

DETERMINAÇÃO DE TEOBROMINA E CAFEÍNA EM CACAU E PRODUTOS DE CHOCOLATE POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA*

Helena Yuco YABIKU**
Iracema de Albuquerque KIMURA**

RIALA6/796

YABIKU, H.Y. & KIMURA, I.A. - Determinação de teobromina e cafeína em cacau e produtos de chocolate por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):59-64, 1996.

RESUMO: Com o objetivo de determinar os teores de teobromina e cafeína, 77 amostras de produtos de chocolate foram analisadas. As amostras testadas foram 12 amostras de massa de cacau, 4 amostras de aromas de cacau e 61 amostras de alimentos à base de cacau, tais como barras de chocolate, bebidas lácteas, biscoitos, bolos, sorvetes, etc. de diferentes marcas. O método utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de díodos, coluna C₁₈ e fase móvel metanol - água - ácido acético (20:79:1). A quantificação foi feita por padronização externa.

DESCRIPTORIOS: Produtos de chocolate, Teobromina e cafeína, técnica: Cromatografia líquida de alta eficiência, determinação.

INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse entre os profissionais da Saúde, no conhecimento do teor de metilxantinas, entre elas a teobromina e a cafeína nos produtos alimentícios.

Este fato ocorreu desde que a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos retirou a cafeína da lista de drogas geralmente reconhecidas como seguras, "Lista GRAS" e tem alertado às mulheres, principalmente as grávidas, no sentido de consumir pouco ou mesmo evitar, alimentos e drogas contendo cafeína¹.

Existem evidências, ainda que não comprovadas, de que a cafeína atravessa livremente a placenta, e pode causar possivelmente defeitos de nascença em humanos semelhantemente àqueles observados em animais⁴.

Sob o ponto de vista fisiológico, segundo o Pharmaceutical Codex 1979, estes 2 alcalóides atuam em diferentes níveis: como estimulador do sistema nervoso central e como diurético. Enquanto a cafeína tem

ação diurética fraca, é um grande estimulador do sistema nervoso central. A teobromina possui ação diurética semelhante à cafeína, porém, não possui ação estimulante do sistema nervoso central¹⁰.

A importância da teobromina está no seu metabolismo, uma vez que a metilação da mesma leva a produzir cafeína¹.

Existem vários estudos sobre o conteúdo da cafeína em chá, café e cacau, porém, poucas informações sobre o teor de teobromina em produtos de chocolate^{2, 4, 5, 6, 7, 8}.

Os primeiros trabalhos publicados na literatura sobre a análise de cafeína e teobromina eram bastante difíceis e extremamente morosos, devido à impossibilidade do método clássico utilizado em separar a cafeína da teobromina. Por outro lado, ainda havia uma dificuldade suplementar em produtos contendo grandes quantidades de açúcar.

A análise da teobromina, tal como tem sido feita pelo método gravimétrico, é bastante onerosa e trabalhosa^{6,12}.

* Realizado na Seção de Aditivos e Resíduos de Pesticidas

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Com o advento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), atualmente permite a separação e quantificação da teobromina e cafeína quando presentes numa mesma amostra^{1, 2, 3, 8, 9, 11, 13}.

Nesse sentido, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar a concentração de teobromina e cafeína em amostras de cacau e produtos de chocolate utilizando a técnica de CLAE.

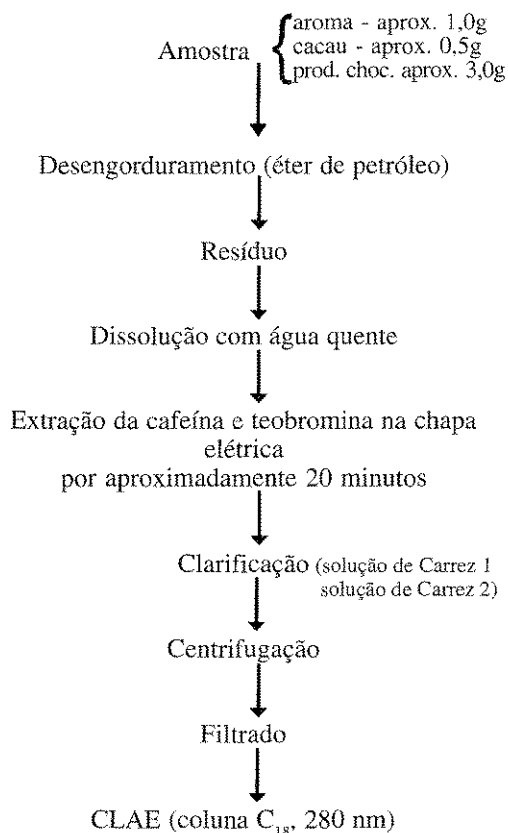
MATERIAL E MÉTODO

Material

Amostras de cacau de diversas procedências, aromas à base de cacau e produtos de chocolate, tais como biscoitos, bolos, bebidas lácteas, alimentos achocolatados, sorvetes, etc, totalizando 77 amostras foram adquiridas junto a empresas do ramo e supermercados da Cidade de São Paulo, em colaboração com o Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

