



**ALANE PEREIRA CANGANI**

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFÉINA E TAURINA EM BEBIDAS  
ENERGÉTICAS POR ELETROFORESE CAPILAR**

**CAMPINAS**

**2015**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ALANE PEREIRA CANGANI**

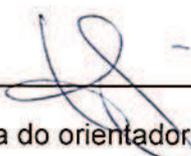
**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFEÍNA E TAURINA EM BEBIDAS  
ENERGÉTICAS POR ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Helena Teixeira Godoy**

**Co-orientador (a): Dra. Adriana Dillenburg Meinhart**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Alane Pereira Cangani e orientada pela Profa. Dra. Helena Texeira Godoy.

  
\_\_\_\_\_  
Assinatura do orientador(a)

**CAMPINAS**

**2015**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

C162d Cangani, Alane Pereira, 1985-  
Desenvolvimento, otimização e validação de método para determinação simultânea de cafeína e taurina em bebidas energéticas, por eletroforese capilar / Alane Pereira Cangani. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.  
Coorientador: Adriana Dillenburg Meinhart.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cafeína. 2. Taurina. 3. Bebidas energéticas. 4. Validação de método. 5. Eletroforese capilar. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Meinhart, Adriana Dillenburg. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development, optimization and validation method of simultaneous determination of caffeine and taurine in energy drinks, by capillary electrophoresis

**Palavras-chave em inglês:**

Caffeine

Taurine

Energy drinks

Method validation

Capillary electrophoresis

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Daniela de Queiroz Pane

Merenice Roberto Sobrinho

**Data de defesa:** 17-07-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy  
(Orientadora)



---

Dra. Daniela de Queiroz Pane  
(Membro Titular)  
CENTRO UNIVERSITÁRIO SENAC



---

Dra. Merenice Roberto Sobrinho  
(Membro Titular)  
SENAI PROF. DR EURYCLIDES DE JESUS ZERBINI

---

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone  
(Membro Suplente)  
FEA-DCA-UNICAMP

---

Dr. Cristiano Augusto Ballus  
(Membro Suplente)  
FEA-DCA-UNICAMP



## ABSTRACT

Taurine and caffeine are the constituents present in energy drinks for the purposes of stimulating the central nervous system and intensify cardiac activity, improving sports performance, concentration level and general well-being. On the other hand, the high consumption of this drink can cause undesirable symptoms, such as anxiety, insomnia, tremor, arrhythmia, tachycardia and other undesirable effects. Therefore it is very important to monitor the presence and also the amount of caffeine and taurine added to energy drinks, in order to ensure that the levels in the final product are in compliance with the applicable legal limits and the contents displayed on the product label. The objective of this study was to optimize and validate a method for the simultaneous determination of caffeine and taurine, using multivariate statistical techniques. The method uses capillary with extended bulb 50  $\mu\text{m}$  d. i x 72 cm effective length, using as electrolyte benzoic acid 16,198  $\text{mmol.L}^{-1}$  with surfactant SDS 39,9  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,26, 25  $^{\circ}\text{C}$ , hydrodynamic injection of 50 mbar for 5 to voltage run (30 kV), detection at UV-Vis and run time of 12 min. The method showed acceptable validation parameters according to ANVISA. The average caffeine concentration in the 73 samples analyzed varied between 16,68 and 34,64  $\text{mg} / 100 \text{ ml}$  and taurine varied between 188,97 and 614,19  $\text{mg} / 100 \text{ ml}$ . Considering the confidence intervals (95%), it was found that 68% of the samples had less than caffeine content declared on the label and 19% of the samples had taurine content below the stated on the label. Also through the confidence interval (95%), it was found that any sample had caffeine content higher than that permitted by law and that 50% of the samples had taurine content above the permitted limits established by legislation current legislation.

Keywords: caffeine, taurine, energy drink, method validation, capillary electrophoresis.



## RESUMO

A taurina e a cafeína são os constituintes presentes nas bebidas energéticas com as finalidades de estimular o sistema nervoso central e intensificar a atividade cardíaca, melhorando o desempenho esportivo, o nível de concentração e o bem estar geral. Por outro lado, a ingestão elevada dessa bebida pode causar sintomas como: ansiedade, insônia, tremores, arritmia, taquicardia e outros efeitos indesejáveis. Portanto torna-se muito importante monitorar a presença e as quantidades de cafeína e taurina adicionadas às bebidas energéticas, a fim de garantir que os níveis no produto final estejam de acordo com os limites legais vigentes e com o teor apresentado no rótulo do produto. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método em cromatografia eletrocínica micelar para a determinação simultânea da cafeína e taurina, utilizando técnicas estatísticas multivariadas. O método otimizado empregou capilar com bulbo estendido de 50  $\mu\text{m}$  d. i. x 72 cm comprimento total, usando como eletrólito o ácido benzoico 16,2  $\text{mmol.L}^{-1}$  com tensoativo SDS 39,9  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,26, 25  $^{\circ}\text{C}$ , injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 5 s e voltagem de +30 kV e detecção na região do ultravioleta com tempo de corrida de 12 min. O método apresentou parâmetros de validação aceitáveis segundo o "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" da ANVISA. A concentração média de cafeína nas 73 amostras analisadas, variou entre 16,68 e 34,64  $\text{mg.100 mL}^{-1}$  e de taurina variou entre 188,97 e 614,19  $\text{mg.100 mL}^{-1}$ . Considerando os intervalos de confiança (95%), verificou-se que 68% das amostras possuíam teor de cafeína menor que o declarado no rótulo e 19% das amostras possuíam teor de taurina abaixo que o declarado no rótulo. Também através do intervalo de confiança (95%), verificou-se que nenhuma amostra possuía teor de cafeína acima do permitido pela legislação vigente e que 50% das amostras possuíam teor de taurina acima dos limites legais.

Palavras-chave: cafeína, taurina, bebida energética, validação de método, cromatografia eletroforese capilar.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	xvii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
OBJETIVOS .....	9
Objetivo Geral.....	9
Objetivos Específicos.....	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
1. Revisão Bibliográfica .....	13
1.1. Bebida Energética .....	13
1.2. Mercado de bebidas energéticas no Brasil e no mundo.....	15
1.3. Cafeína.....	15
1.3.1. Cafeína - Propriedades físico-químicas .....	15
1.3.2. Cafeína em alimentos .....	18
1.4. Taurina .....	20
1.4.1. Taurina – Propriedades físico - químicas.....	20
1.5. Métodos de Análise de cafeína e taurina .....	22
1.5.1. Eletroforese Capilar .....	22
1.5.2. Análise de Cafeína e Taurina por Eletroforese Capilar .....	23
1.6. Otimização de método.....	25
1.7. Validação de Métodos .....	27
1.8. Conclusão .....	27
2. Referências Bibliográficas .....	28
Artigo 1 .....	37
DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFEÍNA E TAURINA EM BEBIDAS ENERGÉTICAS POR MEKC-DAD.....	37
RESUMO.....	39
ABSTRACT .....	41
1. Introdução .....	43
2. Materiais e métodos .....	46
2.1. Amostras .....	46
2.2. Reagentes .....	46

2.3. Equipamento .....	47
2.4. Planejamento dos experimentos e tratamento dos dados.....	47
2.5. Validação do método por eletroforese capilar .....	50
3. Resultados e Discussão.....	51
4. Conclusão.....	61
5. Referências Bibliográficas.....	61
Artigo 2 .....	69
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFEÍNA E TAURINA EM BEBIDAS ENERGÉTICAS COMERCIALIZADAS EM SÃO PAULO POR ELETROFORESE CAPILAR .....	69
RESUMO .....	71
ABSTRACT .....	73
1. Introdução.....	75
2. Materiais e Métodos .....	77
2.1. Amostras .....	77
2.2. Reagentes .....	77
2.3. Análise por eletroforese capilar.....	78
3. Resultados e Discussão.....	79
4. Conclusão.....	85
Agradecimentos.....	85
5. Referências Bibliográficas .....	85
CONCLUSÕES GERAIS .....	91

*“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se...  
Se escolher o mundo ficara sem amor, mas se escolher o amor com  
ele você conquistará o mundo.”*

*(Albert Einstein)*



## **Dedico**

Aos meus pais, Valdir e Lúcia, que com todo amor investiram seu tempo e recursos na minha educação, possibilitando minha chegada até aqui. Esta vitória é de vocês.

A minha tia Iara (*in memoriam*) que teve sua brilhante vida de professora interrompida. Meu exemplo de persistência e amor pela vida.

Ao meu irmão Maxwell, que sempre me impulsionou a correr atrás dos meus objetivos e nunca desistir perante a qualquer obstáculo. Agora somos mestres, irmão.

Ao meu namorado Thiago, que sempre com todo o seu amor foi meu amparo nos momentos difíceis e um dos meus maiores motivadores de todos os meus desafios pessoais e profissionais. Esta conquista é sua amor.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que é meu refúgio e minha fortaleza em qualquer situação ou momento;

À minha família, por todo o cuidado e carinho, sempre me apoiando e acreditando em meu potencial. Tudo que sou hoje devo a vocês;

Ao meu namorado, Thiago, por todo o amor, apoio, incentivo, companheirismo e compreensão. Quantos realizações e desafios superados juntos. Sem você essa jornada seria dolorosa;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Ciência de Alimentos da UNICAMP, pela oportunidade de realização do mestrado;

À minha orientadora, Professora Dra. Helena Teixeira Godoy, por toda ajuda oferecida nesses anos, por todos os ensinamentos e pela orientação comprometida que teve comigo em todo momento. Sempre terá a minha amizade e gratidão;

À minha co-orientadora, Adriana Dillenburg Meinhart, pelos ensinamentos, conselhos, amizade, companheirismo e dedicação;

À banca examinadora pelas contribuições e sugestões de melhoria do trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro durante meu mestrado;

A todos os meus amigos que fiz no decorrer da minha vida, quantas saudades sinto dos amigos que hoje à distância nos separa. Todos são especiais e com cada um aprendi a beleza de ter bons relacionamentos;

Aos amigos que fiz aqui na UNICAMP, especialmente os do Laboratório de Análise de Alimentos, Sheila, Wellington, Cris, Tayse, Elenice, Janclei, Danilo, Maria Rosa, Thaís, Michely, Dani Neves, Polly, Marcus, Mateus, Marla, Leonardo, por todos os momentos que passamos juntos, amizade assim é pra vida toda;

Aos técnicos do laboratório, Marcela, André, e especialmente o seu Dirceu que sempre foram atenciosos, prestativos e prontos a ajudar;

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos e apoio;

A todos, amigos e conhecidos que mesmo que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Alane



## INTRODUÇÃO GERAL

A bebida energética foi desenvolvida por um austríaco, chamado Dietrich Mateschitz, que durante uma viagem à Ásia conheceu alguns compostos energéticos populares. A partir disto, por volta do ano de 1987, decidiu lançar uma bebida no mercado europeu, com propriedade estimulante composta por: cafeína, taurina, glucoronolactona e vitaminas do complexo B (FINNEGAN, 2003; DALL'AGNOL, 2009). No Brasil, a importação da bebida energética iniciou-se em 1996, ganhando rapidamente popularidade no mercado nacional (CARVALHO et al., 2006).

Nos últimos anos, o número de marcas de bebidas energéticas vêm aumentando, devido ao seu apelo de fornecimento de energia para atividades diversas, tendo especialmente como público alvo a população jovem, desde estudantes até atletas (TRABULO, 2011). Estima-se que o consumo de bebida energética teve um crescimento de 25% em 2011, e com projeção de crescimento de 70% até 2015, atingindo mais de 175 milhões de litros da bebida no mercado brasileiro e alcançando o valor total de US\$ 52 bilhões em 2016 em escala mundial no segmento (ABIR, 2011).

Segundo a Agência de Vigilância Sanitária brasileira a bebida energética é definida como um composto líquido pronto para o consumo, podendo apresentar em sua composição os seguintes ingredientes: inositol e/ou glucoronolactona (máximo 20 mg.100 mL<sup>-1</sup>), e/ou taurina (máximo 400 mg.100 mL<sup>-1</sup>), e/ ou cafeína (máximo 35 mg.100 mL<sup>-1</sup>), podendo ser adicionada de vitaminas e/ou minerais em até 100% da ingestão diária recomendada (IDR), podendo ser adicionados outros ingredientes desde que não haja descaracterização do produto final (ANVISA, 2005).

A cafeína, um dos ingredientes principais da bebida energética, é consumida pelo homem há séculos. É classificada como um alcalóide purínico da classe das metilxantinas e está associada com a estimulação do sistema nervoso central e das atividades

cardíacas no organismo humano (TRABULO, 2011). Está naturalmente presente em alimentos como: sementes de café, folhas de chá verde, cacau, guaraná, na erva-mate, assim como em produtos industrializados, como refrigerante do tipo cola e bebida energética (DE MARIA, 2007; INJAC, 2008; MEINHART, 2010; CAMPBELL, 2013). Na bebida energética é adicionada, sendo um dos ingredientes mais comuns em todas as marcas, podendo ser encontrada em doses que variam de 70 a 300 mg, chegando a concentração de  $500 \text{ mg} \cdot 270 \text{ mL}^{-1}$  (NORDT, 2012). A cafeína, quando consumida em doses elevadas ( $10 \text{ a } 15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), pode causar sintomas indesejáveis como arritmia, taquicardia, tremores, insônia, ansiedade, náuseas, desconforto gastrointestinal, convulsões e em casos mais extremos levar ao coma e a morte (TRABULO, 2011).

A taurina é um ácido beta aminosulfônico, proveniente do metabolismo dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) que é encontrada no organismo de forma conjugada com ácidos biliares de sódio e potássio, resultando na formação do ácido taurocólico, um dos ácidos da bile alcalina, essencial para absorção das gorduras (DALL'AGNOL, 2009). É considerado como o principal aminoácido intracelular livre da maior parte dos tecidos nos mamíferos, inclusive do corpo humano (PEREIRA, 2012). Estudos sugerem que a taurina apresenta propriedades anticonvulsivas, ação osmorreguladora, antioxidante, protege o coração, regula o fluxo de cálcio intracelular, promove a estabilização da membrana celular, inibição do estresse oxidativo, ação anti-inflamatória e modulação da atividade da insulina (PANSANI, 2010; TRABULO, 2011). Segundo estudo de Dall`Agnol et al. (2009) a bebida energética foi testada e demonstrou ter um efeito positivo na resposta hormonal, conduzindo assim para um maior desempenho e tempo de exercício físico. A taurina é um dos ingredientes principais das bebidas energéticas, podendo estar presente até  $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . No que tange a toxicidade da taurina, existem diversos estudos científicos que comprovaram que a ingestão de taurina é geralmente bem tolerada pelo organismo, o que significa que a taurina não

apresentou nenhum efeito adverso ao organismo. Apesar dos muitos estudos neste sentido, a verdade é que não foi definida até hoje uma dose ótima de taurina. Sabe-se que em usos terapêuticos não consta relatos de sérios efeitos colaterais em doses de 1 a 3 g ao dia, e que médicos especialistas em nutrição geralmente prescrevem o consumo de taurina nas concentrações de 500 a 1000 mg de 2 a 3 vezes ao dia, para adultos (FINNEGAN, 2003; CARVALHO, 2006; HECKMAN, 2010).

Devido ao aumento do consumo das bebidas energéticas torna-se necessário desenvolver métodos rápidos para determinação de cafeína e taurina em bebidas energéticas a fim de controlar se os níveis presentes nas bebidas estão de acordo com a legislação e com os valores declarados no rótulo (BURROWS, 2013).

Nesse sentido, este estudo desenvolveu um método por eletroforese capilar (CE), que é uma técnica que se baseia na separação de compostos iônicos ou ionizáveis devida a sua migração diferenciada em um campo elétrico (TAVARES, 1996). É considerada como uma técnica rápida, eficiente, reproduzível e com baixo custo. São necessários pequenos volumes de amostra e quando necessários pequenos volumes de solvente (RONDA, 2008), representando menor produção de resíduos, o que resulta em um menor impacto ambiental. Particularmente, a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), foi utilizada em diversos estudos na determinação de metilxantinas em alimentos e produtos vegetais (THOMPSON; TRENNERY; KEMMERY, 1995; WALKER; ZAUGG, 1997; FRAZIER; AMES; NURSTEN, 2000; MEINHART et al., 2010). Dentre a literatura pesquisada, foram encontrados poucos estudos para a determinação simultânea de cafeína e taurina por CE. Normalmente os compostos são determinados de forma isolada, para a taurina utilizam-se métodos como: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (MOU, 2002; CAO, 2003; ZINELLU, 2009), cromatografia iônica (IC) (MOU, 2002), cromatografia gasosa (GC) (MOU, 2002) e eletroforese capilar (CE) (MOU, 2002; CAO, 2003; ZINELLU, 2009).

Geralmente as técnicas utilizadas na análise de bebidas energéticas, a cafeína e taurina são determinadas individualmente, existindo poucos estudos onde estes dois analitos sejam determinados simultaneamente. A análise simultânea dos dois compostos já foi descrita em estudos que empregaram CLAE com detector por espectrometria de massas e por MEKC com dois detectores acoplados (DAD para a cafeína condutométrico para a taurina) (VOCHYANOVA, 2014).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas.

BNA Brasil Relatório 2011- **Consumo de todas as bebidas comerciais (2005-2010)**.

Disponível em: <[www.abir.org.br/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=322](http://www.abir.org.br/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=322)>. Acesso em: 03 dez. 2013.

BRASIL. RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Misturas para o Preparo de Alimentos e Alimentos Prontos para o Consumo. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005.

BURROWS, T.; PURSEY, K.; NEVE, M.; STANWELL, P. What are the health implications associated with the consumption of energy drinks? A systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 3, p. 135-148.

