

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM CAFÉ*

Marcia Regina Pennacino do Amaral MELLO **
Regina Sorrentino MINAZZI-RODRIGUES **
José Byron de CARVALHO **
Issao SHIROSE ***

RIALA6/734

AMARAL MELLO, M.R.P. e col. - Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de cafeína em café. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2):89-95, 1992.

RESUMO: Foram realizados estudos comparativos entre três métodos de extração para determinação de cafeína em amostras de café cru, café torrado, café solúvel e extrato de café. Compararam-se os métodos: de Cortes, descrito nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"; este mesmo método, com modificações relativas à quantidade de amostra e de Lee Kum-Tatt modificado. Verificou-se que os métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt modificados forneceram os melhores resultados, e que este último, além disso se destacou como o mais apropriado para análises de rotina pela sua rapidez e operacionalidade.

DESCRITORES: Café, determinação de cafeína em. Cafeína em café, determinação. Métodos de extração, estudo comparativo.

INTRODUÇÃO

O café, talvez seja a bebida mais conhecida e apreciada em todo o mundo. Além de suas características organolépticas destaca-se a sua ação estimulante sobre o sistema nervoso central, a musculatura esquelética e o sistema circulatório, ação essa devida à presença do alcalóide trimetilxantina ou cafeína.³

O teor da cafeína no café pode variar de 0,5% a 2,0% dependendo da espécie⁴, e tem sido utilizado como parâmetro de qualidade, tanto do café cru em grão, como do café torrado e do café solúvel. A legislação brasileira, de 1978, exige um teor mínimo de 1% p/p de cafeína para o café cru em grão, de 0,7% p/p para café torrado e de 2,0% p/p para café solúvel^{1,10}.

Muitos métodos analíticos são citados na literatura para a quantificação da cafeína em café. Esses métodos incluem a determinação gravimétrica^{2,5}, a espectrofotometria na região do ultravioleta^{5,6,9,11,12} e a cromatografia líquida de alta resolução⁷.

A quantificação de cafeína em cafés tem sido realizada, na maioria dos casos, por meio da determinação espectrofotométrica, que tem se mostrado seletiva, simples e rápida. A etapa precedente a essa quantificação pode ser realizada através de extração ácida, como descrita nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"⁵ com base no método de Cortes², ou seja, por carbonização seletiva da matéria orgânica da amostra pelo ácido sulfúrico concentrado, para liberação da cafeína, seguida da extração com clorofórmio. No que se refere a essa técnica, os autores têm constatado que a variação da quantidade de ácido em relação à amostra utilizada pode resultar na obtenção de diferentes teores de cafeína.

Alguns autores, entretanto, utilizam extração alcalina com hidróxido de amônio e clorofórmio e subsequente passagem do extrato através de coluna de alumina, com vistas à remoção de impurezas interferentes⁶.

* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no VII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, São Paulo, 1991.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Seção de Estatística).

Com o objetivo de escolher a melhor conduta para determinar cafeína em amostras de café, levando em consideração facilidade de operação, eliminação de possíveis interferências e obtenção de bons resultados na faixa de concentração estudada, foi realizado um estudo comparativo entre o método oficial descrito no livro *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, e este mesmo método com modificações relativas a quantidades de amostra e o método de Lee Kum-Tatt⁶, baseado em extração alcalina, com modificações.

MATERIAL E MÉTODOS

a) MATERIAL

Foram analisadas 42 amostras de café, assim distribuídas de acordo com a forma de apresentação: dez amostras de café cru em grão, dez amostras de café torrado e moído, dez amostras de café solúvel e doze amostras de extrato de café.

b) MÉTODOS

Foi realizado um estudo comparativo entre três métodos de extração de cafeína: a) método I.A.L. — baseado em extração ácida, empregando-se a técnica descrita no livro de "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" v. 1, 1985; b) método I.A.L. modificado — empregando-se a mesma técnica, apenas alterando-se a quantidade de amostra; c) método Lee Kum-Tatt modificado — baseado em extração alcalina.

