



# BRAGANTIA

Revista Científica do Instituto Agrônomo, Campinas

Vol. 39

Campinas, abril de 1980

Nota n.º 8

## MÉTODO DE SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS BASES PURINAS CAFEÍNA E TEOBROMINA (1)

DAYSE SOAVE SPOLADORE e JOÃO PAULO F. TEIXEIRA, *Seção de Fitoquímica, Instituto Agrônômico*

As bases purinas — cafeína e teobromina — quando se apresentam juntas em soluções-padrão ou em produtos vegetais, tornam-se de difícil separação, devido a vários fatores. A cafeína é a 1, 3, 7-trimetilxantina e a teobromina 3,7-dimetilxantina, o que torna seus pesos moleculares próximos, embora tenham características bastante diversas, como a solubilidade em água (2).

Alguns métodos de separação já foram desenvolvidos com a utilização de cromatografia de placa e de coluna. O método por cromatografia em camada delgada (3) envolve a separação em placa e a retirada do material após revelação onde é feita a determinação

de nitrogênio total pelo método Kjeldahl.

O método de cromatografia de coluna, desenvolvido por SHINGLER & CARLTON (4), utiliza como suporte o ácido silícico ( $H_2SiO_4$ ), eluindo-se os alcalóides com clorofórmio e clorofórmio com 5% de butanol, conseguindo-se com isso a separação de cafeína, teobromina e teofilina.

O estabelecimento de metodologia eficiente para a separação e determinação de alcalóides é necessária para estudos de produtos vegetais, visando principalmente à caracterização desses materiais, o que se presta tanto como base de programas de melhoramento genético envolvendo a alteração

(1) Recebida para publicação a 20 de outubro de 1979.

(2) FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed. São Paulo, 1959. 1265p.

(3) SENANAYAKE, U. M. & WIJESSEKERA, R. O. B. A rapid micromethod for the separation, identification and estimation of the purine bases: caffeine, theobromine and theophyllin. *J. Chromatography*, 32:75-86, 1968.

(4) SHINGLER, A. J. & CARLTON, J. K. Method for the separation and determination of theophyllin, theobromine and caffeine. *Analytical Chemistry*, 31(10):1679-1680, 1959.

desses compostos, como para trabalhos exploratórios buscando novas fontes vegetais de alcalóides, de grande aplicação na indústria farmacêutica.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para separação e determinação das bases purinas — cafeína e teobromina — visando à futura aplicação em estudos com amêndoas de cacau.

*Aparelhamento:* No presente trabalho, utilizou-se para separação dos alcalóides uma coluna cromatográfica que consistiu em bureta de vidro com capacidade de 100ml, diâmetro 1,5cm, empacotada com alumina básica ( $Al_2O_3$ ).

Foram pesados 60g de  $Al_2O_3$ , ao qual se adicionaram 8,18ml de água destilada (para atividade V), homogeneizada com agitação mecânica por três horas.

Na bureta, colocou-se pequena porção de lã de vidro e adicionou-se a solução de 5% de butanol em clorofórmio. A alumina recebeu adição dessa mesma solução e foi transferida para a bureta, onde se decantou sem fluxo, usando-se bastão para facilitar a remoção de bolhas de ar, assim como vibrações esporádicas para permitir a compactação da alumina. Após essa operação, deixou-se a coluna com solução de solvente, acima da superfície da alumina. A coluna, após empacotada, apresentou uma altura constante de 31,6cm.

A solução de 5% de butanol em clorofórmio foi utilizada para a eluição dos alcalóides. Empregou-se um espectrofotômetro UV-

visível, Hitachi-Perkin-Elmer mod. 139, para a leitura das frações eluídas.

*Reagentes:* Todo o clorofórmio utilizado foi lavado com água (100ml de clorofórmio para 10ml de água destilada) em funil de separação.

