a utilização de solventes orgânicos.

Já o processo cromatográfico foi realizado de maneira mais simples, pois no processo de preparo de amostras utiliza-se apenas MgO e não se utiliza reagentes orgânico. Permite também a separação dos componentes na análise. Enquanto que na determinação espectrofotométrica outras substâncias podem absorver no mesmo comprimento de onda o que compromete a diferenciação de outras espécies uma vez que a análise realizada de forma conjunta há a possibilidade de todas as espécies químicas absorverem comprimento de onda, provocando uma interferência espectral.

REFERÊNCIAS

ACHESON, Kevin J; GREMAUND, Gérard; MEIRIM, Isabelle, et. al. Metabolic Effects of Caffeine in Humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.79, p. 40- 76, 2004.

ARRUDA, Aline C. et al . Justificativas e motivações do consumo e não consumo de café. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 29, n. 4, p. 754-763, Dez. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Estatísticas – indicadores da indústria de café no Brasil**. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2017/>>. Acesso em: 02 de jun. de 2018.

BALLISTRERI, Martha C.; CORRADI-WEBSTER, Clarissa Mendonça. El uso de bebidas energizantes en estudiantes de educación física. **Revista Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 16, n. spe, p. 558-564, Ago. 2008.

BARRON, Andrew R; ALLEN, John J; BOTT, Simon, et al. **Physical Methods in Chemistry and Nano Science**. Disponível em: <<https://cnx.org/contents/uieDnVBC@23.1:uZ0soqWw@9/Introduction>>. Acesso em: 01 de jun de 2018.

BELAY, Abebe., TURE, Kassahum., REDI, Mesfin., ASFAW, Araya. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/VIS spectrometer, **Food Chemistry**, p. 310–315, 2008.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/Justificativa_Limites_Suplementos.pdf/e265ccd0-8361-4d8e-a33f-ce8b2ca69424>. Acesso em: 25 de mai. de 2018.

BRASIL. **Regulamento Técnico para composto líquido pronto para consumo**. Portaria nº 868/1998.

BRITO, Natilene Mesquita; et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, 2003.

BUERGUE, Ignaz J.; POIGER, Thomas; MULLER, Markus D.; BUSER, Hans-R. Caffeine, an Anthropogenic Marker of Wasterwater Contamination of Surface Water. **Environmental Science e Technology**, v. 37, n. 4, p. 691-700, 2003.

BURKE, Louise M. Caffeine and sports performance. **Applied Physiology Nutrition Metabolism**. Ottawa, v.33, n.7, p. 1319-1334, 2008.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F.. TEOR DE CAFEÍNA EM CAFÉS BRASILEIROS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., Campinas , v. 18, n. 4, 1998 .

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas. Unicamp, 2006.

DE MARIA, Carlos A. B.; MOREIRA, Ricardo F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 99-105, Fev. 2007. Disponível em:<<http://www.directindustry.com/pt/prod/harvard-bioscience-inc/product-23613-1323269.html>>. Acesso em 02 de dez de 2018.

FILHO, Waldemar G. V. **Bebidas não alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo:Blucher, 2010.

GUERRA, Ricardo O; BERNARDO, Gerlane C.; GUTIERREZ, Carmen V. Cafeína e esporte. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, Niterói, v. 6, n. 2, p. 60-62, Abr, 2000.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro. LTC, 2013.

HARVARD, BIOSCIENCE, INC. disponível em Acesso em: 25 d nov. de 2018.

HIGSON, Séamus. **Química Analítica**. São Paulo. McGraw-Hill, 2009.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. 6 ed. Bookman, 2009.

ICO (International Coffe Organization. Disponível em: <http://www.ico.org/es/botanical_c.asp?fbclid=IwAR1SIL7gq5vBNT0jN4bnUCHQTsgPjZGvQNh6uR_uaBtJKk7E_MwwQypa06k#bot> Acesso em 01 de dez de 2018.

ISO 20481:200. Coffe and coffe products. **Determination of the caffeine content using high performance liquid chromatography (HPLC) – Reference method**.

KNUPP, Vagner F. **Determinação de cafeína por método espectrofotométrico por absorção molecular na região do ultravioleta**. Roteiro de aula prática. Ouro Branco, 2015.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia líquida moderna – HPLC/CLAE**. 1 ed. Campinas. Átomo, 2009.

LOPES, Priscila R. N. R. **Efeitos ergogênicos da ingestão de cafeína sobre variáveis bioquímicas e de desempenho anaeróbico**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2015.

MONTEIRO, Mariana C; TRUGO, Luis C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.

NAIK, Pura J. Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Índia, 2001.

NEVES, Afonso C. Cafeína e café: estimulantes do progresso e da ciência em São Paulo no início do século XX. **Revista de Neurociências**, v.18, p. 595-600, 2010.

ORMOND, J.G.P.; DE PAULA, S. R. L.; FILHO, P. F. Livro: **Café: (re) conquista dos mercados**. BNDS Setorial, Rio de Janeiro, n.10. set. 1999

PASSOS, Elisângela A. **Espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Vis**. São Paulo, 2011

PIRES, Elísabet. **Chocolate sí, pero sin pasarse**. Disponível em: <<https://isqch.wordpress.com/2013/12/16/chocolate-si-pero-sin-pasarse/>> . Acesso em: 25 de abr. de 2018.

QUEIROZ, Sonia C. N.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo , v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUADROS, T; MAIA, G. **A quantidade de cafeína em diferentes bebidas, 2018**. Disponível em: <<https://www.nexojornal.com.br/grafico/2018/08/10/A-quantidade-de-cafe%C3%ADna-em-diferentes-bebidas>>. Acesso em: 29 de nov. de 2018.

SILVA, C; BEIJAMIN, C; CARVALHO, L; ROCHA, E; MORI,E. Determinação do teor de cafeína em diferentes tipos de café. Revista. **Demetra: Alimentação, nutrição e saúde**. Rio de Janeiro., v. 13, n.2, 2018.

SKOOG, Douglas. A.; WEST, Donald. M.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

VINADÉ, Maria E. C.; VINADÉ, Elsa. R. C. **Métodos espectroscópicos de análise quantitativa**. Santa Maria. UFSM, 2005.

VOGEL, A. I. **Química orgânica: análise orgânica qualitativa**. 3 ed. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico, S.A. 1981, v. 3.