



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO 2



KEVEN DOS SANTOS FRAGOSO

**QUANTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA EM BEBIDAS ENERGÉTICAS POR  
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR QUANTITATIVA DE  $^1\text{H}$**

BRASÍLIA – DF

2º 2023

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO**  
**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO 2**

KEVEN DOS SANTOS FRAGOSO

**QUANTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA EM BEBIDAS ENERGÉTICAS POR  
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR QUANTITATIVA DE  $^1\text{H}$**

**Trabalho de Conclusão de Curso 2  
apresentado Instituto de Química da  
Universidade de Brasília como  
requisito parcial para conclusão do  
curso de Bacharelado em Química**

**Orientador: Profa. Dra. Aline Lima de  
Oliveira Paterno**

BRASÍLIA – DF

2º 2023

Aos meus pais, irmãos e amigos pelo amor, carinho e apoio

Se eu só fizer o que eu sei,  
Nunca serei mais do que já sou  
(Autor desconhecido)

## **AGRADECIMENTOS**

**Á Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Lima de Oliveira Paterno, pela orientação, ensinamentos e a oportunidade para a realização deste trabalho. As horas dedicadas para a correção dos meus erros e ao meu aprendizado.**

**Ao Dr. Luiz Eduardo Celino Benedito pela paciência na hora de realizar os experimentos bem como o conhecimento compartilhado comigo.**

**A Amanda Meloto Sachetti por me aturar respondendo várias dúvidas que eu tive ao longo do processo.**

**Aos professores que tive ao longo da graduação pelos ensinamentos e aprendizados transmitidos a mim.**

**A minha família pelo apoio e suporte oferecido nestes cinco longos anos, pois sem este eu não estaria chegando neste momento.**

**Aos meus amigos próximos que sempre que tiveram a oportunidade diziam que eu nasci para me tornar um químico.**

**Aos meus amigos e colegas que adquiri ao decorrer do curso. Sem vocês eu não teria chegado ao final ainda com um sorriso no rosto.**

**E principalmente as vozes na minha cabeça que me forneceram piadas e motivações ao decorrer de tudo.**

## RESUMO

O consumo de cafeína é muito popular em nossa sociedade, uma vez que ela é capaz de proporcionar benefícios no organismo humano, como o aumento da performance física, na redução da fadiga e no aumento de estado de alerta. Em busca desse estímulo advindo da absorção da cafeína no organismo, o consumo de bebidas energéticas tem aumentado. Contudo, o uso excessivo de cafeína também pode acarretar sérios problemas de saúde. Assim, estudos que envolvam análise e quantificação deste composto se fazem necessários para controle da quantidade de cafeína que o indivíduo está ingerindo. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) apresenta algumas vantagens na análise quantitativa de substâncias, como não precisar de um padrão de referência, fácil preparo de amostra e curto tempo de análise e foi incluída nas farmacopeias de vários países. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de cafeína em bebidas energéticas através de espectroscopia de RMNq de  $^1\text{H}$  a fim de verificar se os níveis desse composto estão de acordo com a norma brasileira e com o descrito no rótulo. Os resultados obtidos mostram que é possível identificar e quantificar a cafeína presente em bebidas energéticas e, portanto, em uma mistura com uma matriz complexa. As concentrações de cafeína obtidas das amostras analisadas estão abaixo do estipulado pela ANVISA e 4 das marcas estudadas apresentaram um teor de cafeína abaixo do descrito no rótulo. Além disso, também foi possível identificar e quantificar outras 8 substâncias presentes nas amostras analisadas (taurina, niacina, sacarose,  $\alpha$ - e  $\beta$ -glicose, etanol, citrato de sódio e o ácido benzoico).

Palavras-chave: cafeína, bebidas energéticas, RMNq.

## ABSTRACT

Caffeine consumption is very popular in our society, as it can provide benefits to the human body, such as increasing physical performance, reducing fatigue, and increasing alertness. In search of this stimulus resulting from the absorption of caffeine in the body, the consumption of energy drinks has increased. However, excessive use of caffeine can also cause serious health problems. Therefore, studies that involve analysis and quantification of this compound are necessary to control the amount of caffeine that the individual is ingesting. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has some advantages in the quantitative analysis of substances, such as not needing a reference standard, easy sample preparation and short analysis time and has been included in the pharmacopoeias of several countries. In this context, the objective of this work was to determine the concentration of caffeine in energy drinks through  $^1\text{H}$  qNMR spectroscopy in order to verify whether the levels of this compound are in accordance with the Brazilian standard and what is described on the label. The results obtained show that it is possible to identify and quantify the caffeine present in energy drinks and, therefore, in a mixture with a complex matrix. The caffeine concentrations obtained from the analyzed samples are below that stipulated by ANVISA and 4 of the drinks studied had a caffeine content below that described on the label. Furthermore, it was also possible to identify and quantify 8 other substances present in the analyzed samples (taurine, niacin, sucrose,  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucose, ethanol, sodium citrate and benzoic acid).

