



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**CAFEÍNA: BIODSSÍNTESE, PROPRIEDADES,
APLICAÇÕES E QUANTIFICAÇÃO**

Isabela Maria Lara Moreira

**Belo Horizonte - MG
2013**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**CAFEÍNA: BIOSÍNTESE, PROPRIEDADES,
APLICAÇÕES E QUANTIFICAÇÃO**

Isabela Maria Lara Moreira

Monografia apresentada ao Curso de
Química Tecnológica do CEFET-MG como
parte das exigências da disciplina Trabalho
de Conclusão de Curso II (TCC II).

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Fernando
Garcia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia (orientador)

Prof. Dr. Ildefonso Binatti

Prof^a. Dra. Jociani Ascari

Monografia aprovada em 08 de abril de 2013

**Belo Horizonte - MG
2013**

AGRADECIMENTOS

Aproveito o espaço para agradecer a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, prof. Cleverson Garcia, pela atenção, paciência, dedicação e grande ajuda na elaboração desta monografia.

Agradeço aos professores do curso que contribuíram para minha formação.

Agradeço aos meus pais pelo amor incondicional e pelo grande apoio.

Finalmente, agradeço a Deus pela vida, pela força e por me permitir escrever este trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

CG - Cromatografia Gasosa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IMP-d - Inosina desidrogenase

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

MDMA - Metilenodioximetanfetamina

OMS- Organização Mundial da Saúde

SAM - S-adenosilmetionina

SES - Sistema de Extração Supercrítica

UV- Radiação Ultravioleta

WADA - Agência Mundial Anti-doping

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Figura 1 - a) Estruturas químicas da a) adenina e b) da guanina.....	3
Figura 2 - Estruturas químicas da a) teofilina; b) cafeína; c) teobromina.....	4
Figura 3 - Estrutura química da SAM.....	7
Figura 4 - Conversão do monofosfato de inosina em monofosfato de xantosina.....	7
Figura 5 - Conversão do monofosfato de xantosina em xantosina.....	8
Figura 6 - Conversão da xantosina em 7-metilxantina.....	9
Figura 7 - Conversão da 7-metilxantina a partir da 7-metilxantosina.....	10
Figura 8 - Conversão da 7-metilxantina em teobromina.....	11
Figura 9 - Formação da Cafeína partir da Teobromina.....	12
Figura 10 - Fluxograma: Processo de descafeinação do café com CO ₂ supercrítico.....	16
Figura 11 - Espectro de massas da cafeína	22
Figura 12 - Íon-molecular m/z 194.....	23
Figura 13 - Formação do íon m/z 109 a partir do íon molecular.....	24
Figura 14- Formação do íon m/z 55 a partir do íon m/z 109.....	25
Figura 15 - Cromatograma do padrão de cafeína b)Cromatograma de uma amostra de guaraná em pó.....	27
Figura 16 - Cromatogramas dos extratos de amostra de café arábica com torra clara (A) torra escura (B) conilon com torra escura (C). Picos: ácido nicotínico (1), trigonelina (2), 5-ACQ (3) e cafeína (4).....	29
Figura 17 - Cromatograma de uma das amostras de café.....	31
Figura 18 - Cromatograma dos padrões de teobromina (8,27 min), teofilina (13,79 min) e cafeína (29,96 min).....	34
Figura 19 - Cromatograma de uma amostra de folhas de chá. Picos caracterizados: teobromina (8,13 min), teofilina (14,99 min) e cafeína (28,92 min).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teores médios de cafeína em diferentes marcas de café em pó.....	31
Tabela 2- Comparação dos resultados de cafeína (g/100g) em chás por CLAE e Espectrofotometria.....	36

RESUMO

CAFEÍNA: BIODSSÍNTESE, PROPRIEDADES, ANÁLISES E QUANTIFICAÇÃO

MOREIRA, I. M. L.; GARCIA, C. F.

O presente trabalho objetiva realizar uma revisão bibliográfica englobando vários aspectos referentes à cafeína, uma das substâncias psicoativas mais consumidas em todo mundo. A cafeína está presente nas sementes de café, guaraná, cacau e folhas de diversas plantas empregadas na fabricação de chás comerciais. Pertence à classe das metilxantinas, sendo um pseudoalcalóide. Entre suas propriedades mais importantes, pode-se citar a baixa solubilidade em água, a baixa polaridade e a capacidade de absorver radiação ultravioleta. Por ser uma substância estimulante e apresentar propriedades de interesse econômico, a cafeína chama a atenção da indústria esportiva, de alimentos e farmacêutica. Sua quantificação é geralmente realizada via CG ou CLAE e os processos de grande escala para a descafeinação de produtos, via extração com fluído supercrítico.

Palavras-chave: cafeína, revisão bibliográfica, propriedades.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. DESENVOLVIMENTO.....	2
2.1 Metilxantinas.....	2
2.2 Cafeína.....	4
2.3 Biossíntese.....	5
2.4 Propriedades Físico-químicas.....	11
2.4.1 Polaridade.....	11
2.4.2 Absorção de radiação ultravioleta.....	12
2.4.3 Basicidade.....	12
2.5 Métodos de extração.....	13
2.6 Aplicações.....	17
2.6.1 Aplicação em competições esportivas.....	16
2.6.2 Controle da dengue.....	17
2.6.3 Efeito da cafeína na cognição.....	17
2.7 Métodos Instrumentais de Quantificação.....	18
2.7.1 Cromatografia Gasosa.....	18
2.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	24
3. CONCLUSÃO.....	34
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
5. ANEXOS.....	39

1. INTRODUÇÃO

A cafeína é um metabólito derivado da xantina, cujo nome sistemático é 1,3,7-trimetilxantina. Apresenta grande importância para o ser humano, pois é uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo. A cafeína pode ser encontrada em mais de 63 espécies vegetais, entre elas fontes comerciais como café, chá mate, guaraná e o chocolate.

Os efeitos da ingestão da cafeína são aumento do estado de alerta, redução da fadiga, irritabilidade, insônia e alterações no controle motor. Além disso, suspeita-se que seu consumo excessivo possa gerar insônia, dor de cabeça, doenças coronárias e evoluir para alguns tipos de câncer. Entretanto, tais efeitos dependem de fatores como idade, sexo, dieta e características genéticas de cada consumidor.

As propriedades da cafeína a tornam atraente para a indústria. O fato de ser um estimulante a faz interessante para a indústria esportiva e a torna uma potencial substância para aprimorar a cognição.

Por outro lado, a presença da cafeína em alimentos e bebidas pode ser indesejada. É o caso de determinadas atividades esportivas onde seu consumo é proibido e de pessoas que, por indicação médica, não podem consumi-la.

Ao considerar os aspectos legais, a ANVISA disponibiliza uma portaria que regulamenta o teor de cafeína em produtos descafeinados, não limitando teores para produtos não descafeinados.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é realizar uma revisão bibliográfica sobre as características químicas da cafeína, sua importância, biossíntese e algumas metodologias empregadas em sua extração e quantificação.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Metilxantinas

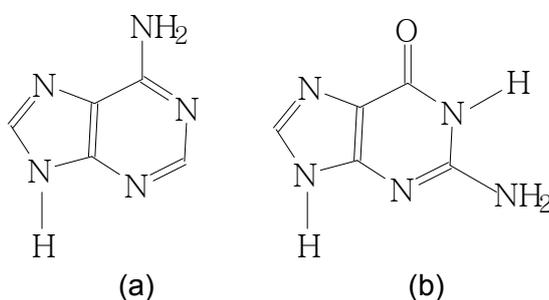
Segundo Vaz (2008), metabólitos secundários são substâncias produzidas por seres vivos e que não estão envolvidas diretamente em seu crescimento e desenvolvimento. Considerando apenas as plantas, os metabólitos secundários atuam, por exemplo, como agentes polinizadores, dispersores de sementes e defensores contra predadores e patógenos.

Entre as classes de metabólitos secundários, estão os alcalóides e as metilxantinas. Os alcalóides são definidos como “compostos nitrogenados” ou “compostos alcalinos”, derivados dos aminoácidos, em sua maioria heterocíclicos e que ocorrem principalmente no reino vegetal (PRADO, 2012).

Segundo Prado (2012), os alcalóides podem ser classificados em:

- Alcalóides verdadeiros: metabólitos derivados de aminoácidos e possuem nitrogênio heterocíclico;
- Protoalcalóides: são aminas simples, derivadas de aminoácidos, sem nitrogênios heterocíclicos;
- Pseudoalcalóides: metabólitos nitrogenados que não derivam de aminoácidos.

Por não derivarem de aminoácidos, as metilxantinas são classificadas como pseudoalcalóides, sendo biossintetizadas a partir das bases nitrogenadas púricas adenina e guanina (Figura 1).



**Figura 1 – Estruturas químicas da a) adenina e b) da guanina.
Fonte: SOLOMONS (2009)**

Sua ocorrência não está relacionada às famílias não filogeneticamente relacionadas, com distribuição restrita principalmente a regiões tropicais e subtropicais. Aproximadamente 60 espécies vegetais, organizadas

especialmente nos gêneros *Coffea* (Rubiaceae), *Cola* e *Theobroma* (Sterculiaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Camellia* (Theaceae = Ternstroemiaceae) contêm metilxantinas (Simões *et al.* 2009). Nos vegetais, as metilxantinas estão envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do carbono, participando das reações de transmetilação-desmetilação. O estágio de desenvolvimento, as alterações sazonais e outros fatores ambientais e agrônômicos influenciam sua concentração. Além disso, podem apresentar significado ecológico, influenciando a relação entre organismos e favorecendo a adaptação do vegetal a ambientes desfavoráveis. Por exemplo, as folhas de chá-da-Índia (*Camellia spp.*) acumulam metilxantinas buscando aproveitar seu efeito alelopático, e não exercem papel nutritivo como fonte de nitrogênio, suposto teoricamente. (Simões *et al.* 2009)

Alves *et al.* (2002) citam a teofilina (1,3-dimetilxantina), a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina) (Figura 2), como as principais xantinas naturais.

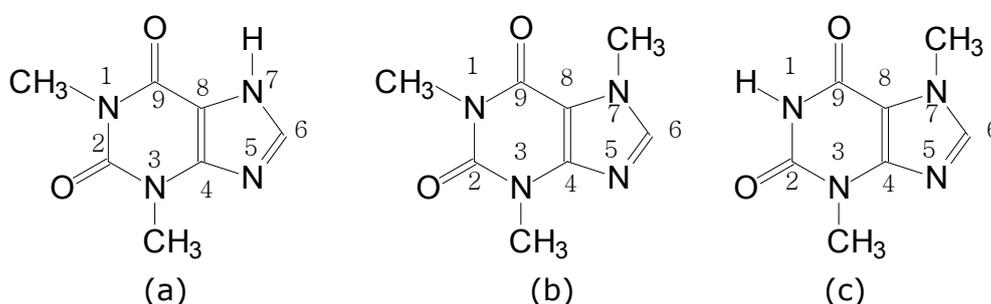


Figura 2 – Estruturas químicas da a) teofilina, b) cafeína e da c) teobromina.
Fonte: ASHIHARA (2006)

Alves *et al.* (2002) relatam que a teobromina é encontrada em frutas como o cacau e seus derivados, possuindo efeito diurético. Por outro lado, Eduardo *et al.* (2004) retratam a teobromina como potencialmente tóxica para os fetos em formação, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

A xantina teofilina apresenta ação vasodilatadora, sendo frequentemente prescrita para problemas respiratórios. Além disso, é possível que a substância possua efeitos antiinflamatórios em baixas concentrações, o que seria uma vantagem, pois minimizaria efeitos colaterais. Outra

potencialidade da teofilina é sua ação no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), um dos maiores problemas de saúde pública do mundo (ZACARIAS *et al.*, 2007).

2.2 Cafeína

A história da cafeína se confunde com a história do café. Nunes (2010) relata que os primeiros registros sobre o efeito estimulante do café foram feitos no ano 575. A narrativa versava sobre um pastor etíope que alimentava suas cabras com sementes e folhas de café para deixá-las mais ágeis e resistentes às caminhadas. Por volta do ano 1000, na Arábia, o café passou a ser consumido na forma de bebida com fins puramente medicinais. Somente no século XIV iniciou-se o processo de torrefação do café, cujos grãos chegaram no ocidente através dos comerciantes italianos (século XVII).

A cafeína foi descoberta em 1819, pelo cientista Friedlieb Ferdinand Runge, na Universidade de Jena, na Alemanha, durante estudos em semente de café (BAUMMAN *et al.*, 2010).

Até o ano de 2009, a cafeína já havia sido identificada em fontes comerciais como grãos de café (*Coffea sp.*), folhas de chá verde (*Camilla sinesis*) e, em menores quantidades, em sementes de cacau (*Theobroma cocoa*), guaraná (*Paullinia cupana*) e na erva-mate (*Ilex paraguayensis*) de acordo com Leite (2009).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), substâncias psicoativas são capazes de alterar o humor, cognição e comportamento de um indivíduo. Assim, classifica-se a cafeína como uma substância estimuladora, pois aumenta a atividade cerebral. Além disso, seu consumo leva a um aumento do estado de alerta, redução da fadiga, irritabilidade, insônia, alterações no controle motor, além do aumento da pressão arterial (LEITE, 2009).

Segundo Toci *et al.* (2006), a cafeína é uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo. Dessa forma, a quantidade de estudos sobre seus efeitos é muito grande. Existem trabalhos que apontam que o consumo de café diminui a fadiga, melhora o estado de espírito e aumenta o estado de alerta. Por outro lado, estudos associam a ingestão da bebida integral ao

aumento de doenças coronárias e câncer. Diante desse paradoxo, muitas pessoas consomem bebidas descafeinadas por optarem por um estilo de vida considerado mais saudável ou por recomendação médica em caso de doenças cardiovasculares, relatam os autores. Dessa maneira, a extração da cafeína é, muitas vezes, desejável.

A dose máxima recomendada equivale à faixa entre 10 a 15 mg de cafeína por quilograma de massa corporal, sendo sua variação dependente de fatores como idade, sexo, dieta e características genéticas de cada pessoa (LEITE, 2009).