CAMPBELL, B.; WILBORN, C.; BOUNTY, P. L.; TAYLOR, L.; NELSON, M. T.; GREENWOOD, M.; ZIEGENFUSS, T. N.; LOPEZ, H. L.; HOFFMAN, J. R.; STOUT, J. R.; SCHIMITZ, S.; COLLINS, R.; KALMAN, D. S.; ANTONIO, J.; KREIDER, R. B. International Society of Sports Nutrition position stand: Energy Drinks. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 10, p. 1-16, 2013.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; RODRIGUES, S. Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n.2, p. 78-85, 2006.

CAO, Y.; ZHANG, X.; CHU, Q.; FANG, Y.; YE, J. Determination of taurine in *Lycium Barbarum L.* and other foods by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Electroanalysis**, v. 15, n. 10, p. 898-902, 2003.

DALL'AGNOL, T.; SOUZA, P. F. A. Efeitos Fisiológicos Agudos da Taurina Contida em uma Bebida Energética em Indivíduos Fisicamente Ativos. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva**, v. 15, n. 2, p. 123-126, 2009.

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.

FINNEGAN, D. The health effects of stimulant drinks. **Review in British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin**, n.28, p. 147-155, 2003.

FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. **Capillary electrophoresis for food analysis: Method development**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000.

HECKMAN, M. A.; SHERRY, K.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Energy Drinks: An assessment of their market size, consumer, demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 303-317, 2010.

INJAC, R.; SRDJENOVIC, B.; PRIJATELJ, M.; BOSKOVIC, M.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; STRUKELJ, B. Determination of Caffeine and Associated Compounds in Food, Beverages, Natural Products, Pharmaceuticals, and Cosmetics by Micellar Electrokinetic

Capillary Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 137-143, 2008.

MEINHART, A. D.; BIZZOTO, C. S.; BALLUS, C. A.; PRADO, M. A.; BRUNS, R. E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. **Food Chemistry**, v.120, n. 4, p. 1155-1161, 2010.

MOU, S.; DING, X.; LIU, Y. Separation methods for taurine analysis in biological samples. **Journal of Chromatography B**, n. 781, p. 251-267, 2002.

NORDT, S. P.; VILKE, G. M.; CLARK, R. F.; CANTRELL, F. L.; CHAN, T. C.; GALINATO, M.; NGUYEN, V.; CASTILLO, E. M. Energy Drink Use and Adverse Effects Among Emergency Department Patients. **Journal Community Health**, n. 37, p. 976-981, 2012.

PANSANI, M. C. **Influência da deficiência de taurina no coração**. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, 2010.

PEREIRA, J. C.; SILVA, A. A.; FERNANDES E MARINS, J. C. B. Efeito da ingestão de taurina no desempenho físico: uma revisão sistemática. **Revista Andaluza de Medicina de Esporte**, v.3, n.3, p. 156-162, 2012.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

THOMPSON, C. O.; TRENERRY, V. C.; KEMMERY, B. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drink and other foods. **Journal of Chromatography A**, v. 694, n. 2, p. 507-514, 1995.

TRABULO, D.; MARQUES, S.; PEDROSO, E. Caffeinated energy drink intoxication. **Journal Medical Emergency**, v.28, p. 712-714, 2011.

WALKER, J.C.; ZAUGG, S. E.; WALKER, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 781, n. 1-2, p. 481-485, 1997.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; BASTIANINA, S.; CHESSA, R.; GASPA, L.; FRANCONI, F.; DEIANA, L.; CARRU, C. Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food applications. **Amino Acids**, n. 36, p. 35-41, 2009.

VOCHYANOVA, B.; OPEKAR, F.; TUMA, P. Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/ photometry detection. **Electrophoresis**, v. 35, p. 1660-1665, 2014.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Desenvolver, otimizar com o uso de técnicas multivariadas e validar um método para separação e quantificação simultânea da cafeína e taurina presentes em bebida energética, utilizando cromatografia eletrocinética micelar, com detector de arranjo de diodos (MECK-DAD), e aplicar o método em 22 amostras comerciais de bebidas energéticas, avaliando se os níveis presentes estão de acordo com o rótulo e legislação vigente.

### **Objetivos Específicos**

- 1) Criar um método para determinação e quantificação simultânea da cafeína e taurina em bebidas energéticas por cromatografia eletrocinética micelar com detector de arranjo de diodos, fazendo uso de ferramentas estatísticas;
- 2) Determinar o teor de cafeína e taurina em bebidas energéticas de marcas comercializadas em São Paulo e avaliar se as concentrações contidas nas bebidas estão de acordo com o valor declarado no rótulo e com a legislação vigente.



## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1. Bebida Energética

A bebida energética é uma bebida conhecida pelas suas propriedades de melhoria no desempenho mental, físico e pelo fornecimento de energia à pessoa que a consome. Sua composição pode apresentar uma variedade de ingredientes, que podem ser diferenciados conforme a marca do produto e sua respectiva comercialização. Sua composição é basicamente água, carboidratos (glucose, maltodextrina), vitaminas (complexo B), minerais, e mais uma gama de ingredientes que podem aumentar o estado de atenção, acelerar o metabolismo, aumentar a performance e energia (cafeína, taurina, aminoácidos, glucoractorona, guaraná, ginkgo biloba, carnitina, ginseng, chá verde, erva mate, entre outros) (TRABULO, 2011; GRAY, 2012; CAMPBELL, 2013; RIPPE, 2013).

No Brasil, a produção e venda de bebidas energéticas são regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº 273 (Diário Oficial da União de 22 de setembro de 2005). Nesta portaria, as bebidas energéticas são identificadas como compostos líquidos prontos para o consumo e em sua maioria consiste em uma mistura composta por carboidratos (cerca de 11 g.100 mL<sup>-1</sup>), taurina (cerca de 0,4 g.100 mL<sup>-1</sup>), cafeína (cerca de 0,032 g.100 mL<sup>-1</sup>), glucoronolactona (cerca de 0,24 g.100 mL<sup>-1</sup>), inositol (cerca de 0,02 g.100 mL<sup>-1</sup>) e vitaminas do complexo B (cerca de 40 a 100% das necessidades diárias) (ANVISA, 2005).

O maior público consumidor deste tipo de bebida é a população jovem (com idades entre 18 e 34 anos), especialmente universitários que levam uma vida corrida associada à pressão de atingirem elevados desempenhos acadêmicos. Estudos estimam que entre 34% e 51% dos universitários consomem a bebida (VELAZQUEZ, 2012).

Ainda dentro deste público alvo estão os atletas, que consomem a bebida energética como um suplemento alimentar. Este público de consumidores considera a bebida como um aliado na rápida obtenção de energia extra, que por sua vez ainda promove a diminuição da fadiga e um aumento da resistência. Além dos benefícios citados, acredita-se que a bebida energética, pode ser uma forte aliada na tentativa de queima de calorias e aumento de massa muscular (CAMPBELL, 2013; RIPPE, 2013).

Alguns países, como por exemplo, o Canadá que exige que os fabricantes de bebidas energéticas coloquem etiquetas nos rótulos das bebidas, indicando que esta não deve ser consumida simultaneamente com bebida alcoólica e que seu consumo diário não deve ultrapassar duas latas. Em outros países, o consumo de bebida energética é restrito como é o caso da Noruega, porém outros países são mais radicais como a França, Uruguai e Dinamarca onde o consumo de bebida energética é proibido devido aos seus riscos à saúde. Isto porque, existem relatos de casos hospitalares de internações e até óbitos devido à toxicidade da cafeína presente nesta bebida, ocorridos devido ao consumo de altas doses de cafeína. Além disso, comprovam que o consumo de bebida energética associado à bebida alcoólica, potencializa e mascara os efeitos do álcool no organismo, isto porque ocorre uma combinação do efeito estimulante promovido pela cafeína e o efeito depressor do álcool no organismo, o que é algo realmente preocupante, (HECKMAN, 2010; TRABULO, 2011; GRAY, 2012).

Fatos como esses fazem com que profissionais da saúde, especialmente os médicos cardiologistas, estejam cada dia mais conscientes dos potenciais perigos que a bebida energética apresenta. Existem estudos que revelam que a taurina apresenta uma influência na atividade do coração bem semelhante ao que a cafeína proporciona, e quando associada com a cafeína acaba potencializando estes efeitos. Porém, pouco se sabe sobre a sua toxicidade, e os poucos estudos existentes são insuficientes para sugerir um nível seguro de consumo de taurina. Por isso, é de extrema importância que a

sociedade tenha conhecimento, especialmente dos efeitos cardíacos que esta bebida pode provocar (TRABULO, 2011; GRAY, 2012).

## 1.2. Mercado de bebidas energéticas no Brasil e no mundo

As bebidas energéticas são muito comercializadas no Canadá e nos Estados Unidos e tem alcançado cada vez mais o mercado consumidor brasileiro. Pesquisas apontam que nos últimos cinco anos, a bebida conquistou ainda mais o mercado de bebidas não alcoólicas, alcançando uma taxa de crescimento médio de consumo dez vezes maior do que qualquer outra modalidade de bebida (OSCAR, 2012; VELAZQUEZ, 2012).

Um estudo realizado pela Associação Brasileira de Indústrias de Refrigerantes e Bebidas Não Alcoólicas (ABIR) mostrou que o consumo de bebidas energéticas no Brasil, entre os anos de 2006 e 2010 cresceu 325%, ao passo que o consumo de sucos foi o segundo do ranking e teve um crescimento de 53% (OSCAR, 2012).

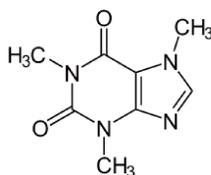
Além disso, sabe-se que nos últimos anos o número de marcas de bebidas energéticas tem aumentado, especialmente devido ao apelo comercial e de marketing de ser uma bebida responsável pelo fornecimento de energia para atividades diversas ou até mesmo podendo ser utilizada como um suplemento alimentar (TRABULO, 2011).

## 1.3. Cafeína

### 1.3.1. Cafeína - Propriedades físico-químicas

A figura 1 apresenta a estrutura química da cafeína. Este composto faz parte do grupo das metilxantinas, sendo também classificadas como alcalóides verdadeiros (alcalóides purínicos), devido a sua atividade biológica (RATES, 2001). Quimicamente, as metilxantinas apresentam características interessantes, pois são compostos provenientes

de bases purínicas e que são de carácter anfótero, possuindo em sua estrutura molecular a presença de nitrogênio heterocíclico (RATES, 2001; BIZZOTO, 2010). A cafeína é solúvel em água em ebulição e em temperatura ambiente, também é facilmente dissolvida em solvente orgânico (ex: clorofórmio). Na presença de água a cafeína comporta-se como uma base muito fraca, apresentando uma constante de equilíbrio ácido (pKa) de 14,2 (BIZZOTO, 2010).



**Figura 1** - Estrutura química da Cafeína (1, 3, 7-Trimetilxantina)

Sabe-se que, dentre todos os alcalóides, a cafeína é a mais consumida mundialmente. Seu consumo pela população é em grande parte na forma de bebidas, a outra parte é consumida na forma de fármacos (ex: antigripais) (DE MARIA, 2007; INJAC, 2008).

A cafeína está associada com a estimulação do sistema nervoso central e com as atividades cardíacas, agindo como um potente estimulante promovendo melhoria no desempenho mental e melhoria da resistência física, além de reduzir o estado de fadiga (DE MARIA, 2007; CAMPBELL, 2013). Cada vez mais os estudos sobre cafeína comprovam seus efeitos positivos a saúde mediante a sua ingestão na forma de bebidas, tratando-se tanto de respostas psicoativas (estado de alerta, mudanças de humor), como nas condições neurológicas (hiperatividade, mal de Parkinson), na melhoria das desordens metabólicas (diabetes) e função renal (FINNEGAN, 2003; FUJIOKA & SHIBAMOTO, 2008; NKONDJOCK, 2009; BIZZOTO, 2010).

Também é comumente utilizada na formulação de fármacos, especialmente em medicamentos que atuam no sistema nervoso central, no cardíaco, como estimulante do sistema respiratório e na homeostase de cálcio. A sua velocidade de ação e absorção no organismo, depende diretamente da formulação físico-química da dose do produto administrada. Em média a cafeína no organismo apresenta uma meia-vida de aproximadamente 2 - 10 horas, sendo eliminada após este período pelo organismo através da transpiração e da urina (FINNEGAN, 2003; DE MARIA, 2007; CAMPBELL, 2013).

No entanto, quando consumida em excesso, pode provocar: arritmia, palpitações, dores de cabeça, tremores, taquicardia, aumento da pressão arterial, ansiedade, náuseas, insônia, nervosismo, irritabilidade, perda de controle motor, prejudicar a qualidade do sono, ocasionar convulsões, alucinações, coma e em casos raros, a morte. Em adultos saudáveis a ingestão segura de cafeína deve ser menor ou igual a 400 mg/dia. Doses acima de 1 g/dia apresenta toxicidade ao organismo quando e em doses de 5 a 10 g por dia podem ser letais em adultos saudáveis. Além disso, esta quantidade de cafeína em gramas pode ser ainda menor. Em indivíduos com condições pré-existentes (doenças cardíacas e distúrbios convulsivos) a quantidade letal pode ser ainda menor. Por isso, estudos recomendam que indivíduos que apresentam hipertensão, doenças coronarianas e arritmia cardíaca diminuam a ingestão de cafeína (DE MARIA, 2007; TRABULO, 2011; GRAY, 2012; RATH, 2012).

Sabe-se que a cafeína tem ação inibitória sobre os receptores do neurotransmissor de adenosina no sistema nervoso central, agindo assim de forma contrária a adenosina, que no organismo tem o papel de reduzir a pressão sanguínea, a frequência cardíaca e a temperatura corporal (KERRIGAN & LINDSEY, 2005; CARVALHO, 2006; HECKMAN, 2010). Isto faz com que o organismo do indivíduo responda de forma crônica à presença de cafeína aumentando o número de receptores

de adenosina (SPILLER, 1998). Segundo Coultate (2004) é por esta razão que existem indivíduos intolerantes ou com hipersensibilidade à cafeína, que acabam apresentando desconfortos mesmo em pequenas doses, que irá por sua vez depender do nível de intolerância de cada indivíduo.

### 1.3.2. Cafeína em alimentos

A cafeína pode ser encontrada em fontes naturais como também pode ser adicionada na formulação de alimentos industrializados, como no caso das bebidas energéticas. O Food and Drug Administration (FDA) estabelece que nos rótulos desses produtos seja incluída a quantidade de cafeína presente ou que faça um alerta ao consumidor quanto aos potenciais perigos de seu consumo excessivo. Porém, no Brasil este último alerta não é exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005; DE MARIA, 2007; INJAC, 2008; RATH, 2012).

A concentração média de cafeína presente na bebida energética é de 7 – 32 mg.100 mL<sup>-1</sup> (GRAY, 2012), um pouco abaixo da concentração de cafeína normalmente presente em uma xícara de café (20 – 40 mg.100 mL<sup>-1</sup>) e um pouco acima da concentração de cafeína presente em uma lata de refrigerante a base de cola (11 – 17 mg.100 mL<sup>-1</sup>). Considerando-se que uma dose diária de cafeína com segurança aceitável para um adulto é de no máximo 400 mg/dia (TRABULO, 2011; GRAY, 2012) , é de extrema importância monitorar o teor de cafeína presente nas bebidas energéticas, que muitas vezes são ingeridas em excesso pelos consumidores que desejam obter as propriedades estimulantes da mesma.

Foi comprovado que o consumo excessivo de bebida energética pode promover complicações a saúde e eventos adversos, principalmente em indivíduos suscetíveis, sendo que tais efeitos têm sido fortemente associados ao elevado teor de cafeína

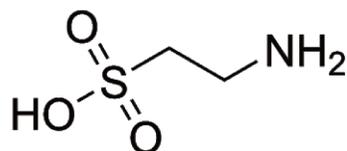
presente em sua composição. Estudos recomendam que indivíduos que tenham conhecimento de casos de problemas cardíacos na família ou doenças cardíacas pré-existentes, devem evitar o consumo de bebida energética ou qualquer outro alimento que tenha efeito cardioestimulante, pois estes podem acarretar em eventos cardiovasculares graves, podendo levar a morte (CAMPBELL, 2013). Existem ainda casos em que o consumo desta bebida em jejum, por indivíduos geneticamente suscetíveis, apresentou processo de convulsões. Nos adolescentes, o consumo de cafeína está associado com o aumento da pressão arterial e distúrbios do sono. Já entre as mulheres grávidas, elevadas concentrações de cafeína estão associadas ao aborto, nati-morte e bebês pequenos para a idade gestacional (ARRIA, 2011; TRABULO, 2011).

A introdução cada vez maior da cafeína em produtos alimentícios, especialmente em bebidas energéticas, tem se tornado um dos motivos dos estudos quanto aos seus riscos e benefícios a saúde. Sabe-se que o consumo regular de cafeína pode levar a dependência, contribuindo com o aparecimento de doenças cardíacas, podendo levar inclusive ao aumento da pressão arterial. Por outro lado, existem estudos que mostram que o consumo habitual de cafeína resulta em efeitos positivos a saúde, promovendo a queda nos riscos de desenvolvimento de depressão e da doença de Parkinson, efeitos positivos comportamentais, incluindo melhoria no desempenho cognitivo e no humor. Sendo assim, os benefícios e malefícios da cafeína têm sido estudados com maior profundidade pelos grupos de pesquisa científica, mostrando que estes efeitos ao organismo estão intimamente associados à dose consumida (LIEBERMAN, 2012).

## 1.4. Taurina

### 1.4.1. Taurina – Propriedades físico - químicas

Por volta dos anos 1960, iniciou-se o interesse pela taurina (figura 2), devido a descoberta de sua presença em diversos tecidos corporais, em algas e no reino animal em altas concentrações. A taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico) é o principal aminoácido intracelular livre nos tecidos da maioria dos mamíferos, estando presente em quantidades relativamente elevadas na retina dos olhos, tecidos musculares esqueléticos e cardíacos. É derivada do metabolismo de aminoácidos sulfurados, como a metionina e cisteína, é sintetizada no fígado devido a diversas reações enzimáticas. Em adultos as necessidades dos aminoácidos sulfurados correspondem a 17 mg/g de proteína ingerida. Sabe-se que a ingestão diária de taurina é fundamental para o aumento desse aminoácido no organismo, tendo em vista que os mamíferos apresentam capacidade limitada de sintetizá-la (DALL'AGNOL, 2009; PEREIRA, 2012).