Keywords: caffeine, energy drinks, qNMR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da cafeína -----	3
Figura 2 – Os dois estados de spin permitidos para um próton -----	11
Figura 3 – Energia associada aos estados de spin de um próton na ausência e na presença de um campo magnético. -----	12
Figura 4 - Processo de ressonância magnética nuclear. -----	12
Figura 5 - Espectro de $^1\text{H}$ do padrão dimetilsulfona (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ). -----	19
Figura 6 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) da bebida energética 01 a $25^\circ\text{C}$ . Espectros (A) com a supressão do sinal da água e (B) sem a supressão do sinal da água. -----	21
Figura 7 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da cafeína pura à $25^\circ\text{C}$ . -----	23
Figura 8 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de cafeína pura à $25^\circ\text{C}$ . -----	23
Figura 9 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca 01 a $25^\circ\text{C}$ . -----	25
Figura 10 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca 01 a $25^\circ\text{C}$ . --	25
Figura 11 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca 01 a $25^\circ\text{C}$ . -----	26
Figura 12 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca 01 a $25^\circ\text{C}$ . -----	27
Figura 13 - Estrutura química da taurina. -----	29
Figura 14 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) das amostras 01 e 02. -	30
Figura 15 - Estrutura da niacina. -----	31
Figura 16 – Expansão de espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) da amostra 01. -----	32
Figura 17 –Expansão do espectro de $^1\text{H}$ (600MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ da amostra 01: sinais não sobrepostos de açúcares) -----	34
Figura 18 - Estrutura química da sacarose. -----	35

Figura 19 - Estrutura química da $\alpha$ – glicose. -----	36
Figura 20 - Estrutura química da $\beta$ – glicose. -----	37
Figura 21 - Comparação de espectros de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) das amostras 01 e 02. -----	38
Figura 22 - Estrutura química do citrato de sódio. -----	40
Figura 23 - Espectro de $^1\text{H}$ ampliado no sinal do citrato de sódio (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ). -----	40
Figura 24 – Estrutura química do ácido benzoico. -----	42
Figura 25 - Espectros de $^1\text{H}$ (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) das amostras. -----	43
Figura 26 - Espectros de $^1\text{H}$ (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) ampliado no sinal da cafeína usado na quantificação. -----	45
Figura 27 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) ampliado da marca 01 e 02 no sinal da taurina usado na quantificação. -----	48



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação das amostras analisadas. -----	17
Tabela 2 - Atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da cafeína em $\text{CDCl}_3$ . -----	24
Tabela 3 - Atribuição dos sinais: deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , multiplicidade e integral da cafeína da amostra 01. -----	28
Tabela 4 - Atribuição dos sinais: deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , multiplicidade e integral referentes a taurina da amostra 01. -----	30
Tabela 5 - Atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , constante de acoplamentos, multiplicidade e integral referentes a molécula da niacina. -----	32
Tabela 6 - Atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , constante de acoplamentos, multiplicidade e integral referentes a molécula da sacarose. -----	35
Tabela 7 - Atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , constante de acoplamentos, multiplicidade e integral referentes a molécula da $\alpha$ – glicose. -----	36
Tabela 8 - Atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , constante de acoplamentos, multiplicidade e integral referentes a molécula da $\beta$ – glicose. -----	37
Tabela 9 - Atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , constante de acoplamentos, multiplicidade e integral referentes a molécula de etanol. -----	39
Tabela 10 - Atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , constante de acoplamentos, multiplicidade e integral referentes a molécula de citrato de sódio. -----	41
Tabela 11 – Atribuição dos sinais de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , constante de acoplamentos, multiplicidade e integral referentes a molécula de ácido benzoico. -----	43
Tabela 12 – Concentração de Cafeína nas amostras de bebidas energéticas. -----	46
Tabela 13 - Concentração de Taurina nas amostras de bebidas energéticas. -----	48
Tabela 14 - Concentração de niacina nas amostras de bebidas energéticas. -----	50
Tabela 15 - Concentração de sacarose nas amostras de bebidas energéticas. -----	51
Tabela 16 - Concentração de $\alpha$ – glicose nas amostras de bebidas energéticas. ---	52

Tabela 17 - Concentração de $\beta$ – glicose nas amostras de bebidas energéticas. ----	52
Tabela 18 - Concentração de açúcares nas amostras de bebidas energéticas. -----	53
Tabela 19 - Concentração de etanol nas amostras. -----	54
Tabela 20 - Concentração de citrato de sódio nas amostras de bebidas energéticas. - -----	55
Tabela 21 – Concentração de ácido benzoico nas amostras. -----	56