Para a verificação da separação dos alcalóides, foram utilizados padrões p.a. de cafeína e teobromina. Foi preparada solução padrão estoque aquosa contendo 500ppm de cada um dos dois alcalóides: a partir desta, foram feitas diluições para concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500ppm, injetados na coluna para separação e determinação.

*Método:* O procedimento adotado para operação na coluna foi o seguinte:

a) pesar 7,33g de  $Al_2O_3$  e adicionar 1ml da solução padrão de trabalho, homogeneizando com agitação mecânica até uma mistura uniforme;

b) deixar passar solvente na coluna até sua superfície se aproximar 15cm do topo da alumina e colocar papel de filtro com o diâmetro da coluna;

c) deixar passar mais solvente até próximo da superfície do papel de filtro, ficando 3cm de solvente, colocar o padrão mais alumina na coluna e solvente, agitando com bastão para remoção de bolhas de ar;

d) começar a adição da mistura de solvente, 5% de butanol em clorofórmio, para eluição, com vazão de 0,8ml/min, num total de 210ml, mantendo sempre completa

a coluna com a solução, para que não houvesse alteração do fluxo de saída;

e) o eluído foi coletado em tubos de cultura, calibrados para 5ml, sendo que o primeiro tubo utilizado recebeu 10ml do solvente eluído, sendo empregado como branco na determinação espectrofotométrica;

f) o eluído contido nos quarenta tubos foi avaliado em espectrofotômetro UV-visível, em 276,5nm;

g) as absorbâncias obtidas para cada alcalóide e concentração foram utilizadas para fazer a curva padrão de zero a 500 $\mu$ g, permitindo o cálculo da recuperação desses compostos após eluição pela coluna.

A coluna pode ser usada sem sofrer recuperação pelo menos até dez injeções de material, devendo, entretanto, ficar sempre com a solução de solventes.

Quando apareceu retardamento na saída dos picos, foi retirada a alumina da coluna, evaporado o solvente e recuperada em mufla por doze horas, a 800°C, estando após esse tratamento em condições de ser utilizada novamente.

*Resultados e discussão:* Neste trabalho, inicialmente foram feitas tentativas de usar a técnica descrita por SHINGLER & CARLTON (4), para a separação das bases purinas — cafeína e teobromina — segundo trabalho de MARVEL & RANDS JR. (5), uti-

lizando ácido silícico em coluna para esse fim. Porém, a separação por esse método não se mostrou satisfatória, devido à má repetibilidade. Além desse problema, essa técnica, que utiliza ácido silícico ( $H_2SiO_4$ ) em coluna, necessita para eluição dos compostos dois sistemas de solventes, clorofórmio e, posteriormente, 5% de butanol em clorofórmio. Essa exigência do método apresenta dificuldades de operação, quando da substituição dos solventes, o que pode ser a causa da não repetibilidade verificada.

Devido a isso, optou-se pela substituição do ácido silícico da coluna por alumina básica que pode ser utilizada para a separação dos alcalóides com um só sistema de solventes, ou seja, 5% de butanol em clorofórmio.

Na figura 1 são apresentados os resultados obtidos na separação de cafeína e teobromina, usando a técnica descrita, nas concentrações de 100, 200 e 300 $\mu$ g de cada alcalóide.

Como se pode verificar pela figura 1, a separação em todas as concentrações utilizadas foi satisfatória. O mesmo ocorreu para padrões de 400 e 500 $\mu$ g de cada alcalóide. O somatório das absorbâncias verificadas para cada fração coletada foi plotado em gráfico, como mostrado na figura 2, em função da concentração utilizada.

Por essas curvas-padrão, pode-se avaliar que na faixa de concentração utilizada, 0 a 500 $\mu$ g,

(5) MARVEL, C. S. & RANDS JR., R. D. Separation of organic acids. J. Am Chem. Soc., 72:2642-2646, 1950.