**Figura 2** – Estrutura química da Taurina (Ácido 2-aminoetanossulfônico)

Em alimentos, a taurina pode ser encontrada em maior concentração em frutos do mar (8.270 mg/kg para crustáceos, 5.200 mg.kg<sup>-1</sup> para moluscos, 6.550 mg.kg<sup>-1</sup> para mexilhões), pescada (1.720 mg.kg<sup>-1</sup>), carne escura de aves (2.000 mg.kg<sup>-1</sup>) e em carnes escuras de peru (3.000 mg.kg<sup>-1</sup>) e leite materno (3,24 mg.100 mL<sup>-1</sup>) (FERREIRA, 2006; DALL'AGNOL, 2009; PEREIRA, 2012).

Estudos sugerem que a taurina apresenta ação osmorreguladora, modulando as funções contráteis do músculo esquelético e exercendo efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), apresentando propriedades anti-convulsivas, epiléticas, inotropismo (poder de influenciar a força de contração muscular), cronotropismo (capacidade do coração gerar seus próprios estímulos elétricos), tem ação *scavenger* (sequestradora) atuando sobre os radicais livres e na regulação da taxa de geração de espécies reativas de oxigênio (TRABULO, 2011; GRAY, 2012; PEREIRA, 2012).

Todas essas características da taurina levaram a proposições que o seu uso pode trazer benefícios em situações onde ocorram um aumento de susceptibilidade de lesão corporal e estresse oxidativo, como acontece durante um exercício físico exaustivo e durante o processo de envelhecimento. Dessa forma, fabricantes das bebidas energéticas defendem o uso deste composto por ser um ingrediente funcional e com propriedades ergogênicas (PEREIRA, 2012). A propriedade ergogênica é definida como a melhora da capacidade de realização de um trabalho físico ou um desempenho atlético, ou seja, é o aumento da oferta e da taxa de produção de energia para o músculo (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2008).

A taurina é solúvel em água em temperatura ambiente e insolúvel em solvente orgânico (ex: clorofórmio). Na presença de água a taurina é dissociada gerando um grupo sulfônico (- SO<sub>3</sub>H) com uma constante de equilíbrio ácido (pKa) de 1,5 e um grupo amina (- NH<sub>2</sub>) com pKa 9,08 (MADURA, 1997).

## 1.5. Métodos de Análise de cafeína e taurina

### 1.5.1. Eletroforese Capilar

Nas últimas três décadas, houve um grande avanço tecnológico em termos de instrumentação analítica, como na década de 50 com a introdução da cromatografia em fase gasosa (GC), na década de 70 teve início a cromatografia em fase líquida (HPLC) e já a partir da década de 80 surgiu a eletroforese capilar (EC). Desde então, esta técnica tem sido cada vez mais explorada em diversos estudos, devido a sua simplicidade experimental, especialmente devido a possibilidade da variedade de modos de separação que podem ser realizados em uma mesma coluna capilar e mediante a possibilidade de análise de diferentes tipos de compostos (TAVARES, 1997).

A técnica de eletroforese capilar tem sido cada vez mais empregada devido a sua capacidade de multianálise de compostos de baixo peso molecular em diferentes matrizes, por ser ainda uma técnica analítica eficiente e rápida, precisa, reprodutível, com resolução e seletividade excelentes devido a sua alta eficiência de separação (CAO, 2003; SILVA, 2003; DE MARIA, 2007; RONDA, 2008; BALLUS, 2012; SULTAN, 2013).

O princípio de separação da técnica de eletroforese capilar consiste na diferença de mobilidade dos analitos iônicos ou ionizáveis presentes em uma solução eletrolítica que diante da ação de um campo elétrico gerado através de uma alta voltagem aplicada entre os eletrodos do equipamento, acabam percorrendo o capilar e sendo detectados pelo detector (BELIN, GÜLAÇAR, 2007). Existem diferentes técnicas de separação em eletroforese capilar que dependem do analito estudado. Quando espera-se analisar uma amostra que o composto de interesse é uma molécula neutra a técnica ideal para ser utilizada é a cromatografia eletrocinética micelar, que se baseia na adição de um tensoativo ao eletrólito formando micelas que por sua vez irão realizar interações com

todos os analitos presentes na solução, especialmente com as moléculas neutras, dando a elas carga e assim possibilitando sua determinação (FRAZIER et al., 2000; LIOTTA et al., 2012).

### **1.5.2. Análise de Cafeína e Taurina por Eletroforese Capilar**

A técnica de eletroforese capilar apresenta várias vantagens em relação a outras técnicas cromatográficas, como a necessidade de pequenos volumes de amostra, tempos de análise relativamente curtos, possibilidade de injeção e detecção em fluxo. Outra vantagem é sua compatibilidade com diversos sistemas de detecção, como: absorção no UV-visível, fluorescência, condutividade, espectrometria de massas, entre outros. Sabe-se ainda por cromatografia eletrocínética micelar, onde um tensoativo na concentração adequada para formar micelas é adicionado no eletrólito, promovendo assim um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, na qual os compostos carregados são transportados através do fluxo eletrosmótico sob ação do campo elétrico, enquanto as micelas representam a fase secundária, ou também conhecida como pseudo-estacionária, onde o soluto é transportado dentro do capilar, possibilitando a separação de moléculas neutras (TAVARES, 1997; DE MARIA 2007; INJAC, 2008), como é o caso da cafeína. Esta técnica tem demonstrado em vários estudos grande utilidade na determinação de cafeína em alimentos, produtos vegetais, bebidas e fármacos (THOMPSON; TRENERRY; KEMMERY, 1995; WALKER; ZAUGG, 1997; FRAZIER; AMES; NURSTEN, 2000; MAESO et al., 2006; DE MARIA, 2007; INJAC, 2008; MEINHART et al., 2010).

Existem ainda diversos métodos analíticos para a determinação de cafeína, como: gravimetria e determinação de nitrogênio (DE MARIA, 2007), espectrofotometria de UV-visível (DE MARIA, 2007; INJAC, 2008), cromatografias de adsorção e camada delgada

(DE MARIA, 2007), eletroanálise (DE MARIA, 2007), cromatografia iônica (INJAC, 2008), espectrometria transformada de Fourier-Raman (INJAC, 2008), espectroscopia de infravermelho (IR) (FTIR) (DE MARIA, 2007; INJAC, 2008), cromatografia gasosa (GC) (DE MARIA, 2007; INJAC, 2008; AL-OTHMAN, 2012; LIOTTA, 2012), espectrometria de massas (AL-OTHMAN, 2012), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (ARESTA, 2005; BRUNETTO et al., 2007; DE MARIA, 2007; PERRONE, 2008; INJAC, 2008; AL-OTHMAN, 2012; LIOTTA, 2012), eletroforese capilar (CE) (JIMIDAR, 1993; POMILIO, 2005; DE MARIA, 2007; INJAC, 2008; MEINHART et al., 2010; AL-OTHMAN, 2012; BALLUS, 2012; LIOTTA, 2012; SULTAN, 2013). Porém, a maioria desses métodos apresenta tempo de análise longo e com baixa sensibilidade (AL-OTHMAN, 2012).

Os aminoácidos em geral apresentam a limitação de não absorverem na região UV-visível do espectro, por isso os estudos existentes dos diversos métodos para análise de aminoácidos já levam isto em consideração. Especificamente a taurina, os métodos de análise existentes na literatura, são: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com derivatização em pré-coluna e detecção UV-visível (MOU, 2002; CAO, 2003; VOCHYANOVA, 2014; ZINELLU, 2009), analisador de aminoácidos e de espectroscopia FTIR (VOCHYANOVA, 2014), cromatografia iônica (IC) (MOU, 2002), cromatografia gasosa (GC) (MOU, 2002) e eletroforese com detecção LIF (CE) (MOU, 2002; CAO, 2003; ZINELLU, 2009). Porém, sabe-se que mesmo os aminoácidos sendo passíveis de serem analisados por eletroforese capilar, seriam necessários pré-tratamentos como reações de complexação, quelação ou derivatização para a sua possível detecção em UV-visível. Assim, a detecção indireta é a opção a ser escolhida, neste caso é necessário o uso de uma solução tampão (eletrólito) adicionado de uma substância química que absorve na região do UV-visível, gerando um sinal de fundo elevado. Assim quando o analito, que não absorve, atinge o detector, ocorre uma queda no sinal, registrando um pico negativo, possibilitando assim, a detecção deste aminoácido sem haver a

necessidade de várias reações, o que seria muito dispendioso (FRAZIER et al., 2000; JAGER, 2001; MEINHART, 2010).

Geralmente nas análises realizadas em bebidas energéticas, a cafeína e taurina são determinadas individualmente, existindo poucos trabalhos onde estes dois analitos foram determinados simultaneamente. Na literatura consultada, estes estudos empregaram CLAE com detector por espectrometria de massas e por MEKC com dois detectores acoplados (DAD para a cafeína condutométrico para a taurina). A maioria dos métodos publicados para determinação simultânea utilizam técnicas que exigem instrumentação combinada a um pré-tratamento da amostra, o que torna a análise mais difícil de ser realizada como rotina (VOCHYANOVA, 2014).

#### 1.6. Otimização de método

As técnicas estatísticas são de extrema importância na obtenção de respostas a questões de forma racional e econômica, em diversas áreas de pesquisa. Uma dessas técnicas é conhecida como planejamento multivariado de experimentos que, por sua vez, tem fundamental importância para que estudos possam obter o máximo de informações úteis relevantes, realizando o mínimo de experimentos possíveis (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003).

Cotidianamente são encontrados diversos estudos onde são aplicadas técnicas estatísticas para determinação de condições ideais de análise, variando-se um dos parâmetros e mantendo os outros constantes, sendo conhecida como técnica unidimensional. Porém, esta técnica apresenta a desvantagem de muitas vezes não levar em conta possíveis interferentes entre os parâmetros avaliados e ser uma técnica muito laboriosa. Por isso, os planejamentos experimentais multivariados têm sido utilizados com eficiência para a otimização de processos. O processo de otimização pode ser realizado

seguinte dois passos, o primeiro é preparação de um planejamento experimental, realizando-se experimentos com todas as combinações possíveis e dessa forma permitindo avaliar os efeitos das interações entre as variáveis e selecionando as variáveis significativas que afetam o método analítico e o segundo passo é estimar uma função matemática que seja adequada às respostas analíticas geradas e às variáveis significativas, possibilitando assim a determinação dos valores ideais das variáveis para o método otimizado, reduzindo assim o número de experimentos e tempo total de análise (DE ARAGÃO et al., 2005; RONDA, 2008; BALLUS et al., 2011; MEINHART et al., 2011).

Portanto, quando um trabalho envolve muitos fatores, como é o caso de um método multivariado, é comum que sejam geradas várias respostas e provavelmente será difícil que a região ótima seja a mesma para todas elas. A partir disto, pode-se utilizar a metodologia de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich (1980), trata-se de uma ferramenta estatística que concilia o grande número de respostas gerado, gerando uma resposta global desejada aos objetivos estabelecidos pelo pesquisador. Este método é baseado na definição de uma função de desejabilidade para cada resposta, tendo valores nos intervalos  $[0,1]$ , onde (0) representa um valor inaceitável e (1) o valor mais desejável. Assim que as funções de desejabilidade são estabelecidas para todas as respostas, elas são combinadas em uma desejabilidade global. Porém, é necessário que as condições ótimas selecionadas sejam testadas experimentalmente, para confirmar se os resultados obtidos através do algoritmo realmente representam os valores empíricos (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; DA SILVEIRA, 2013). A técnica de Derringer e Suich foi aplicada por estudos realizados por Meinhart e colaboradores (2011) e Ballus e colaboradores (2014) e que tiveram êxito com esta técnica estatística para a separação de 11 carboidratos presentes em matrizes alimentícias diversas e 17 compostos fenólicos presentes em azeite de oliva, respectivamente, por eletroforese capilar.

### 1.7. Validação de Métodos

Existem diversos guias de validação de metodologia analítica no Brasil, e segundo o "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" da ANVISA (2003) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando assim a confiabilidade dos resultados. Por isso, quando um método analítico é desenvolvido, ainda antes de ser aplicado em amostra, este deve ser validado. O processo de validação de método é a forma encontrada para assegurar que nas condições em que será utilizado, este método irá gerar os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequados (LANÇAS, 2009).

Apesar de ainda não existir um consenso sobre quais parâmetros devem ser incluídos no processo de validação de um método analítico, na maioria das vezes os parâmetros analisados, são: seletividade; limite de detecção; limite de quantificação; linearidade e faixa de aplicação; precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e exatidão (LANÇAS, 2009; RIBANI et al., 2004).

### 1.8. Conclusão

Perante aos efeitos positivos e adversos que a cafeína e taurina podem provocar ao organismo dependendo da quantidade ingerida, juntamente com os limites legais quando adicionados nas bebidas energéticas. São necessários estudos que desenvolvam métodos que determinem e quantifiquem simultaneamente estes ingredientes nessa bebida.

## 2. Referências Bibliográficas

AL-OTHMAN, Z. A.; AQUEL, A.; ALHARBI, M. K. E.; BADJAH-HADJ-AHMED, A. Y.; AL-WARTHAN, A. A. Fast chromatographic determination of caffeine in food using a capillary hexyl methacrylate monolithic column. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2217-2223, 2012.

ARESTA, A.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, C. G. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine and nicotine in human milk by liquid chromatography with diode array UV detection. **Food Chemistry**, v. 93, n1, p. 177-181, 2005.

ARRIA, A.M; O'BRIEN, M.C. The "High" Risk of Energy Drinks. **Journal American Medical Association**, v. 305, n. 6, p. 365-375, 2011.

BALLUS, C.A.; MEINHART, A. D.; BRUNS, R. E.; GODOY, H.T. Use of multivariate statistical techniques of optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 83, p. 1181–1187, 2011.

BALLUS, C.A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; BIZZOTO, C. S.; FILHO, J.T.; GODOY, H.T. A fast and efficient method for the study of caffeine levels in energy drinks using micellar electrokinetic chromatography (MEKC). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 401-404, 2012.

BALLUS, C.A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; JUNIOR, F. A. S. C.; BRUNS, R. E.; GODOY, H.T. Doehlert design design desirability function multi-criteria optimal separation

of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 558- 568, 2014.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. Ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

BELIN, G. K.; GÜLAÇAR, F. O. Separation of Chorins and Carotenoids in Capillary Electrophoresis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 45, p. 593 – 599, 2007.

BIZZOTO, C. S. **Metilxantinas por eletroforese capilar: desenvolvimento, otimização e validação de método. Aplicação em café descafeinado e outras bebidas**. 2010. 164p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BRASIL. RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Misturas para o Preparo de Alimentos e Alimentos Prontos para o Consumo. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005.

BRUNETTO, M. R. et al. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by high performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 459-467, 2007.

CAMPBELL, B.; WILBORN, C.; BOUNTY, P. L.; TAYLOR, L.; NELSON, M. T.; GREENWOOD, M.; ZIEGENFUSS, T. N.; LOPEZ, H. L.; HOFFMAN, J. R.; STOUT, J. R.;

SCHIMITZ, S.; COLLINS, R.; KALMAN, D. S.; ANTONIO, J.; KREIDER, R. B. International Society of Sports Nutrition position stand: Energy Drinks. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 10, p. 1-16, 2013.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; RODRIGUES, S. Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n.2, p. 78-85, 2006.

CAO, Y.; ZHANG, X.; CHU, Q.; FANG, Y.; YE, J. Determination of taurine in *Lycium Barbarum L.* and other foods by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Electroanalysis**, v. 15, n. 10, 2003.

COULTATE, T. P. Alimentos – **A química de seus components** (3rd ed.). Porto Alegre: Artmed, 2004.

DALL'AGNOL, T. M.; SOUZA, P. F. A. Efeitos Fisiológicos Agudos da Taurina Contida em uma Bebida Energética em Indivíduos Fisicamente Ativos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, n.2, 2009.

DE ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; BISPO, M. S.; FERREIRA, S. L. C.; DE ANDRADE, J. B. Multivariate optimisation of experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v.67, p. 1007-1013, 2005.

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.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several responses variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, n. 4, p. 214-219, 1980.

FERREIRA, M. P. L. V. O.; NUNES, M. V.; MENDES, E.; REMIÃO, F.; FERREIRA, M. A. Development of na HPLC-UV Method for Determination of Taurine in Infant Formulae and Breast Milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 20, n. 8, p. 1269-1278, 2006.

FINNEGAN, D. The health effects of stimulant drinks. **Review in British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin**, n.28, p. 147-155, 2003.

FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. **Capillary electrophoresis for food analysis: Method development**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000.

FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 217 – 221, 2008.

GRAY, B. et al. Consumption of energy drinks: A new provocation test for primary arrhythmogenic diseases?. **International Journal of Cardiology**, v. 159, n. 1, p.77-78, 2012.

HECKMAN, M. A.; SHERRY, K.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Energy Drinks: An assessment of their market size, consumer, demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 303-317, 2010.

INJAC, R.; SRDJENOVIC, B.; PRIJATELJ, M.; BOSKOVIC, M.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; STRUKELJ, B. Determination of Caffeine and Associated Compounds in Food, Beverages, Natural Products, Pharmaceuticals, and Cosmetics by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 137-143, 2008.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. **Química Nova**, v. 24, p. 363-373, 2001.

KERRIGAN, S.; LINDSEY, T. Fatal caffeine overdose: two case reports. **Forensic Science International**, v. 153, n. 1, p. 67 – 69, 2005.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 382p.