## LISTA DE ABREVIações E ACRÔNIMOS

AMPC – Adenosina 3,5-monofosfato cíclico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

d – Duplet ERECT – Eletronic Reference To Access in Vivo Concentration

GABAA – Receptor de ácido gama-aminobutírico

GABA – Ácido gama-aminobutírico

HMBC – Heteronuclear multiple bond correlation

HSQC – Heteronuclear single quantum coherence

IDR – Ingestão diária recomendada

IV – Infravermelho

NOE – Efeito nuclear overhauser

RMN – Ressonância magnética nuclear

P90 – Pulso de 90°

PULCON – Pulse Length Based Concentration Determination

MNq – Ressonância magnética nuclear quantitativa

s – Simpleto

t – Tripleto

TSP – Sal de sódio do ácido trimetilsililpropanóico – d4

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1. Cafeína.....	2
2.2. Bebidas energéticas.....	6
2.3. Ressonância Magnética Nuclear .....	10
2.3.1 Ressonância Magnética Nuclear quantitativa .....	12
3. OBJETIVOS .....	15
3.1. Objetivo geral .....	15
3.2. Objetivo específico .....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. Materiais .....	16
4.2. Preparo da amostra .....	16
4.3. Análise por RMN.....	17
4.4. Quantificação dos espectros .....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	20
5.1. Análise dos espectros.....	20
5.1.1.Cafeína pura .....	21
5.1.2.Cafeína em bebidas energéticas.....	23
5.1.3.Identificação de outras substâncias .....	28
5.2. Quantificação de cafeína das amostras comerciais.....	43
5.3. Quantificação simultânea de outras substâncias. ....	45
6. CONCLUSÕES .....	57
7. REFERÊNCIAS .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

A cafeína é uma xantina encontrada em diversas fontes naturais, particularmente em grãos de café, podendo ser extraída por maceração ou infusão. A cafeína extraída pode ser usada tanto para fins medicinais quanto para recreação. Ela atua diretamente no corpo humano, sendo capaz de acelerar o metabolismo, diminuir o estado de sonolência, melhorar o desempenho em atividades físicas, etc. Porém, seu uso também pode causar insônias, variações da frequência cardíaca, entre outros malefícios. Entre os fatores que afetam a absorção da cafeína estão a idade, o peso, o sexo, entre outros (Rodrigues et al., 2021).

A crescente popularidade da cafeína transformou significativamente o consumo de bebidas estimulantes, que tem sido largamente feito por jovens e adultos. O consumo exacerbado de bebidas energéticas tem gerado uma importante discussão no mundo devido às inúmeras preocupações causadas pelo risco associado ao seu uso (Teng, 2019). O maior risco ao consumir este tipo de bebida está associado aos efeitos da cafeína. Vale ressaltar que a quantidade permitida por lata de energético é de 35 mg de cafeína em 100 mL de energético. Assim, em uma lata com a capacidade de 473 mL de energético, há cerca de 165 mg de cafeína. Esta quantidade, se somada com outras latas de energéticos ou até mesmo com xícaras de café, pode resultar em sérios riscos à saúde. A estimativa de dose letal associada ao uso de cafeína é de 10 g (Higgins, 2018; Chen, 2023).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade de cafeína em bebidas energéticas através de espectroscopia de RMN a fim de verificar se os níveis desse composto estão de acordo com a norma brasileira e com o descrito nos rótulos. Foi utilizado o método PULCON, no qual utiliza uma comparação entre dois sinais pertencentes um à amostra e um ao padrão externo. Além disso, esse trabalho identificou diversos compostos presentes nas matrizes das amostras além da cafeína com o auxílio dos espectros de RMN 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e 2D (HSQC e HMBC). A comparação com espectros de banco de dados teve importância para a elucidação dos analitos presentes nas amostras..

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cafeína

A cafeína (Figura 1) é uma xantina natural identificada como 1,3,7-trimetilxantina. Sua fórmula química é  $C_8H_{10}N_4O_2$  e sua massa molecular é de 194,19 g/mol. Em sua estrutura, podemos observar a presença de três metilas e podemos notar dois ciclos fundidos com quatro heteroátomos de nitrogênio (Figura1). A cafeína, na sua forma pura, apresenta-se como uma substância cristalina, branca e amarga. É solúvel em água e em solventes orgânicos como clorofórmio e etanol e possui hidrofobicidade suficiente para atravessar as membranas biológicas. Sua densidade a 25 °C é de 1,23 g/cm<sup>3</sup>, seu ponto de fusão é de 236 °C.

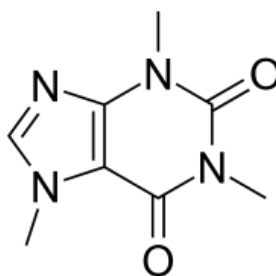


Figura 1 – Estrutura da cafeína

A cafeína é uma substância química usada desde os tempos antigos para se manter em alerta. Embora essa substância seja utilizada há muito tempo, ela foi isolada apenas em 1820 e sua estrutura foi finalmente estabelecida no final dessa década. Suas propriedades estimulantes foram reconhecidas apenas 1981, quando o bloqueio de receptores de adenosina foi correlacionado às propriedades estimulantes da cafeína e dos seus análogos por Snyder (1981), em estudos envolvendo camudongos. Esse efeito ocorre por meio do bloqueio de receptores de adenosina. A adenosina possui um efeito inibidor da atividade neural e a cafeína pode se ligar aos seus receptores, bloqueando-os e, assim, atuando de maneira antagônica por meio da ativação do sistema nervoso central. (Rahimi et al., 2023; Wichmann, 2009; Alves et al., 2009; Snyder, 1981)