Método

O método empregado foi o descrito por BRERETON e alii³ cujo procedimento basicamente encontra-se esquematizado a seguir:



Preparo das Soluções

Solução de Carrez 1: dissolver 219g de acetato de zinco em aproximadamente 500 ml de água do Milli-Q e 30 ml de ácido acético 0,1 mol/L. Transferir para um balão volumétrico de 1 litro, completando o volume com água.

Solução de Carrez 2: dissolver 106g de ferrocianeto de potássio em aproximadamente 500mL de água e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1 litro, completando-o com água.

Solução-estoque de teobromina (250µg/mL): pesar 50mg de teobromina, dissolver em água e aquecer, se necessário, transferindo a solução para um balão volumétrico de 200 mL, completando-o com água.

Solução-padrão de trabalho de teobromina: diluir 1, 2, 3, 4 e 5mL da solução-estoque de teobromina para 100mL com água.

Solução-estoque de cafeína (500µg/mL): pesar 50mg de cafeína, dissolver em água e completar a 100 mL, no balão volumétrico.

Solução-padrão de trabalho de cafeína: diluir 1, 2, 3, 4 e 5mL da solução-estoque de cafeína para 100mL no balão volumétrico.

Equipamento

Foi utilizado o cromatógrafo líquido Hewlett Packard, modelo 1090 com detector de arranjo de diodos. As condições cromatográficas de trabalho foram:

coluna: Lichrosphere 100 RP-18 em Lichrocart 125-4 (Merck)

fase móvel: metanol-água-ácido acético (20:79:1)

fluxo da fase móvel: 1,0ml/min

temperatura do forno: 35°C

comprimento de onda: 280nm

volume de injeção: 20 µL

Os solventes e as amostras foram filtradas através de membranas filtrantes (Millipore) antes de serem introduzidas no cromatógrafo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de teobromina e cafeína encontrados nos vários tipos de alimentos coletados de vários supermercados da Cidade de São Paulo, são apresentados na Tabela I.

Para cada marca de alimento foi feita análise em duplicata e tirado um valor médio.

Os valores apresentados na Tabela 1 representam a média dos valores médios de cada marca de alimento analisado.

Os teores de teobromina e cafeína foram determinados pelo cálculo das áreas de seus picos cromatográficos, utilizando o método de padrão externo.

As curvas-padrões de teobromina e cafeína apresentaram-se lineares dentro dos intervalos de concentrações examinados de 25ng a 125ng.

A avaliação do teste de recuperação foi conduzida em quatro diferentes matrizes: massa de cacau, biscoitos recheados sabor chocolate, alimentos achocolatados e chocolate em pó solúvel.

Inicialmente as amostras foram determinadas quanto ao conteúdo de teobromina e cafeína. Em seguida, as amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas dos padrões de teobromina e cafeína, isto é, a metade e o dobro das quantidades encontradas em cada amostra.

Os testes foram realizados em triplicata.

As médias e os desvios-padrões das recuperações em porcentagem corrigidas pela subtração dos valores-controle encontrados em diferentes substratos foram de 99,3% e 2,8% para teobromina e 97,5% e 3,3% para cafeína (Tabela 2).

Os teores dos alcalóides teobromina e cafeína encontrados na massa de cacau, alimentos achocolatados em pó, e as barras de chocolate foram semelhantes aos obtidos por outros pesquisadores^{4, 5, 9, 13}.

É evidente que com o acréscimo da manteiga de cacau, sólidos lácteos e açúcar à massa de cacau que é a substância-base ou de partida para todos os produtos à base de chocolate, ocorre uma diminuição nos teores de teobromina e cafeína no produto final.

A massa de cacau é um alimento sólido ou semi-sólido obtida a partir da moagem do miolo da semente de cacau. Foram analisadas 12 amostras de massa de cacau de 7 diferentes procedências quanto ao conteúdo de teobromina e cafeína.

Os valores médios de teobromina e cafeína foram 1,31% e 0,16%, respectivamente, com variação de 1,12 - 1,50% e 0,14 - 0,20%, respectivamente (Tabela 1). A ligeira variação nos teores dos alcalóides pode ser atribuída a vários fatores como variedades diferentes, grau de maturidade das sementes na ocasião da colheita e diferenças no grau de fermentação.