LIEBERMAN, H.R.; STAVINOHA, T.; MCGRAW, S.; WHITE, A.; HADDEN, L.; MARRIOTTE, B.P. Caffeine Use among Active Duty US Army Soldiers. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 6, p. 902-912, 2012

LIOTTA, E.; GOTTARDO, R.; SERI, C.; RIMONDO, C.; MIKSIK, I.; SERPELLONI, G.; TAGLIARO, F. Rapid analysis of caffeine in “smart drugs” and “energy drinks” by microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC). **Forensic Science International**, n. 220, p. 279-283, 2012.

MADURA, J. D.; LOMBARDINI, J. B.; BRIGGS, J. M.; MINOR, D. L.; WIERZBICKI, A. Physical and structural properties of taurine and taurine analogues. **Amino Acids**, v. 13, p. 131 – 139, 1997.

MAESO, N. et al. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees. Study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1095-1100, 2006.

MCARDLE, W.; KATCH, F.; KATCH V. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1099 p.

MEINHART, A. D.; BIZZOTO, C. S.; BALLUS, C. A.; PRADO, M. A.; BRUNS, R. E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. **Food Chemistry**, v.120, n. 4, p. 1155-1161, 2010.

MEINHART, A. D.; BALLUS, C. A.; BRUNS, R. E.; PALLONE, J. L. A.; GODOY, H. T. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v. 85, p. 237 – 244, 2011.

MOU, S.; DING, X.; LIU, Y. Separation methods for taurine analysis in biological samples. **Journal of Chromatography B**, n. 781, p. 251-267, 2002.

NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of câncer: na overview. **Câncer Letters**, v. 277, n. 2, p. 121 – 125, 2009.

OSCAR, N. Consumo de bebidas energéticas cresce 325%. O Estado de São Paulo, São Paulo, 18 fev, 2011. Disponível em: <<http://economia.estadao.com.br/noticias/economia.consumo-de-bebidas-energeticas-cresce-325-,55706,0.htm>>. Acesso em 03 dez. 2012.

PEREIRA, J. C.; SILVA, A. A.; FERNANDES E MARINS, J. C. B. Efeito da ingestão de taurina no desempenho físico: uma revisão sistemática. **Revista Andaluza de Medicina de Esporte**, v.3, n.3, p. 156-162, 2012.

PERRONE, D.; DONANGELO, C. M.; FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 1030-1035, 2008.

POMILIO, A. B.; TRAJTEMBERG, S. P.; VITALE, A. A. Micellar electrokinetic capillary chromatography of methylxanthines containing beverages: Discussion of the molecular species involved. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 4, p. 622-628, 2005.

RATES, S. M. K. **Metilxantinas em Farmacognosia. Da planta ao medicamento**, Simoes CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (eds) 3a. edição, Editora da UFSC Florianópolis, SC e Editora da Universidade/ UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

RATH, M. et al. Energy drinks: What is all the hype? The dangers of energy drink consumption. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v. 24, p. 70-76, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; & JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

RIPPE, J. M. In: KHODAEI, M.; SPITTLER, J.; LIVINGWELL, S. R. **Sports Supplements**. Boca Raton: CRC Press, 2013, p. 721-727

RONDA, F.; RODRIGUEZ-NOGALES, J.M.; SANCHO, D.; OLIVETE, B.; GÓMEZ, M. Multivariate optimization of capillary electrophoretic method for the separation of glutenins. Application to quantitative analysis of the endosperm storage proteins in wheat. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 287-296, 2008.

SILVA, J. A. F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56 – 64, 2003.

SPILLER, G. A. **Caffeine**. New York: CRC Press, 1998. 374 p.

SULTAN, M. A.; MAHER, H. M.; ALZOMAN, N. Z.; ALSHEHRI, M. M.; RIZK, M. S.; ELSHAHED, M. S.; OLAH, I. V. Capillary electrophoretic determination of antimigraine formulations containing caffeine, ergotamine, paracetamol and domperidone or metoclopramide. **Journal of Chromatographic Science**, n. 51, p. 502-510, 2013.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

THOMPSON, C. O.; TRENNERY, V. C.; KEMMERY, B. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drink and other foods. **Journal of Chromatography A**, V. 694, N. 2, P. 507-514, 1995.

TRABULO, D.; MARQUES, S.; PEDROSO, E. Caffeinated energy drink intoxication. **Journal Medical Emergency**, v.28, p. 712-714, 2011.

VELAZQUEZ, C.E.; POULOS, N.S.; LATIMER, L.A.; PASCH, K.E. Associations between energy drink consumption and alcohol use behaviors among college students. **Drug and Alcohol Dependence**, v.123, p. 167-172, 2012.

VOCHYANOVA, B.; OPEKAR, F.; TUMA, P. Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/ photometry detection. **Electrophoresis**, v. 35, p. 1660-1665, 2014.

WALKER, J.C.; ZAUGG, S. E.; WALKER, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 781, n. 1-2, p. 481-485, 1997.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; BASTIANINA, S.; CHESSA, R.; GASPA, L.; FRANCONI, F.; DEIANA, L.; CARRU, C. Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food applications. **Amino Acids**, n. 36, p. 35-41, 2009.

## Artigo 1

# **DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFEÍNA E TAURINA EM BEBIDAS ENERGÉTICAS POR MEKC-DAD**

Alane Pereira Cangani, Adriana Dillenburg Meinhart e Helena Teixeira Godoy

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de  
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),  
CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil

Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico “Química Nova”



**RESUMO**

As bebidas energéticas estimulam o sistema nervoso central e intensificam a atividade cardíaca, efeitos atribuídos principalmente à cafeína e taurina, principais ingredientes da bebida. No entanto, a ingestão elevada pode causar ansiedade, taquicardia e outros sintomas mais graves. Por isso, é necessário o monitoramento do teor de cafeína e taurina a fim de comprovar se os níveis no produto final estão de acordo com a rotulagem e com limites legais vigentes. O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método rápido e confiável para a determinação simultânea de cafeína e taurina por cromatografia eletrocínética micelar e detector de arranjo de díodos (MEKC-DAD). Técnicas estatísticas multivariadas como o planejamento composto central e o método de otimização simultânea de Derringer e Suich foram utilizadas para a otimização do método. O método otimizado empregou um capilar com bulbo estendido de 50  $\mu\text{m}$  d.i. x 72 cm de comprimento total, eletrólito contendo 16,20  $\text{mmol.L}^{-1}$  de ácido benzóico e 39,90  $\text{mmol.L}^{-1}$  de SDS, em pH 7,26, voltagem de +30 kV, detecção direta da cafeína a 274 nm e indireta da taurina a 230 nm. Os parâmetros de validação foram eficientes demonstrando a confiabilidade do método para a aplicação em amostras.

Palavras-chaves: bebida energética, cafeína, taurina, MEKC-DAD, otimização multivariada, Derringer e Suich.



**ABSTRACT**

Energy drinks are becoming increasingly pervasive for those seeking for the purposes of stimulating the central nervous system and intensify cardiac activity, this feature of the energy drink is due to its composition, mainly by the presences of caffeine and taurine. On the other hand, a high intake of this drink, can cause some undesirable symptoms as anxiety, tachycardia, and others. Therefore, the monitoring of the amounts of caffeine and taurine added to energy drinks to see if its levels in the final product are according to the labeling and within the legislation limits are needed.. The objective of this study was to optimize and validate a quick method for the simultaneous determination of caffeine and taurine through micellar electrokinetic chromatography coupled with diode array (MEKC-DAD). Multivariate statistical techniques as the central composite design and the simultaneous optimization method of Derringer and Suich were used to optimize the separation of these compounds. The multivariate procedures were effective to determine the optimal separation conditions, using as resolution responses between caffeine and taurine, asymmetry and peak height of taurine. The method uses capillary with extended bulb 50  $\mu\text{m}$  d.i x 72 cm effective length, using as electrolyte benzoic acid 16,20  $\text{mmol.L}^{-1}$  with surfactant SDS 39,90  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7.26, 25  $^{\circ}\text{C}$ , hydrodynamic injection of 50 mbar for 5 s to run voltage (30 kV), detection at 230 and 274 nm, and run time of 12 min. The method showed efficient validation parameters, presenting confiability for its further application.

Keywords: energy drink, caffeine, taurine, MECK-DAD, multivariate optimization, Derringer and Suich.



## 1. Introdução

As bebidas energéticas são classificadas como não alcoólicas e se caracterizam, principalmente, por estimularem o sistema nervoso central e pela ação diurética que ajuda na eliminação de substâncias nocivas ao organismo (CARVALHO, 2006; HECKMAN, 2010). Estima-se que o consumo no Brasil aumentou em 25% em 2011, com projeção de crescimento de 70% até 2015 (ABIR, 2011).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira a bebida energética é um “Composto Líquido Pronto para o Consumo”, podendo apresentar em sua composição os seguintes ingredientes: inositol e/ou glucoronolactona (máximo 20 mg.100 mL<sup>-1</sup>), e/ou taurina (máximo 400 mg.100 mL<sup>-1</sup>), e/ ou cafeína (máximo 35 mg.100 mL<sup>-1</sup>), podendo ser adicionada de vitaminas e/ou minerais (em até 100% da Ingestão Diária Recomendada) ou outros ingredientes, desde que não haja descaracterização do produto (ANVISA, 2005). A cafeína e taurina são substâncias adicionadas na maioria das bebidas energéticas.

A cafeína é um psicoativo atribuído à estimulação do sistema nervoso central e das atividades cardíacas no organismo humano (SEIFERT et al., 2011; TRABULO, 2011). No entanto, quando ingerida em doses acima de 400 mg/dia/pessoa (considerando um adulto de 70 kg) pode causar ansiedade, insônia, taquicardia, tremor, entre outros sintomas indesejáveis (REISSIG et al., 2008). A partir de 1000 mg/dia/pessoa apresenta toxicidade ao organismo e em quantidades de 5000 a 10.000 mg/dia/pessoa pode ser letal (SEIFERT et al., 2011).

A taurina é um aminoácido sulfuroso importante em diversas reações metabólicas do organismo humano. É essencial para a formação dos sais biliares, age no equilíbrio de água e sais dentro das células e tem ação importante como um estabilizador das membranas celulares. Além disso, tem função diurética auxiliando na eliminação de

substâncias tóxicas ao organismo. A adição de taurina em bebidas energéticas é uma forma de suprir ou complementar as necessidades deste aminoácido na dieta. No que tange a toxicidade, a taurina é geralmente bem tolerada no organismo e mesmo após diversos estudos clínicos, não foram encontrados registros sobre a dose diária recomendada. Porém, médicos especialistas em nutrição recomendam o consumo de 500 a 1000 mg/dia/pessoa de taurina para adultos saudáveis (CARVALHO, 2006; HECKMAN, 2010; PANSANI, 2010; PROSSER, 2012).

A determinação de cafeína e taurina é de extrema importância para avaliar se as bebidas energéticas apresentam os teores declarados nos rótulos sem que ocorram superdosagens ao consumidor, ou, até mesmo, que o teor esteja abaixo do declarado no rótulo, indicando fraude. Além disso, a análise é de extrema importância para avaliar se as bebidas apresentam teor de acordo com os limites legais permitidos pela legislação brasileira (HECKMAN, 2010; BURROWS, 2013).

A cafeína é um alcalóide de pka 8,3 e 14,2, massa molecular de  $194,2 \text{ g.mol}^{-1}$  (BIZZOTO, 2010; TAGLIARI et al., 2012). Absorve a luz da radiação UV-visível, nos comprimentos de 200-210 e 274 nm. Normalmente é determinada por cromatografia de líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e coluna C18 (ARESTA et al., 2005; BRUNETTO et al., 2007; BIZZOTTO et al., 2013). A eletroforese capilar, com detector de arranjo de diodos (EC-DAD), também é muito empregada. Neste caso utiliza-se um eletrólito contendo um tensoativo (como o SDS) para torná-la ionizada ou um eletrólito (como o borato de sódio) que interage com a molécula para que ela possa ser separada mesmo sem possuir carga (INJAC, 2008; MEINHART et al., 2010).

A análise de taurina, aminoácido de pka 1,5 e 9,2, massa molecular de  $125,2 \text{ g.mol}^{-1}$  geralmente é realizada por CLAE, com colunas C18 ou por EC de zona ou MEKC. No entanto, a molécula não absorve a luz na região do UV-VIS, sendo detectada indiretamente por detector de arranjo de diodos (DAD), de fluorescência, de fluorescência

induzida por laser, amperométrico e condutométrico (FERREIRA et al., 1997; CATALDI, 2004; SAWABE, 2008; ZINELLU, 2009 VOCHYANOVA, 2014).

A principal dificuldade no desenvolvimento de um método simultâneo para análise de cafeína e taurina consiste no modo de detecção a ser aplicado, já que a cafeína absorve a radiação e a taurina não. A análise simultânea dos dois compostos já foi descrita em estudos que empregaram CLAE com detector por espectrometria de massas e por MEKC com dois detectores acoplados (DAD para a cafeína condutométrico para a taurina) (VOCHYANOVA, 2014).

A técnica de eletroforese capilar tem sido cada vez mais utilizada devido a alta resolução, rapidez, baixo custo e baixa geração de resíduos (HSIEH et al., 2006; MEINHART, 2010; BALLUS, 2012; VOCHYANOVA, 2014). A cromatografia eletrocínética micelar é importante principalmente para a análise de moléculas neutras. Baseia-se na adição de um tensoativo ao eletrólito que resulta na formação de micelas. Estas interagem com todos os analitos presentes na solução, seja por repulsão ou atração, dependendo da espécie iônica e da hidrofobicidade da molécula. (LINDEBERG, 1996; FRAZIER et al., 2000; INJAC, 2008; LIOTTA et al., 2012). Não foram encontrados estudos em que a separação de cafeína e taurina foi realizada simultaneamente por EC utilizando apenas DAD, que é um dos detectores mais comuns nos laboratórios de análise de alimentos.

Por isso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, otimizar e validar um método para determinação e quantificação simultânea da cafeína e da taurina em bebidas energéticas, utilizando cromatografia eletrocínética micelar com detector de arranjo de diodos. A condição ótima de separação foi determinada a partir do emprego de técnicas estatísticas multivariadas, como o planejamento composto central e o método de otimização simultânea de respostas proposto por Derringer e Suich.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Amostras

Para o desenvolvimento e otimização do método foram adquiridas, em supermercados da cidade de Campinas, 3 embalagens de 350 mL de um único fabricante cuja composição foi considerada a mais complexa em comparação com as demais marcas, levando em consideração as informações apresentadas no rótulo do produto. O conteúdo total das embalagens foi homogeneizado e desgaseificado em ultrassom durante 20 minutos antes da tomada de amostra para as determinações. As amostras foram previamente filtradas em filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, EUA) antes da injeção no equipamento.

### 2.2. Reagentes

Ácido benzoico foi adquirido da Carlo Erba (Itália) e dodecil sulfato de sódio (SDS) da Riedel-de-Haen (Alemanha). Os padrões de cafeína e taurina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). As soluções estoque de cafeína e taurina (500  $\text{mg.L}^{-1}$  e de 5000  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente), bem como as soluções de trabalho, foram armazenadas sob temperatura de refrigeração (10°C). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Corporation, EUA) e filtradas em membranas de celulose de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade (Millipore, EUA). Antes da injeção os padrões e amostra foram sonicados por 5 minutos.

### 2.3. Equipamento

O equipamento utilizado foi um sistema de eletroforese capilar Agilent G1600AX (Agilent Technologies, Germany), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor automático e sistema de controle de temperatura ajustado para 25°C. Utilizou-se um capilar de sílica fundida com 50 µm de diâmetro interno por 72 cm de comprimento efetivo, com bulbo estendido (Agilent Technologies, Germany). A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 230 e 274 nm, para a taurina e cafeína, respectivamente. A análise e o tratamento dos dados foram realizados no *software HP ChemStation*.

O capilar novo foi ativado e condicionado por lavagem com pressão de 50 mbar, usando uma solução de hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup> durante 30 min, seguido de 10 min de água. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi condicionado durante 5 min com hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>, seguido de 5 min com água e 10 min de eletrólito de corrida (tampão). No final do dia foi realizada uma limpeza do capilar com lavagem de hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup> durante 5 min, seguido de água durante 5 min. O capilar foi armazenado em água durante a noite.

### 2.4. Planejamento dos experimentos e tratamento dos dados

O primeiro estudo realizado se refere à forma de detecção. A cafeína possui dois máximos de absorção de luz UV (200-210 e 274 nm). Já a taurina não absorve a luz na região UV-VIS. Para possibilitar a detecção, foi realizada uma busca na literatura a fim de escolher um eletrólito que permita a detecção da cafeína em um de seus comprimentos de onda máximos e a detecção indireta da taurina. Para tanto, o eletrólito deve possuir duas características importantes: não absorver a luz na região de um dos máximos da cafeína (para permitir a detecção direta desta) e possuir um cromóforo que apresente

absorção da luz em qualquer região do UV (desde que não seja no mesmo comprimento de onda de um dos máximos da cafeína), permitindo assim, a detecção da taurina.

A segunda fase do estudo foi adicionar um surfactante para ionizar a molécula da cafeína, permitindo a obtenção da mobilidade eletroforética da mesma, o que acarreta na separação desta do fluxo eletroosmótico e dos demais componentes da amostra. Vários trabalhos já descreveram o SDS como um surfactante que produz este efeito, quando empregado acima da concentração micelar crítica ( $8,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). (FRAZIER et. al, 2000). Com base na literatura, o uso de concentrações muito elevadas aumenta demasiadamente o tempo de corrida. Estudos Ballus et al. (2012), Meinhart et al. (2010) utilizaram concentrações de até  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  para a análise da cafeína.