Além de bloquear os receptores de adenosina, a cafeína pode atuar inibindo a fosfodiesterase, aumentando o efeito e a duração de ação do AMPc intracelular. A cafeína também atua nos canais receptores de cálcio, sendo necessárias concentrações milimolares de cafeína para ativar os canais de liberação de cálcio no meio intracelular. A cafeína pode interagir com os receptores de GABA<sub>A</sub>, mas é necessário uma concentração superior obtida em uma dieta normal, concentração capaz de agir como antagonista nos locais de ação dos benzoazepínicos, ou seja, bloqueando os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibidor do cérebro. (Rahimi, 2023 ; Song, 2023)

Apesar da cafeína trazer consigo diversos benefícios como os citados anteriormente, esta classe de xantina normalmente possui um amplo espectro de atividades biológicas capazes de atuar tanto nos sistemas nervoso central, cardiovascular e em tecido liso (Greer et al., 2006). Assim, a cafeína parece ser segura quando ingerida em quantidades modestas, mas o consumo excessivo deve ser evitado para evitar efeitos negativos (Song, 2023; Ribeiro e Sebastião 2010). O consumo de cafeína em doses entre 150-300 mg ao dia, o que representa cerca de 3-5 doses de café, pode levar rapidamente ao desenvolvimento de uma alta tolerância a seus efeitos.

Entre as adversidades provenientes de seu uso estão a perturbação do sono, tolerância aos efeitos subjetivos da cafeína, sintomas de abstinência, incapacidade de concentração, dor de cabeça, irritabilidade, sonolência e em alguns casos insônia e dores no estômago, em parte superior do corpo e articulações. Pessoas que fazem uso constante e em doses grandes podem levar ao desenvolvimento de uma síndrome chamada cafeísmo. Cafeísmo é o vício em cafeína, que causa dependência juntamente com várias condições físicas e mentais que não são benéficas para o ser humano. Entre estas condições estão o nervosismo, irritabilidade, ansiedade, tremores, espasmos musculares, hiperreflexia, insônia, dores de cabeça, alcalose respiratória e palpitações cardíacas (Ribeiro e Sebastião 2010).

É importante lembrar que a interrupção brusca do consumo de cafeína pode levar a sintomas de abstinência como dor de cabeça, fadiga, fraqueza, sonolência, irritabilidade, concentração diminuída, ansiedade, entre outros. Por isso, é recomendado reduzir gradualmente o consumo ao invés de parar o consumo abruptamente. (Song, 2023).

Apesar de ser uma substância lícita, a cafeína produz efeitos subjetivos que são qualitativamente similares aos psicoestimulantes clássicos, como a cocaína e anfetamina, principalmente a ativação motora, excitação e efeitos de reforço. Apesar de ter efeitos similares, a cafeína tem uma eficácia de reforço mais fraca se comparada com os psicoestimulantes clássicos (Song, 2023). Além disso, a predisposição genética individual para o desenvolvimento de determinadas doenças, o estilo de vida do indivíduo, o uso de cafeína com outras substâncias (juntamente ao álcool ou com tabaco) poderão influenciar diretamente nos efeitos da cafeína e também na saúde do consumidor (Alves et al., 2009).

Há algum tempo a cafeína também é considerada uma substância ergogênica, ou seja, uma substância capaz de melhorar a performance tanto das atividades físicas quanto ocupacionais. (Giraldez-Costas et al., 2023) Um dos problemas de se fazer o uso de cafeína constante para realizar alguma atividade é o desenvolvimento de uma crença de que apenas a cafeína pode trazer as condições necessárias para realizar a tarefa. Um exemplo clássico é o de estudantes que consomem café ao estudar e tendem a achar que apenas conseguem estudar se estiverem sobre o efeito da cafeína. Um estudo na cidade de Montes Claros – MG indicou que de 348 estudantes entrevistados, 63,5% faziam o uso de cafeína como estimulante. Nesse mesmo estudo, 64,9% dos estudantes relataram uma redução do sono (Santana, 2020).

A bebida mais popular que contém este composto é o café, que é a terceira bebida mais consumida no mundo, atrás apenas da água e do chá. A cafeína também pode ser encontrada em algumas folhas de chá, como o chá-verde (*Camilla sinensis*) e a erva mate (*Ilex paraguayensis*), em grãos de cacau, nozes de cola e outras plantas. Estima-se que ela está presente em mais de 60 espécies de plantas (Chen, 2023; Song, 2023). A quantidade de cafeína presente nos alimentos não é algo absoluto, podendo variar de acordo com a espécie da planta, o tipo de grão de café, cacau ou folha de chá, a localização geográfica, o clima e as práticas culturais. A quantidade de cafeína consumida também pode variar dependendo do método de preparo, seja da bebida ou da comida. Dessa forma, a quantidade de cafeína em uma xícara de café pode variar entre 47 e 134 mg (Tavares e Sakata, 2012).