O cacau vendido no comércio (cacau em pó parcialmente desengordurado) sob a forma de pó é prepa-

rado através da pulverização do material remanescente após a remoção da matéria graxa (manteiga de cacau) da massa de cacau.

Uma vez que a teobromina e a cafeína permanecem na porção não graxa da massa, o cacau comercial vendido desengordurado possui concentração maior de teobromina e cafeína que a massa de cacau.

Os valores médios de teobromina e cafeína encontrados foram de 2,22% e 0,24% respectivamente.

As barras de chocolate de diversos tipos como ao leite, branco e meio-amargo também foram pesquisados quanto ao conteúdo de teobromina e cafeína (Tabela 1).

Como era de se esperar, a barra de chocolate branco não apresentou nenhum conteúdo de teobromina e cafeína. Em relação à barra de chocolate meio-amargo, o teor médio de teobromina e cafeína encontrados foram de 0,84% e 0,10% respectivamente.

Na barra de chocolate ao leite, os teores de teobromina e cafeína encontrados foram de 0,15% e 0,04%, respectivamente. Esses valores são inferiores aos do tipo meio-amargo, uma vez que são introduzidos os sólidos de leite, além dos componentes normais utilizados em ambos os tipos de chocolate que são a massa de cacau e manteiga de cacau.

Os aromas naturais de cacau analisados eram compostos de extrato de cacau, extrato de baunilha, vanilina, etil vanilina e maltol, sendo que os teores de teobromina e cafeína variaram de 0,11% a 0,34% e 0,02% a 0,07% respectivamente.

Vários outros alimentos, tais como biscoitos, bebidas lácteas, coberturas de chocolate, sorvetes, etc, também foram analisados, conforme apresentados na Tabela 1.

Os resultados encontrados indicam que o método é bastante preciso e exato e que a técnica quantifica satisfatoriamente os dois alcalóides, conjuntamente.

A análise da teobromina e cafeína leva aproximadamente 2 horas desde a pesagem da amostra até a injeção do extrato no cromatógrafo líquido, com grande vantagem em relação ao método oficial, gravimétrico utilizado até então, que levava aproximadamente 2 dias.

CONCLUSÃO

O método utilizado para quantificar a teobromina e a cafeína, simultaneamente, mostrou-se bastante exato e preciso, como demonstrado pela avaliação da recuperação, sugerindo a adoção deste método como método oficial na determinação de teobromina.

TABELA 1

Níveis de teobromina e cafeína encontrados nos diferentes alimentos analisados.

Alimento	Nº de marcas analisadas	Nº de amostras analisadas	Média de Teobromina (%)	Intervalo de Teobromina (%)	Média de Cafeína (%)	Intervalo de Cafeína (%)	Total de Alcalóides (%)
Barra de chocolate							
Ao Leite	2	2	0,15	0,14 - 0,15	0,04	0,02 - 0,05	0,19
Branco	2	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Meio-amargo	2	2	0,84	0,79 - 0,88	0,10	0,09 - 0,10	0,94
Alimento Aço- colatado em pó	7	7	0,33	0,19 - 0,38	0,04	0,02 - 0,08	0,37
Mistura prepa- rada para bolo	3	3	0,15	0,13 - 0,17	0,02	0,02	0,17
Biscoito recheado	3	4	0,09	0,05 - 0,13	0,01	0,00 - 0,02	0,10
Bebida láctea	1	1	0,15	0,15	0,01	0,01	0,16
Composto Ali- mentar	3	4	0,33	0,15 - 0,64	0,04	0,01 - 0,08	0,37
Licor de cacau e/ou chocolate	4	6	0,03	0,02 - 0,07	0,00	0,00 - 0,01	0,03
Cobertura de chocolate	2	2	0,16	0,11 - 0,20	0,03	0,02 - 0,03	0,19
Pão de mel	1	1	0,09	0,09	0,01	0,01	0,10
Bolo	4	4	0,05	0,01 - 0,08	0,00	0,00	0,05
Rocamboles	1	1	0,09	0,09	0,01	0,01	0,10
Marshmallow	1	1	0,24	0,24	0,04	0,04	0,28
Alim. enriq. c/ vit. e sais minerais	2	2	0,13	0,09 - 0,16	0,01	0,01	0,14
Alim. à base de extrato de malte	1	1	0,30	0,30	0,01	0,01	0,31
Cookies	1	1	0,30	0,30	0,04	0,04	0,34
Sorvetes	9	10	0,08	0,03 - 0,15	0,01	0,00 - 0,01	0,09
Chocolate em pó solúvel	2	2	0,77	0,75 - 0,78	0,11	0,10 - 0,11	0,88
Massa de cacau	7	12	1,31	1,12 - 1,50	0,16	0,14 - 0,20	1,47
Cacau em pó parc. deseng.	3	3	2,22	2,15 - 2,27	0,24	0,23 - 0,24	2,46
Chocolate em pó parc. deseng.	2	2	1,13	1,10 - 1,15	0,13	0,12 - 0,14	1,26
Aroma natural de cacau	4	4	0,24	0,11 - 0,34	0,05	0,02 - 0,07	0,29
Total de amostras analisadas		77					