Em seguida, foi realizado um estudo univariado da faixa de pH a ser investigada. Foi estudada a faixa de 4,0 a 11,0 (intervalo de 1,0) com base no pKa dos compostos. Não foram utilizados níveis de pH menores que 5, pois ocorre uma redução muito drástica no fluxo eletroosmótico o que acarreta no aumento demasiado no tempo de análise. Para tais estudos, foi utilizado um capilar com bulbo estendido de  $50 \mu\text{m d.i} \times 72 \text{ cm}$  de comprimento total, eletrólito contendo  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ácido benzoico e  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  de SDS, injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 5 s e voltagem de + 30 kV.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios univariados um planejamento composto central  $2^3$ , com pontos centrais e axiais, foi utilizado para investigar os efeitos individuais e de interação entre as variáveis pH, concentração do eletrólito e concentração de SDS. O ponto central foi analisado em triplicata, totalizando 17 experimentos. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória. Os níveis empregados foram de 10 (-1,68) a 40  $\text{mmol.L}^{-1}$  (+1,68) para a concentração de eletrólito; 10 (-1,68) a 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  (+1,68) para a concentração de SDS; e entre 5,00 (-1,68) e 10,00 (+1,68) para o pH. A Tabela 1 mostra a matriz do planejamento composto central.

Os experimentos foram realizados através da injeção de amostra adicionada de padrões, nas concentrações de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de cafeína e 5 mg.mL<sup>-1</sup> para taurina. Todas as condições do planejamento composto central foram injetadas com 50 mbar de pressão por 5 s, temperatura de 25<sup>o</sup>C e detecção em 230 e 274 nm, para a taurina e cafeína, respectivamente. Antes de cada condição do planejamento foi realizado um condicionamento com 5 minutos de hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>, 5 minutos de água e 10 minutos do eletrólito da condição em estudo, a fim de manter as condições iniciais do capilar para todas as condições estudadas. Cada condição foi injetada em duplicata, sendo que entre as corridas da mesma condição o capilar foi condicionado por 2 minutos com o eletrólito.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios, foram escolhidas algumas respostas a serem otimizadas, sendo elas: (1) a diferença de tempo entre o fluxo eletroosmótico e a cafeína (para avaliar a separação da cafeína do pico do sistema); (2) resolução entre a cafeína e taurina (necessária para garantir a não supressão dos sinais, já que a detecção da cafeína é de forma direta e da taurina, de forma indireta), calculada conforme a equação 1; (3) simetria do pico da taurina (devido as efeitos de dispersão resultantes da diferença de condutividade do eletrólito e da molécula de taurina), calculada conforme a equação 2; (4) altura do pico da taurina (para melhorar o limite de detecção); e (5) variação de linha de base em 230 nm (muito significativo em detecções indiretas). Para cada resposta foram avaliados os modelos lineares e quadráticos quanto a falta de ajuste, distribuição de resíduos e significância das regressões através da Análise de Variância (ANOVA), ao nível de confiança de 95%.

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad \text{Equação 1}$$

Onde  $R_s$  representa o valor da resolução,  $t_1$  e  $t_2$  representam o tempo de migração de cada composto do par analisado e  $w_1$  e  $w_2$  representam a largura da base do pico de cada composto (COLLINS, 2006).

$$S = \frac{T_{\text{final}} - T}{T - T_{\text{inicial}}} \quad \text{Equação 2}$$

onde  $S$  = simetria,  $T$  = tempo da altura máxima do pico,  $T_{\text{final}}$  = tempo do final da base do pico e  $T_{\text{inicial}}$  = tempo do início da base do pico.

Em seguida, para avaliar as respostas simultaneamente e determinar a melhor condição de análise, foi utilizada a função de desejabilidade de Derringer e Suich (1980), estipulando um valor de desejabilidade para cada resposta e a partir disso, combinando-as em uma desejabilidade global (BREITKREITZ, JARDIM & BRUNS, 2009). O tratamento dos dados foi através do software Design Expert 6.0.4 (Minneapolis, EUA).

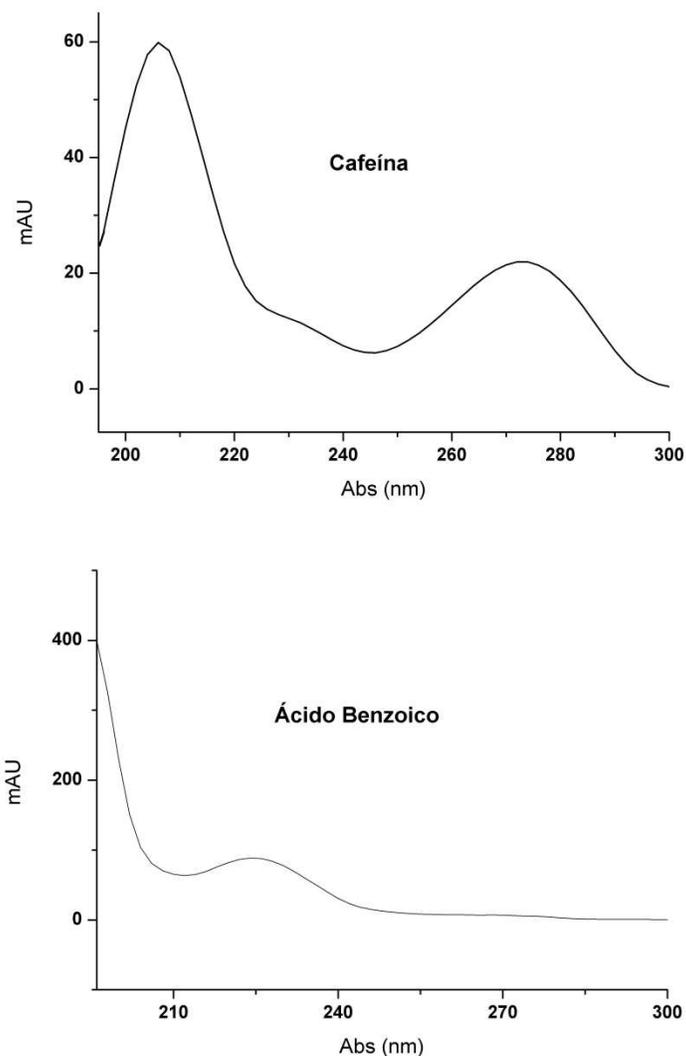
## 2.5. Validação do método por eletroforese capilar

O método foi validado utilizando-se uma solução estoque com os padrões de cafeína e taurina, de acordo com as recomendações do Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA, 2003). Os limites de detecção e quantificação foram determinados através de diluições sucessivas das soluções padrões e estimados como sendo 3 e 6 vezes a relação sinal/ruído, respectivamente. O limite de quantificação foi estabelecido com base no menor nível que apresentou coeficiente de variação relativo aceitável ( $\leq 20\%$ ) para a concentração avaliada. As curvas analíticas foram construídas em triplicatas aleatórias, cada qual com 7 níveis de concentração, de forma equidistante, levando-se em consideração as concentrações esperadas nas amostras. A linearidade das curvas analíticas foi avaliada e o modelo linear foi validado através de análise de variância (ANOVA) para a falta de ajuste, distribuição de resíduos e significância da regressão.

Para a avaliação da repetitividade, foram realizadas dez determinações em um mesmo dia, incluindo três concentrações das curvas analíticas (correspondente ao limite de quantificação, o ponto intermediário da curva e a concentração máxima). A precisão intermediária (entre dias) foi avaliada através de cinco determinações, nos mesmos níveis de concentração da repetitividade, em cinco dias consecutivos. Para o estudo da recuperação, foi realizada a fortificação da amostra com os padrões em concentrações conhecidas, também seguindo três níveis da curva (nas concentrações do limite de quantificação, no ponto intermediário e na concentração máxima), através de três determinações em cada nível.

### **3. Resultados e Discussão**

Para o sistema de detecção direta da cafeína e indireta da taurina, o eletrólito de corrida escolhido foi o ácido benzoico por apresentar em sua estrutura um cromóforo, que possui absorvidade máxima a 230 nm e não absorve na região de 274 nm, que é o segundo pico máximo da cafeína. Desta forma a detecção simultânea dos compostos foi possível, sendo que a cafeína foi detectada de forma direta a 274 nm e a taurina de forma indireta a 230 nm. Na Figura 1 estão apresentados os espectros de absorbância da cafeína e do ácido benzoico.



**Figura 1** - Espectros de absorvância de soluções aquosas de cafeína e de ácido benzoico.

No estudo univariado do pH foi observado que valores acima 10, aumentaram muito o ruído da linha de base e valores abaixo de 5 prolongaram demasiadamente o tempo de análise.

A partir dos resultados univariados o método foi otimizado através do estudo multivariado. Na Tabela 1 estão apresentados as variáveis, os níveis, bem como as respostas obtidas nos experimentos do planejamento composto central  $2^3$ . As cinco respostas investigadas (diferença de tempo entre o fluxo eletrosmótico e a cafeína,

resolução entre a taurina e cafeína, variação na linha de base a 230 nm, simetria do pico da taurina e altura do pico da taurina) foram avaliadas quanto aos modelos lineares e quadráticos através da Análise de Variância (ANOVA), ao nível de 95% de confiança, sendo utilizado o modelo que apresentou melhor descrição das variáveis. Na Tabela 2 estão apresentados os testes para a falta de ajuste, significância da regressão e coeficientes dos modelos.

É possível verificar que os modelos para as respostas de simetria da taurina e altura do pico da taurina não apresentaram evidência de falta de ajuste. Já os modelos da diferença do tempo entre o fluxo eletrosmótico e a cafeína, da resolução entre a taurina e cafeína e da variação na linha de base a 230 nm apresentaram falta de ajuste. Quanto a significância dos modelos, somente o parâmetro da variação na linha de base a 230 nm, apresentou modelo com regressão não significativa, informação esta, pouco confiável já que ocorreu falta de ajuste e, do ponto de vista experimental, foram observadas muitas variações da linha de base entre as condições estudadas.

Quando um modelo utilizado para a otimização dos algoritmos apresenta falta de ajuste, a função de desejabilidade de Derringer e Suich pode não estimar corretamente a condição ótima. Porém, é possível afirmar que a falta de ajuste para as respostas da diferença do tempo entre o fluxo eletrosmótico e a cafeína, resolução entre a taurina e a cafeína e a variação da linha de base a 230 nm para a taurina foram consideradas pequenas, já que foram na magnitude de 1,7, 1,2 e 3,7 vezes acima do valor do  $F$  crítico, respectivamente. Vários autores já demonstraram que o uso de modelos com leve falta de ajuste pode ainda ser útil para prever as condições analíticas. Dias et al. (2014), empregou modelos com valores de  $F_{\text{calculado}}$  até 10 vezes superiores aos valores de  $F_{\text{crítico}}$  obtendo resultados satisfatórios na otimização das respostas. De forma semelhante, nos estudos de Meinhart et al. (2011) e Ballus et al. (2014), modelos com leve falta de ajuste contribuíram para otimizar métodos de análise. Tendo em vista que tais modelos

apresentaram distribuição de resíduos aleatória, estes foram mantidos no processo de otimização simultânea das respostas.

Neste trabalho também foram realizadas restrições da região experimental para diminuir o erro de predição do algoritmo devido a falta de ajuste dos modelos, assim como realizado no trabalho de Dias et al. (2014). As respostas experimentais da diferença do tempo entre o fluxo eletrosmótico e a cafeína indicaram que as condições dos experimentos 3, 5, 7, 10, 13, 15, 16 e 17 deveriam ser evitadas já que as respostas foram insatisfatórias (tempo menor que 0,25). A outra resposta com falta de ajuste (variação da linha de base) indica que as condições dos ensaios 9, 10, 11 e 14 apresentaram variação da linha de base muito elevada (acima de 200 mUA), devendo ser evitadas tais condições. A resposta de resolução entre cafeína e taurina, embora tenha falta de ajuste, não é preocupante pois todas as resoluções foram altas. Assim, as restrições foram realizadas de forma a rejeitar os níveis de variáveis que foram prejudiciais experimentalmente para a diferença de tempo entre o fluxo eletrosmótico e a cafeína, e variação da linha de base. Como pode ser observado na Tabela 3, o pH foi limitado aos níveis de -1.00 a 1.00, a concentração de ácido benzoico de -1.00 a 1,68 e o SDS de -1,68 a 1,00.

Para o emprego do algoritmo de desejabilidade proposto por Derringer e Suich, foram estabelecidas as desejabilidades individuais para cada variável, com o objetivo de obter a diferença do tempo entre o fluxo eletrosmótico e a cafeína maior que 0,8 e menor que 2,0 minutos, obter a menor variação da linha de base possível, a maior altura do pico da taurina, reduzir a simetria da taurina para valores próximos a 1,0, com o mínimo aceitável de 0,8. Para a resolução entre cafeína e taurina o critério de desejabilidade foi de reduzir a mesma (já que os valores estavam demasiadamente altos, de 8 a 28), com o limite mínimo de 3,0, resolução considerada como excelente para a quantificação. Com a

redução da resolução para valores próximos a 3,0 existe a tendência de reduzir o tempo de análise.

Na Tabela 3 também estão apresentados as condições de análise sugeridas pelos algoritmos cada um dos parâmetros, bem como as respostas experimentais previstas. A condição analítica de pH 7,26, 16,20 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido benzoico e 39,90 mmol.L<sup>-1</sup> de SDS foi testada, em triplicata, e na tabela estão apresentados os valores experimentais observados, com seus respectivos desvios.

Exceto para a resposta da diferença do tempo entre o fluxo eletroosmótico e a cafeína, as demais respostas observadas apresentaram-se bem próximas as respostas previstas. As diferenças podem ser atribuídas ao erro que existe em cada um dos modelos devido a falta de ajuste. No entanto, os modelos ainda foram úteis para otimizar o método analítico. O eletroferograma da condição ótima de separação de cafeína e taurina em amostra de bebida energética pode ser observado na Figura 2.



**Tabela 1.** Variáveis, níveis e respostas do planejamento composto central realizado para a otimização na determinação de taurina e cafeína em bebidas energéticas.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas			Respostas				
	A	B	C	A pH	B Concentração de eletrólito (mmol.L <sup>-1</sup> )	C Concentração de SDS (mmol.L <sup>-1</sup> )	Diferença tempo FEO/Cafeína (min)	Resolução Taurina e Cafeína	Simetria Taurina	Altura do pico Taurina (mUA)	Varição da linha de base em 230 nm (mUA)
1	-1.00	-1.00	-1.00	6.00	16.10	16.10	0,25	13,3	9,2	453,3	181,6
2	-1.00	-1.00	1.00	6.00	16.10	39.90	0,55	11,4	10,1	505,9	85,6
3	-1.00	1.00	-1.00	6.00	33.90	16.10	0,07	27,5	7,6	296,2	156,2
4	-1.00	1.00	1.00	6.00	33.90	39.90	0,79	20,4	8,0	312,7	172,2
5	1.00	-1.00	-1.00	9.00	16.10	16.10	0,20	12,1	10,3	514,2	24,0
6	1.00	-1.00	1.00	9.00	16.10	39.90	0,53	10,4	11,3	492,6	43,9
7	1.00	1.00	-1.00	9.00	33.90	16.10	0,11	25,3	7,4	307,5	138,6
8	1.00	1.00	1.00	9.00	33.90	39.90	0,54	20,6	7,6	331,2	163,2
9	-1.68	0.00	0.00	5.00	25.00	25.00	1,83	8,4	10,1	612,3	1359,0
10	1.68	0.00	0.00	10.00	25.00	25.00	0,23	16,3	9,8	477,6	212,9
11	0.00	-1.68	0.00	7.50	10.00	25.00	0,85	8,6	13,1	445,6	208,5
12	0.00	1.68	0.00	7.50	40.00	25.00	0,35	28,2	6,9	195,5	114,1
13	0.00	0.00	-1.68	7.50	25.00	10.00	0,12	25,9	6,8	432,5	44,2
14	0.00	0.00	1.68	7.50	25.00	50.00	1,01	15,3	10,1	401,0	242,1
15	0.00	0.00	0.00	7.50	25.00	25.00	0,13	19,4	9,0	432,7	93,8
16	0.00	0.00	0.00	7.50	25.00	25.00	0,21	18,4	9,4	460,4	168,5
17	0.00	0.00	0.00	7.50	25.00	25.00	0,07	18,7	8,8	451,7	155,2

SDS: dodecil sulfato de sódio, FEO: fluxo eletroosmótico

**Tabela 2.** Modelos matemáticos obtidos a partir das respostas do planejamento composto central, testes de falta de ajuste e da significância das regressões.