A partir da extração, a dosagem da cafeína obtida foi feita por espectrofotometria na região do ultravioleta.

b. 1 Método I.A.L.

Pesar com precisão n g da amostra em um béquer de 100 ml (onde $n = 2$ g para café cru e café torrado; 1 g para o café solúvel e extrato de café). Adicionar cuidadosamente, evitando a formação de grumos, com auxílio de uma vareta de vidro, 4 ml de ácido sulfúrico. Homogeneizar. Aquecer em banho-maria por 15 minutos. Adicionar, com cuidado, 50 ml de água destilada fervente. Aquecer por mais de 15 minutos. Filtrar a quente. Lavar o béquer e o filtro com três porções de 10 ml de água quente, acidulada com ácido sulfúrico. Receber o filtrado e as águas de lavagem em um funil de separação de 250 ml. Esfriar. Adicionar 30 ml de clorofórmio. Agitar. Esperar a separação das camadas. Decantar a camada clorofórmica, por meio de um filtro umedecido com clorofórmio, para um balão de fundo chato de 250 ml com junta esmerilhada. Repetir a extração com mais três porções de 30 ml de clorofórmio. Evaporar o clorofórmio. Dissolver o resíduo em água destilada quente, filtrando para um balão volumétrico de 1000 ml. Completar o volume com água destilada. Medir a absorvância a 274 nm, em espectrofotômetro. Determinar a quantidade de cafeína correspondente, usando curva-padrão previamente estabelecida.

Curva-padrão — preparar uma solução-estoque de cafeína com 10 mg/100 ml. Com auxílio de bureta transferir alíquotas de 2, 3, 5, 7, 8, 10 e 15 ml para balões de 100 ml. Completar o volume com água destilada. Medir a absorvância a 274 nm, usando um branco para calibração do espectrofotômetro.

b. 2 Métodos I.A.L. modificado

Empregou-se a mesma técnica descrita acima, apenas alterando-se a quantidade de amostra (1 g ao invés de 2 g para café cru e café torrado e 0,5 g ao invés de 1 g para café solúvel).

b. 3 Método de Lee Kum-Tatt modificado

Pesar 1,0g para café cru, torrado e extrato de café ou 0,5g para café solúvel, transferir para um frasco erlenmeyer de 125 ml contendo 3 ml de solução de hidróxido de amônio a 10%; adicionar 50 ml de clorofórmio contendo 1% de etanol, aquecer sob refluxo por dez minutos. Passar o conteúdo do frasco através de um funil contendo algodão, de maneira que o filtrado seja recebido diretamente em uma coluna de vidro (2,5 cm de diâmetro x 25 cm de altura) "empacotada" com 10 g de óxido de alumínio neutro (atividade I). Lavar o frasco com mais duas porções de 50 ml do clorofórmio contendo 1% de etanol. Recolher o eluato em um balão de fundo chato de 250 ml com junta esmerilhada. Evaporar o clorofórmio e dissolver o resíduo em água destilada quente, filtrando para um balão volumétrico de 1000 ml. Completar o volume com água. Medir a absorvância a 274 nm, em espectrofotômetro. Determinar a quantidade de cafeína correspondente, usando uma curva-padrão previamente estabelecida.

As modificações introduzidas no método original de Lee Kum-Tatt referem-se ao volume de clorofórmio usado na extração, tempo de aquecimento sob refluxo e leitura da cafeína em água destilada em vez de clorofórmio.

