

Validação analítica e quantificação de método para determinação da concentração de cafeína em produtos descafeinados

LIMA, M. F. F. de¹; FRANÇA. G. I. S.¹; SOBRINHO, J. R. B. C.¹; SOUSA, C. E. M. de^{1*}.

¹Centro Universitário Tabosa de Almeida, Avenida Portugal, 584, Bairro Universitário, CEP 55016-901, Caruaru, Pernambuco, Brasil.

e-mail: nandadelyma@gmail.com ou eduardomiranda@nudfac.com.br

Abordar-se neste artigo o desenvolvimento e validação de técnica analítica para quantificação de cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV). O estudo teve por objetivo determinar o teor de cafeína e verificar se os teores nos cafés descafeinados estão dentro dos padrões determinados por agências reguladoras. A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna C-18 de fase reversa Phenomenex®, Gemini, com fase móvel água/acetonitrila. As amostras foram extraídas e viabilizadas em acetonitrila e analisadas em comparação a cafeína padrão em clorofórmio (1 mg.ml⁻¹). A técnica determinada apresentou as melhores condições de separação cromatográfica. Os resultados, assegurados pela validação demonstrou técnica com muito boa linearidade, precisão e exatidão, além de metodologia de execução simples, rápida, com menores custos e resultados satisfatórios, reduzido tempo sem comprometer a fidedignidade da análise.

1. Introdução

A cafeína (3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona) é uma trimetilxantina com fórmula estrutural C₈H₁₀N₄O₂ e massa molecular de 198,19 g/mol¹, apresenta forma cristalina, coloração branca e aspecto brilhante, característico do grupo alcaloides

ao qual pertence. A depuração da substância no organismo humano é via hepática através do sistema citocromo P450 CYP1A2, consistindo na desmetilação da cafeína, produzindo três principais metabólitos ativos, 3,7-dimetilxantina; 1,3-dimetilxantina e em maior quantidade, 1,7-dimetilxantina. Sua biodisponibilidade via gastrointestinal é de mais de 90% e picos plasmáticos atingidos entre 20 a 30 minutos após ingestão. A cafeína está presente na dieta através do café, refrigerantes, isotônicos, suplementos vitamínicos dentre outros produtos¹⁻⁴.

Figura 1.

A ação no organismo é diretamente nos íons das membranas celulares excitáveis e ações sistêmicas no sistema nervoso central (SNC). Proporciona aumento da força de contração muscular, devido ao efeito de liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático das células, impedimento a recaptção e consequente aumento da concentração livre. Atuação na bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+), mantendo as concentrações de potássio (K^+) altas no interior das células e baixa em seu exterior, aumentando a excitabilidade celular. Além da inibição da enzima fosfodiesterase, responsável pela degradação do segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (AMPc - cíclico), aumentando seu tempo de meia vida. E, antagonismo dos receptores A1, de adenosina, receptor que também interagem com o AMPc, provocando um aumento desse segundo mensageiro e, como resposta, liberação de catecolaminas, aumento da pressão sanguínea, diurese e ativação do SNC⁵⁻⁷.

Numerosos estudos determinam métodos analíticos distintos para identificação e quantificação da cafeína. As técnicas variam entre gravimetria, cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida (CL) associada a espectrometria de massas e de infravermelho. São eficientes, proporcionam resultados fidedignos e poucos

interferentes, porém altamente laboriosas, exigindo o processamento de grandes quantidades de amostras, alto tempo de processamento individual ou não disponíveis nos laboratórios de análise devido o alto custo dos equipamentos e reagentes exigidos na execução^{8,9}.

Os métodos com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV) são frequentes na literatura de análise da cafeína, verificando melhor efetividade na faixa ultravioleta e colunas de fase reversa. Apesar das informações disponíveis na literatura, é notável a falta de padrão analítico, tempo de processamento muito longo (>10 min) e procedimentos específicos de quantificação. Desta forma, faz-se necessário a um método para quantificar teores de cafeína em vias não biológicas para apoiar estudos de controle de qualidade de produtos¹⁰⁻¹⁶.