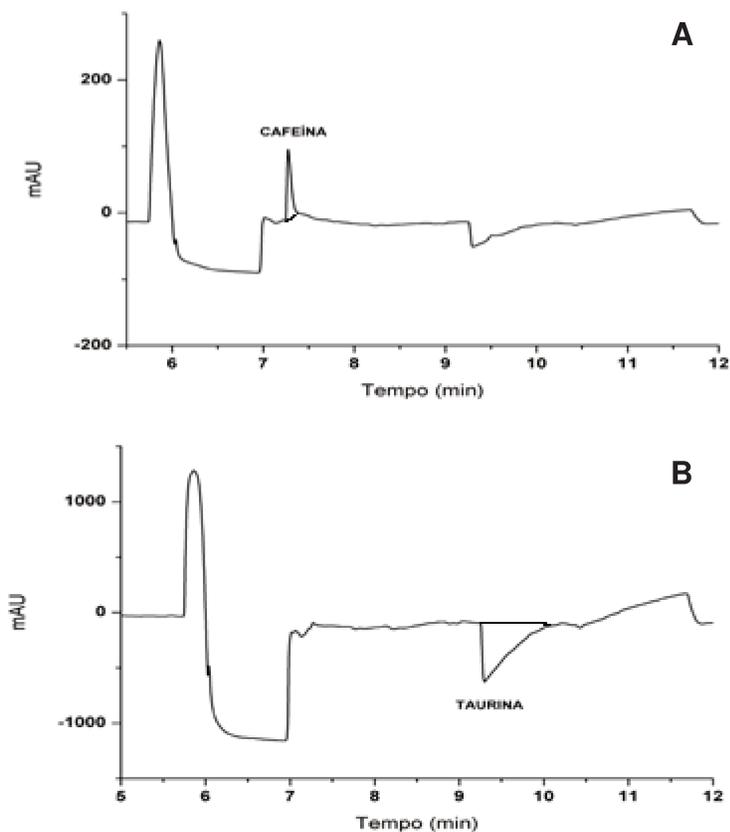
Respostas	Coeficientes da regressão										Testes ajuste e regressão	
	Intercepto	A pH	B Conc. Eletrólito	C Conc. SDS	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>	AB	AC	BC	F <sub>Calculado</sub> Falta de ajuste <sup>(1)</sup>	F <sub>Calculado</sub> Regressão <sup>(2)</sup>
Diferença tempo FEO/Cafeína	0,46 (0,09)	-0,22 (0,10)	- 0,06 (0,10)	0,24 (0,10)	-	-	-	-	-	-	32,87	3,47
Resolução Taurina/Cafeína	18,78 (1,29)	0,66 (0,60)	5,82 (0,60)	-2,43 (0,60)	-2,16 (0,67)	-0,03 (0,67)	0,77 (0,67)	0,03 (0,79)	0,31 (0,79)	-1,04 (0,79)	22,76	14,17
Simetria Taurina	9,16 (0,20)	0,07 (0,22)	-1,52 (0,22)	0,60 (0,22)	-	-	-	-	-	-	7,95	18,77
Altura do pico da Taurina	449,88 (25,02)	-10,92 (11,76)	-83,44 (11,76)	1,33 (11,76)	28,81 (12,95)	-50,70 (12,95)	-16,62 (12,95)	-2,23 (15,36)	-8,37 (15,36)	1,15 (15,36)	12,80	8,92
Varição da Linha de Base em 230 nm	156,28 (163,77)	-157,68 (76,95)	10,00 (76,95)	21,75 (76,95)	171,84 (84,78)	-49,48 (84,78)	-55,91 (84,78)	21,59 (100,50)	15,56 (100,50)	14,59 (100,50)	70,91	1,24

SDS: dodecil sulfato de sódio; FEO: fluxoeletrósmótico; <sup>(1)</sup> F<sub>crítico</sub> para o teste de falta de ajuste: 19,35 (valores de F<sub>calculado</sub> maiores que F<sub>crítico</sub> indicam modelo com falta de ajuste); <sup>(2)</sup> F<sub>crítico</sub> para a significância da regressão: 3,55 (valores de F<sub>calculado</sub> menores que o F<sub>crítico</sub> indicam regressão significativa).

**Tabela 3.** Condições de desejabilidade empregadas na otimização simultânea das respostas, valores preditos pelo modelos e valores observados

Variável/ Resposta	Critério	Limite inferior	Limite superior	Importância	Valor Previsto	Valor Observado
Ph	Na faixa	-1	1	3	7,26	-
Concentração eletrólito	Na faixa	-1	1,68	3	16,20	-
Concentração SDS	Na faixa	-1,68	1	3	39,90	-
Diferença tempo FEO/Cafeína	Na faixa	0,8	2,0	5	0,80	0,31±0,02
Resolução Taurina/Cafeína	Minimizar	3,0	28,2	3	12,15	9,92±1,04
Simetria Taurina	Minimizar	0,8	10,0	5	11,26	15,55±1,47
Altura do pico Taurina	Maximizar	300,0	613,0	5	469,83	517,15±15,63
Varição da linha de base em 230 nm	Minimizar	1,0	1359,0	3	79,81	76,00±1,84

SDS: dodecil sulfato de sódio, FEO: fluxo eletrósmótico.



**Figura 2** - Eletroferograma da condição ótima de separação de cafeína (A) no comprimento de onda a 274 nm e taurina (B) no comprimento de onda a 230 nm, em amostra de bebida energética. Condições analíticas: capilar de 50  $\mu\text{m}$  de d.i x 72 cm de comprimento total com bulbo estendido, eletrólito ácido benzoico 16,2  $\text{mmol.L}^{-1}$  com dodecil sulfato de sódio (SDS) 39,9  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,26, 25  $^{\circ}\text{C}$ , injeção de 50 mbar por 5s e voltagem de +30 kV.

O método foi validado e as figuras de mérito estão apresentados na Tabela 4. Através da análise de variância, verificou-se que a regressão linear foi significativa nas faixas de concentração estudadas e que o modelo matemático para a cafeína apresentou leve falta de ajuste (devido ao baixo erro experimental) e o modelo matemático para a taurina não apresentou falta de ajuste ( $p > 0,05$ ), mostrando-se apropriados para realizar as quantificações. Os limites de quantificação foram adequados para análise de bebidas

energéticas com um método de extração extremamente simples. Os demais parâmetros também apresentaram resultado adequado para a quantificação de acordo com as exigências da ANVISA (2003) demonstrando que o método é confiável para a determinação simultânea da cafeína e taurina em bebidas energéticas.

**Tabela 4.** Figuras de mérito da validação do método de análise para cafeína e taurina em bebidas energéticas.

Parâmetros	Compostos		
	Cafeína	Taurina	
Faixa Linear (mg.L <sup>-1</sup> )	4 – 84	15 – 235	
F (falta de ajuste)*	6,76	2,59	
Limite de Detecção (mg.L <sup>-1</sup> )	2	7,5	
Limite de Quantificação (mg.L <sup>-1</sup> )	4	15	
Repetitividade (n=10) CV	Nível 1	15,93 %	13,80 %
	Nível 2	8,21 %	13,25 %
	Nível 3	8,75 %	9,08 %
Precisão Intermediária (n=5) CV	Nível 1	10,57 %	14,27 %
	Nível 2	5,59 %	13,12 %
	Nível 3	3,97 %	10,57%
Recuperação (n=3) %	Nível 1	105,11 %	117,18 %
	Nível 2	111,26 %	120,81 %
	Nível 3	118,83 %	115,40%

(<sup>1</sup>)  $F_{\text{crítico}}(3,10) : 3,71$  (taurina)  $F_{\text{crítico}}(4,11) : 3,36$  (valores de  $F_{\text{calculado}}$  menores que  $F_{\text{crítico}}$  indicam modelo sem falta de ajuste) (<sup>2</sup>) Concentração para a repetitividade, precisão intermediária e recuperação: Níveis 1, 2 e 3, equivalente a 4, 40 e 84 mg.L<sup>-1</sup> para a cafeína e 15,110 e 235 mg.L<sup>-1</sup> para a taurina, respectivamente.

#### 4. Conclusão

Através do emprego de técnicas estatísticas multivariadas, como o planejamento composto central e o método de desejabilidade de Derringer e Suich, foi possível otimizar a separação da cafeína e taurina presentes na bebida energética por cromatografia eletrocínética micelar, obtendo-se uma máxima altura de pico e com menor simetria do pico de taurina.

As condições finais do método consistiram na utilização de capilar de 50  $\mu\text{m}$  de d.i x 72 cm de comprimento total com bulbo estendido, eletrólito ácido benzoico 16,20  $\text{mmol.L}^{-1}$  com dodecil sulfato de sódio (SDS) 39,90  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,26, 25  $^{\circ}\text{C}$ , injeção de 50 mbar por 5s e voltagem de +30 kV e detecção a 230 e 274 nm. A separação da cafeína e taurina ocorreu em 12 minutos.

O método desenvolvido apresentou resultados adequados para os parâmetros de validação, com preparo de amostra simples e eficiente. A técnica utiliza poucos reagentes, apresenta baixo custo de análise, rapidez e baixa geração de resíduos apresentando-se como uma boa alternativa para análises de controle de qualidade de bebidas energéticas.

#### 5. Referências Bibliográficas

ABIR, Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas. BNA Brasil Relatório 2011- **Consumo de todas as bebidas comerciais (2005-2010)**. Disponível em: <[www.abir.org.br/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=322](http://www.abir.org.br/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=322)>. Acesso em: 03 dez. 2013.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Misturas para o Preparo

de Alimentos e Alimentos Prontos para o Consumo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ARESTA, A.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, C. G. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine and nicotine in human milk by liquid chromatography with diode array UV detection. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 177-181, 2005.

BALLUS, C.A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; BIZZOTO, C. S.; FILHO, J.T.; GODOY, H.T. A fast and efficient method for the study of caffeine levels in energy drinks using micellar electrokinetic chromatography (MEKC). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n.2, p. 401-404, 2012

BALLUS, C.A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; JÚNIOR, F. A. S. C.; BRUNS, R. E.; GODOY, H.T. Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 558-568, 2014.

BIZZOTO, C. S.; MEINHART, A. D.; BALLUS, C. A.; GHISELLI, G.; GODOY, H. T. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for caffeine determination in decaffeinated coffee. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 186-191, 2013.

BREITKREITZ, M.C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column mobile phase mixture statical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromotography A**, v.1216, p. 1439-1449, 2009.

BRUNETTO, M. R.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A.; GÓMEZ, Á.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 459-467, 2007.

BURROWS, T.; PURSEY, K.; NEVE, M.; STANWELL, P. What are the health implications associated with the consumption of energy drinks? A systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 3, p. 135-148.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; RODRIGUES, S.; Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n.2, p. 78-85, 2006.

CATALDI, T. R. I.; TELESCA, G.; BIANCO, G.; NARDIELLO, D. Quantitative determination of taurine in real samples by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Talanta**, v. 64, p. 626-630, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, editora UNICAMP, 2006, 453 p.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several responses variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DIAS, C. B.; MEINHART, A. D.; PANE, D. Q.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. (2014). Multivariate Optimisation and Validation of Method for the Separation of Five Artificial Sweeteners by UPLC-DAD in Nine Food Matrices. **Food Anal. Methods**: 1-12. doi: 10.1007/s12161-014-0056-8

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; NUNES, M. V.; MENDES, E.; REMIÃO, F.; FERREIRA, M. A. Development of an HPLC-UV method for determination of taurine in infant formulae and breast milk. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 20, p. 1269-1278, 1997.

FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. **Capillary electrophoresis for food analysis – Method development**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000.

HECKMAN, M. A.; SHERRY, K.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Energy Drinks: An Assessment of their Market Size, Consumer, Demographics, Ingredient Profile, Functionality, and Regulations in the United States. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 303 – 317, 2010.

HSIEH, M.; CHEN, C.; HSIEH, S.; HSIEH, S.; LEE, P. B.; LI, C.; HSIEH, T. Separation of Phenils from the Leaves of *Toona sinensis* (Meliaceae) by Capillary Electrophoresis. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 53, p. 1203 – 1208, 2006.

INJAC, R.; SRDJENOVIC, B.; PRIJATELJ, M.; BOSKOVIC, M.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; STRUKELJ, B. Determination of Caffeine and Associated Compounds in Food, Beverages, Natural Products, Pharmaceuticals, and Cosmetics by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 137-143, 2008.

LINDEBERG, J. Capillary electrophoresis in food analysis. **Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 73-94, 1996.

LIOTTA, E.; GOTTARDO, R.; SERI, C.; RIMONDO, C.; MIKSIK, I.; SERPELLONI, G.; TAGLIARO, F. Rapid analysis of caffeine in “smart drugs” and “energy drinks” by microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC). **Forensic Science International**, v. 220, p. 279-283, 2012.

MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; PRADO, M. A.; BRUNS, R. E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. **Food Chemistry**, v.120, n. 4, p. 1155-1161, 2010.

MEINHART, A. D.; BALLUS, C. A.; BRUNS, R. E.; PALLONE, J. A. L.; GODOY, H. T. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v. 85, p. 237-244, 2011.

PANSANI, M. C.; PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M. Influência da deficiência de taurina no coração. **Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, 2010.

PROSSER, C. G.; RUTHERFURD, S. M. Chapter 2 - Glutamine and Taurine. **Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods**, Estados Unidos: Editora CRC Press, 2012, p. 25 – 34.

REISSIG, C. J.; STRAIN, E. C.; GRIFFITHS, R. R. Caffeinated energy drinks – A growing problem. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 99, n. 1, p. 1-10, 2009.

SAWABE, Y.; TAGAMI, T.; YAMASAKI, K. Determination of Taurine in Energy Drink by HPLC using pre-column derivative. **Journal of Health Science**, v. 54, n. 6, p. 661-664, 2008.

SEIFERT, S. M.; SCHAECHTER, J. L.; HERSHORIN, E. R.; LIPSHULTZ, S. E. Health Effects of Energy Drinks on Children, Adolescents, and Young Adults. **Pediatrics**, v. 127, n. 3, p. 511 – 528, 2011.

TAGLIARI, M. P.; GRANADA, A.; KUMINEK, G.; STULZER, H. K; SILVA, M. A. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartícula de quitosana e alginato. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1228-1232, 2012.

TRABULO, D.; MARQUES, S.; PEDROSO, E. Caffeinated energy drink intoxication. **Journal Medical Emergency**, v.28, p. 712-714, 2011.

VOCHYANOVA, B.; OPEKAR, F.; TUMA, P. Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/ photometry detection. **Electrophoresis**, v. 35, p. 1660-1665, 2014.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; BASTIANINA, S.; CHESSA, R.; GASPA, L.; FRANCONI, F.; DEIANA, L.; CARRU, C. Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food applications. **Amino Acids**, v. 36, p. 35-41, 2009.



## Artigo 2

# **DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFEÍNA E TAURINA EM BEBIDAS ENERGÉTICAS COMERCIALIZADAS EM SÃO PAULO POR ELETROFORESE CAPILAR**

Alane Pereira Cangani, Adriana Dillenburg Meinhart e Helena Teixeira Godoy

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de  
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),  
CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil

Manuscrito em preparação para submissão no periódico “ Food Science and Tecnology”



**RESUMO**

O consumo de bebidas energéticas no Brasil e no mundo tem aumentado a cada ano, especialmente devido às suas propriedades estimulantes. Esta bebida é composta basicamente por carboidratos, vitaminas do complexo B, inositol e seus principais ingredientes são a taurina e a cafeína. O objetivo deste trabalho foi analisar amostras de bebidas energéticas comercializadas no Brasil para verificar se o teor de cafeína e taurina estão de acordo com os valores declarados nos rótulos e com os limites estabelecidos pela legislação brasileira. Foram analisadas 22 marcas de bebidas energéticas por cromatografia eletrocínética micelar, utilizando um capilar de sílica fundida (50  $\mu\text{m}$  x 72 cm), voltagem de + 30 kV, temperatura de 25 °C, injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 5 s e detecção a 230 nm e 274nm, para taurina e cafeína, respectivamente. O eletrólito consistiu em 16,2 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido benzoico e 39,9 mmol.L<sup>-1</sup> de dodecil sulfato de sódio (SDS), em pH 7,26. A concentração de cafeína variou entre 16,68 e 34,64 mg.100 mL<sup>-1</sup> e para a taurina entre 188,97 e 614,19 mg.100 mL<sup>-1</sup>. Considerando os intervalos de confiança (95%), verificou-se que quase a totalidade das marcas analisadas (21 entre 22 marcas) apresentaram teor de cafeína menor que o declarado no rótulo, enquanto 11 marcas apresentaram teor de taurina abaixo do declarado. Com relação à cafeína nenhuma das marcas tiveram o teor acima do limite máximo permitido pela legislação vigente, no entanto, 50% das marcas possuíam teor de taurina acima do limite máximo permitido. Houve também, uma heterogeneidade no teor de cafeína e taurina entre os lotes analisados da mesma marca, mostrando a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso e com uma melhor padronização dos ingredientes adicionados a este produto.

Palavras chave: cafeína; taurina; bebidas energéticas; cromatografia eletrocínética micelar.



**ABSTRACT**

The consumption of energy drinks in Brazil and in the world is increasing over the years, especially due to its stimulant property. This drink is basically composed of carbohydrates, B vitamins, inositol, and its main ingredients are taurine and caffeine. The aim of this study was to analyze samples of energy drinks commercialized in Brazil to verify if their caffeine and taurine content are according with the values declared on the labels and with Brazilian legislation limits. A total of 26 brands of energy drink were analyzed by micellar electrokinetic chromatography, using a fused silica capillary (50  $\mu\text{m}$  x 72 cm) at + 30 kV during 2 min, temperature 25  $^{\circ}\text{C}$ , hydrodynamic injection at 50 mbar for 5 s, and detection at 230 and 274 nm for taurine and caffeine, respectively. The running buffer consisted of 16,2  $\text{mmol.L}^{-1}$  benzoic acid and 39,9  $\text{mmol.L}^{-1}$  sodium dodecyl sulfate (SDS) (pH 7.26). . The mean caffeine concentration varied between 16,68 and 34,64  $\text{mg. 100 mL}^{-1}$  and the taurine concentration varied between 188,97 and 614,19  $\text{mg mL}^{-1}$ . Considering confidence intervals (95%), it was found that almost all of the analyzed marks (marks 22 from 21) were less than caffeine content declared on the label and 11 brands had taurine content stated below. With regard to caffeine any of the brands had the content above the maximum extent permitted by law, however, 50 % of the brands had taurine content above the maximum allowed limit. There was also a heterogeneity in caffeine and taurine analyzed between batches of the same brand, demonstrating the need for a more strict quality control and a better standardization of ingredients added to this product.

Keywords: caffeine; taurine; energy drink; micellar electrokinetic chromatography.



## 1. Introdução

A bebida energética surgiu nos anos de 1960 nos continentes Europeu e Asiático e sua expansão tem sido tão elevada que sua comercialização é considerada como o mercado com o crescimento mais acelerado dentre as demais bebidas não alcoólicas. O consumo de bebida energética tem se tornado popular, principalmente, entre o público jovem, com idades entre 18 a 34 anos, especialmente entre os estudantes (MALINAUSKAS, 2007; ATTILA; CAKIR, 2011), pessoas fisicamente ativas (TSITSIMPIKOU et al., 2011) e entre os atletas (BUXTON; HAGAN, 2012).