Salienta-se que as modificações, tanto para o método I.A.L. como para o método de Lee Kum-Tatt foram introduzidas após vários testes com relação ao tempo e à eficiência de extração.

c) ANÁLISE ESTATÍSTICA

c. 1 Para análise conjunta dos dados de café cru, café torrado e moído e café solúvel

Os dados de teores de cafeína em café foram submetidos à análise da variância, segundo o delineamento de parcelas subdivididas (*split-plots design*) incluindo nas parcelas o fator tipos de café e nas subparcelas o fator métodos de extração, e a interação tipos de café x métodos de extração. Quando da significância ($p < 0,05$) dessa interação, estudou-se o efeito de um fator em relação ao outro. A análise da variância foi complementada com o teste de TuKey para o confronto das médias referentes a tipos de café e a métodos de extração da cafeína.

c. 2 Para extrato de café

Os dados de teores de cafeína foram submetidos à análise da variância segundo o modelo de dois critérios de classificação, e as médias referentes a métodos de extração confrontadas pelo teste de Tukey.

Para ambos os casos o nível de erro para os testes estatísticos foi fixado em 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da determinação de cafeína das amostras pelos métodos citados, encontram-se relacionados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, de acordo com o tipo de amostra.

Tabela 1
Teores de cafeína nas amostras de café cru, obtidos pelos diferentes métodos.

Amostra N ^o	Método I.A.L. g/100g	Método I.A.L. modificado g/100g	Método Lee Kum-Tatt modificado g/100g
1	0,93	1,08	0,91
2	0,94	1,08	0,98
3	0,94	1,14	0,97
4	1,03	1,14	1,00
5	1,01	1,13	0,97
6	0,95	1,15	1,10
7	0,99	1,15	0,92
8	0,97	1,05	0,97
9	0,91	1,08	0,92
10	0,92	1,08	0,90

Tabela 2
Teores de cafeína nas amostras de café torrado e moído, obtidos pelos diferentes métodos.

Amostra N ^o	Método I.A.L. g/100g	Método I.A.L. modificado g/100g	Método Lee Kum-Tatt modificado g/100g
1	1,04	1,28	1,31
2	1,08	1,38	1,33
3	1,08	1,35	1,20
4	1,07	1,31	1,30
5	0,99	1,22	1,22
6	0,98	1,22	1,23
7	0,98	1,31	1,24
8	1,02	1,35	1,24
9	1,56	1,80	1,89
10	1,02	1,22	1,22

Tabela 3
Teores de cafeína nas amostras de café solúvel, obtidos pelos diferentes métodos.

Amostra N ^o	Método I.A.L. g/100g	Método I.A.L. modificado g/100g	Método Lee Kum-Tatt modificado g/100g
1	2,51	2,77	2,77
2	2,29	2,49	2,48
3	2,52	2,71	2,69
4	2,19	2,52	2,40
5	2,18	2,39	2,40
6	2,48	2,80	2,92
7	2,35	2,69	2,58
8	2,32	2,63	2,62
9	2,06	2,26	2,33
10	2,49	2,70	2,65

Tabela 4
Teores de cafeína nas amostras de extrato de café, obtidos pelos diferentes métodos.

Amostra N ^o	Método I.A.L. g/100g	Método Lee Kum-Tatt modificado g/100g
1	0,96	1,00
2	1,04	1,06
3	1,06	1,00
4	2,36	2,66
5	2,37	2,68
6	2,32	2,51
7	1,16	1,16
8	1,20	1,16
9	1,17	1,17
10	2,30	2,42
11	2,54	2,83
12	2,60	2,75

Uma vez que as "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz" não indicam o procedimento para extração da cafeína do extrato de café, adotou-se nesse

caso o mesmo método I.A.L. indicado para outros tipos de café, mas adequando-se a quantidade de

amostra a ser utilizada em função da concentração de cafeína presente.

Confrontando os valores de cafeína obtidos, verifica-se que o método I.A.L. modificado mostrou-se mais eficiente que o método I.A.L. para os cafés cru, torrado e solúvel.

Comparando-se os métodos I.A.L. modificado (extração ácida) e Lee Kum-Tatt modificado (extração alcalina), verifica-se que somente no caso do café cru, pelo fato da cafeína estar ligada a outras substâncias, o que não ocorre nas demais formas de café⁸, a extração ácida mostrou-se mais eficiente.