TABELA 2

Recuperação (%) de teobromina e cafeína em diferentes substratos.

AMOSTRA	TEOBROMINA		CAFEÍNA	
	MÉDIA	DP*	MÉDIA*	DP*
Massa de cacau	100,8	3,5	95,3	3,7
Biscoito Recheado	98,9	2,5	100,7	2,4
Alimento Achocolatado	97,2	3,1	95,4	3,6
Chocolate em pó solúvel	100,4	2,0	98,4	3,3
Média	99,3	2,8	97,5	3,3

* Média e desvio padrão de análises em triplicata

O presente trabalho apresentou um perfil dos conteúdos de teobromina e cafeína em produtos de chocolate, atendendo à necessidade destes conhecimentos por parte dos profissionais da Saúde.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a colaboração do Centro de Vigilância Sanitária (ERSA-2), em especial à Dra. Cecília Cibele Zepellini pela coleta das amostras.

RIALA

YABIKU, H. Y.; KIMURA, I. A. - High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):59-64, 1996.

ABSTRACT: In order to investigate the levels of theobromine and caffeine, 77 samples of chocolate liquor and commercial chocolate products were analysed. The samples tested included 12 samples of chocolate liquor, 4 samples of cocoa flavour and 61 samples of commercial chocolate products like sweet bar chocolate, milk beverages, biscuits, cakes, ice-cream, etc from different brands. A liquid chromatography technique was developed using a diode array detector, a C₁₈ column and methanol-water-acetic acid (20:79:1) as mobile phase. Quantitation was carried out by external standardization.

DESCRIPTORS: chocolate products, theobromine and caffeine, high pressure liquid chromatographic determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Arlington, Virginia, p. 776 (980.14), 1990.
2. BLAUCH, J.L. & TARKA J.R., S.M. - HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea and instant hot cocoa mixes. *J. Food Sci.*, **48**:745-50, 1983.
3. BRERETON, P., HAGUE, M. & WOOD, R. - The determination of theobromine in cocoa and chocolate products. *J. Assoc. Publ. Analysts*, **30**:49-54, 1994.
4. CRAIG, W.J. & NGUYEN, T. T. - A research note - Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. *J. Food Sci.*, **49**:302-305, 1984.
5. DE VRIES, J.W., JOHNSON, K.D. & HEROFF, J.C. - A research note HPLC determination of caffeine and theobromine content of various natural and red dutched cocoas. *J. Food Sci.*, **46**:1986-9, 1981.
6. GERRITSMA, K.W. & KOERS, J. - Determination of theobromine in cocoa residues. *Analyst*, **4**:201-5, 1953.
7. HAMANN, Y.; TISSE, C. & ESTIENNE, J. - Etude de la teneur en théobromine par

- chromatographie liquide haute performance des fèves de cacao. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **828**(6): 271-76, 1984.
8. HURST, W.J.; SYNDER, P.S. & MARTIN JR., R.A. - Use of microbore high-performance liquid chromatography for the determination of caffeine, theobromine and theophylline in cocoa. *J. Chromatogr.*, **318**(2): 408-411, 1985.
 9. KREISER, W.R. & MARTIN JR., R.A. - High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products: collaborative study. *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, **63**(3):591-4, 1980.
 10. LOVE, L.J. - Caffeine, theophylline and theobromine in New Zealand Foods. *Food Technology in New Zealand*, January, 29-31, 1989.
 11. MUHTADI, F.J.; EL-HAWARY, S.S. & HIFNAWY, M.S. - Comparative HPLC and GLC determination of caffeine in different products. *J. Liquid Chromatogr.*, **13**(5):1013-1028, 1990.
 12. SÃO PAULO, Instituto Adolfo Lutz - *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. V.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3ª ed., São Paulo, p. 175-7, 1985.
 13. ZOUMAS, B.L.; KREISER, W.R. & MARTIN, R.A. - Theobromine and caffeine content of chocolate products. *J. Food Sci.*, **45**:314-16, 1980.

Recebido para publicação em 22/12/95