Por fim, o teor de cafeína em produtos comerciais está regulamentado na Portaria nº 277, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo o teor máximo de cafeína permitido entre 0,1% (g/100g) a 0,3 % (g/100g) em produtos solúveis descafeinados. Os demais produtos comerciais não apresentam regulamentações correspondentes.

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

2.3 Biossíntese

A cafeína é um pseudoalcalóide derivado de bases púricas livres como a hipoxantina, adenina (aparentemente mais importante), guanina e também os nucleosídeos correspondentes. No reino animal, os derivados da purina são resultantes da hidrólise de ácidos nucleicos ou via biossíntese "de novo". Em vegetais superiores, o anel purina é sintetizado a partir do ácido inosínico ou do monofosfato de inosina pela rota biossintética "de novo", sendo cada metilação associada à coenzima S-AdenosilMetionina (SAM) (Figura 3) (Simões *et al.* 2009).

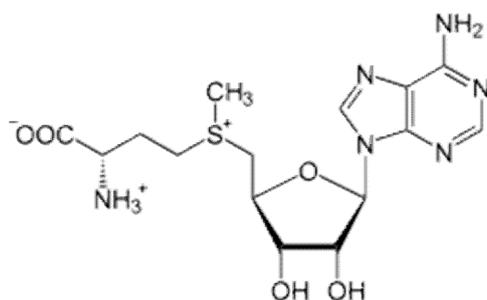


Figura 3 – Estrutura química da SAM.
Fonte: METABOLISMO (2003)

A biossíntese “de novo” da cafeína é iniciada com a molécula de monofosfato de inosina, a qual sofre uma oxidação catalisada pela enzima monofosfato de inosina desidrogenase (IMP-d). Como consequência, o núcleo púrico passa a apresentar mais uma carbonila, levando a obtenção do monofosfato de xantosina (Figura 4).

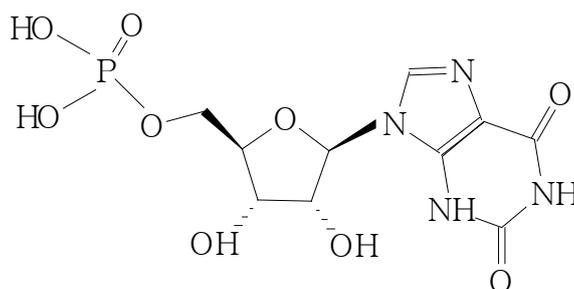


Figura 4 – Conversão do monofosfato de inosina em monofosfato de xantosina.
Fonte: SIMÕES *et al.* (2009)

Em seguida, o monofosfato de xantosina é convertido em xantosina através da enzima hidrolase, eliminando o grupo fosfato ligado ao carbono 5 da ribose (Figura 5; p. 7) (SIMÕES *et al.* 2009).

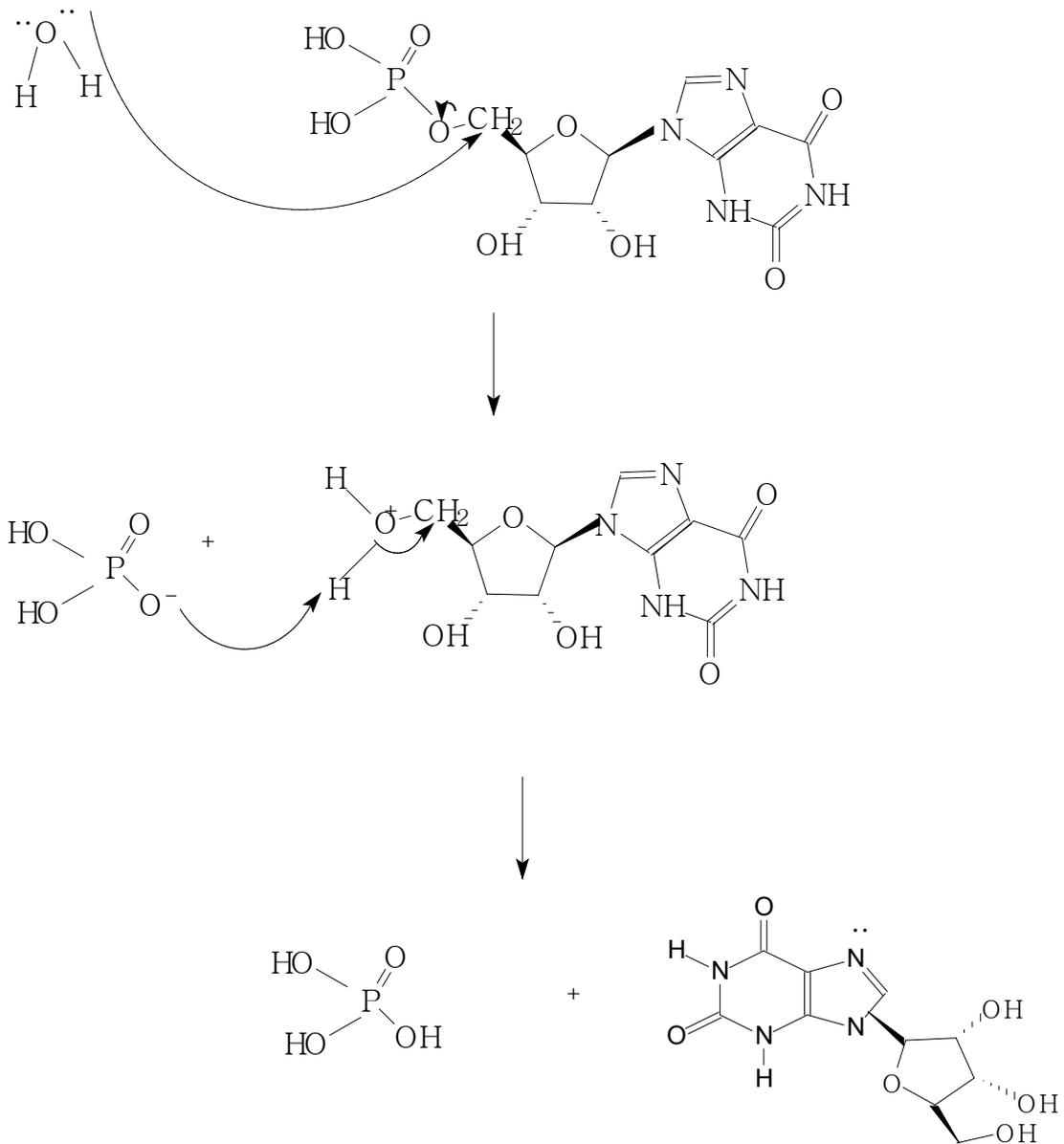


Figura 5 – Conversão do monofosfato de xantossina em xantossina.
Fonte: SIMÕES *et al.* (2009)

Uma vez formada a xantossina, os processos de metilação associados à coenzima SAM iniciam. A primeira metilação é catalisada pela enzima 7-metilxantossina sintase, transformando a xantossina em 7-metilxantossina (Figura 6; p. 8).

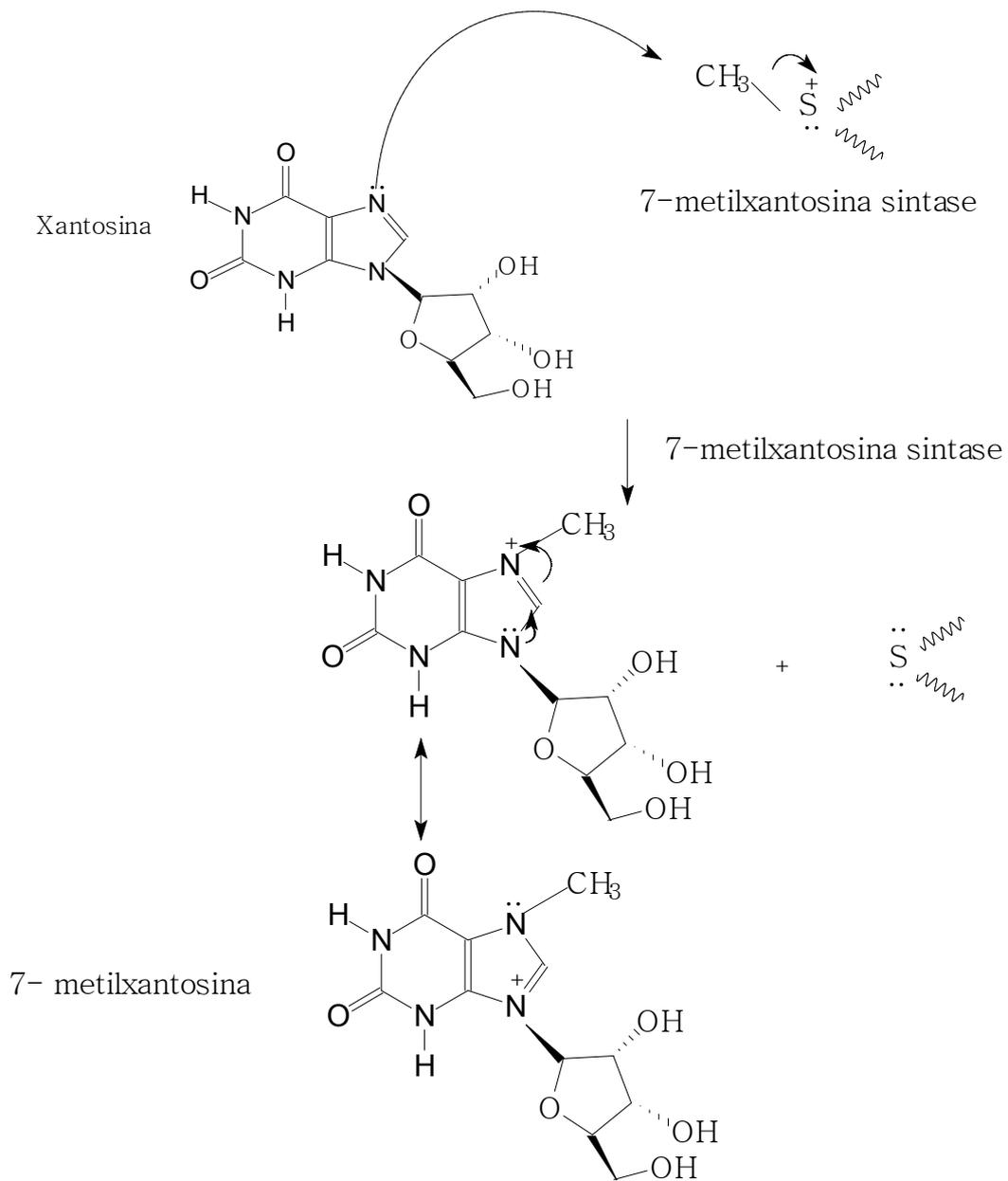


Figura 6 - Conversão da xantosina em 7-metilxantosina.
Fonte: ASHIHARA *et al.* (2007)

Uma segunda hidrólise ocorre na biossíntese, eliminando a ribose da 7-metilxantosina, gerando a 7-metilxantina. O referido processo é catalisado pela enzima hidrolase N-metilnucleosidade (Figura 7; p. 9).