Muitas pessoas não sabem a quantidade de cafeína que consomem diariamente e tampouco as consequências advindas do seu uso. A causa disto pode estar relacionada com a falta de atenção ao consumir o alimento sem nem ao menos ler o



rótulo onde está especificado o teor da cafeína e de seus outros componentes. Além disso, o consumo da cafeína não se limita a comidas e bebidas, podendo ser encontrada também em medicamentos. Como no Brasil é comum a venda de medicamentos em farmácias sem prescrição médica, o indivíduo consome cafeína sem se preocupar com a dose associada ao medicamento. Isso pode acarretar no risco contínuo de doses tóxicas, se consumido juntamente com alimentos ricos em cafeína (Lopes et al., 2013).

Quando uma pessoa consome qualquer substância ela é digerida e metabolizada (totalmente ou parcialmente) pelo corpo humano, podendo ser expelida sem sofrer nenhuma alteração. Quando ingerida, a cafeína é completamente absorvida no trato gastrointestinal e liberada na corrente sanguínea. Como ela solubiliza facilmente em água ela é espalhada rapidamente pelo corpo. (Song, 2023)

A metabolização da cafeína pode variar dependendo de alguns fatores, por exemplo a idade. Um adulto consegue metabolizar quase toda a quantidade ingerida, sendo apenas de 1 a 5% excretados pela urina. Já uma criança com idade próxima a 9 meses não consegue metabolizar a cafeína, expelindo aproximadamente 85% da quantidade ingerida (Song, 2023 ; Tavares e Sakata, 2013; Alves et al., 2009). A meia-vida de eliminação da cafeína em um adulto varia entre 3 e 7 horas, podendo ser influenciada por fatores como sexo, idade, uso de contraceptivos orais, gravidez e tabagismo. Em pessoas que não fazem uso recorrente, a cafeína apresenta uma meia vida superior quando comparada aos consumidores frequentes, podendo demorar duas vezes mais tempo para ser eliminada, o que explica o motivo destas pessoas sentirem mais os efeitos da cafeína e apresentarem maior facilidade para intoxicações (Song, 2023; Tavares e Sakata, 2013).

Biologicamente, um ser humano é capaz de digerir quantidades limitadas de substâncias e para a cafeína não é diferente, sendo a dose letal estimada em 10 g/pessoa. Há um caso relatado de uma pessoa adulta que veio a óbito após ingerir 6,5 g de cafeína, porém também existe um relato de um indivíduo que suspostamente consumiu 24 g de cafeína mas continuou vivo (Nawrot et al., 2003; Daly, 2007; Tavares e Sakata, 2013).

## 2.2. Bebidas energéticas

Bebidas energéticas são definidas pela ANVISA como um composto líquido pronto para o consumo. É um produto que contém ou não como ingrediente(s) principal(is): Inositol, glucoronolactona, taurina, e cafeína, podendo ser adicionado de vitaminas ou minerais até 100% da ingestão diária recomendada (IDR) na porção do produto. Outro(s) ingrediente(s) pode(m) ser adicionado(s), desde que não descaracterize(m) o produto. Segundo a Anvisa, uma bebida energética pode ter no máximo 35 mg/100 mL de cafeína em sua composição, sendo que este valor deve estar contido na lista de ingredientes (ANVISA, 2005). Conforme dados do Euromonitor, em 2021, o setor global de bebidas energéticas atingiu expressivos 14 bilhões de litros em volume de vendas, registrando um valor total de US\$ 60 bilhões em transações comerciais. Esses dados destacam a significativa presença e importância econômica desse mercado em escala mundial. O crescimento contínuo e a considerável movimentação financeira ressaltam a robustez e o interesse constante dos consumidores por produtos energéticos, consolidando a indústria como uma componente relevante do cenário global de bebidas. Essas estatísticas refletem não apenas o volume expressivo de consumo, mas também a dimensão econômica desse segmento, evidenciando oportunidades e desafios para as empresas que atuam nesse ramo.

As bebidas energéticas apareceram pela primeira vez na Europa e na Ásia, na década de 1960, sendo os produtos que mais crescem na indústria de bebidas. Estão sendo consumidas cada vez mais por jovens e adultos, até mesmo crianças estão fazendo o uso destes tipos de bebidas. Energéticos são capazes de incrementar a resistência física, proporcionar reações mais rápidas e maior concentração, aumentar o estado de alerta mental, evitar o sono, proporcionar sensação de bem-estar, estimular o metabolismo e ajudar a eliminar substâncias nocivas ao corpo. É importante consumir este tipo de bebida de forma equilibrada e consciente para que se mantenha um estilo de vida saudável. Normalmente, se consumido sem exagero, uma porção de energético possui os mesmos efeitos que outras bebidas cafeinadas (Nadeem et al., 2021; Cadoni, 2023).

