

As metil xantinas são alcalóides purínicos que estão presentes em diversos produtos naturais como o guaraná, *Paulinia cupana* (Carlson & Thompson, 1998), folha de mate, *Ilex paraguense* (Athayde et al., 2000), café, chá preto, cupuaçu, cacau e outros (Blauch & Tarka, 1983; Terada & Sakabe, 1984). Dentre essas substâncias, a teofilina é usada na indústria farmacêutica como broncodilatador e existe em pequenas quantidades no chá e no cacau. A teobromina é o principal alcalóide existente no fruto do cacau (*Theobroma cacao*), estando também presente em produtos processados (achocolatados) na faixa de 0,5% a 2,0% (Zoumas et al., 1980). Nas sementes de guaraná, a teobromina é encontrada em menor quantidade que no cacau, e a teofilina, normalmente, encontra-se em quantidades traço (Carlson & Thompson, 1998). A cafeína é o estimulante mais utilizado no mundo, estando presente no café e no chá, mas também no fruto e no extrato de guaraná. A quantificação destes alcalóides, além de determinar seus teores nos diversos tipos de alimentos e bebidas, tem particular importância ao servir como marcador da presença do produto natural nestes mesmos produtos. Isto porque pode ocorrer alguma adulteração em produtos processados pela adição de cafeína sintética aos mesmos.

Material e Métodos

Este trabalho descreve um método de análise de cafeína, teobromina e teofilina por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa, que tem como grande vantagem a rapidez, economia e a facilidade de execução (Castro & Mello, 2000). Este método pode ser aplicado em amostras de achocolatados e de extratos e bebida de guaraná. A análise consiste na extração das metil xantinas por 10 minutos em ultra-som, utilizando como solução extrativa a própria fase móvel. Após a extração, as soluções são avolumadas também com fase móvel e disponibilizadas para a análise cromatográfica. Neste método, nenhum tipo de *clean up* é necessário - a amostra é filtrada em membrana FHUP 0,45 µm e injetada no cromatógrafo líquido. O sistema cromatográfico é constituído por uma bomba isocrática, coluna de fase reversa Waters Nova

Determinação de Metil Xantinas em Alimentos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Izabela Miranda de Castro ¹
Jeane Santos Rosa de Mello ²

Pak C₁₈ 5 µm (150 mm x 4,6 mm), um detector de UV no comprimento de onda de 280 nm e um sistema de integração, aquisição e processamento dos dados. A composição da fase móvel foi de 10% de MeCN em HOAc 0,5%. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min. O ácido acético na fase móvel é utilizado como supressor de ionização (Lindsay, 1992), isto é, desloca o equilíbrio no sentido de não permitir a ionização das metil xantinas. O ácido acético na fase móvel é utilizado como supressor de ionização, isto é, desloca o equilíbrio no sentido de não permitir a ionização das metil xantinas. A diminuição do pH impede a ionização parcial dos analitos (metil xantinas - substâncias básicas), pois, caso contrário, seria possível observar a formação de duas bandas (uma neutra e outra ionizada), ou, ainda, uma banda larga e mal resolvida do componente de interesse.

Resultados

A ordem de eluição e os tempos de retenção observados nas condições descritas foram os seguintes: teobromina (3,2 min), teofilina (4,2 min) e cafeína (8,3 min). Foram feitas curvas de linearidade para as 3 metil xantinas (Figuras 1, 2 e 3), onde pode-se observar um comportamento linear para estas substâncias, nas faixas de concentração utilizadas.

¹ Química, Ph.D., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: imcastro@ctaa.embrapa.br

² Química, B.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: jeane@ctaa.embrapa.br