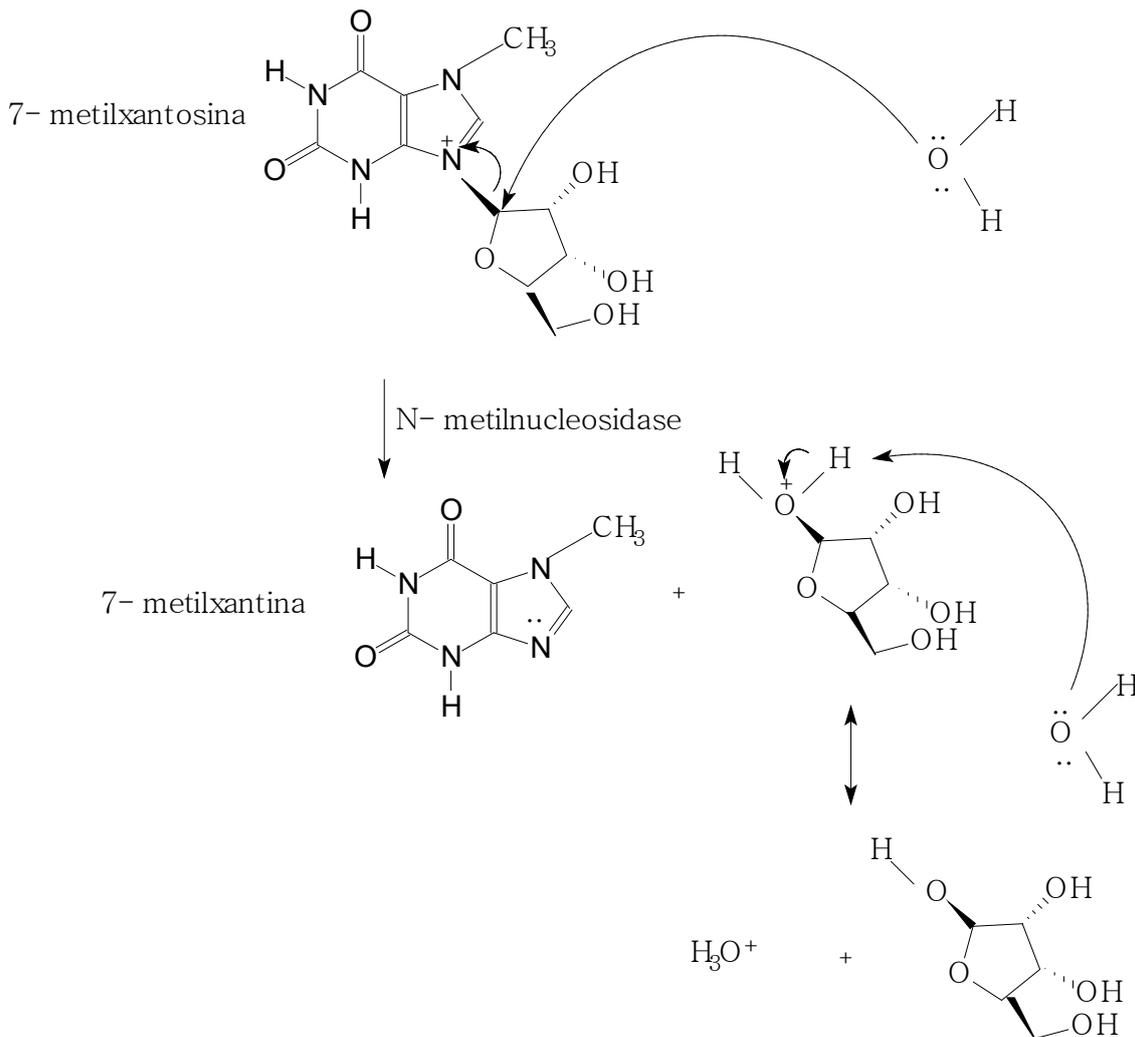
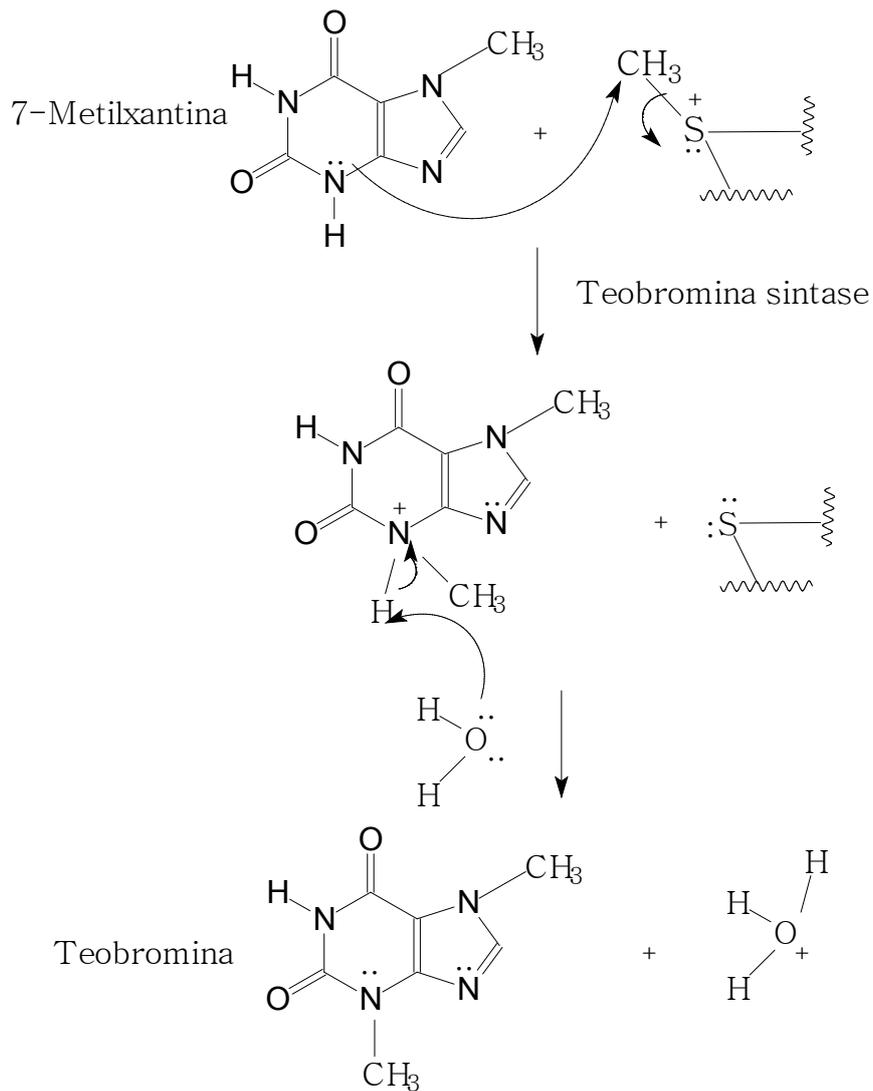


Figura 7 - Formação da 7-metilxantina a partir da 7-metilxantosina.
Fonte: ASHIHARA *et al.* (2007)

A segunda metilação ocorre no nitrogênio 3 da 7-metilxantina, catalisada pela enzima teobromina sintase, em meio à coenzima SAM. O mecanismo biossintético é similar à primeira metilação, sendo a posição da metilação no núcleo púrico e a eliminação de um hidrogênio na forma de íon hidrônio são as únicas diferenças (Figura 8; p. 10).



**Figura 8 - Conversão da 7-metilxantina em teobromina.
Fonte: ASHIHARA *et al.* (2007)**

Por fim, a cafeína é biossintetizada a partir da molécula de teobromina via uma nova metilação, localizada no nitrogênio 2. Assim como as anteriores, a molécula responsável pela transferência do grupo metil é a coenzima SAM, mas o catalisador empregado é a enzima cafeína sintase (Figura 9; p. 11).

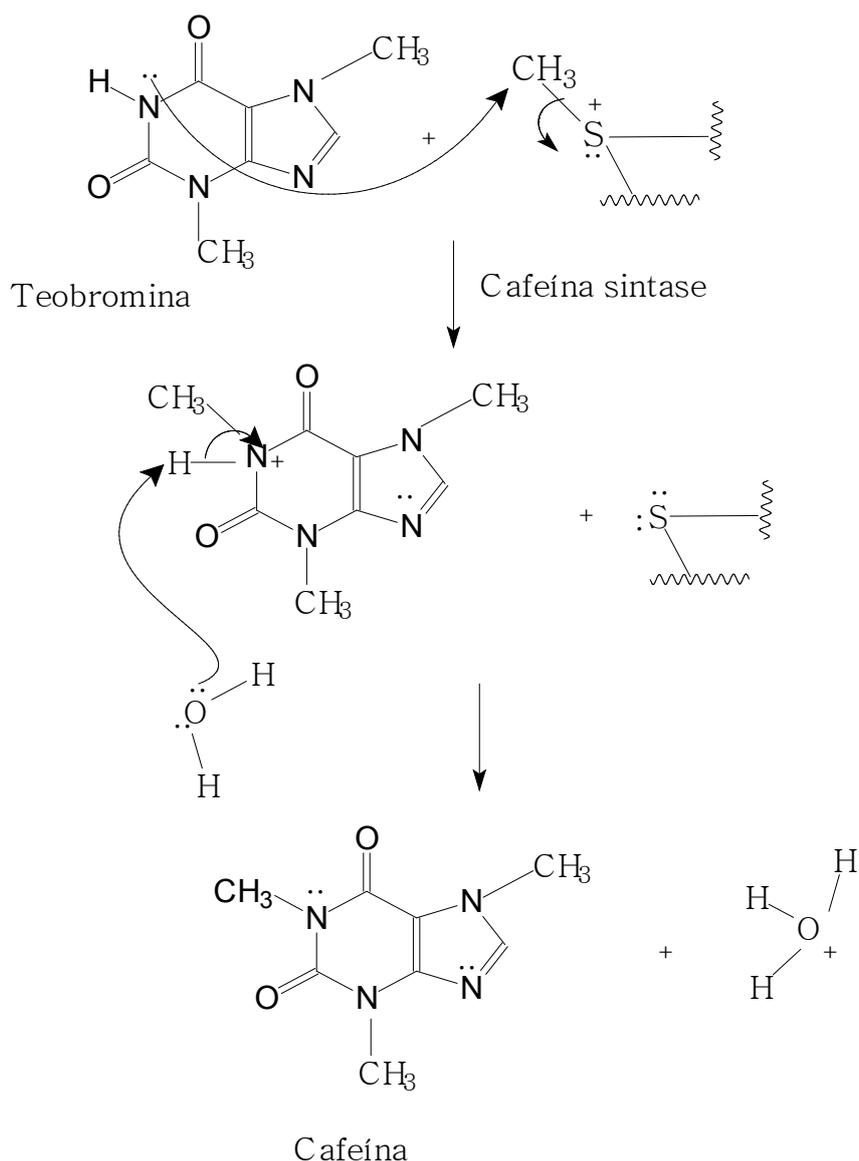


Figura 9 - Formação da cafeína a partir da teobromina.
Fonte: ASHIHARA *et al.* (2007)

2.4 Propriedades Físico-Químicas

À temperatura e pressão ambiente, a cafeína é um sólido, cristalino, incolor, inodoro e de sabor amargo. Suas temperaturas de fusão e de sublimação são 238°C e 178°C, respectivamente (SOARES *et al.*, 2004). Tendo em vista processos associados à elaboração ou à análise de produtos comerciais com a referida metilxantina, procurou-se descrever algumas propriedades físico-químicas de interesse.

2.4.1 Polaridade

Segundo Leite (2009), apesar da cafeína ser rica em nitrogênios e oxigênios, eletronegativos, é uma molécula de baixa polaridade

(hidrofóbica). Uma hipótese que procura explicar o efeito é a influência da extensão da cadeia carbônica que contribui para a diminuição da polaridade da molécula. Tal redução também se deve à disposição dos átomos eletronegativos no ciclo de seis vértices e no ciclo de cinco vértices, gerando dois vetores resultantes que se subtraem parcialmente.

Simões *et al.* (2010) afirmam que a cafeína é solúvel em solventes de polaridade intermediária a baixa como etanol, clorofórmio, éter etílico e tetracloreto de carbono. Em condições supercrítica, o gás carbônico, por ser apolar, é um excelente solvente extrator.

2.4.2 Absorção de radiação ultravioleta

Segundo Solomons e Graig (1996), substâncias que possuem insaturações são capazes de absorver radiação eletromagnética na região do ultravioleta para realizar excitações eletrônicas. Quando as insaturações são conjugadas, o comprimento de onda máximo de absorção no ultravioleta aumenta, podendo alcançar a faixa de radiação visível.

A cafeína possui algumas conjugações e, portanto, é capaz de absorver radiação ultravioleta. De acordo com Instituto Adolfo Lutz (19855), o comprimento de onda no ultravioleta empregado para analisar a cafeína é igual a 274 nm.

2.4.3 Basicidade

A cafeína possui nitrogênios com par de elétrons não ligante, caracterizando-a como uma base de Lewis. Dessa forma, ao reagir com substâncias capazes de receber elétrons para formar uma nova ligação covalente (ácidos de Lewis), formam sais ou sais e água (reação ácido-base) (SOLOMONS, 1996).

Entre seus nitrogênios, o metilado do anel de cinco vértices se mostra mais básico por apresentar menor extensão de conjugação com o restante da cadeia. Todos os demais conseguem, por exemplo, conjugar seus elétrons não ligantes com as ligações π de pelo menos uma carbonila, exceto o nitrogênio sp^2 que está fora do plano.

2.5 Métodos de extração

A cafeína geralmente é extraída através da aplicação de solventes de baixa polaridade, imiscíveis em água. Além disso, tratamentos ácido-base são realizados para convertê-la em um cátion solúvel em água e para reestabelecê-la como uma molécula neutra.

Um exemplo pode ser encontrado no trabalho de Kopack (2003), onde a extração é realizada com solventes de baixa polaridade como hexano ou benzeno, em meio a uma solução básica de hidróxido de amônio. Assim, a cafeína é mantida em sua forma neutra e, graças à sua baixa polaridade, é extraída para a fase orgânica. É importante ressaltar que o benzeno é extremamente tóxico e, se possível, não deve ser utilizado. Em seguida, adiciona-se à mistura ácido clorídrico para formar o cátion de cafeína, solúvel em meio aquoso. Assim, a fase orgânica é recuperada e o meio aquoso volta a ser tratado com hidróxido de amônio (molécula neutra). Para purificar a cafeína, o material recebe mais um volume de hexano (extrator), o qual é separado da fase aquosa e é recuperado via rotaevaporação, gerando o produto sólido.

Brenelli (2003) descreveu duas metodologias para extrair a cafeína de bebidas estimulantes com o objetivo de propor uma nova abordagem para um experimento tão comum em aulas práticas de graduação, sendo eficientes para produtos solúveis e insolúveis em água. O primeiro método é adequado para amostras solúveis em água e consiste em medir 10 g de amostra (café ou mate instantâneo) e dissolver em água quente (extração não seletiva a quente). Após o resfriamento, adiciona-se uma solução 10% de óxido de manganês e agita-se a mistura em banho-maria. O óxido de manganês provoca a precipitação de taninos que podem interferir na extração. Posteriormente, a mistura é filtrada sob vácuo. Em seguida, adiciona-se ácido sulfúrico ao filtrado até atingir pH igual a 1. Posteriormente, deve-se concentrar o filtrado evaporando metade do seu volume. Em seguida, extrai-se a cafeína do concentrado três vezes com diclorometano. Vale salientar que como a extração do cátion de cafeína foi realizada com diclorometano (polaridade baixa), é possível que parte dos cátions ainda tenham permanecido na fase aquosa. Ao extrato obtido, adiciona-se hidróxido de potássio e lava-se a fase básica com diclorometano

(extração da molécula neutra). Após a recuperação da fase orgânica, a cafeína será visualizada em sua forma sólida dentro do balão seco.

O segundo método de Brenelli (2003) aplica-se a amostras solúveis e insolúveis em água. Uma massa de 10 g de amostra é pesada em um cartucho para Soxhlet. Utiliza-se etanol como solvente (extrator para compostos de polaridade intermediária e alta polaridade). Após montar o sistema adequadamente, o refluxo deve ocorrer por duas horas seguidas. Após esse período, deve-se aguardar o esfriamento do extrato. Em seguida, adiciona-se uma solução 10% de óxido de manganês. O etanol deve ser evaporado. O restante do procedimento é idêntico ao descrito anteriormente.

O uso de fluidos supercríticos para extrair substâncias de interesse em produtos naturais apresenta vantagens em relação a solventes comuns, pois elimina etapas de purificação, facilitando o processo. Uma das aplicações industriais mais importantes desta tecnologia é a extração da cafeína dos grãos de café com CO₂ supercrítico como descrevem Saldaña *et al.* (1997). Os autores realizaram um trabalho objetivando medir o teor de cafeína em marcas comuns de café brasileiro. Para isso, realizaram uma extração utilizando fluido supercrítico.

A extração da cafeína ocorreu em um Sistema de Extração Supercrítica (SES). Grãos de café com 20% de umidade foram colocados no extrator e o solvente supercrítico foi introduzido até se atingir a temperatura e pressão desejada. A cafeína apresentou uma solubilidade satisfatória em CO₂ supercrítico a 313K e 15 MPa.