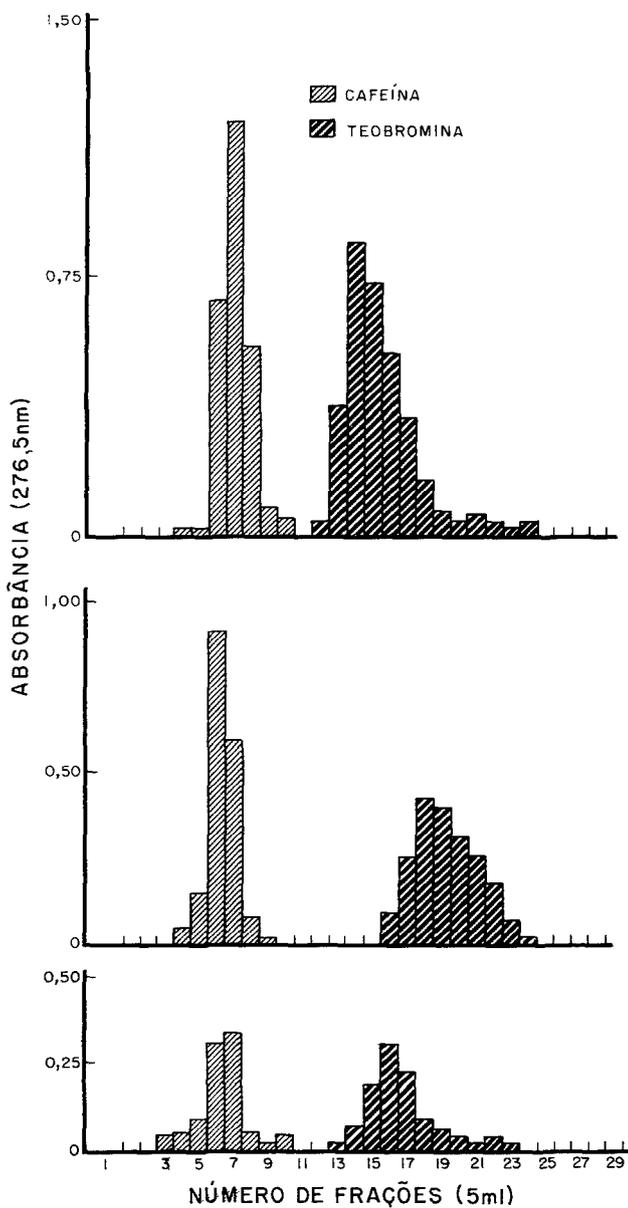


Figura 1. - Separação de cafeína e teobromina obtida em coluna com alumina básica como suporte e 5% de butanol em clorofórmio como eluente a partir de soluções contendo 100, 200 e 300 µg de cada alcalóide.

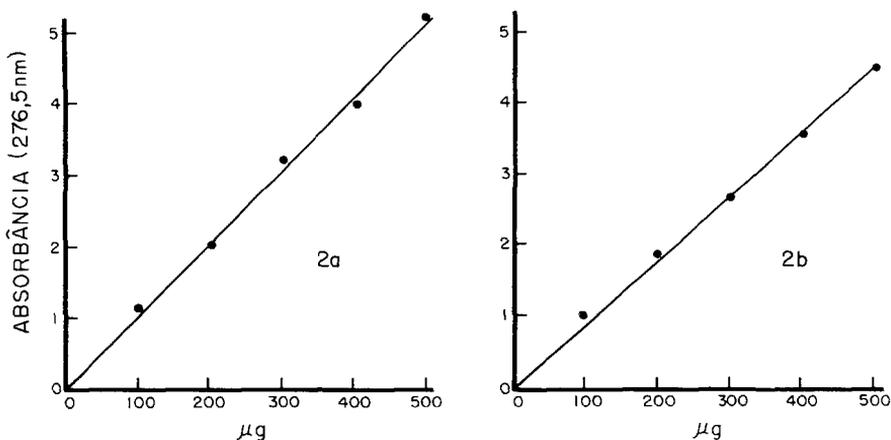


Figura 2. - Curvas-padrão de teobromina (2a) e cafeína (2b), obtidas após eluição pela coluna de alumina básica com 5% de butanol em clorofórmio como eluente, nas concentrações de 0 a 500  $\mu\text{g}$  de cada alcalóide.

há obediência à lei de Beer, permitindo a determinação quantitativa dos alcalóides eluídos na coluna.