A fonte de cafeína para bebidas energéticas normalmente é oriunda da noz de cola, guaraná ou a cafeína que é derivada e purificada com a descafeinação do café. Apesar dos energéticos terem composição diversificada, os riscos associados a estas

bebidas são relacionados à ingestão de doses contínuas dessa bebida, que contém altos níveis de cafeína e podem causar uma intoxicação (Cadoni, 2023; Lee, 2006).

Normalmente, as bebidas energéticas são consumidas por adultos abaixo dos 30 anos. Um dos fatores que ajudam para o sucesso deste gênero de bebidas é o fato dela ser apresentada como um meio natural para aumentar a energia (Protano, 2023). Além disso, o consumo dos energéticos com álcool é cada vez mais frequente entre a população juvenil. Muitas pessoas assumem de forma errada que a cafeína presente nos energéticos anula os efeitos do álcool. Na verdade, a quantidade de álcool no sangue não é afetada pela cafeína. Quando os efeitos da cafeína se dispersam, os efeitos do álcool voltam à tona. De fato, essa combinação pode acarretar uma série de transtornos como convulsões, arritmias e em casos extremos levar à morte súbita (Protano, 2023; Lee, 2006).

Porém, existem relatos que mostram os efeitos prejudiciais das bebidas energéticas. Por exemplo, o pesquisador Tim Berigan (2005) fez um relato de um caso em que um homem de 25 anos reclamou de sintomas de ansiedade, inquietação, irritabilidade, dificuldades de concentração e problemas para adormecer. No seu dia a dia não havia nada que explicasse tais sintomas, tampouco em seus exames médicos. Ele havia dito que consumia de 6 a 8 latas de bebidas energéticas por dia, nos últimos quatro meses, antes de procurar ajuda. Após o paciente não fazer mais o uso diário e contínuo de bebidas energéticas, os sintomas sentidos por ele pararam completamente.

O uso de bebidas energéticas é bem aceito por praticantes de atividades físicas. Atletas em geral, e principalmente os que praticam esportes de alta competitividade, sempre se mostram interessados em produtos que prometem melhorar o rendimento ou aumentar a capacidade de recuperação (Protano, 2023). Um estudo feito com estudantes em uma faculdade na Argentina mostrou que a maioria dos entrevistados fazem o uso de bebidas energéticas para fins recreativos, e não para obter uma melhor performance em atividades físicas. Os estudantes revelaram que as ocasiões nas quais ingeriam energéticos eram para poder aproveitar bares e festas por toda a noite e também para melhorar o sabor das bebidas alcoólicas (Ballistreri et al., 2008).

Os pesquisadores Wolk, Ganetsky e Babu (2012) sugerem que a ingestão de cafeína, especialmente na forma de bebidas energéticas, pode ter efeitos expressivos

no que diz respeito à saúde cardiovascular, incluindo o risco de arritmias e hipertensão. Além dos estudos desenvolvidos por estes três pesquisadores, Worthley (2010) descobriu que o consumo do mesmo tipo de bebida também pode causar um aumento significativo na agregação plaquetária e na pressão arterial média e uma diminuição significativa na função endotelial. Mas é importante frisar que estes estudos têm limitações e faz com que mais pesquisas sejam imprescindíveis para entender completamente a extensão dos efeitos cardiovasculares da cafeína.

Uma revisão feita por um grupo de pesquisadores descreveu 32 estudos abrangendo 96.549 indivíduos que relataram insônia, estresse e humor depressivo na população pediátrica estudada. Estes efeitos também aparecem na população adulta, acrescidos de nervosismo, agitação, tremores nas mãos e distúrbios gastrointestinais, o que demonstra que o uso frequente de bebidas energéticas deve ser evitado, principalmente por parte de crianças que ainda estão em fase de desenvolvimento (Nadeem et al., 2021).

A taurina é um aminoácido comumente adicionada em bebidas energéticas, capaz de atuar como antioxidante e anti-inflamatório. Ela pode ser encontrada presente no nosso organismo e em alimentos ingeridos na dieta humana. A adição desta substância em bebidas energéticas vem crescendo nas últimas décadas, entretanto há poucos estudos sobre os efeitos da taurina no que diz respeito a o desempenho físico ou mental do usuário, entretanto há outros estudos indicando que o uso de taurina não resulta em alterações significativas nos músculos ou metabólicas (Yonamine et al., 2019).

A niacina aumenta o estado de alerta mental, foco e melhora o humor, sendo adicionada em bebidas energéticas, pois possui um papel importante de conversão de açúcares em energia. Esta molécula é capaz de atuar como coenzima essenciais para o funcionamento celular, atuando principalmente nas funções mitocondriais e produção de energia. Um ponto importante a salientar é que a dieta humana é capaz de suprimir completamente a necessidade de niacina que o organismo precisa, indicando assim que a suplementação com bebidas energéticas não é importante, mas sim opcional (Yonamine et al., 2019).