Saldaña *et al.* (1997) relatam que, em baixas pressões, à medida que a temperatura aumenta a solubilidade diminui. Esse fenômeno é chamado de comportamento retrógrado, comum em extrações por fluido supercrítico. A explicação para tal comportamento está no aumento da pressão de vapor e a diminuição da densidade do fluido com a temperatura, resultando na redução da solubilidade. Nessa situação, o efeito da densidade supera o da pressão de vapor. Em pressões superiores a 19 MPa, a solubilidade aumenta com a temperatura. Nesse caso, o efeito do aumento da pressão de vapor é maior que o da diminuição da densidade do fluido. Os autores Saldaña *et al.* (1997) também observaram um aumento da solubilidade da

cafeína quando os grãos de café estão grosseiramente triturados. Como o grão triturado possui uma área de contato com o solvente maior que o grão inteiro, a passagem da cafeína presente no café para o fluido supercrítico se torna mais fácil, tornando o processo de extração mais eficiente.

O processo de extração da cafeína com CO₂ supercrítico apresenta a vantagem de usar solventes baratos, não tóxicos e não inflamáveis afirmam Gomes *et al.* (2010). Além disso, o processo é mais simples pois a etapa de recuperação do solvente não existe. O fluxograma do processo de descafeinação do café utilizando fluido supercrítico está na Figura 10.

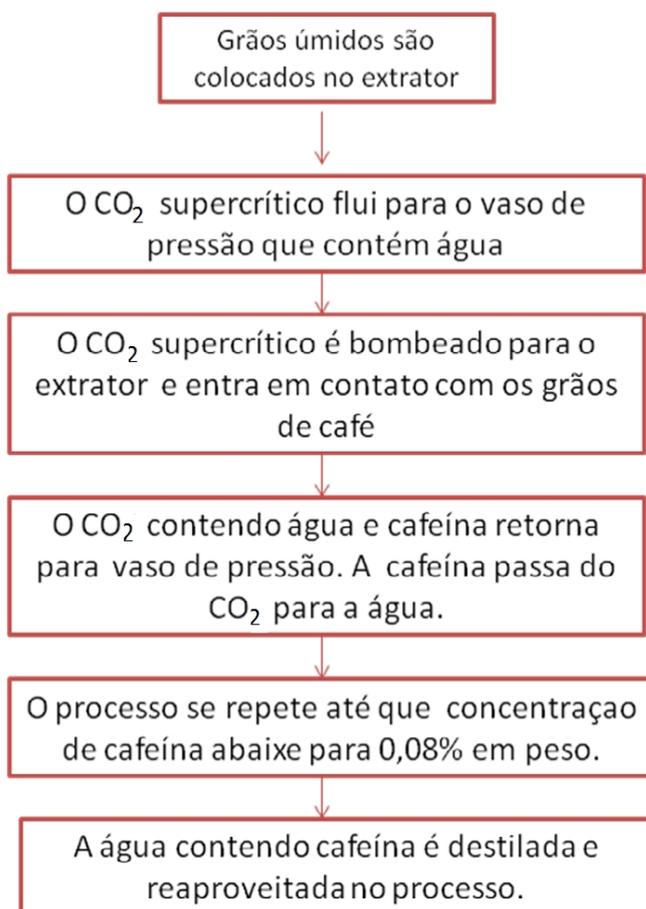


Figura 10 – Processo de descafeinação do café com CO₂ supercrítico.

Fonte: adaptado de Gomes *et al.* (2010)

Durante o processo, Gomes *et al.* (2010) explicam que é importante que os grãos de café estejam úmidos (40-50%) para que as células inchem e se

abram, expondo a cafeína. O CO₂ atinge o estado supercrítico à temperatura de 70°C e à pressão de 160 atm.

Gomes *et al.* (2010) afirmam que a cafeína também pode ser extraída por degradação enzimática ou microbiológica, ainda em fase de estudo.

2.6 Aplicações

A cafeína é uma substância de grande interesse nas áreas de saúde e de alimentos, sendo muito estudada. A seguir, tem-se a descrição de alguns trabalhos de pesquisa voltados às tais interesses.

2.6.1 Aplicação em competições esportivas

As competições esportivas de alto nível exigem um desempenho cada vez melhor dos atletas. Para Altimari *et al.* (2006), a ocorrência de fadiga é um fator prejudicial ao desempenho. Dessa maneira, a busca por substâncias ergogênicas, capazes de retardar a fadiga e aumentar a contração dos músculos esqueléticos e cardíacos vem aumentando. Os autores afirmam que a cafeína é uma substância ergogênica utilizada nos casos de exercícios de alta intensidade e curta duração (anaeróbios). Informam, ainda, que a cafeína foi retirada da lista de substâncias proibidas pela World Anti doping Agency (WADA, 2004). Entretanto, criou-se um programa de monitoramento que avalia o consumo de cafeína pelos atletas.

Altimari *et al.* (2006) fizeram um levantamento bibliográfico sobre o efeito da cafeína na performance de exercícios anaeróbios. O trabalho apresenta duas teorias sobre o efeito ergogênico da cafeína. A primeira afirma que a cafeína age sobre o sistema nervoso central, interferindo na percepção do esforço e/ou na transmissão dos estímulos neurais para a junção neuromuscular. Na segunda teoria, a cafeína age diretamente sobre o músculo a partir de mecanismos como alteração de íons, inibição de enzimas e modificações metabólicas que influenciam a contração muscular. Normalmente, a segunda teoria é mais aceita.

Após a revisão de vários estudos, Altimari *et al.* (2006) concluíram que a ingestão de cafeína melhora significativamente a performance de exercícios de duração menor que 5 minutos. Entretanto, os resultados são controversos para atividades com um tempo de duração maior. Portanto,

mais estudos devem ser feitos para avaliar o real efeito da cafeína e desvendar o real mecanismo de ação.

2.6.2 Controle da dengue

Alguns estudos sugerem que a cafeína inibe o desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue, uma doença muito séria no Brasil. Laranja *et al.* (2006) conduziram um trabalho objetivando verificar se os mosquitos desenvolveriam resistência à ação da cafeína. O estudo avaliou a quantidade de mosquitos adultos e a taxa de oviposição em meios contendo soluções aquosas de cafeína 200 e 500 µg/mL. Os resultados mostraram que a quantidade de adultos e a taxa de oviposição decresceram nas duas concentrações e que os mosquitos não apresentaram resistência. Somente os dados referentes à concentração de 200 µg/mL foram estatisticamente significativos. Dessa maneira, mais estudos são necessários para avaliar qual papel da cafeína no controle do *Aedes aegypti*.

2.6.3 Efeito da cafeína na cognição

Galduroz *et al.* (1996) relatam que a medicina popular atribui ao guaraná, *Pauíínia cupana*, propriedades terapêuticas como alívio para dores articulares, cólicas menstruais e má digestão, além do efeito estimulante. Entretanto, nenhum desses efeitos tem comprovação científica. Dessa maneira, o guaraná atrai pesquisadores que objetivam estudar os efeitos do seu consumo.

Galduroz *et al.* (1996) investigaram o efeito a longo prazo do consumo de guaraná na cognição e nível de ansiedade de voluntários idosos. Idosos com mais de 60 anos, aparentemente saudáveis, que não tomam medicação e com escolaridade superior à 6ª série foram submetidos à pesquisa durante 150 dias e divididos em três grupos: grupo placebo, grupo de consumo da cafeína em cápsulas (na mesma concentração da cafeína presente no guaraná) e grupo de consumo do guaraná. Os resultados mostraram que no teste de digitação de símbolos (os pacientes recebiam uma sequência de símbolos, que estavam associados a números, e deveriam digitar os números correspondentes o mais rápido possível) houve uma melhora em todos os grupos, não havendo diferença estatística entre eles. No teste do mosaico, em que os pacientes deveriam montar figuras a partir de algumas

peças, o terceiro grupo conseguiu resultados melhores que os outros dois primeiros. Em relação à ansiedade, não houve mudanças relevantes em nenhum dos grupos.

Portanto, não foi possível afirmar que o guaraná tenha algum efeito na cognição. Entretanto, é preciso considerar falhas no método de investigação, o pequeno intervalo de tempo da pesquisa e efeito causados por outras substâncias presentes no guaraná. Assim, mais pesquisas devem ser feitas para se comprovar ou não as propriedades do guaraná.

2.7 Métodos instrumentais de quantificação

2.7.1 Cromatografia Gasosa

Segundo Skoog *et al.* (2006), a cromatografia gasosa (CG) é uma das técnicas mais utilizadas em análises quantitativas e qualitativas. De Maria *et al.* (2007) relatam que a cromatografia gasosa passou a ser usada para se analisar a cafeína a partir da década de 1970. A técnica permitiu obter resultados reprodutíveis, diminuiu o tempo de análise e a quantidade de amostra. Dessa forma, observa-se que cromatografia gasosa é uma técnica muito útil e adequada para a análise da cafeína. Atualmente, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas também é utilizada. De Maria *et al.* (2007) afirmam que a sensibilidade e a especificidade são excelentes para a cafeína. A técnica permite detectar a substância na ordem de ng L^{-1} .

Lapachinske *et al.* (2004) quantificaram cafeína via cromatografia gasosa em amostras adulteradas de ecstasy (metilendioximetanfetamina), uma droga ilegal alucinógena e ativadora no sistema nervoso central. Atualmente, o consumo ilegal dessa substância está crescendo e, conseqüentemente, o número de casos de intoxicação por ingestão da droga, de similares e de adulterantes. Segundo os autores, a identificação de adulterantes do ecstasy é necessária porque tais substâncias podem causar maior dependência do que o próprio princípio ativo da droga, o MetilenoDioxiMetAnfetamina (MDMA) e seus análogos. Além disso, drogas adulteradas contêm uma concentração menor de MDMA e análogos levando o usuário a consumir uma maior quantidade de comprimidos para obter o efeito desejado. Lapachinske *et al.* (2004) alegam que a cafeína e a

efedrina são os adulterantes mais encontrados. Dessa maneira, é importante quantificar a cafeína nesse tipo de amostra.

Lapachinske *et al.* (2004) realizaram a extração da cafeína por meio da trituração e homogeneização de cada comprimido e, no caso das cápsulas, na utilização do material contido nos invólucros gelatinosos. Uma fração de 5 mg foi dissolvida em 5 mL de metanol. A análise foi realizada em um cromatógrafo equipado com detector de nitrogênio/fósforo. As análises foram feitas nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida 5% fenilmetilsilicone, temperatura do injetor igual a 270°C. A programação da temperatura no forno seguiu a seguinte ordem: 148°C (1 min), 10°C/min até 200°C, 20°C/min até 270°C (8 min). As análises demonstraram que o tempo de retenção absoluto da cafeína foi igual a 9,68 min e o relativo à difenilamina (padrão interno) foi igual a 1,25 min. Já o tempo de retenção absoluto do MDMA foi de 6,85 min e o relativo foi de 0,885 min.

O trabalho de Lapachinske *et al.* (2004) não fornece a concentração de cafeína nas amostras. Porém, disponibiliza informações importantes para os profissionais da área de toxicologia e contribui, ao desenvolver um método simples e rápido, para a elucidação dos constituintes e adulterantes da droga.

Lima e Frota (2007) utilizaram cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para validar um método de identificação de cafeína em urina de cavalos de corrida. Como citado anteriormente, a cafeína é proibida nas atividades turfísticas. O preparo das amostras consistiu em fortificar amostras de urina coletada de um *pool* de cavalos de referência com solução de cafeína e adicionar uma solução metanólica de diazepam como padrão interno. Foram produzidas 174 amostras para a extração em fase sólida. A partir das diluições das amostras e de um branco de urina, iniciou-se a extração em fase sólida. Os cartuchos de extração em fase sólida foram condicionados com metanol e água ultra-pura. As amostras foram tratadas com sulfato de amônio, para a precipitação de proteínas, tiveram seu pH ajustado para 9,4-9,8 e foram centrifugadas. Transferiu-se uma fração do sobrenadante das amostras para os cartuchos. Os cartuchos foram lavados com água ultra-pura e secos por 3 min. O processo se repetiu utilizando-se hexano ao invés da água. Os cartuchos

secos foram eluídos com clorofórmio. Os eluatos foram recolhidos e transferidos para cápsulas de evaporação à temperatura ambiente. Os resíduos da evaporação foram retomados com diclorometano e transferidos para frascos de injeção, quando foram novamente evaporados à temperatura ambiente. Em seguida, os resíduos foram ressuspensos com acetato de etila, finalizando a extração. Lima e Frota (2007) afirma que, após o preparo das amostras, os extratos foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas. A fase estacionária era composta de 35% fenilmetilpolisiloxano, a temperatura da interface foi de 295°. A programação da temperatura consistiu em: temperatura inicial do forno da coluna: 60°C, 22°C/min até 200°C, 10°C/min até 270°C, 30°C/min até 305°C (6 min). A detecção estava no modo de ionização por elétrons (IE), 70 eV, em faixa de varredura de 40 a 550 unidades de massa atômica.

O espectro de massas da cafeína identificada na solução-padrão e nas amostras está demonstrado na Figura 11.