Algumas considerações devem ser feitas com relação à operacionalidade de cada método. Assim, os métodos I.A.L. e I.A.L. modificado apresentam como desvantagens o fato de incluírem uma etapa de extração da cafeína envolvendo agitação em funil de separação e problemas de formação de emulsões, principalmente nos casos de amostras de café verde e de extrato de café. Embora solucionáveis, tais inconvenientes retardam o andamento da análise. Comparativamente, o método de Lee Kum-Tatt modificado mostrou-se mais simples e rápido.

Os resultados estatísticos constam dos Quadros 1, 2, 3 e 4.

Quadro 1
Análise da variância dos dados de teores de cafeína nos cafés cru, torrado, moído e solúvel.

F.V. *	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tipos de café (T)	2	38,779042		
Resíduo (a)	27	1,685740	0,062435	
Subtotal	(29)	(40,464782)		
Método de extração (M)	2	0,795049		
Interação T x M	4	0,185605	0,046401	24,94 (p < 0,05)
Resíduo (b)	54	0,100480	0,001861	
Total	89	41,545916		

C.V. (parcelas) = 15,73%

C.V. (subparcelas) = 2,72%

* F.V. = fonte de variação

S.Q. = soma de quadrados

F = valor da estatística F

G.L. = graus de liberdade

Q.M. = quadrado médio

C.V. = coeficiente de variação

p = nível mínimo de significância

Quadro 2

Confronto das médias de métodos de extração dentro de cada forma de extração devido à significância da interação tipos de café x métodos de extração.

- D.M.S. (5%) = diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro de 5%

- As médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey

MÉTODOS	TIPOS DE CAFÉ		
	Torrado	Cru	Solúvel
I.A.L.	1,08 a	0,96 a	2,34 a
I.A.L. modificado	1,34 b	1,11 b	2,60 b
Lee Kum-Tatt modificado	1,32 b	0,96 a	2,58 b
D.M.S. (5%)	0,05	0,05	0,05

Quadro 3
Confronto das médias de formas de apresentação dentro de cada método de extração devido à significância da interação tipos de café x métodos de extração.

TIPOS DE CAFÉ	MÉTODOS		
	I.A.L.	I.A.L. modificado	Lee Kum-Tatt modificado
Torrado	1,08 a	1,34 a	1,32 a
Cru	0,96 a	1,11 b	0,96 b
Solúvel	2,34 b	2,60 c	2,58 c
D.M.S. (5%)	0,16	0,16	0,16

- D.M.S. (5%) = Diferença mínima significativa do teste de Tukey ao nível de erro 5%

- As médias acompanhadas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Quadro 4
Análise da variância dos dados dos teores de cafeína no extrato de café.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Métodos	1	0,07260	0,07260	7,78 (p < 0,05)
Amostras	11	12,57493	1,14318	122,57 (p < 0,05)
Resíduo	11	0,10260	0,009327	
Total	23	12,75013		

C.V. = 5,33%

O Quadro 1 mostra que o efeito da interação tipos de café x métodos de extração foi significativo ($p < 0,05$), indicando que o efeito de um fator depende do outro. Indica também que o coeficiente de variação (c.v.) para parcelas e subparcelas foi de magnitudes 15,73% e 2,72% respectivamente.

O Quadro 2 mostra que os teores de cafeína objetidos pelos métodos I.A.L. modificado e Lee Kum-Tatt modificado não diferiram significativamente entre si, tanto para café torrado como para café solúvel, mas que diferiram do obtido pelo método I.A.L. Já para o café cru, o teor de cafeína pelo método I.A.L. modificado foi significativamente superior aos obtidos pelos métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt modificado.

O Quadro 3 mostra que o teor de cafeína no café solúvel foi significativamente superior aos demais tipos de café para todos os métodos utilizados, e que no café torrado, o teor de cafeína foi significativamente superior ao café cru nos métodos I.A.L. modificado e Lee Kum-Tatt modificado, mas não no método I.A.L.