A adição de açúcares neste tipo de bebida pode contribuir de forma considerável para a obesidade dos usuários, entretanto em uma dieta com déficit de carboidratos ela pode ser uma fonte fácil e rápida para obter energia. Os açúcares podem contribuir com um melhor desempenho físico, diminuição de fadiga e melhor conservação de glicogênio muscular (Yonamine et al., 2019).

O emprego de diversas técnicas é utilizado para análise tanto qualitativa quanto quantitativa dos ingredientes de bebidas energéticas. Uma das primeiras técnicas utilizadas foi a gravimetria associada à extração da cafeína, utilizando água ou etanol, seguida da extração líquido-líquido com clorofórmio. A cafeína possui sítios moderadamente polares, o que a torna solúvel em solventes polares, e desta maneira ela possui grande afinidade com o clorofórmio. Após a extração, o solvente é evaporado e então é obtida a cafeína em sua forma sólida, e desta maneira é possível fazer sua determinação por gravimetria pesando sua massa (De Maria, 2007; Quirino et al., 2020).

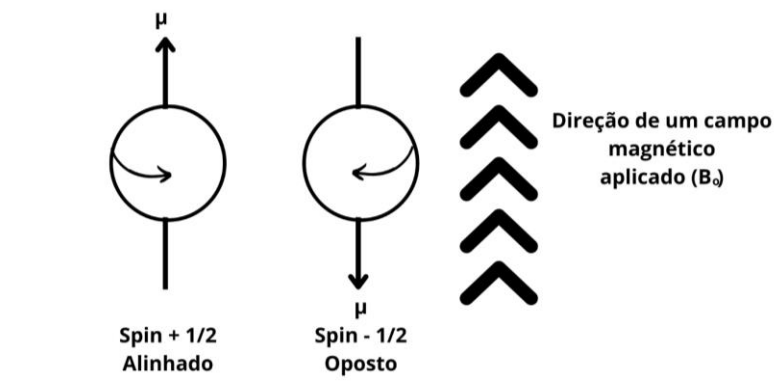
Outro método de análise consiste na espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível. Sua quantificação consiste na proporcionalidade da quantidade de radiação absorvida com a concentração da espécie. Este tipo de análise consiste na extração do analito em questão e a análise na região ultravioleta em 274 nm (De Maria, 2007; Quirino et al., 2020). A espectroscopia no Infravermelho (IV) também é uma técnica bastante utilizada em análise de cafeína. Esta é uma técnica que preserva a amostra analisada, isto é, não ocorre a destruição da amostra. Nela também é necessária a extração do analito em um solvente, geralmente é usado o clorofórmio em uma extração líquido-líquido (De Maria, 2007; Quirino et al., 2020). O método mais empregado para a quantificação de cafeína em diversos compostos é a cromatografia. Nela, é possível separar todas as substâncias presentes na matriz desde que elas possuam tempos de retenção diferentes, isto é, desde que elas interajam de maneiras diferentes com a coluna cromatográfica. A área do sinal no cromatograma é proporcional à quantidade de analito presente na amostra, e desta maneira é possível fazer uma quantificação do analito de interesse. Um dos pontos negativos da cromatografia é a necessidade de usar um padrão de referência do analito em questão, sendo preciso uma construção de uma curva de calibração, o que resulta em um maior uso de fase móvel e, conseqüentemente, um maior custo e tempo de análise (De Maria, 2007; Quirino et al., 2020).

### 2.3. Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de RMN é uma técnica amplamente usada no meio científico para elucidar, identificar e confirmar compostos químicos. O princípio da técnica baseia-se no fato de que átomos com spin nuclear diferente de zero possuem um momento magnético que, quando submetidos a um forte campo magnético e excitados por uma frequência, emitem um sinal que pode ser transformado em um espectro, através da aplicação de uma transformada de Fourier.

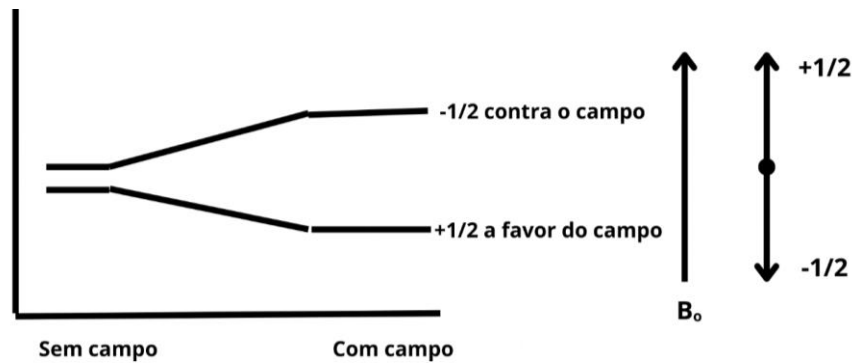
Quando um campo magnético é aplicado aos átomos com número de spin igual a  $1/2$ , o momento magnético dos spins nucleares se alinha a favor ou contrário às linhas do campo magnético (Figura 2), e adquirem energias diferentes (Figura 3) (Hage et al., 2009), porém um número um pouco maior de spins nucleares se encontram no estado de menor energia, resultando em uma pequena diferença nos estados populacionais dos spins

Figura 2 – Os dois estados de spin permitidos para um próton.