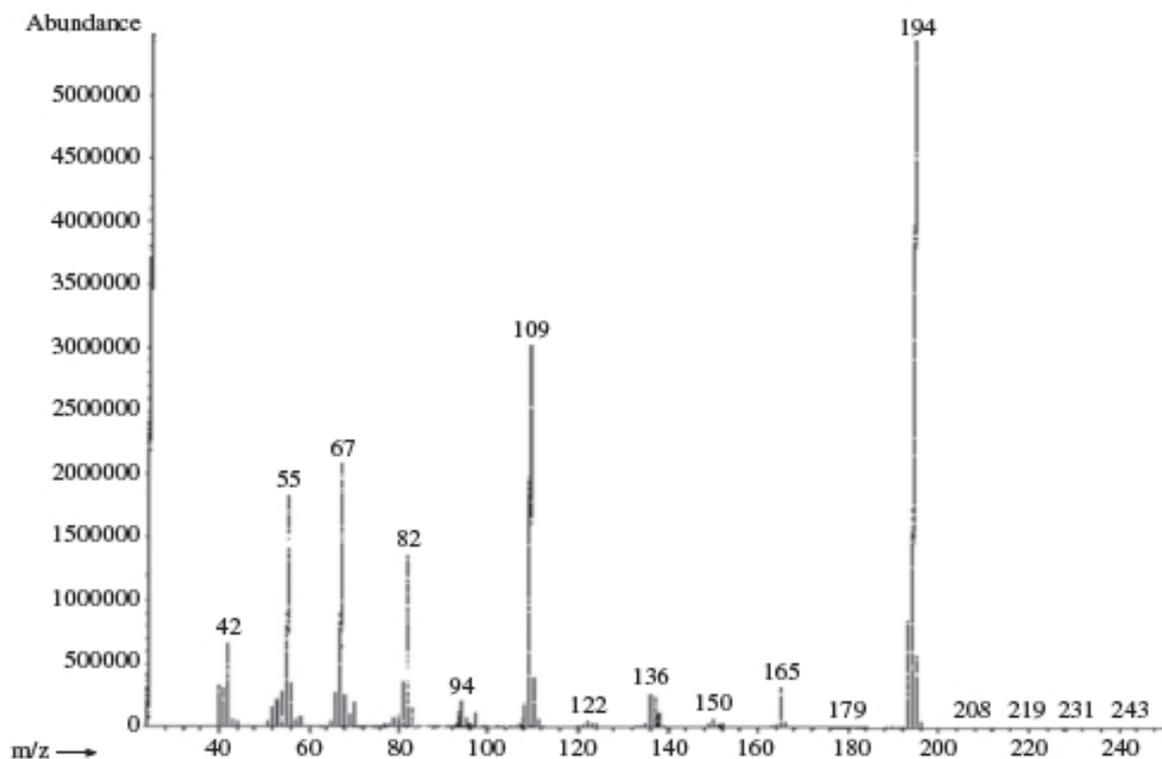


Figura 11 – Espectro de massas da cafeína.
Fonte: Lopes et al. (2009)

A avaliação das amostras quanto à presença de cafeína teve como base a caracterização dos picos de massa mais abundantes, provenientes da

caféina: m/z 194 e m/z 109. O perfil das fragmentações está ilustrado nas Figuras 12, 13 (p. 22) e 14 (p. 23).

O íon com o maior sinal no espectro de massas é o 194 m/z (íon-molecular). A intensidade do sinal referente ao íon-molecular é alta devido à sua grande estabilidade, pois apresenta quatro nitrogênios e dois oxigênios com elétrons não ligantes capazes de se converter no íon-molecular ($n-C=O^+$) detectável (Figura 12).

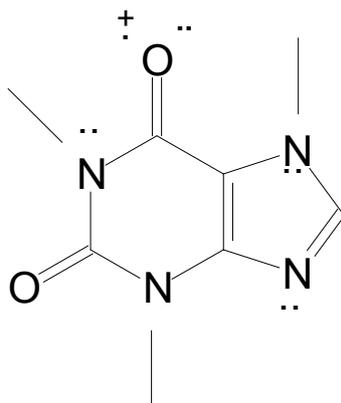
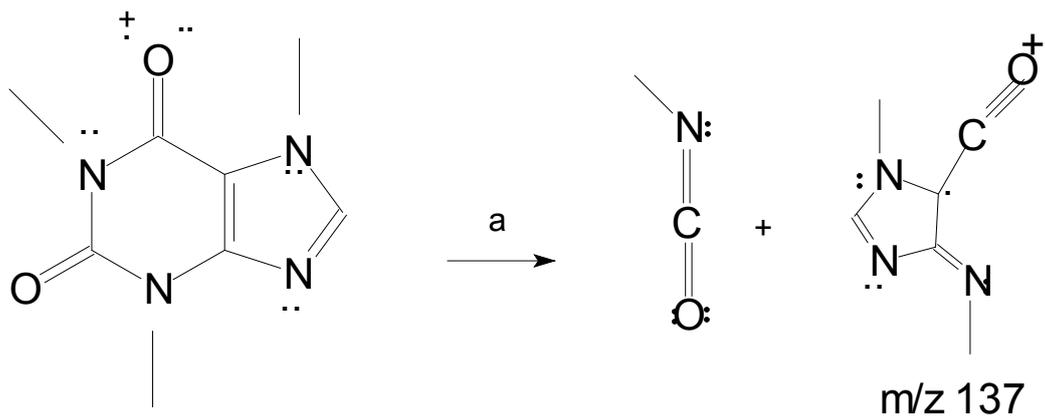


Figura 12 - Íon-molecular (m/z 194).
Fonte: LOPES et al. (2009)

A formação do íon m/z 109 a partir do íon-molecular ocorre em duas etapas: a) eliminação de uma molécula éster metilisociânico ($CH_3-N=C=O$) e b) eliminação de uma molécula de monóxido de carbono (CO). A primeira fragmentação é fornecida pelos sistemas conjugados $:N-C=:O:$ e $:N-C=C:$. A segunda fragmentação é favorecida pela saída de uma molécula neutra estável em condições de alta energia (Figura 13; p. 22).

O íon m/z 55 é formado a partir do íon m/z 109 também em duas etapas: a) perda de uma molécula de metanonitrila ($HC\equiv N$) e b) perda de uma segunda molécula de metanonitrila. A primeira eliminação é favorecida pela presença do sistema conjugado $-N^+\equiv C-C\equiv N^-$ e do sistema não-conjugado $C=C=N:-CH_3$, onde dois hidrogênios metílicos são eliminados para a formação da extremidade insaturada que dará origem à metanonitrila (Figura 14; p. 23).



Cafeína m/z 194

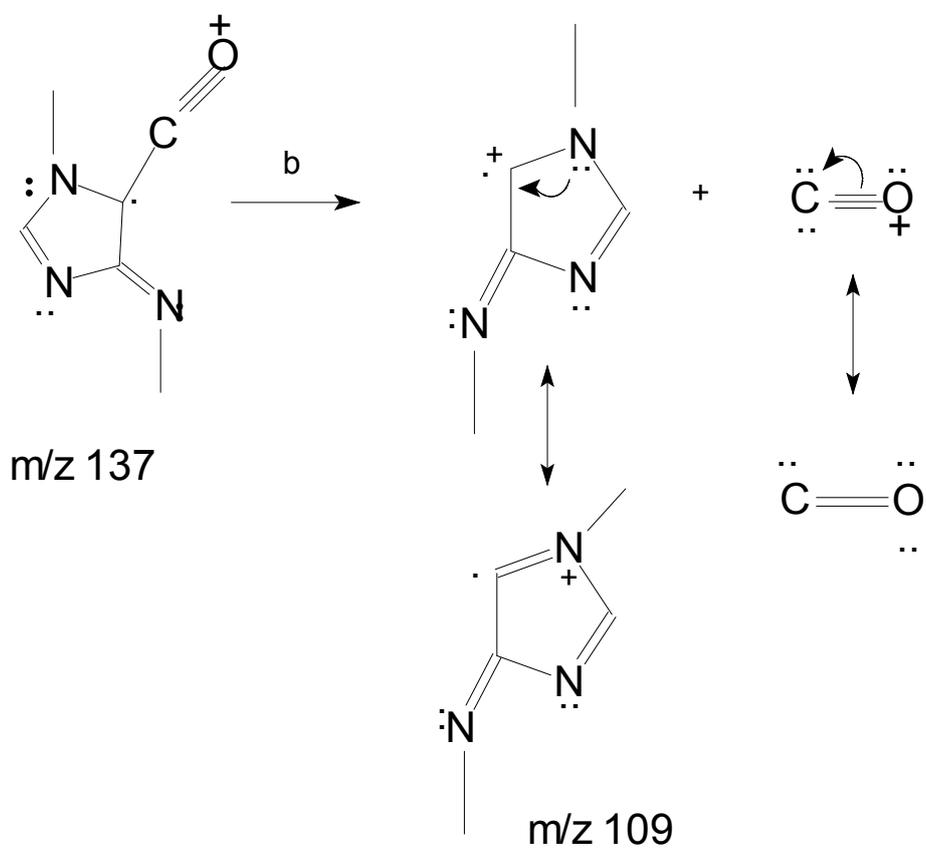


Figura 13 - Formação do íon m/z 109 a partir do íon molecular.
Fonte: LOPES et al. (2009)

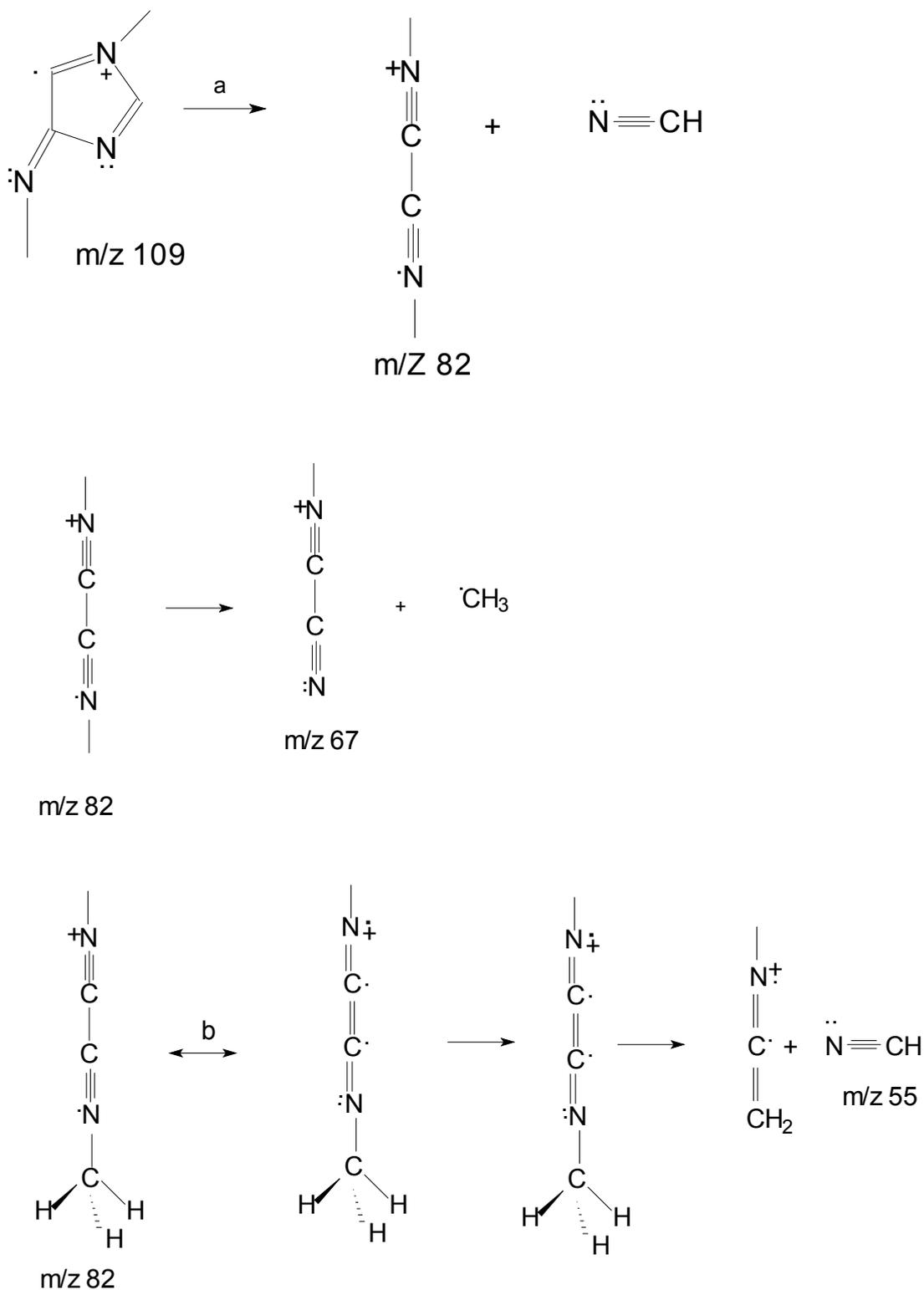


Figura 14 – Formação do íon m/z 55 a partir do íon m/z 109.
Fonte: LOPES et al. (2009)

É importante ressaltar que somente os sinais de maior intensidade foram discutidos, por serem mais estáveis e servirem para caracterizar a cafeína. Os outros sinais se referem a outros fragmentos da cafeína ou de outras moléculas que não são de interesse para o desenvolvimento deste trabalho.

Lima e Frota *et al.* (2007) concluíram que o método proposto foi válido para análises qualitativas, o que é útil para atividades turfísticas, já que, normalmente, a tolerância para substâncias proibidas é zero.

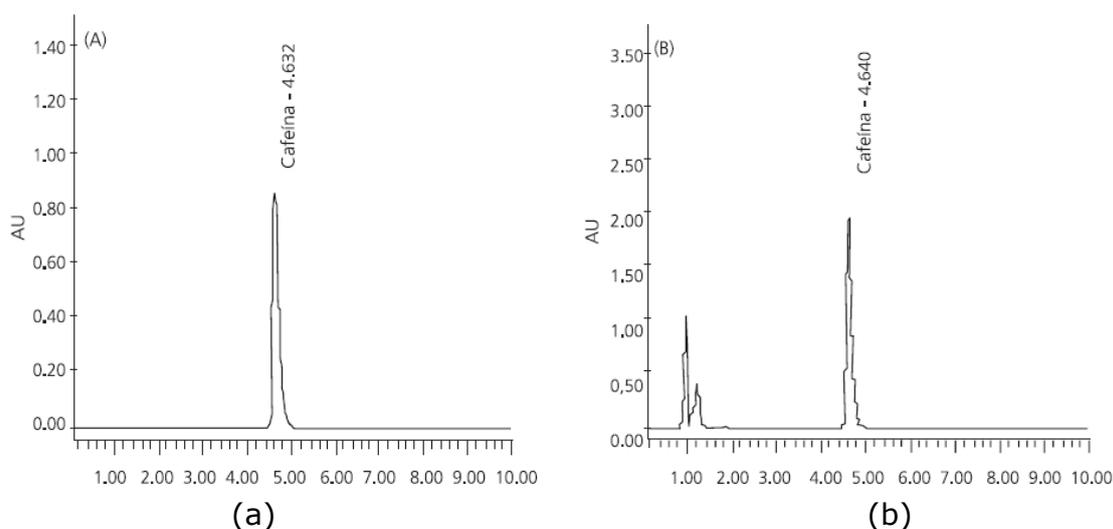
2.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Skoog *et al.* (2006) afirmam que as aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se estendem pela química forense, bioquímica, toxicologia, química dos alimentos, estudos farmacológicos, etc. De Maria *et al.* (2007) afirmam que a CLAE é utilizada para analisar a cafeína e seus metabólitos em fluidos biológicos e garante resultados seguros. Dessa forma, é relevante destacar a técnica para a análise da cafeína. Segundo Camargo *et al.* (1998), a cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo muito utilizada para análise de cafeína em alimentos. Esse fato é justificado porque a técnica oferece as vantagens de ser sensível, específica, rápida e não exigir um preparo de amostra complicado.