Este artigo apresenta um método analítico HPLC-UV para a determinação dos teores de cafeína em café descafeinado. A técnica utiliza a extração líquido-líquido e analisada no intervalo de $\mu\text{m.mL}^{-1}$. O estudo tem por objetivo determinar o teor de cafeína e verificar se os teores de cafeína nos cafés descafeinados disponíveis no mercado brasileiro estão dentro dos padrões determinados pelas agências reguladoras.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation / instrumentação

O procedimento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC-UV) foi realizado usando um cromatógrafo de sistema de bombas binárias (LC 20AD), injetor manual (SIL), um transmissor automático, um controlador de sistema (CBM 20A) ligado à detecção ultravioleta (SPD 20A) Shimadzu (Kyoto, Japão). Para o procedimento de extração das amostras de cafeína foi utilizada centrífuga Fanem

Excelsa II 206 BL (Brasil). As amostras foram armazenadas em refrigerador Consul (São Paulo, Brasil) até a análise.

2.2. Chromatography conditions / condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna C18 de fase reversa Phenomenex®, Gemini com comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 4,6 mm e partículas com tamanho de 5 μm . A fase móvel foi constituída de água/acetonitrila (82:18 v/v) e bombeada em fluxo de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O procedimento foi realizado em temperatura de 22° C e a detecção em comprimento de onda de 285 nm.

2.3. Preparation of working solutions and quality control standards / preparações de soluções de trabalho e padrão de solução controle

A solução reserva de cafeína padrão (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi preparada por dissolução da cafeína em clorofórmio (m/v). A curva de calibração da cafeína foi construída utilizando metanol em concentrações: 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As amostras para precisão e exatidão também foram preparadas da cafeína padrão em clorofórmio (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e diluídas em metanol, na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.4. Sample preparation / preparação da amostra

As amostras foram preparadas transferindo 0,25 g para um becker, ao qual foi adicionada 0,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M. Em seguida, adicionou-se 5 mL de água destilada a temperatura de 70° C e foi mantida sob agitação. O sistema foi basificado com 0,25 mL de hidróxido de potássio (KOH) e mantido sob agitação até atingir temperatura ambiente. As amostras receberam 4 mL de clorofórmio e foram submetidas a centrifugação em temperatura ambiente, por 5° C a 2500 x g. A fase inferior foi separada e recebeu 2 mL de clorofórmio e novamente submetida as mesmas

condições de centrifugação. A fase orgânica resultante foi transferida para becker e evaporado até a secura. O resíduo das amostras foram redissolvidos em 2 mL de acetronitrila / água (1:1 v/v) e acondicionados em eppendorf para análise.

2.5. Method validation

A quantificação baseou-se na relação entre a área do pico das amostras de café descafeinado e a área do pico da cafeína padrão. Na determinação da precisão (desvio padrão relativo) e exatidão (estudos de erros relativos) as amostras foram preparadas entre dois analistas, com seis aplicações cada, foram analisadas no mesmo dia (precisão e exatidão intra dia) e em outro dia consecutivo (precisão e exatidão inter dia).

2.6. Method Application

O método foi determinado considerando a melhor condição cromatográfica obtida no procedimento. O estudo utilizou única extração por cada amostra de café descafeinado, os produtos foram enumerados 1, 2, 3, 4, 5 e 6, em ordem aleatória, os nomes dos fabricantes foram confidencializados por motivos éticos. As amostras dos cafés após o procedimento de extração foram suspensas em acetoneitrila:água (1:1 v/v), e refrigeradas a 8 °C até análise.

2.7. Statistical analysis

Os valores obtidos a partir das análises realizadas foram calculados utilizando o software Lab-Solutions (versão 3.6). Esses dados, plotados em Excel® 2010, com aplicação dos seguintes tratamentos estatísticos: média, desvio padrão, coeficiente de variação e regressão linear.