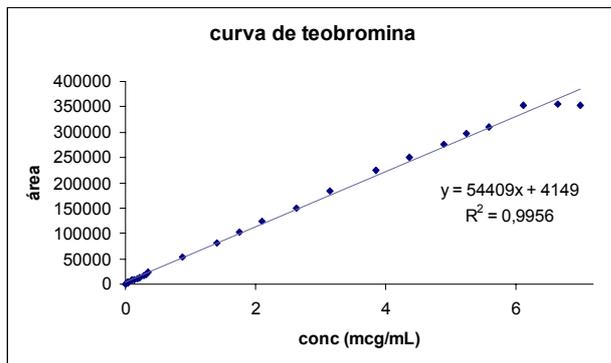


Fig. 1. Curva de linearidade de teobromina - área do pico x concentração

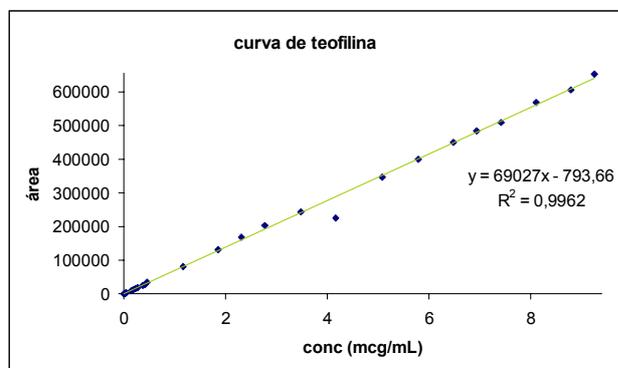


Fig. 2. Curva de linearidade de teofilina - área do pico x concentração

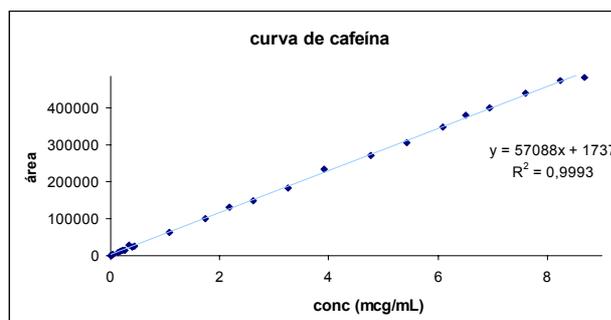


Fig. 3. Curva de linearidade de cafeína - área do pico x concentração

Este método foi utilizado na análise de 143 amostras de refrigerante de guaraná, onde foram monitorados os teores de teobromina e de cafeína. Os resultados obtidos demonstraram a sensibilidade do método proposto. O mesmo procedimento analítico, aplicado em 25 amostras de chocolate em pó, de cupuaçu em pó, guaraná em pó, bebidas energéticas e em extratos de guaraná, também apresentou boa reprodutibilidade para todas as metil xantinas. Os perfis cromatográficos da solução padrão e de uma amostra de guaraná se encontram respectivamente nas Figs. 4 e 5.

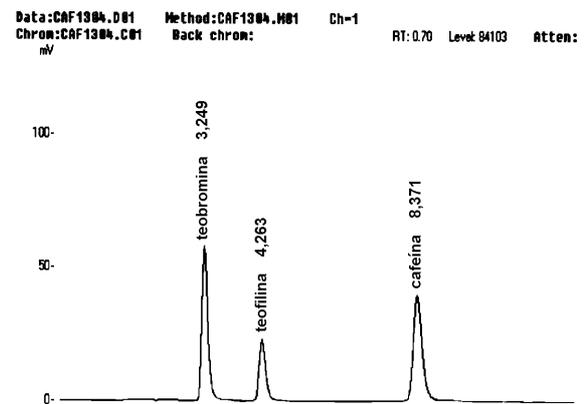


Fig. 4. Cromatograma dos padrões de metil xantinas de uma solução padrão

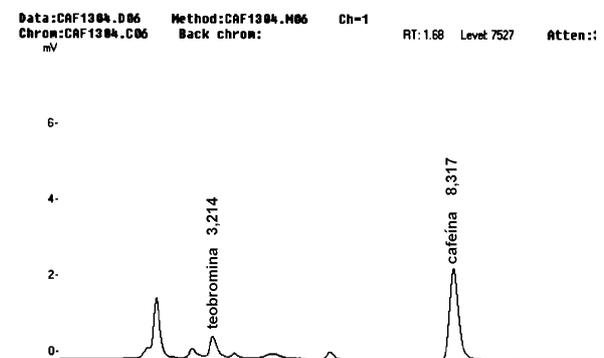


Fig. 5. Cromatograma de metil xantinas de uma amostra de bebida energética

Conclusões

1. O procedimento analítico – extração da amostra com a fase móvel no ultra-som por 10 minutos, sem *clean up*, e análise por cromatografia líquida usando fase reversa e detetor de UV – aplicado na análise de diferentes amostras demonstrou ser bastante adequado.
2. As curvas de linearidade obtidas para as três metil xantinas mostraram que os resultados são lineares para a faixa de concentração utilizada nas amostras (até 5 µg/mL).
3. Este método, aplicado na análise 143 amostras de refrigerante de guaraná, onde foram monitorados os teores de teobromina e de cafeína, demonstrou a sua sensibilidade assim como a sua reprodutibilidade.
4. O mesmo procedimento analítico aplicado em 25 amostras de chocolate em pó, de cupuaçu em pó, bebidas energéticas, guaraná em pó e em extratos de guaraná, também apresentou boa reprodutibilidade para todas as metil xantinas.
5. O método apresentou excelente robustez e versatilidade.

Referências Bibliográficas

ATHAYDE, M. L.; COELHO, J. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticularwax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill, **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, p. 853-857, 2000.

BLAUCH, J. L.; TARKA JR., S. M. HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea and instant hot cocoa mixes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, p. 745-750, 1983.

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **Journal of the AOAC International**, Amsterdam, v. 81, p. 691-701, 1998.

CASTRO, I. M.; MELLO, J. S. R. Rápida determinação de teobromina, teofilina e cafeína por HPLC em bebidas

de guaraná e achocolatados, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza, CE. **Livros de Resumos**. Fortaleza: SBCTA, 2000. v. 4, p. 2.43.

LINDSA Y, S. **High performance liquid chromatography**. Londres: Ed. ACOL, 1992.

TERADA, H.; SAKABE Y. High performance liquid chromatographic determination of theobromine, theofylline and caffeine in food products. **Journal of Chromatography**, Washington, D.C., v. 291, p. 453-459, 1984.

ZOUMAS, B. L.; KREISER, W. R.; MARTIN, R. A. Theobromine and caffeine content of chocolate products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 5, p. 314-316, 1980.

Comunicado Técnico, 55

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 2410-7400
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-7498
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2002): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Esdras Sundfeld*
Membros: *Maria Ruth Martins Leão, Neide Botrel Gonçalves, Renata Torrezan, Ronoel Luiz de O. Godoy, Virginia Martins da Matta*

Expediente

Supervisor editorial: *Maria Ruth Martins Leão*
Revisão de texto: *Comitê de Publicações*
Editoração eletrônica: *André Luis do N. Gomes*

CGPE 1320