Tfouni *et al.* (2007) quantificaram cafeína em diferentes marcas de guaraná em pó disponíveis comercialmente, segundo a metodologia de Camargo e Toledo (1998). Segundo Tfouni *et al.* (2007), a cafeína é encontrada em mais de 63 espécies vegetais. O guaranazeiro é a planta que possui maiores concentrações de cafeína, especialmente, nas suas sementes. As sementes do guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K. *Typica* e *Paullinia cupana* variedade *sorbilis* (Mart.) Ducke), após serem secas e moídas, dão origem ao guaraná em pó, o qual é produzido em escala comercial somente no Brasil. O preparo de amostra foi iniciado medindo-se 10 g de guaraná em pó. Em seguida, adicionou-se água destilada em ebulição ao pó. Posteriormente, filtrou-se a mistura. Após a solução atingir a temperatura ambiente, adicionou-se uma solução saturada de acetato de chumbo básico ao filtrado. Segundo Tfouni *et al.* (2007), a adição do acetato de chumbo durante a extração gera uma solução totalmente límpida, livre de interferentes. Posteriormente, centrifugou-se a solução. Ao sobrenadante, adicionou-se bicarbonato de sódio. Centrifugou-se novamente. Ao sobrenadante foi adicionado ácido clorídrico, até atingir um pH aproximadamente igual a 4. Essa solução foi então completada com água destilada para 100 ml num balão volumétrico e injetada no cromatógrafo. A análise foi realizada de acordo com as seguintes condições gerais:

cromatógrafo Waters, constituído por uma bomba quaternária modelo 600, injetor automático modelo 717, acoplado a um detector de arranjo de diodos modelo 996. Empregou-se uma coluna cromatográfica C18, fase móvel composta por acetonitrila:água (10:90) e fluxo igual a 1,0 mL/min.

A identificação da cafeína foi efetuada por comparação dos tempos de retenção dos picos de interesse e por comparação com o espectro da cafeína padrão, nas mesmas condições de análise. Os cromatogramas da cafeína padrão e de uma amostra analisada estão na Figura 15 a e b, respectivamente.



**Figura 15 – a) Cromatograma do padrão de cafeína
b) Cromatograma de uma amostra de guaraná em pó.**

Fonte: TFOUNI *et al.* (2007)

Pode-se observar no cromatograma da amostra que o pico correspondente à cafeína está bem definido e sem a presença de compostos interferentes.

Os autores concluíram que a técnica foi eficiente para separar e identificar a cafeína, eliminando a influência de interferentes. A concentração de cafeína nas amostras variou de 14,18 a 28,79 mg/g.

Por sua vez, Alves *et al.* (2006) buscaram desenvolver uma metodologia analítica simples e rápida para dosar simultaneamente o ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico (5-ACQ) e cafeína em cafés arábica e conilon, torrados em diferentes condições. Essas substâncias são quantificadas para distinguir as espécies de café, o grau de torra e a qualidade do produto.

O preparo das amostras foi feito pela extração com acetonitrila/água (5:95 em volume), à 80 °C, durante 10 minutos. A mistura foi filtrada em papel

qualitativo. Uma fração do filtrado foi transferida para um balão e completado com a solução extratora. O extrato obtido foi filtrado em Membrana Millipore e injetado no cromatógrafo. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, constituído por duas bombas LC10AD. O instrumento foi acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível. As análises empregaram uma coluna ODS 1 acoplada a uma pré-coluna C18 (5µm). A fase móvel foi formada por uma mistura de ácido acético/H₂O (5:95 em volume) denominada A e acetoniitrila denominada B. A eluição gradiente ocorreu de B para A. Os tempos de eluição e os comprimentos de onda programados foram os seguintes: 0 a 15 min (272 nm), 15 a 23 min (320 nm) e de 23 min até o final (272 nm). A Figura 16 evidencia os cromatogramas de três amostras distintas (ALVES *et al.* 2006).

A partir da figura pode-se constatar que a resolução dos cromatogramas são satisfatórias nas três situações. Não houve uma diferença significativa entre os tempos da análise e foi possível separar os quatro compostos propostos pelos autores.

Dentre as substâncias analisadas, o ácido nicotínico é o menos presente. Alves *et al.* (2006) afirmam que esse comportamento é esperado, principalmente em cafés de torra severa (torra escura), pois o ácido nicotínico degrada nessa condição. É por isso que o sinal referente ao ácido não aparece na Figura 16 B e C.

Tanto a trigonelina e o 5-AQC foram detectados nas três situações, porém Alves *et al.* (2006) afirmam que a concentração dessas substância também varia de acordo com a espécie e grau de torra. O maior teor de 5- AQC foi na amostra de café arábica de torra clara.

Alves *et al.* (2006) afirmam que a cafeína é resistente à torra e por isso está presente em todas as amostras analisadas. Alves *et al.* (2006) também relatam que é normal que o teor de cafeína seja maior em cafés conilon.

Alves *et al.* (2006) concluíram que o método utilizado foi eficiente e rápido para separar ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico (5-ACQ) e cafeína.

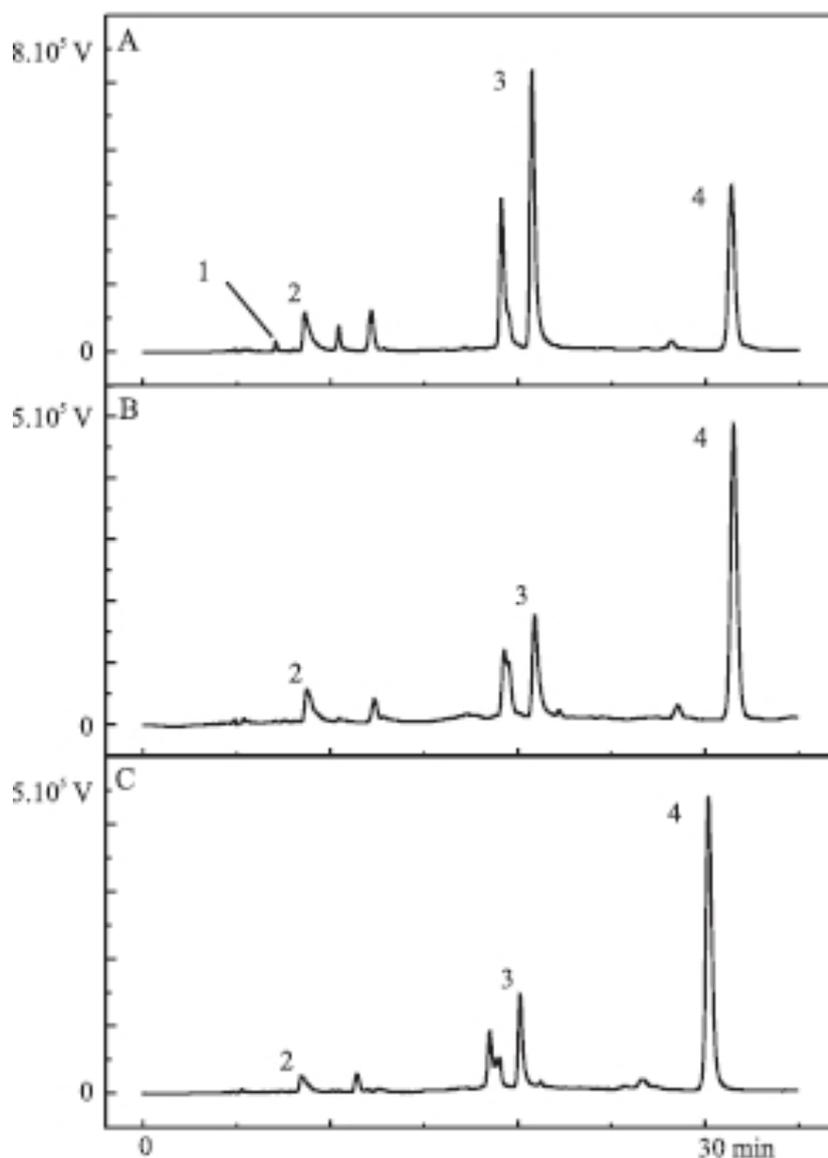


Figura 16– Cromatogramas dos extratos de amostra de café arábica com torra clara (A) torra escura (B) conilon com torra escura (C). Picos: ácido nicotínico (1), trigonelina (2), 5-ACQ (3) e cafeína (4). Fonte: ALVES *et al.* (2006)

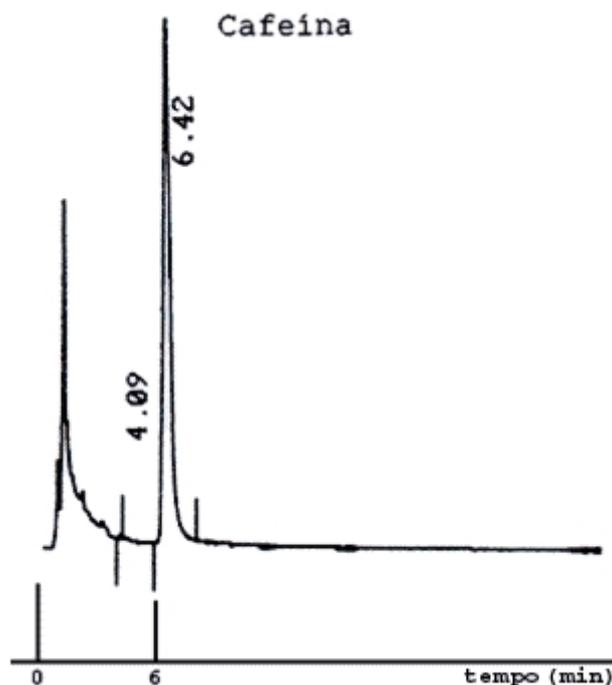
Camargo *et al.* (1998) mediram o teor de cafeína em várias marcas nacionais de café em pó e em bebidas instantâneas seguindo o método de Madison, Kozarek e Damo. Os autores acreditam que o trabalho é importante porque o Brasil apresenta um alto consumo de café e porque o café é uma importante fonte de cafeína.

O preparo das amostras baseou-se no método de Madison, Kozarek e Damo e foi iniciado medindo 20g de pó de café. Adicionaram-se 250 mL de água destilada em ebulição ao pó de café. Filtrou-se a mistura. Após a solução atingir a temperatura ambiente, adicionaram-se 6 mL de uma solução

saturada de acetato de chumbo básico a 20 mL do filtrado. A adição de acetato de chumbo foi uma adaptação de Camargo *et al.* (1998) ao método proposto para que a solução se tornasse mais límpida antes de ser inserida no cromatógrafo. Centrifugou-se a solução. Separou-se o sobrenadante e adicionou-se bicarbonato de sódio. Centrifugou-se novamente. Ao sobrenadante foi adicionado HCl 1,0 mol/L, de modo a se obter um pH ácido (ao redor de 4). Completou-se a solução com água destilada para 100 mL. Injetou-se a mistura no cromatógrafo. Para as bebidas instantâneas, 0,2 g de café solúvel foram dissolvidos em 30 mL de água bidestilada aquecida. Após a solução atingir a temperatura ambiente, adicionaram 8 mL de uma solução saturada de acetato de chumbo básico. A mistura foi centrifugada. Em seguida, adicionaram bicarbonato de sódio ao sobrenadante, que foi centrifugado novamente nas mesmas condições. Por fim, o sobrenadante foi acidificado com uma solução de HCl. Completou-se o volume com água destilada para 50 mL e injetou-se a solução no cromatógrafo (CAMARGO *et al.*, 1998).

A análise de cafeína foi feita em um cromatógrafo Waters com bomba isocrática, injetor Rheodyne e detector de ultravioleta (254 nm). Para a separação da cafeína foi utilizada uma coluna de fase reversa C18. Utilizou-se uma fase móvel isocrática constituída de metanol:água (25:75 em volume), com fluxo constante de 1,0 mL/min (Camargo *et al.*, 1998). A Figura 17 (p. 29) disponibiliza o cromatograma de uma das amostras de café, evidenciando a especificidade da técnica quanto à caracterização da cafeína.

Os valores de concentração das amostras, determinada por Camargo *et al.* (1998) variaram de 0,43 a 0,85 mg/mL para as amostras de café em pó. E de 0,61 a 0,82 mg/mL para as amostras de café instantâneo. A Tabela 1 mostra os valores de cafeína encontrados pelos autores em diferentes marcas de café.



**Figura 17 – Cromatograma de uma das amostras de café.
Fonte: CAMARGO *et al.* (1998)**

Tabela 1- Teores médios de cafeína em diferentes marcas de café em pó.

Café (marca)	Cafeína		
	mg/g	mg/ml	mg/xícara (60 ml)
A	5,34 ± 0,53	0,43 ± 0,04	25,80 ± 2,51
B	6,36 ± 0,49	0,51 ± 0,04	30,60 ± 2,34
C	6,55 ± 0,89	0,52 ± 0,07	31,20 ± 4,33
D	6,62 ± 0,33	0,53 ± 0,03	31,80 ± 1,61
E	6,70 ± 1,31	0,54 ± 0,10	32,40 ± 6,20
F	7,07 ± 1,24	0,57 ± 0,10	34,20 ± 5,99
G	7,35 ± 0,21	0,59 ± 0,02	35,40 ± 1,02
H	7,82 ± 0,74	0,63 ± 0,01	37,80 ± 3,56
I	7,93 ± 0,57	0,64 ± 0,05	38,40 ± 2,85
J	8,10 ± 0,51	0,65 ± 0,04	39,00 ± 2,22
K	8,30 ± 0,82	0,66 ± 0,07	39,60 ± 3,91
L	8,71 ± 0,62	0,69 ± 0,05	41,40 ± 3,17
M	8,91 ± 1,12	0,71 ± 0,09	42,60 ± 5,40
N	10,51 ± 0,59	0,84 ± 0,05	50,40 ± 2,82
	$X = 7,59 \pm 1,31$	$X = 0,61 \pm 0,10$	$X = 36,47 \pm 6,19$

Fonte: Camargo *et al.* (1998)

Camargo *et al.* (1998) observaram uma grande variabilidade no teor de cafeína nos cafés analisados. Assim, conclui-se que a quantidade de cafeína

na bebida depende da quantidade de pó utilizada, do tipo de café e forma de preparo do mesmos.