.3. Results and Discussion

3.1. HPLC chromatogram

Analisando os resultados obtidos de acordo com a metodologia experimental aplicada, a cafeína nas amostras apresentou boas condições de separação dos demais componentes do café e sem a presença de interferentes em todas as seis amostras. O tempo de retenção da cafeína foi de 4,578 minutos e o tempo total de corrida para cada amostra foi 7,0 minutos, como é possível verificar na Figura 1. Na literatura é relatado o uso de fase móvel composta por metanol em solução aquosa de tampão fosfato ($<0,1$, $>0,01$ mol.L⁻¹ e pH entre 4,0 e 5,0), porém a utilização da solução aquosa de acetronitrila sem tampão não interferiu na qualidade da leitura cromatográfica¹⁷⁻²⁰. Os picos apresentaram-se bem definidos, em curto tempo de identificação.

Figura 2.

3.2. Linearity

A linearidade da análise cromatográfica foi avaliada em diversas concentrações de cafeína padrão, no intervalo de 10–100 µg.mL⁻¹. Os resultados apresentaram curva de calibração com boa linearidade, comprovada pelo coeficiente de determinação (r^2) no valor de 0.9965 e curva com ótima precisão e exatidão, representadas na Tabela 1. O Limite de detecção foi determinado em 0,1 µg.mL⁻¹ e o limite de quantificação foi de 0,35 µg.mL⁻¹.

Figura 3.

Tabela 1.

3.3. Precision and accuracy

No estudo, as precisões foram referidas com o desvio padrão relativo (RSD %) na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando valores $<2\%$. As precisões intraday, entre os aplicadores 1 e 2, foram de $0,48\%$ e $1,22\%$, com exatidão de $102,887\%$ e $100,7903\%$, respectivamente e do dia 2, $1,50\%$ e $0,64\%$ e exatidão de $100,696\%$ e $99,591\%$, respectivamente, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2.

3.5. Estudo quantitativo

A análise quantitativa de cafeína nos produtos testados é descrita na Tabela 3. Os valores de concentração foram calculados a partir da área da cafeína de cada amostra. A média de concentração encontrada foi de $0,1887 \text{ g.100 g}^{-1} \pm 10,7$. Todos os valores obtidos encontraram-se dentro da faixa permitida, inferior a $0,3 \text{ g.100 g}^{-1}$, de acordo com a Resolução Brasileira RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A maior concentração de cafeína encontrada foi de $0,2388 \text{ g.100 g}^{-1}$ e o menor, de $0,0946 \text{ g.100 g}^{-1}$, das amostras 6 e 1, respectivamente.

Tabela 3.

4. Conclusion

A quantificação de cafeína nos café descafeinados demonstrou que todos os produtos apresentaram teor inferior a $0,25 \text{ g.100 g}^{-1}$ representando que todos os produtos analisados estão com as determinações das agencias reguladoras do Brasil, que determina que o teor de cafeína inferior a $0,3 \text{ g.100 g}^{-1}$. Os resultados são assegurados pela validação, que demonstrou que a técnica desenvolvida apresentou muito boa

linearidade, precisão e exatidão, além de fornecer uma metodologia mais simples para a extração e análise, reduzido tempo de execução de leitura (7 minutos), sem comprometer a fidedignidade dos resultados. A metodologia desenvolvida permitiu a verificação de uma técnica rápida e com menores custos de análise e resultados satisfatórios no estudo da quantificação da cafeína em cafés descafeinados.

5. Agradecimentos

Ao professor orientador e ao Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces/Unita) pelo apoio colaborativo ao desenvolvimento da pesquisa.