Baseando-se nessas curvas, foi calculada a determinação quantitativa dos alcalóides separados na coluna. Esses dados e os da

recuperação obtida, que constam do quadro 1, mostram que a recuperação que se conseguiu utilizando a técnica ora proposta foi satisfatória, permitindo que essa metodologia seja utilizada para separação e determinação de alcalóides em solução.

QUADRO 1. — Resultados quantitativos obtidos após eluição com 5% de butanol em clorofórmio de cafeína e teobromina em coluna cromatográfica com alumina básica (atividade V) como suporte

Quantidade injetada	Cafeína		Teobromina	
	Quantidade obtida	Recuperação	Quantidade obtida	Recuperação
$\mu\text{g}$	$\mu\text{g}$	%	$\mu\text{g}$	%
100	95,85	95,85	111,94	111,94
200	190,32	95,16	181,08	90,54
300	290,78	96,93	297,98	99,33
400	375,59	93,90	371,07	92,77
500	475,09	95,02	474,56	95,91

Para verificação da efetividade da metodologia estudada na separação e determinação de alcalóides em produtos vegetais, efetuou-se a separação, por essa técnica, dos alcalóides presentes em amêndoas fermentadas de cacau, os quais foram extraídos segundo

MELO et alii (6), com a utilização de óxido de magnésio (MgO) "pesado".

A figura 3 apresenta a separação obtida, mostrando que é viável a aplicação da metodologia descrita nesse trabalho para produtos vegetais.

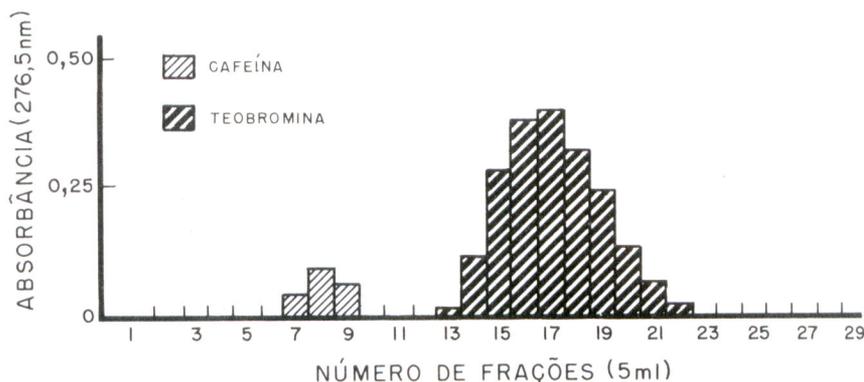


Figura 3. - Separação de cafeína e teobromina ...

#### A METHOD FOR THE SEPARATION AND DETERMINATION OF THE PURINE BASES: CAFFEINE AND THEOBROMINE

##### SUMMARY

A method for separation and determination of caffeine and theobromine in plant material by chromatographic column is presented.

The alkaloids were extracted from the plant material (cocoa bean) by MgO powder, and separated in chromatographic column using alumina ( $Al_2O_3$ ) as support and the solvent was 5% butanol in water washed chloroform. The compound present in the effluent was determined by spectrophotometry at 276.5nm.

The results obtained were considered satisfactory for both, standard and plant material alkaloids solutions.

(6) MELO, M.; CARVALHO, A. & MONACO, L. C. Contribuição do porta-enxerto, no teor de cafeína em grãos de café. *Bragantia*, Campinas, 35:55-61, 1976.