Cardozo *et al.* (2010) objetivaram avaliar as metilxantinas, entre elas a cafeína, e compostos fenólicos em folhas de mate. Além disso, o trabalho estimou os componentes de variância e herdabilidade entre as diferentes amostras. Os autores coletaram amostras nas seguintes cidades: Ivaí (PR), Barão de Cotegipe (RS), Quedas do Iguaçu (RS), Pinhão (PR) e Cascavel (PR).

Cardozo *et al.* (2010) extraíram a cafeína das folhas de mate por maceração em 50 mL de uma solução metanol-água (70:30 em volume). Em seguida, o extrato foi filtrado e injetado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu acoplado a um detector de ultravioleta (265 nm). Para tanto, utilizaram uma coluna Supelcosil LC-18 mantida à 30°C. As fases móveis utilizadas foram solução aquosa de ácido acético (0,3% v/v) e metanol, com fluxo constante de 1 mL/min, segundo a seguinte programação: 15% a 20% de metanol por 20 min (gradiente linear), 20% a 85% de metanol por 5 min (gradiente linear) e 85% de metanol por 5 min.

Os teores de cafeína variaram de 0,248% a 1,663% de acordo com a procedência da amostra. O resultado sugere que o teor de cafeína em folhas de mate varia de acordo com espécie vegetal.

Alves e Bragagnolo (2002) utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar simultaneamente a teobromina, teofilina e a cafeína em amostras de chá. A escolha da matriz foi motivada pelo fato do chá ser uma das bebidas mais consumidas no mundo e as referidas substâncias serem frequentemente encontradas nas folhas.

A quantificação pelo método cromatográfico foi comparada com o método espectrofotométrico de Schormüller (1970).

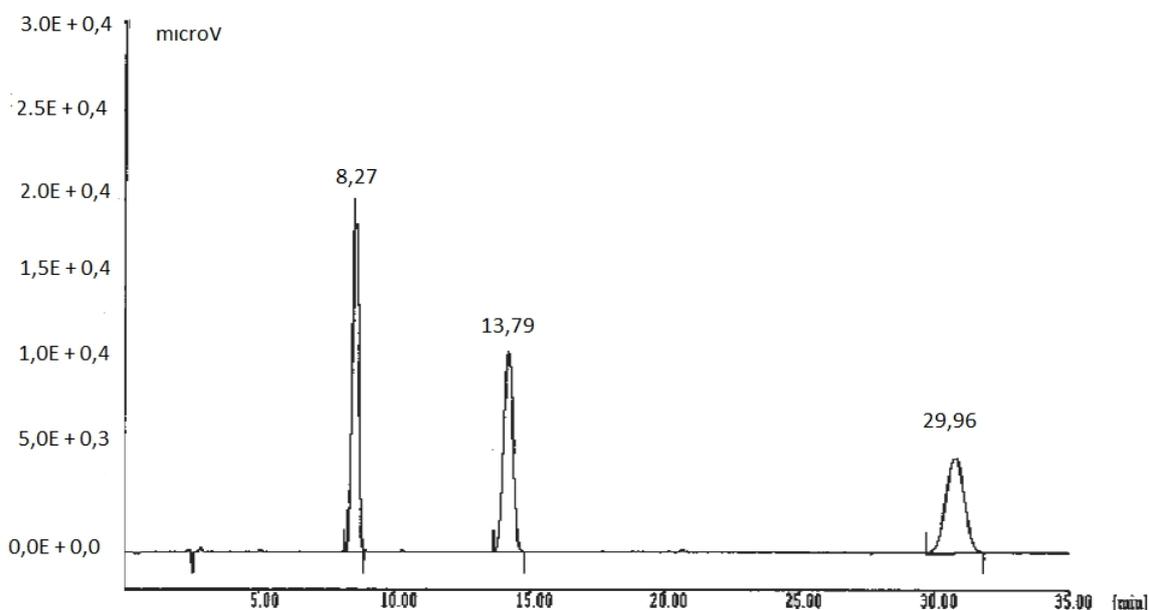
No preparo da amostra para o método espectrofotométrico, Alves e Bragagnolo (2002) trataram 2,0 g de folhas de chá com óxido de magnésio e água destilada fervente. A mistura resfriada foi filtrada e transferida para um funil de separação preenchido com uma solução aquosa de ácido sulfúrico (10% v/v). Realizaram-se 5 extrações com clorofórmio. A fase clorofórmica foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, o qual teve seu volume completado com clorofórmio. A solução foi então

diluída (2 mL para um balão volumétrico de 50 mL) e as absorvâncias foram lidas nos seguintes comprimentos de onda: 273 e 320 nm.

Alves e Bragagnolo (2002) prepararam as amostras para o método cromatográfico baseados na ISO 10095 (1992). Para tanto, os autores mediram 3,0 g de amostra e 6,0 g de óxido de magnésio e adicionaram água destilada. Manteve-se a mistura fervendo por 15 minutos. O conjunto foi resfriado e a água destilada completada. Em seguida, centrifugaram e filtraram o sobrenadante em uma membrana de 0,45 µm. Por fim, a amostra foi injetada no cromatógrafo. Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Pharmacia LKB 2248 com detector UV/Vis (273 nm). As condições cromatográficas estão listadas a seguir: coluna ODS-3 e uma coluna de guarda. A fase móvel foi composta pela mistura de uma solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) e acetonitrila (95:5 em volume) e fluxo constante de 1 mL/min.

A caracterização das substâncias foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos picos dos padrões com os picos das amostras. A quantificação foi realizada via padronização externa.

Os cromatogramas dos padrões e de uma amostra de chá estão ilustrados nas Figura 18 e 19 (p. 32), respectivamente.



**Figura 18 – Cromatograma dos padrões de teobromina (8,27 min), teofilina (13,79 min) e cafeína (29,96 min).
Fonte: ALVES e BRAGAGNOLO (2002)**

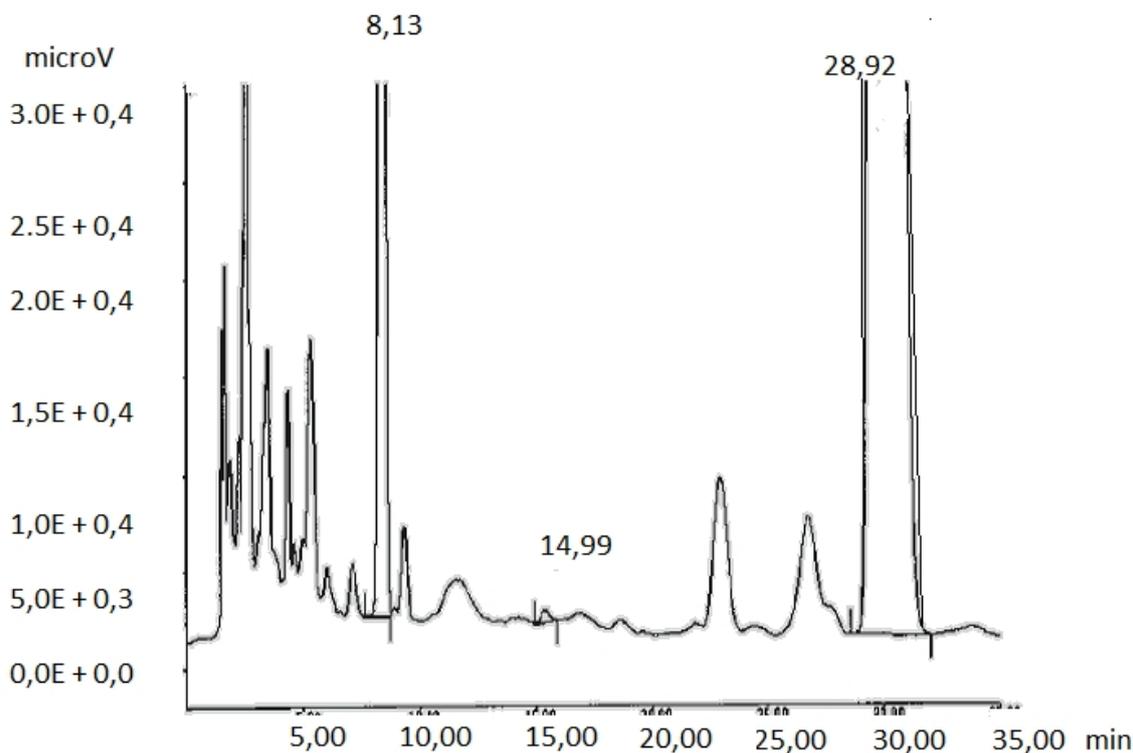


Figura 19 – Cromatograma de uma amostra de folhas de chá. Picos caracterizados: teobromina (8,13 min), teofilina (14,99 min) e cafeína (28,92 min).

Fonte: ALVES e BRAGAGNOLO (2002)

A Tabela 2 mostra a comparação entre os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico e cromatográfico.

Tabela 2 - Comparação dos resultados de cafeína (g/100g) em chás por CLAE e Espectrofotometria.

AMOSTRA	CLAE (MG/100G)	ESPECTROFOTOMÉTRICO (MG/100G)
Chá de camomila 1	ND	ND
Chá de camomila 2	ND	ND
Chá de camomila 3	ND	ND
Chá de Hortelã 1	ND	0,007
Chá de Hortelã 2	ND	0,006
Chá Preto 1	2,405	2,340
Chá Preto 2	2,612	2,655
Chá Preto 3	2,450	2,145
Chá de Boldo	ND	0,013
Floral	ND	0,004

Fonte: adaptado de ALVES e BRAGAGNOLO (2002)

A partir dos resultados, nota-se que a cafeína só foi detectada por CLAE em amostras de chá preto. Por outro lado, o método espectrofotométrico

detectou cafeína em várias outras amostras de chá. Isso mostra que o método espectrofotométrico não é específico para cafeína, detectando outras metilxantinas. (Alves e Bragagnolo 2002).

A cafeína só foi encontrada em amostras de chá preto com valores entre 2,41 a 2,61 g/100 g. A teofilina não foi encontrada em quantidades significativas em nenhuma das amostras. A teobromina, por sua vez, foi detectada em todas as amostras, mas quantidades significativas estavam presentes somente em amostras de chá preto. As concentrações de cafeína encontradas nas amostras de chá preto pelo método espectrofotométrico e cromatográfico não apresentaram diferença significativa.

O método cromatográfico escolhido mostrou-se eficiente e adequado para a determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em amostras de folhas de chá. Além disso, as análises realizadas foram consideradas simples, exatas e precisas.

3. CONCLUSÃO

A elaboração do presente trabalho permitiu agregar novos conhecimentos sobre as propriedades, a biossíntese, as análises e a importância comercial da cafeína. Além disso, tendo em vista o estudo do processo de descafeinação via extração com fluido supercrítico, pôde-se agregar o conhecimento tecnológico com o conhecimento analítico, enfatizado principalmente nas determinações quantitativas de cafeína por CLAE e CG.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTIMARI, R. L.; MORAES, A. C.; TIRAPÉGUI, J.; MOREAU, R. L. M. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 1, p. 18-27, 2006.

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 2, p. 238-242, 2002.

ALVES, S. T.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T.; SCHOLZ, M. B. S. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1164-1168, 2006.

ANVISA. Portaria nº 277, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc36fe0047457e348a3fde3fbc4c6735/RDC_277_2005>. Acesso em: 16/03/2013.

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROIZER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**. v. 69, p. 841-856, 2008.

BAUMANN, T.W.; DORNELAS, M. C.; FRUNGILO, M. L.; MAZZAFERA, P. A ciência e Goethe: cafeína e as flores. **Ciência e cultura**. v. 62, n. 1, p.56-59, 2010.

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

BRENELLI, E.C.S. A Extração de cafeína em bebidas estimulantes- uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química nova**. v.26, n.1, p. 136-138, 2003.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n. 4, p. 421-424, 1998.

CARDOZO JÚNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; FERRARESI FILHO, O.; FRIEDRICH, J. C.; GONELA, A.; STURION, J. A. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesq. agropec. bras**. v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**. v. 30, n.1, p.99-105, 2007.

EDUARDO, M. F.; LANNES, S. C. S. Achocolatados: análise química. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 4 n. 3, p. 405-412, 2004.

GALDUROZ, J. C. F.; CARLINI, E. A. The effects of long-term administration of guarana on the cognition of normal, elderly volunteers. **São Paulo Medical Journal**. v. 114, n. 1, p.1073-1078, 1996.

GOMES, D.; PORTUGAL, D.; PINHEIRO, G.; RIBEIRO, I.; PIRES, R.; ALMEIDA, R. **Produção de café descafeinado**. 2010. Disponível em: <http://paginas.fe.up.pt/~projfeup/cd_2010_11/files/QUI604_poster.pdf>. Acesso em:14/03/2013.

GUERRA, R. O.; BERNARDO, G. C.; GUTIÉRREZ, C. V. Cafeína e esporte. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva**. v. 6, n. 2, p. 61-62, 2000.

INSTITUTO ADOFLO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3ed.São Paulo: IMESP,1985.

KOPCAK, U. **Extração de cafeína da planta do guaraná (Paullinia cupana) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes**. 2003. 237 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Estadual De Campinas, Campinas, 2003.

LAPACHINSKE, S. F.; YONAMINE, M.; MOREAU, R. L. M. Validação de método para determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de *ecstasy* por cromatografia em fase gasosa. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40, n. 1, p. 75-83, 2004.