6. References

- (1) Altimari, LR., ES Cyrino, SM Zucas, AH. Okano & RC. Burini (2001) Rev. Bras. Cienc. Mov. **9(3)**: 54-64.
- (2) Braga, L.C.; Alves, L.P. (2000). Rev Bras Cienc Mov. **8 (3)**: 33-37.
- (3) De Hernandez, C.M.; Walton, H.F. (1972). Anal Chem. **44(6)**: 890-94.
- (4) Monteiro, M.C.; Trugo, L.C. (2005). Qui Nov. **28(4)**: 637-41.
- (5) Ashihara, H.; Sano, H.; Crozier, A. (2008). Phytoc. **69**: 841-56.
- (6) Moreira, I.; Scheel G.L.; Hatumura, P.H.; Scarminio, I.S. (2014). Qui. Nov. **37(1)**: 257-61.
- (7) Ferdholm, B.B. (1985). Acta Med Scand. **217(2)**: 149-53.
- (8) Afonso, J.C.; Pereira, K.S.; (2010). Qui Nov. **33(4)**: 957-63.
- (9) De Maria, C.A.B.; Moreira, R.F.A.; (2007). Qui Nov. **30(1)**: 99-05.
- (10) De Hernandez, C.M.; Walton, H.F.; (1972). Anal Chem. **44(6)**: 890-94.
- (11) Aragão, N.M.; Veloso, M.C.C.; Andrade, J.B. (2009). Qui Nov. **32(9)**: 2476-481.
- (12) Walton, H.F.; Eiceman, G.A.; Otto, J.L.; (1979). J Chromatogr. **180(1)**: 145-56.

- (13) De Maria, C.A.B.; Moreira, R.F.A. (2007). *Qui Nov.* **30(1)**: 99-05.
- (14) Alves, A.B; Bragagnolo, N. (2002). *Rev Bras Cienc Farm.* **38(2)**: 237-43.
- (15) Pinto, G.A.T.; Freitas, L.G.; Machado, Y.; Marinho, P.A. (2015). **4(3)**: 28-7.
- (16) Hanai, T.; Walton, H.F. (1997). *Anal Chem.* **49(6)**: 764-66.
- (17) Aragão, N.M.; Veloso, M.C.C; Andrade, J.B.; (2009). *Qui Nov.* **32(9)**: 2474-481.
- (18) Moreira, I.; Scheel G.L.; Hatumura, P.H.; Scarminio, I.S. (2014). *Qui Nov.* **37(1)**: 2014.
- (19) Murgia, E.; Richards, P.; Walton, H.F. (1973). *J Chromatogr.* **87(2)**: 523-33.
- (20) Murgia, E.; Walton, H.F. (1975). *J Chromatogr.* **104(2)**: 417-24.