No Brasil, a bebida energética é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que a define como um "composto líquido pronto para o consumo", podendo apresentar em sua composição os seguintes ingredientes: inositol e/ou glucoronolactona, e/ou taurina (máximo 400 mg.100 mL<sup>-1</sup>), e/ ou cafeína (máximo 35 mg.100 mL<sup>-1</sup>), possibilitando ainda a adição de vitaminas e/ou minerais em até 100% da ingestão diária recomendada (IDR) e outros ingredientes desde que não haja descaracterização do produto final; sendo permitidas o uso das expressões "bebida energética" ou "energy drink" em sua embalagem (ANVISA, 2005).

A cafeína é considerada como um dos ingredientes mais comuns presentes a todas as marcas de bebida energética (TRABULO, 2011; NORDT, 2012) e tem sido um composto correlacionado com o aumento do estímulo do sistema nervoso central, aumento do desempenho físico e mental, do estado de alerta, melhora do estado de humor e da memória (MALINAUSKAS, 2007; POHLER, 2010; BIZZOTO, 2013). No entanto, quando consumida em doses elevadas (10 a 15 mg.kg<sup>-1</sup>), pode desencadear sintomas indesejáveis, como a ansiedade, tremores, dores de cabeça, agitação, irritabilidade, alucinação, desconforto gastrointestinal, aumento da pressão arterial, redução da sensibilidade a insulina, arritmia, taquicardia e palpitação, insônia, náuseas,

convulsões e em casos mais extremos levar ao coma e a morte (MALINAUSKAS, 2007; POHLER, 2010; TRABULO, 2011).

A taurina é um aminoácido livre, conhecida por apresentar um importante papel em inúmeras funções fisiológicas e por isso podendo ser aplicada em diversos tratamentos clínicos, sendo considerada como o principal aminoácido intracelular livre na maior parte dos tecidos dos mamíferos (CATALDI, 2004; LAMÔNICA-GARCIA, 2008; PEREIRA, 2012). No organismo, têm papel fundamental na absorção de gorduras, agindo como um antioxidante, protegendo o coração, atuando como anticonvulsivo, na estabilização da membrana plasmática e na regulação dos níveis de cálcio intracelular, no desenvolvimento do sistema nervoso central e da retina, na osmorregulação, apresenta capacidade anti-inflamatória e atuação na modulação da insulina (CATALDI, 2004; FERREIRA et al., 2006; DALL'AGNOL, 2009; PANSANI, 2010; TRABULO, 2011; PEREIRA, 2012). Devido as suas funções fisiológicas, a taurina tem sido cada vez mais empregada pelas indústrias de alimentos como um ingrediente funcional em alimentos (QU, 1999; PEREIRA, 2012). Todos estes aspectos explicam porque a taurina é um dos ingredientes principais da composição da bebida energética. Além disso, diversos estudos comprovam que a taurina apresenta um poder ergogênico e proporciona uma melhoria no desempenho físico (PEREIRA, 2012). No que tange a toxicidade da taurina, estudos científicos comprovaram que a ingestão de taurina é geralmente bem aceita pelo organismo, sem efeitos fisiológicos adversos. Sabe-se que em usos terapêuticos não constam relatos de efeitos colaterais em doses de 1000 a 3000 mg ao dia, e que médicos especialistas em nutrição geralmente prescrevem o consumo de taurina nas concentrações de 500 a 1000 mg de 2 a 3 vezes ao dia, para adultos (FINNEGAN, 2003; CARVALHO, 2006; HECKMAN, 2010). No entanto, como não existem estudos conclusivos sobre a quantidade máxima possível ingerida sem que ocorram efeitos

adversos, a ANVISA estabeleceu o limite de  $400 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$  de taurina em bebida energética (ANVISA, 2005).

O objetivo deste trabalho foi determinar o teor de cafeína e taurina em bebidas energéticas de marcas comercializadas no Brasil e avaliar se as concentrações contidas nas bebidas estão de acordo com o valor declarado no rótulo e com a legislação vigente.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Amostras

As amostras analisadas consistiram em 22 marcas, obtidas em três lotes diferentes, sendo que 5 marcas foram adquiridos apenas dois lotes por falta de disponibilidade nos supermercados, totalizando 73 amostras. A marca 4 (4a e 4b) se refere a bebidas energética tradicional e sem adição de açúcar; a marca 5 (5a e 5c) se refere a bebidas energética tradicional e saborizada; e a marca 12 (12a, 12b e 12c) se refere a bebidas tradicional, sem adição de açúcar e aromatizada. As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas-SP. O preparo das amostras consistiu na desgaseificação em ultrassom durante 20 minutos e filtragem em filtro Millipore de  $0,22 \mu\text{m}$  (Millipore, EUA). Em seguida, as mesmas foram injetadas no sistema de eletroforese capilar. Todas as determinações foram feitas em triplicata, sendo que cada replicata representou a média de três injeções.

### 2.2. Reagentes

Os padrões de cafeína e taurina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (EUA). O ácido benzoico adquirido da Carlo Erba (Itália) e dodecil sulfato de sódio (SDS) da Riedel-

de-Haen (Alemanha). Em todos os experimentos e no preparo das soluções, utilizou-se água ultrapura obtida em sistema Direct-Q 3 UV (Millipore Corporation, França).

Todas as soluções foram desgaseificadas por ultrassonicação (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) e antes de cada injeção os vials contendo as amostras filtradas foram colocados no ultrassom durante 5 minutos. As soluções estoque dos padrões de cafeína e taurina ( $500 \text{ mg.L}^{-1}$  e de  $5000 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente) foram preparadas, filtradas em membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  e armazenadas sob temperatura de refrigeração ( $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até o uso no preparo de soluções de trabalho.

### 2.3. Análise por eletroforese capilar

Para a determinação de cafeína e taurina foi utilizado um equipamento de eletroforese capilar (CE) da marca Agilent G1600AX (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD/ UV-vis), com injetor automático e sistema de controle de temperatura ajustado em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . As determinações foram realizadas segundo o método desenvolvido e validado por Cangani et. al. (2015) por cromatografia eletrocínica micelar, empregando um capilar de sílica fundida com bulbo estendido da Agilent Technology (Alemanha), com comprimento efetivo de 72 cm e  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno, eletrólito constituído de ácido benzoico  $16,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  com dodecil sulfato de sódio (SDS)  $39,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,26 ajustado com NaOH, injeção de 50 mbar por 5 s e voltagem de corrida de (+30 kV). A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 230 nm e 274 nm, para taurina e cafeína, respectivamente.

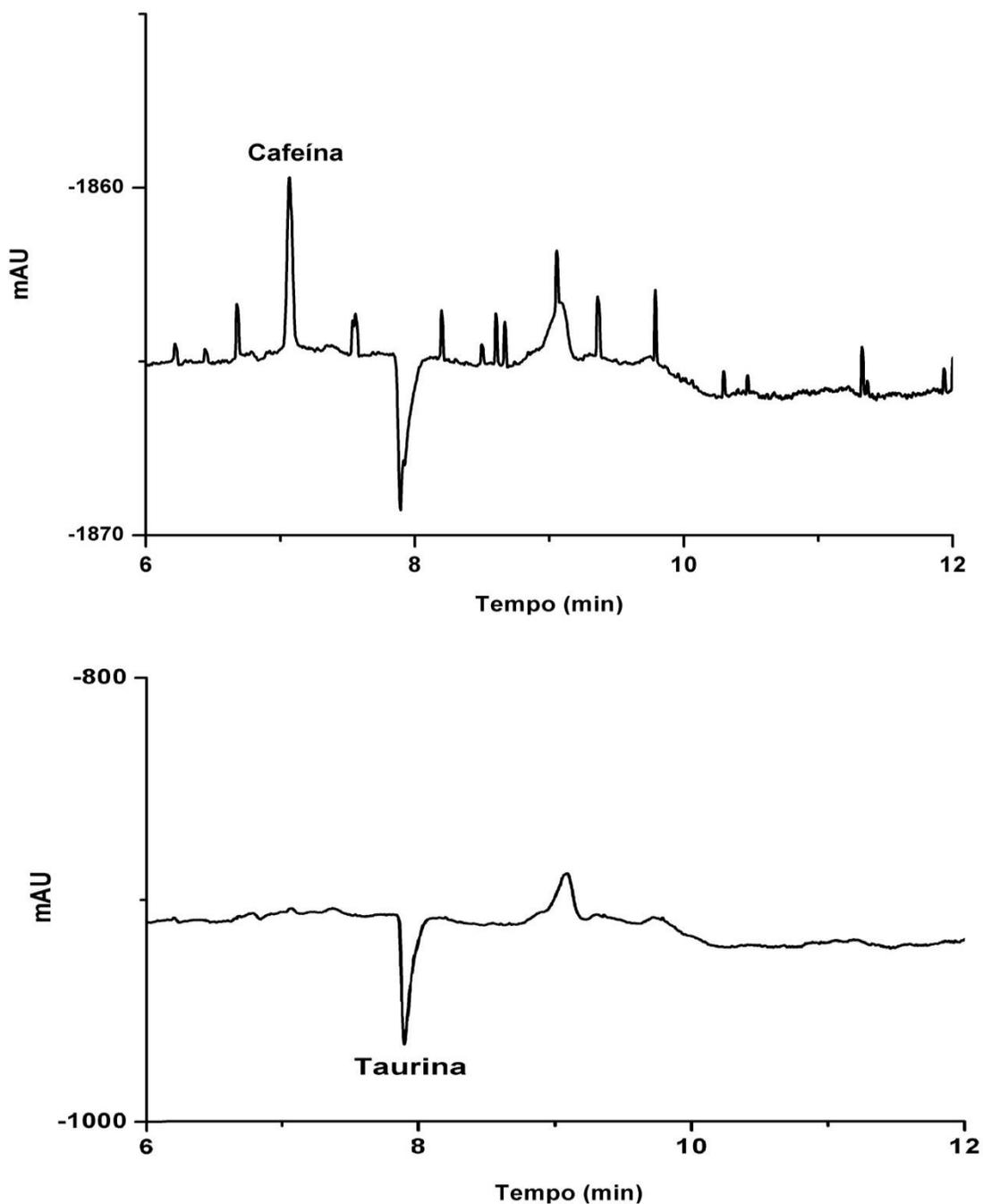
A identificação dos compostos foi realizada comparando-se os tempos de migração com os padrões e adição de padrões. Tanto a cafeína como a taurina foram quantificadas utilizando-se curvas de calibração construídas com sete pontos, em triplicata, na faixa de concentração de 4 a  $85 \text{ mg.L}^{-1}$  para a cafeína e 15 a  $237 \text{ mg.L}^{-1}$  para a taurina. Para

avaliar a diferença entre as marcas e lotes, o teor de cafeína e taurina das amostras foi submetido à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey usando o software Statistica 10 (Statsoft, USA). As amostras foram consideradas estatisticamente diferentes quando ( $p < 0,05$ ).

Para efeito de comparação entre os resultados obtidos nas amostras e as quantidades máximas estabelecidas pela legislação, foram calculados os intervalos de confiança (95%) para cada lote, permitindo assim uma comparação estatisticamente confiável com a RDC nº 273/05 (ANVISA, 2005). Ainda segundo a RDC nº 273/05 para ingredientes adicionados às bebidas energéticas, como é o caso da cafeína e taurina, o teor desses ingredientes no produto e o valor declarado no rótulo deve obedecer aos limites máximos estabelecidos por esta legislação, sem limites de tolerância.

### **3. Resultados e Discussão**

A Figura 1 apresenta um eletroferograma obtido na determinação de cafeína e taurina em uma amostra de bebida energética e na Tabela 1 estão apresentadas as concentrações médias de cafeína e taurina presentes em cada lote das 22 marcas de bebida energética analisadas.



**Figura 1** - Eletroferograma obtido na determinação de cafeína e taurina em uma amostra de bebida energética. Capilar de 50  $\mu\text{m}$  de d.i x 72 cm de comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido benzoico 16,2  $\text{mmol.L}^{-1}$  com dodecil sulfato de sódio (SDS) 39,9  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,26, 30 kV, 25  $^{\circ}\text{C}$ , injeção de 50 mbar por 5 s e detecção a 274 nm (cafeína) e a 230 nm (taurina).

**Tabela 1.** Conteúdo médio de cafeína e taurina (mg.L-1) e o intervalo de confiança (95%) das amostras de bebida energética analisadas.

Marcas	Lote	Cafeína			Taurina		
		Concentração (mg.100 mL <sup>-1</sup> )	IC(95%)	V.D	Concentração (mg.100 mL <sup>-1</sup> )	IC(95%)	V.D
1	A	24,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	21,9 - 27,9	32	614,2 ± 5,7 <sup>a</sup>	525,4 - 703,0	400
	B	25,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	21,0 - 30,8		397,0 ± 9,9 <sup>b</sup>	372,5 - 421,5	
	C	25,3 ± 1,4 <sup>a</sup>	21,9 - 28,6		457,1 ± 13,1 <sup>b</sup>	400,4 - 513,8	
	<b>Média</b>	<b>25,4 ± 0,5</b>			<b>489,4 ± 112,2</b>		
2	A	25,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	23,1 - 27,0	31,92	353,9 ± 10,4 <sup>a</sup>	256,1 - 451,8	400
	B	25,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	21,8 - 29,5		407,6 ± 7,3 <sup>a</sup>	389,4 - 425,7	
	C	26,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	22,3 - 30,0		412,1 ± 14,5 <sup>a</sup>	376,1 - 448,0	
	<b>Média</b>	<b>25,6 ± 0,5</b>			<b>391,2 ± 32,3</b>		
3	A	27,6 ± 1,4 <sup>a</sup>	24,1 - 31,0	32	361,0 ± 10,8 <sup>c</sup>	334,1 - 387,9	400
	B	21,4 ± 1,6 <sup>b</sup>	17,4 - 25,4		434,5 ± 4,3 <sup>b</sup>	423,8 - 445,1	
	C	28,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	27,7 - 28,5		459,4 ± 6,8 <sup>a</sup>	442,7 - 476,2	
	<b>Média</b>	<b>25,7 ± 3,7</b>			<b>418,3 ± 51,1</b>		
4 <sup>a</sup>	A	25,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	22,1 - 27,8	29,74	405,0 ± 26,7 <sup>a</sup>	338,7 - 471,3	371,75
	B	27,1 ± 2,4 <sup>a</sup>	21,1 - 33,0		447,7 ± 10,9 <sup>a</sup>	420,5 - 474,9	
	C	23,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	23,1 - 23,9		454,8 ± 29,8 <sup>a</sup>	380,5 - 528,7	
	<b>Média</b>	<b>25,2 ± 1,8</b>			<b>435,8 ± 26,9</b>		
4b	A	26,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	24,7 - 28,1	29,74	355,1 ± 23,7 <sup>b</sup>	296,2 - 414,0	371,75
	B	27,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	24,1 - 30,7		421,4 ± 26,0 <sup>a</sup>	356,8 - 486,0	
	C	22,2 ± 1,4 <sup>b</sup>	18,7 - 25,7		402,0 ± 8,3 <sup>ab</sup>	381,4 - 422,6	
	<b>Média</b>	<b>25,3 ± 2,8</b>			<b>392,8 ± 34,1</b>		
5 <sup>a</sup>	A	30,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	29,4 - 31,8	32,5	419,6 ± 27,5 <sup>ab</sup>	351,3 - 487,9	400
	B	28,8 ± 2,6 <sup>ab</sup>	22,4 - 35,2		467,7 ± 34,5 <sup>a</sup>	381,9 - 553,5	
	C	25,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	22,5 - 28,6		357,5 ± 14,7 <sup>b</sup>	320,9 - 394,1	
	<b>Média</b>	<b>28,3 ± 2,6</b>			<b>414,9 ± 55,2</b>		
5c	A	32,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	30,7 - 34,2	32,5	437,5 ± 35,1 <sup>a</sup>	350,3 - 524,7	400
	B	31,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	29,5 - 32,5		452,4 ± 28,5 <sup>a</sup>	381,6 - 523,2	
	C	25,8 ± 1,3 <sup>b</sup>	22,6 - 29,0		411,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	410,0 - 413,3	
	<b>Média</b>	<b>29,8 ± 3,5</b>			<b>433,8 ± 20,6</b>		
6	A	33,0 ± 1,3 <sup>a</sup>	29,9 - 36,2	32	414,0 ± 9,6 <sup>b</sup>	390,1 - 437,9	400
	B	32,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	29,5 - 35,9		476,1 ± 11,5 <sup>a</sup>	447,5 - 504,6	
	C	24,0 ± 1,2 <sup>b</sup>	20,9 - 27,0		434,3 ± 8,5 <sup>b</sup>	413,1 - 455,5	
	<b>Média</b>	<b>29,9 ± 5,1</b>			<b>441,4 ± 31,6</b>		
7	A	23,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	22,0 - 25,1	30,77	307,6 ± 21,6 <sup>b</sup>	254,0 - 361,2	384,62
	B	30,4 ± 2,5 <sup>a</sup>	24,2 - 36,6	32	440,0 ± 23,7 <sup>a</sup>	381,3 - 498,8	400
	C	19,7 ± 1,0 <sup>b</sup>	17,1 - 22,2	30,77	307,5 ± 3,4 <sup>b</sup>	299,1 - 315,9	384,62
	<b>Média</b>	<b>24,5 ± 5,4</b>			<b>351,7 ± 76,5</b>		
8	A	24,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	22,1 - 26,3	32	285,6 ± 15,7 <sup>b</sup>	246,5 - 324,6	400
	B	21,2 ± 1,3 <sup>ab</sup>	17,9 - 24,6		347,0 ± 22,6 <sup>ab</sup>	290,9 - 403,10	
	C	20,5 ± 1,7 <sup>b</sup>	16,2 - 24,8		382,0 ± 39,4 <sup>a</sup>	284,0 - 480,0	
	<b>Média</b>	<b>22,0 ± 2,0</b>			<b>338,2 ± 48,8</b>		