O Quadro 4, correspondente ao extrato de café, mostra que a magnitude do coeficiente de variação (c.v.) foi de 5,33%. Sendo o teor médio de cafeína pelos métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt modificado de magnitudes 1,76 e 1,87, respectivamente, e a diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Tukey igual a 0,09, tem-se que o teor de cafeína pelo

método de Lee Kum-Tatt modificado foi significativamente superior ao obtido pelo método I.A.L.

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais e diante dos resultados estatísticos, pôde-se concluir que:

a) Os diferentes métodos de extração de cafeína não apresentaram a mesma eficiência.

b) Pelo método I.A.L. determinou-se teor médio de cafeína sempre inferior ao dos demais métodos.

c) No café solúvel o teor de cafeína sempre foi superior ao dos demais tipos, nos três métodos utilizados.

d) No café cru o teor de cafeína foi inferior aos demais tipos quando se utilizaram os métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt modificado, o que não ocorreu no caso do método I.A.L. modificado.

e) Para as amostras de cafés torrado e solúvel, os métodos I.A.L. modificado e Lee Kum-Tatt modificado apresentaram idênticos resultados.

f) Para o extrato de café o método Lee Kum-Tatt modificado resultou em um teor de cafeína superior ao do método I.A.L.

Os estudos realizados indicaram que os métodos I.A.L. e Lee Kum-Tatt, modificados, forneceram os melhores resultados. O método de Lee Kum-Tatt modificado, além disso, mostrou-se o mais apropriado para análises de rotina pela sua rapidez e operacionalidade.

AMARAL MELLO, M,R,P, *et al.* — Comparative study of extraction methods to determine caffeine in coffee.

ABSTRACT: Comparative studies were made among three extraction methods to determine caffeine in samples of crude, roasted, soluble coffee as well as in coffee extract. The methods used were: Cortes', method according to the Analytic Norm of Adolfo Lutz Institute, the same method with modifications concerning the sample quantity, and the modified Lee Kum-Tatt method. Based on the obtained results, it was proved that I.A.L. and Lee Kum-Tatt modified methods presented the best results, although the Lee Kum-Tatt modified method would be the most appropriate to routine analyses for its rapidity, operationality and good results.

DESCRIPTORS: Coffee, determination of caffeine in. Caffeine in coffee, determination. Extraction methods, comparative study.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Sec. 1, pt. 1, p. 11511-3. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativas a alimentos (e bebidas)...
2. CORTES, F.F. — Nota sobre um novo processo de doseamento da cafeína no café. *Rev. Soc. bras. Quim.*, 4:105.1933. (Nota prévia)
3. ELIAS, P.S. — Problèmes biologiques courants concernant le café et la cafeïne. *Café Cacao The*, 30:199-210, 1986.
4. FOBÉ, L.A. — Cafeína. *Bol. CTPTA*, 6:22-5,1966.
5. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985. v.1, p. 189-92;195-6.
6. KUM-TATT, L. — A routine method for determining caffeine in coffee mixtures. *Analyst*, 86:825-8, 1961.
7. MADISON, B.L.; KOZAREK, W.J. & DANO, C.P. — High pressure liquid chromatography of caffeine in coffee. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 59: 1258-61, 1976.
8. Nery, J.P. — Química do café. *Bol. CTPTA*, 2:24-35, 1964.
9. PASEIRO, P. & SIMAL, J. — Contribucion a la determinacion espectrofotometrica de cafeina en cafes. *An. Bromat.*, 36:97-108, 1984.
10. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. — Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p.1 (NTA 42, 43 e 44). Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas.
11. SMITH, R.F. & REES, D.I. — The spectrophotometric determination of caffeine in coffee and tea products, with special reference to coffee and chicory mixtures. *Analyst*, 88:310-13, 1963.
12. SMITH, R.F. — The spectrophotometric determination of caffeine. *Analyst*, 89: 146-47, 1964.

Recebido para publicação em 10 de agosto de 1991.