ANEXO – Imagens

Figure 1. Chemical structure of caffeine

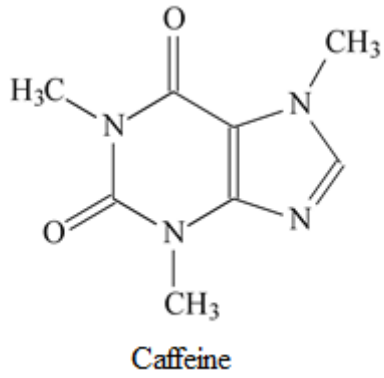


Figure 2. Chromatogram with reading information from caffeine

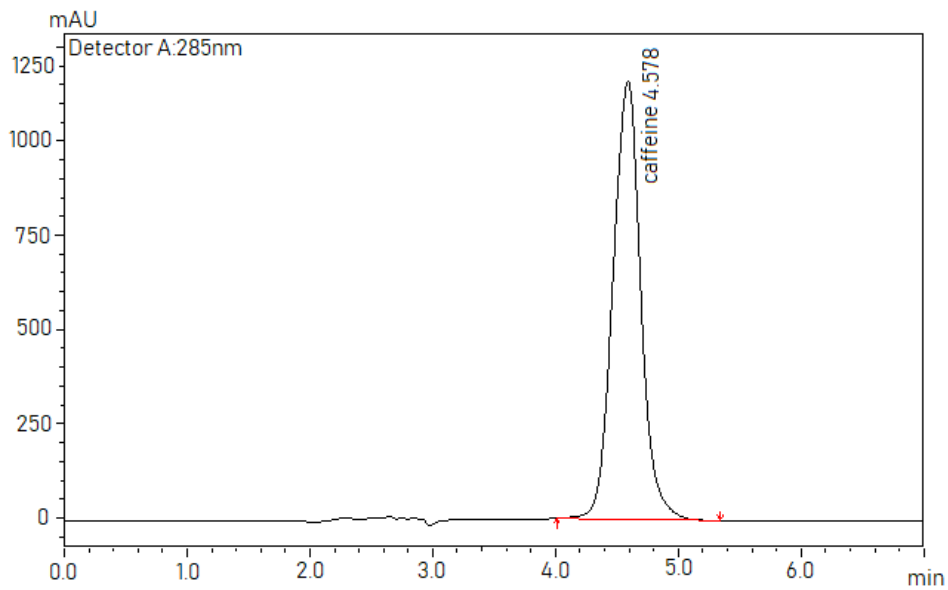


Figure 3. Concentration profile-caffeine after chromatographic reading area. Data on average. 6 samples.

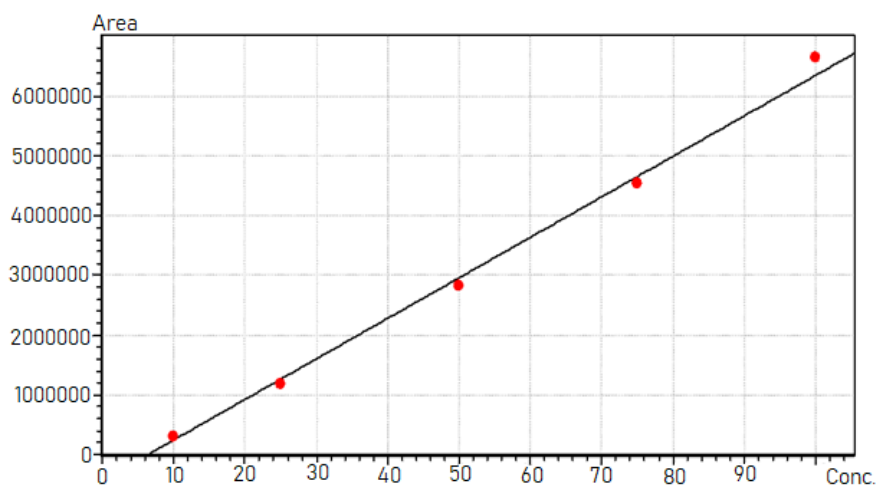


Table 1. Accuracy and precision of Linearity.

Spiked concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Determined concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (Mean \pm SD) (n=3)	Precision (%)	Accuracy (%)
10	10.113 \pm 0.255	2.52	101.13
25	24.961 \pm 0.217	0.87	97.84
50	50.352 \pm 0.605	1.20	100.70
75	77.553 \pm 0.481	0.62	103.40
100	103.655 \pm 1.095	1.06	103.65

Table 2: Precision and accuracy results of validation

Spiked conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intraday ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (n=6)			
	Day 1		Day 2	
	Applicator 1	Applicator 2	Applicator 1	Applicator 2
	Mean (R.S.D.)	Mean (R.S.D.)	Mean (R.S.D.)	Mean (R.S.D.)

0.5	51.444 (0.48%)	50.395 (1.22%)	50.348 (1.50%)	49.796 (0.64%)
Acc. (R.E.)	102.887	100.790	100.696	99.591

Table 3: Concentrations of caffeine found in each sample

Cafeína (n=4)		
Test data	Conc. g/100g	Precision (R.S.D.) (%)
Amostra 1	0.0946	6.935
Amostra 2	0.2371	4.103
Amostra 3	0.1964	8.937
Amostra 4	0.1679	5.566
Amostra 5	0.1972	3.768
Amostra 6	0.2388	3.480