9	A	29,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	28,2 – 31,3	34,57	402,8 ± 24,9 <sup>ab</sup>	341,0 – 464,5	400
	B	26,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	26,2 – 27,7		373,3 ± 12,2 <sup>b</sup>	343,0 – 403,6	
	C	24,8 ± 1,0 <sup>c</sup>	22,4 – 27,2	35	443,9 ± 22,6 <sup>a</sup>	387,7 – 500,0	
	<b>Média</b>	<b>27,2 ± 2,5</b>			<b>406,6 ± 35,5</b>		
10	A	28,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	26,6 – 30,3	34,8	362,7 ± 5,5 <sup>c</sup>	349,2 – 376,3	400
	B	22,0 ± 1,6 <sup>b</sup>	18,0 – 26,0		333,2 ± 5,4 <sup>b</sup>	319,8 – 346,6	
	C	27,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	26,4 – 27,5	453,1 ± 8,8 <sup>a</sup>	431,3 – 475,0		
	<b>Média</b>	<b>25,8 ± 3,4</b>			<b>383,0 ± 62,5</b>		
11	A	29,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	27,2 – 32,1	32	404,3 ± 31,2 <sup>a</sup>	326,8 – 481,8	400
	B	30,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	29,4 – 31,1		471,6 ± 37,1 <sup>a</sup>	379,4 – 563,7	
	C	25,6 ± 1,4 <sup>b</sup>	22,2 – 29,1	461,6 ± 25,0 <sup>a</sup>	399,5 – 523,7		
	<b>Média</b>	<b>28,5 ± 2,5</b>			<b>445,8 ± 36,3</b>		
12 <sup>a</sup>	A	28,6 ± 3,4 <sup>a</sup>	20,3 – 37,0	32	395,0 ± 9,6 <sup>b</sup>	371,1 – 418,9	400
	B	25,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	21,9 – 30,0		449,4 ± 6,3 <sup>a</sup>	433,7 – 465,2	
	C	26,6 ± 1,4 <sup>a</sup>	23,2 – 30,0	32,11	445,7 ± 28,0 <sup>a</sup>	376,2 – 515,1	
	<b>Média</b>	<b>27,1 ± 1,4</b>			<b>430,0 ± 30,4</b>		
12 <sup>b</sup>	A	28,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	25,3 – 32,4	32	381,5 ± 22,9 <sup>b</sup>	324,6 – 438,5	400
	B	25,8 ± 2,3 <sup>ab</sup>	20,2 – 31,5		369,8 ± 13,9 <sup>b</sup>	335,3 – 404,3	
	C	24,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	23,5 – 25,2	458,9 ± 21,0 <sup>a</sup>	406,8 – 511,0		
	<b>Média</b>	<b>26,3 ± 2,3</b>			<b>403,4 ± 48,4</b>		
12 <sup>c</sup>	A	34,6 ± 2,3 <sup>a</sup>	28,8 – 40,4	32	464,4 ± 8,8 <sup>a</sup>	442,6 – 486,2	400
	B	32,8 ± 3,5 <sup>a</sup>	24,0 – 41,5		475,0 ± 6,3 <sup>a</sup>	459,4 – 490,7	
	C	25,1 ± 1,5 <sup>b</sup>	21,4 – 28,7	461,8 ± 14,1 <sup>a</sup>	426,7 – 496,9		
	<b>Média</b>	<b>30,8 ± 5,1</b>			<b>467,1 ± 7,0</b>		
13	A	34,0 ± 2,9 <sup>a</sup>	26,9 – 41,1	35	387,6 ± 20,2 <sup>a</sup>	337,3 – 437,8	400
	B	26,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	25,0 – 28,1		371,8 ± 3,9 <sup>a</sup>	362,1 – 381,5	
	C	30,3 ± 1,6 <sup>ab</sup>	26,3 – 34,3	418,3 ± 33,3 <sup>a</sup>	335,6 – 501,0		
	<b>Média</b>	<b>30,3 ± 3,7</b>			<b>392,5 ± 23,6</b>		
14	A	21,0 ± 1,3 <sup>b</sup>	17,7 – 24,3	35	304,9 ± 6,9 <sup>b</sup>	287,8 – 321,9	393,8
	B	21,8 ± 1,1 <sup>b</sup>	19,0 – 24,6		365,8 ± 28,0 <sup>a</sup>	296,1 – 435,4	
	C	27,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	26,0 – 29,3	406,6 ± 16,4 <sup>a</sup>	365,8 – 447,3	400	
	<b>Média</b>	<b>23,5 ± 3,6</b>			<b>359,1 ± 51,2</b>		
15	A	31,0 ± 2,6 <sup>a</sup>	24,6 – 37,4	31,85	358,8 ± 21,5 <sup>b</sup>	305,4 – 412,3	400
	B	31,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	30,3 – 32,4		461,0 ± 12,8 <sup>a</sup>	429,3 – 492,7	
	C	25,5 ± 1,2 <sup>b</sup>	22,5 – 28,6	189,0 ± 10,3 <sup>c</sup>	163,4 – 214,6		
	<b>Média</b>	<b>29,3 ± 3,3</b>			<b>336,3 ± 137,4</b>		
16	A	19,8 ± 1,6 <sup>ab</sup>	16,0 – 23,7	32	255,4 ± 16,8 <sup>b</sup>	213,7 – 297,1	400
	B	21,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	19,9 – 22,5		333,1 ± 14,5 <sup>a</sup>	297,0 – 369,2	
	C	18,4 ± 0,6 <sup>b</sup>	17,0 – 19,9	350,6 ± 23,4 <sup>a</sup>	292,5 – 408,7		
	<b>Média</b>	<b>19,8 ± 1,4</b>			<b>313,0 ± 50,7</b>		
17	A	32,7 ± 2,4 <sup>a</sup>	26,7 – 38,7	32	380,2 ± 14,3 <sup>b</sup>	344,6 – 415,8	400
	B	26,6 ± 1,3 <sup>b</sup>	23,5 – 29,7		453,6 ± 16,6 <sup>a</sup>	412,3 – 494,8	
	C	30,2 ± 1,6 <sup>ab</sup>	26,2 – 34,3	470,0 ± 18,0 <sup>a</sup>	425,4 – 514,6		
	<b>Média</b>	<b>29,8 ± 3,1</b>			<b>434,6 ± 47,8</b>		
18	A	24,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	23,0 – 26,5	30	384,8 ± 34,3 <sup>a</sup>	299,5 – 470,0	372,5
	B	27,5 ± 1,2 <sup>a</sup>	24,4 – 30,5		380,5 ± 3,2 <sup>a</sup>	372,7 – 388,4	

	Média	26,1 ± 1,9			382,6 ± 3,0		
19	A	31,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	28,7 – 34,3	35	375,2 ± 33,8 <sup>a</sup>	291,2 – 459,2	400
	B	30,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	28,5 – 33,3		384,2 ± 15,7 <sup>a</sup>	345,3 – 423,1	
	Média	31,2 ± 0,4			379,7 ± 6,4		
20	A	31,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	29,7 – 33,6	32	338,8 ± 14,2 <sup>b</sup>	303,6 – 373,9	400
	B	31,5 ± 1,4 <sup>a</sup>	28,1 – 34,8		430,5 ± 14,5 <sup>a</sup>	394,4 – 466,7	
	Média	31,5 ± 0,1			384,7 ± 64,9		
21	A	32,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	31,1 – 33,5	32	401,8 ± 32,1 <sup>a</sup>	322,0 – 481,5	400
	B	28,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	26,9 – 30,6		438,9 ± 2,4 <sup>a</sup>	433,0 – 444,9	
	Média	30,5 ± 2,6			420,4 ± 26,3		
22	A	32,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	30,3 – 34,2	32	400,6 ± 23,2 <sup>a</sup>	343,0 – 458,2	400
	B	16,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	14,9 – 18,5		282,0 ± 11,2 <sup>b</sup>	254,3 – 309,0	
	Média	24,5 ± 11,0			341,3 ± 83,8		

V.D: Valor declarado no rótulo (mg. 100 mL<sup>-1</sup>), a: sabor tradicional, b: zero açúcar e c: saborizada. IC (95%): Intervalo de confiança de 95%, (n=3, t<sub>2</sub>=4,303). Letras minúsculas iguais entre os lotes de uma mesma marca indicam que não há diferença significativa entre os lotes perante teste de Tukey (95% de confiança).

Com relação ao teor de cafeína presente nas 22 marcas analisadas, foi observado que o valor variou de 19,8 mg.100 mL<sup>-1</sup> a 31,5 mg.100 mL<sup>-1</sup>, sendo que a marca 16 apresentou o menor teor, o qual também foi significativamente diferente (p<0,05) do teor encontrado nas marcas 12c, 13, 19, 20, 21. Estas por sua vez não foram estatisticamente diferentes entre si.

Quanto ao teor de taurina, foi observado que o valor variou de 313,0 mg.100 mL<sup>-1</sup> a 489,4 mg.100 mL<sup>-1</sup>. Todas as marcas foram estatisticamente iguais entre si (p<0,05), com exceção da marca 1 em relação a marca 16.

Quando investigada a diferença do teor de cafeína e taurina entre os lotes, foi verificado que para a cafeína, apenas 6 marcas apresentaram igualdade estatística entre os lotes e que 16 marcas tiveram pelo menos um lote diferente dos demais. Para o teor de taurina, 9 marcas apresentaram igualdade estatística entre os lotes e 13 tiveram teor de taurina diferente em pelo menos um dos lotes.

Segundo a ANVISA, o valor declarado no rótulo das bebidas energéticas deve ser fidedigno com o teor presente na bebida, sem tolerâncias (ANVISA, 2005). Comparando o

teor de cafeína com o valor declarado no rótulo através dos valores dos intervalos de confiança, constatou-se que dentre as 22 marcas analisadas, 21 marcas apresentaram pelo menos um lote com o teor cafeína abaixo do valor declarado, sendo que destas, 9 marcas tiveram todos os lotes com os teores abaixo do declarado. Somente a marca 20 apresentou todos os lotes com as mesmas concentrações de cafeína declarada no rótulo.

Com relação ao teor de taurina, 11 marcas apresentaram pelo menos um lote com o valor abaixo do declarado no rótulo. Somente 4 marcas apresentaram todos os lotes com as mesmas concentrações de taurina declaradas no rótulo.

Segundo a ANVISA, o teor de taurina e cafeína presente em amostras deve ser abaixo do limite legal permitido, sem tolerância, sendo de 35 mg.100mL<sup>-1</sup> e 400 mg.100 mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A partir dos intervalos de confiança (95%), foi possível observar que nenhuma marca apresentou o teor de cafeína acima do limite máximo permitido. Com relação ao teor de taurina, 50% das marcas apresentaram pelo menos um lote acima do limite máximo permitido.

Resultados similares para a cafeína foram encontrados por MCCUSKER et al. (2006) utilizando cromatografia gasosa com detector nitrogênio-fósforo, e por BALLUS et al. (2012) utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar com sistema de detecção de DAD (MEKC). Os resultados obtidos neste trabalho, também foram similares aos apresentados por VOCHYANOVA et al. (2014), utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MECK) com capilar curto e sistema de dupla detecção com os detectores de condutividade por contato e fotométrico, na determinação simultânea de cafeína e taurina em bebidas energéticas.

#### 4. Conclusão

Quanto ao teor de cafeína nenhuma amostra estava acima do limite máximo permitido, por outro lado, o teor de taurina em 50% das amostras estava acima do limite máximo permitido na legislação brasileira estabelecido para bebidas energéticas. Das 73 amostras, 68% apresentaram uma quantidade de cafeína estatisticamente inferior a declarada no rótulo do produto, enquanto que para taurina apenas 19% apresentaram quantidade inferior à declarada no rótulo do produto, estando em desacordo com a legislação brasileira.

A maioria das marcas apresentou heterogeneidade no teor de cafeína e taurina entre os lotes analisados de uma mesma marca. Essas diferenças entre os lotes de uma mesma marca mostra a necessidade de um controle mais rigoroso na padronização dos ingredientes adicionados.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a Capes, Fapesp e CNPq pelo suporte financeiro.

#### 5. Referências Bibliográficas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005. Brasília: Diário Oficial da União, 23/09/2005.

ATTILA, S.; CAKIR, B. Energy-drink consumption in college students and associated factors. **Nutrition**, v. 27, n. 3, p. 316-322, 2011.

BALLUS, C.A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; BIZZOTTO, C. S.; FILHO, J.T.; GODOY, H.T. A fast and efficient method for the study of caffeine levels in energy drinks using micellar electrokinetic chromatography (MEKC). **Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 401-404, 2012.

BIZZOTO, C. S.; MEINHART, A. D.; BALLUS, C. A.; GHISELLI, G.; GODOY, H. T. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for caffeine determination in decaffeinated coffee. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 186-191, 2013.

BUXTON, C.; HAGAN, J. E. A survey of energy drinks consumption practices among student-athletes in Ghana: lessons for developing health education intervention programmes. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2012.

CANGANI, A. P.; MEINHART, A. D.; GODOY, H. T. Desenvolvimento, otimização e validação de método para determinação simultânea de cafeína e taurina em bebidas energéticas por MEKC-DAD. **Capítulo 2 – Dissertação de Mestrado**, 2015.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; RODRIGUES, S. Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n.2, p. 78-85, 2006.

CATALDI, T. R. I.; TELESCA, G.; BIANCO, G.; NARDIELLO, D. Quantitative determination of taurine in real samples by high-performance anion-exchange

chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Talanta**, v. 64, p. 626-630, 2004.

DALL'AGNOL, T. M.; SOUZA, P. F. A. Efeitos Fisiológicos Agudos da Taurina Contida em uma Bebida Energética em Indivíduos Fisicamente Ativos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, n.2, p. 123-126, 2009.

FERREIRA, M. P. L. V. O.; NUNES, M. V.; MENDES, E.; REMIÃO, F.; FERREIRA, M. A. Development of a HPLC-UV Method for Determination of Taurine in Infant Formulae and Breast Milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 20, n. 8, p. 1269-1278, 2006.

FINNEGAN, D. The health effects of stimulant drinks. **Review in British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin**, n.28, p. 147-155, 2003.

HECKMAN, M. A.; SHERRY, K.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Energy Drinks: An assessment of their market size, consumer, demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 303-317, 2010.

LAMONICA-GARCIA, V. C.; MARIN, F. A.; LERCO, F. M.; HENRY, M. A. C. A.; BURINI, R. C. Níveis plasmáticos de taurina e de seus precursores em pacientes com câncer de esôfago. **Arquivos de Gastroenterol**, v. 45, n. 3, p. 199-203, 2008.

MALINAUSKAS, B. M.; AEBY, V. G.; OVERTON, R. F.; CARPENTER-AEBY, T.; BARBER-HEIDAL, K. A survey of energy drink consumption patterns among college students. **Nutrition Journal**, v. 6, p. 1 – 7, 2007.

MCCUSKER, R. R.; GOLDBERGER, B. A.; CONE, E. J. Caffeine Content of Energy Drinks, Carbonated Sodas, and Other Beverages. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 30, p. 112-114, 2006.

NORDT, S. P.; VILKE, G. M.; CLARK, R. F.; CANTRELL, F. L.; CHAN, T. C.; GALINATO, M.; NGUYEN, V.; CASTILLO, E. M. Energy Drink Use and Adverse Effects Among Emergency Department Patients. **Journal Community Health**, n. 37, p. 976-981, 2012.

PANSANI, M. C. **Influência da deficiência de taurina no coração**. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, 2010.

PEREIRA, J. C.; SILVA, A. A.; FERNANDES E MARINS, J. C. B. Efeito da ingestão de taurina no desempenho físico: uma revisão sistemática. **Revista Andaluza de Medicina de Esporte**, v.3, n.3, p. 156-162, 2012.

POHLER, H. Caffeine Intoxication and Addiction. **The Journal for Nurse Practitioners - JNP**, v. 6, p. 49-52, 2010.

QU, F.; QI, Z.; LIU, K.; MOU, S. Ion chromatographic determination of taurine in medicine, nutrient capsule and human urine with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 730, p. 161-166, 1999.

.TRABULO, D.; MARQUES, S.; PEDROSO, E. Caffeinated energy drink intoxication. **Journal Medical Emergency**, v.28, p. 712-714, 2011.

TSITSIMPIKOU, C.; CHRISOSTOMOU, N.; PAPALEXIS, P.; TSAROUHAS, K.; TSATSAKIS, A.; JAMURTAS, A. The use of nutritional supplements among recreational athletes in Athens, Greece. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 21, n. 5, p. 377-384, 2011.

VOCHYANOVA, B.; OPEKAR, F.; TUMA, P. Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/ photometry detection. **Electrophoresis**, v. 35, p. 1660-1665, 2014.



## CONCLUSÕES GERAIS

As ferramentas estatísticas utilizadas foram eficientes para o desenvolvimento de um método de cromatografia eletrocínética micelar para a determinação simultânea de cafeína e taurina em bebidas energéticas, revelando-se um método de análise rápido e eficiente.

O método desenvolvido quando aplicado na determinação simultânea de cafeína e taurina nas 73 amostras analisadas, mostrou que a grande maioria das amostras apresentou uma quantidade de cafeína inferior à declarada no rótulo do produto e uma menor parcela apresentou uma quantidade de taurina abaixo do declarado no rótulo do produto. Com relação aos limites máximos legais, nenhuma das marcas apresentou teor de cafeína acima do limite máximo estabelecido e para o teor de taurina 50% das marcas analisadas estavam com teor acima do limite máximo permitido na legislação brasileira, estabelecida para bebidas energéticas. Assim, é sugerido que deve haver um maior controle das indústrias e da fiscalização sobre as bebidas energéticas comercializadas em São Paulo.