LARANJA, A. T.; MANZATO, A. J.; BICUDO, H. E. M. C. Efeito da cafeína sobre a mortalidade e oviposição em gerações sucessivas de *Aedes aegypti*. **Revista Saúde Pública**. v. 40, n. 6, p. 1112-1117, 2006.

LEITE, C. L. **Aceitação e preferência por cafés submetidos a diferentes métodos de extração da cafeína**. 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 13/03/2013.

LIMA; I. M. H.; FROTA, M. N. O enfoque da metrologia química em análises toxicológicas na atividade turfística: validação de método analítico para determinação de cafeína em matrizes biológicas. **Química Nova**. v, 30. n. 8, p. 1820-1829, 2007.

LOPES, E. M. C.; PAULA, D. M. B.; BARBO, F. E.; SOUZA, A.; BLATT, C. T. T.; TORRES, L. M. B.; YOUNG, M. C. M. Chemical composition, acetylcholinesterase inhibitory and antifungal activities of *Pera glabrata* (Schott) Baill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasil. Bot.** v.32, n. 4, p.819-825, 2009.

METABOLISMO. Disponível em <http://www.ufpe.br/dbioq/portalbq04/metabolismo_de_aminoacidos.htm> Acessado em 31/03/2013.

NUNES, Laura M. Café: consumo regular, dependência e consequências para a saúde. **Cadernos Mediáticos. Hábitos Alimentares, Saúde e Bem-estar: abordagens comunicacionais**. v. 7, p.123 – 13, 2010.

PRADO, V. S. **Estudos visando a síntese do alcalóide indolizidínico (+)- Ipalbidina**. 2012. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br> >. Acesso em:16/02/2013

SALDAÑA, M. D.; MAZZAFERA, P.; RAHOMA, S. M.Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com CO₂ supercrítico. **Ciência e Tecnologia de alimentos**. v. 17, n. 4, 1997 .

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. 6ª edição. Florianópolis. UFRGS. 2010.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. F.; CROUCH. S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª Ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006

SOARES, A. I. S. M.; FONSECA, B. R. F. **Cafeína**. 2004. 55p. Trabalho realizado no âmbito da disciplina de Toxicologia e Análises Toxicológicas I- Universidade do Porto,Porto.

SOARES, L. C.; OLIVEIRA, G. S. F.; MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S. Obtenção de bebida a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale,L.*) e extrato de guaraná (*Paullinia cupana sorbilis Mart. Ducke*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 23, n. 2, p. 387-390, 2001.

SOLOMONS, T. W. G.; GRAIG, B. F. **Química Orgânica volume 1**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC.1996.

SOLOMONS, T. W. G.; GRAIG, B. F. **Química Orgânica volume 2**. 9ª ed. Rio de Janeiro: LTC.2009.

SOUZA, S. A.; ALVES, S. F.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó(*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 6, p. 866-870, 2010.

TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO; S. H. P.; MENEGARIO, T. F.; TOLEDO, M. C. F. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Revista de Nutrição**. v. 20, n. 1, p. 1073-1078, 2007.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO. L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após torração. **Química Nova**. v. 9, n. 5, p. 965-971,2006.

VAZ, P. N. **Alcalóides esteroidais dos frutos maduros de *Solanum caavurana* Vell.** 2008. Disponível em: < <http://dSPACE.c3sl.ufpr.br/dSPACE/handle/1884/16162>>. Acesso em:16/02/2013.

ZACARIAS, E. C.; CASTRO, A. A.; CENDON, S. Efeito da teofilina associada ao β 2-agonista inalatório de curta ou longa duração, em pacientes com

doença pulmonarobstrutiva crônica estável: revisão sistemática. **J. Bras. Pneumol.** v. 33, n. 2, p. 152-160, 2007.

5. ANEXOS

Anexo 1- Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 11 inciso IV do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c do Art. 111, inciso I, alínea "b" § 1º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº. 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 29, de agosto de 2005, considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população; considerando a necessidade de atualização da legislação sanitária de alimentos, com base no enfoque da avaliação de risco e da prevenção do dano à saúde da população; considerando que os regulamentos técnicos da ANVISA de padrões de identidade e qualidade de alimentos devem priorizar os parâmetros sanitários; considerando que o foco da ação de vigilância sanitária é a inspeção do processo de produção visando a qualidade do produto final; adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA CAFÉ, CEVADA, CHÁ, ERVA-MATE E PRODUTOS SOLÚVEIS", constante do Anexo desta Resolução.

Art. 2º As empresas têm o prazo de 01 (um) ano a contar da data da publicação deste Regulamento para adequarem seus produtos.

Art. 3º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária sujeitando os infratores às penalidades previstas na Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 4º Revogam-se as disposições em contrário, em especial, a Resolução CNNPA nº. 12/78, item referente a Café Cru; Resolução CTA nº. 1/78; Portaria SVS/MS nº. 519/98; Portaria SVS/MS nº. 130/99; Portaria SVS/MS nº. 377/99; Resolução ANVISA/MS RDC nº. 302/02; e Resolução ANVISA/MS RDC nº. 303/02.

Art. 5º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU RAPOSO DE MELLOANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO PARA CAFÉ, CEVADA, CHÁ, ERVA-MATE E PRODUTOS SOLÚVEIS

1. ALCANCE

Fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer Café Torrado, Cevada Torrada, Chá, Erva-Mate e Produtos Solúveis. Excluem-se deste Regulamento os produtos obtidos de espécies vegetais com finalidade medicamentosa e ou terapêutica.

2. DEFINIÇÃO

2.1. Café Torrado: é o endosperma (grão) beneficiado do fruto maduro de espécies do gênero *Coffea*, como *Coffea arábica* L., *Coffea liberica* Hiern, *Coffea canephora* Pierre (*Coffea robusta* Linden), submetido a tratamento térmico até atingir o ponto de torra escolhido. O produto pode apresentar resquícios do endosperma (película invaginada intrínseca). Pode ser adicionado de aroma.

2.2. Chá: é o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor.

2.3. Erva-Mate: é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil., obtido por processo de secagem e fragmentação destinado ao preparo de "chimarrão" ou "tererê" podendo ser adicionado de açúcar.

2.4. Composto de Erva-Mate: é o produto, destinado ao preparo de "chimarrão" ou "tererê", constituído de erva-mate, adicionado de especiaria(s) e ou outra(s) espécie(s) vegetal(is) constante(s) de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás, podendo conter aroma e ou açúcar.

2.5. Cevada Torrada: é o grão beneficiado da espécie *Hordeum vulgare* L., dessecado e submetido à torrefação. Pode ser adicionado de aroma, exceto aroma de café.

2.6. Produtos Solúveis: são aqueles resultantes da desidratação do extrato aquoso de espécie(s) vegetal(is) prevista(s) neste Regulamento e em Regulamento Técnico específico, obtidos por métodos físicos, utilizando água como único agente extrator. Podem ser adicionados de aroma.

2.7. Esgotamento: é o processo tecnológico utilizado para a retirada parcial ou total da(s) substância(s) sávida(s) ou aromática(s) de uma espécie vegetal.

3. DESIGNAÇÃO

3.1. Café Torrado: o produto deve ser designado de "Café Torrado em Grão". Quando submetido ao processo de moagem deve ser designado de "Café Torrado Moído".

3.2. Chá: o produto deve ser designado de "Chá", seguido do nome comum da espécie vegetal

utilizada, podendo ser acrescido do processo de obtenção e ou característica específica. Podem ser utilizadas denominações consagradas pelo uso.

3.2.1. Quando forem utilizadas duas ou mais espécies vegetais, o produto deve ser designado de "Chá Misto..." seguido dos nomes comuns das espécies vegetais ou "Chá Misto...", seguido do nome consagrado pelo uso.

3.2.2. Quando adicionado de especiarias, deve ser designado de "Chá de ... com especiaria(s)", devendo constar o(s) nome(s) comum(ns) da(s) espécie(s) vegetal(is) utilizada(s). A palavra "especiarias" pode ser substituída pelo(s) nome(s) comum(ns) da(s) especiaria(s) utilizada(s).

3.2.3. Quando o produto for adicionado de açúcar, deve ser incluída, na designação, a expressão "com açúcar".

3.3. Erva-Mate: o produto deve ser designado de "Erva-Mate" ou "Mate", podendo ser seguido da(s) expressão(ões) "chimarrão" e ou "tererê", conforme a finalidade de uso. Quando o produto for adicionado de açúcar, deve ser designado de "Erva-Mate com Açúcar" ou "Mate com Açúcar".

3.4. Composto de Erva-Mate: o produto deve ser designado de "Composto de Erva-Mate" seguido do(s) nome(s) comum(ns) da(s) espécie(s) vegetal(is) adicionada(s).

3.4.1. Quando o produto for adicionado de açúcar, a designação deve ser seguida da expressão "com Açúcar".

3.5. Cevada Torrada: o produto deve ser designado de "Cevada Torrada" seguido da forma de apresentação.

3.6. Produtos solúveis devem ser designados de:

3.6.1. "Café Solúvel" ou "Cevada Solúvel", podendo constar expressões relativas ao processo de obtenção.

3.6.2. "Chá" seguido do nome comum da espécie vegetal utilizada ou do nome consagrado pelo uso, mais a expressão "Solúvel", podendo constar expressões relativas ao processo de obtenção.

3.6.2.1. Quando forem utilizadas duas ou mais espécies vegetais, o produto deve ser designado de "Chá Misto Solúvel" ou "Chá" seguido dos nomes comuns das espécies vegetais utilizadas ou do nome consagrado pelo uso, mais a expressão "Solúvel".

3.6.2.2. Quando for adicionado de especiaria(s), deve ser designado de "Chá... com ...", constando o(s) nome(s) comum(s) da(s) espécie(s) vegetal(is) e das especiaria(s) utilizadas, mais a expressão "Solúvel".

3.6.2.3. Quando o produto for adicionado de açúcar, deve ser incluída, na designação, a expressão "com açúcar".

3.7. Quando o produto for adicionado de aroma(s) acrescentar à designação a expressão "sabor....." ou "sabor artificial.....", conforme o caso, seguido do nome(s) do(s) aroma(s)/aromatizante(s).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4.1. BRASIL. Decreto nº. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 abr. 1965. Seção 1.

4.2. BRASIL. Decreto - Lei nº. 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 out. 1969. Seção 1.

4.3. BRASIL. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todos do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial da Unia, Brasília, DF, 19 dez. 1988. Seção 1.

4.4. BRASIL. Lei nº. 8.078, de 11 de setembro de 1990. Código de Defesa do Consumidor. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 set. 1990. Suplemento.

- 4.5. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 1.428, de 26 de novembro de 1993. Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 dez.1993. Seção 1.
- 4.6. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 ago. 1997. Seção 1.
- 4.7. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 554, de 03 de novembro de 1997. Aprova a extensão de uso de aditivos com suas respectivas funções, em preparações para infusões ou decocções, obedecidos os devidos limites. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 nov. 1997. Seção 1.
- 4.8. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 jan. 1998. Seção 1.
- 4.9. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 15 jan. 1998. Seção 1.
- 4.10. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 685, de 27 de agosto de 1998. Regulamento Técnico de Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos e seu Anexo: Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 ago. 1998. Seção 1.
- 4.11. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimento para Registro de alimentos e ou novos ingredientes. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 mai. 1999. Seção 1.
- 4.12. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 17, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 mai. 2004. Seção 1.
- 4.13. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 104, de 14 de maio de 1999. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 mai. 1999. Seção 1.

- 4.14. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 386, de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas funções. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 ago. 1999. Seção 1.
- 4.15. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 389, de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 16: Bebidas - subcategoria 16.2.2 - Bebidas Não Alcoólicas Gaseificadas e não Gaseificadas. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 ago. 1999. Seção 1.
- 4.16. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 22, de 15 de março de 2000. Procedimentos de Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Importados Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 mar. 2000. Seção 1.
- 4.17. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 23, de 15 de março de 2000. Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 16 mar. 2000. Seção 1.
- 4.18. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.
- 4.19. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 234, de 19 de agosto de 2002. Regulamento Técnico sobre aditivos utilizados segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas Funções. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 ago. 2002. Seção 1.
- 4.20. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2002. Seção 1.
- 4.21. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 nov. 2002. Seção 1.

4.22. BRASIL. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 mai 2003. Seção 1.

4.23. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 175, de 08 de julho de 2003. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 jul. 2003. Seção 1.

4.24. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.

4.25. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.

5. REQUISITOS ESPECÍFICOS

5.1. Umidade

- Café Torrado: máxima 5,0% (g/100 g)
- Cevada Torrada: máxima 5,0% (g/100 g)
- Produtos Solúveis: máxima 5,0% (g/100 g)

5.2. Cafeína

- Produtos descafeinados: máximo 0,1% (g/100g)
- Produtos solúveis descafeinados: máximo 0,3% (g/100g)

6. REQUISITOS GERAIS

6.1. Os produtos devem ser obtidos, processados, embalados, conservados em condições que não produzam, desenvolvam e ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor. Deve ser obedecida a legislação vigente de Boas Práticas de Fabricação.

6.2. Os produtos devem atender aos Regulamentos Técnicos específicos de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação; Contaminantes; Características Macroscópicas, Microscópicas e Microbiológicas; Rotulagem de Alimentos Embalados; Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, quando for o caso; Informação Nutricional Complementar, quando houver; e outras legislações pertinentes.

6.3. As espécies vegetais utilizadas para a obtenção dos produtos não podem ser previamente esgotadas no todo ou em parte, exceto para a obtenção dos produtos descafeinados.

6.4. A utilização de espécie vegetal e partes de espécie vegetal que não são usadas tradicionalmente como alimento, pode ser autorizada, desde que seja comprovada a segurança de uso do produto, em atendimento ao Regulamento Técnico específico.

7. REQUISITOS ADICIONAIS DE ROTULAGEM

7.1. Não é permitida, no rótulo, qualquer informação que atribua indicação medicamentosa ou terapêutica (prevenção, tratamento e ou cura) ou indicações para lactentes.

7.2. Os nomes comuns e as partes das espécies vegetais utilizadas nos chás devem ser informados na lista de ingredientes.

7.3. No painel principal dos produtos descafeinados, deve constar a expressão "descafeinado" próximo à designação.