Fonte: Autor.

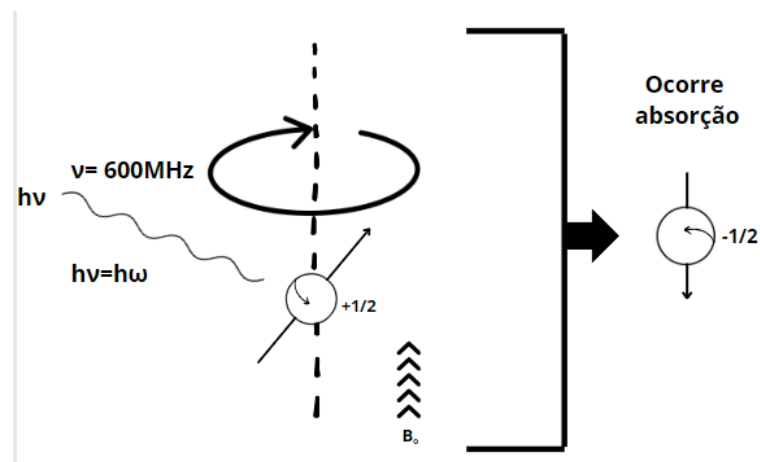
Figura 3 – Energia associada aos estados de spin de um próton na ausência e na presença de um campo magnético.



Fonte: Autor.

Quando os núcleos estão alinhados na presença do campo, eles são capazes de absorver energia e mudar a orientação de spin (Figura 4). A absorção ocorre quando a frequência da radiação for igual à diferença de energia dos estados de spin. Portanto, após a amostra ser submetida a um campo magnético e, em seguida, a um pulso de radiofrequência que excita os núcleos presentes na amostra, o retorno dos spins ao estado fundamental ocorre por meio da emissão de energia que é detectada para gerar o espectro de RMN (Bharti et al., 2012).

Figura 4 – Processo de ressonância magnética nuclear.



Fonte: Autor.

Um ponto importante a comentar é que o núcleo não se alinha precisamente ao campo, mas sim se movimenta de forma análoga a um pião, que gira em torno da direção na qual aponta o campo magnético aplicado, este movimento é conhecido como precessão. O movimento de precessão de um núcleo sobre um eixo ocorre em uma frequência angular diretamente proporcional à intensidade do campo magnético, quanto maior o campo, maior a frequência de precessão e, conseqüentemente, maior será sua velocidade. Se levamos em conta um campo de 1,41 Tesla, a frequência de precessão é de 60 MHz, já em um campo de 14 Testa, a ressonância ocorre em aproximadamente 600 MHz. Quando a energia é equivalente à energia de precessão, ocorre o efeito que conhecemos como ressonância (Mazzola, 2009).

O sinal obtido pelo equipamento é então convertido pela transformada de Fourier em sinal no domínio de frequência para se obter o espectro. O espectro apresenta sinais que são referentes aos diferentes núcleos da molécula. Cada sinal também pode ser relacionado com o ambiente químico do núcleo em questão, isto é, proximidade e substituintes que podem causar uma blindagem ou desblindagem do hidrogênio ou de outros núcleos como o isótopo ativo do carbono ( $^{13}\text{C}$ ) (Mazzola, 2009).

### 2.3.1. Ressonância Magnética Nuclear quantitativa

O princípio que fundamenta a quantificação através da técnica de RMN (RMNq) é a relação de proporcionalidade que existe entre a quantidade de núcleos de hidrogênio com a área do sinal obtido através de um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Bharti et al., 2012). A equação (1) apresenta a relação que existe entre a área do sinal ( $I_{\text{H}}$ ) com a quantidade de hidrogênios presentes na amostra ( $N_{\text{H}}$ ), onde  $K_{\text{a}}$  é uma constante do espectrômetro.

$$I_{\text{H}} = K_{\text{a}}N_{\text{H}} \quad (1)$$

Entretanto, existem fatores que afetam a constante  $K_{\text{a}}$ , entre eles estão:

- Excitação do pulso, que deve ser uniforme em toda a largura espectral.
- Tempo de repetição 5 vezes maior que o tempo de relaxação T1, sendo T1 o tempo necessário para os núcleos voltarem para seu estado fundamental.



O método mais simples e fácil para se fazer uma quantificação por RMNq é a quantificação relativa. Este método é realizado por meio da relação entre a área do sinal e o número de mols de duas espécies (Bharti et al., 2012).

$$\frac{M_x}{M_y} = \frac{I_x}{I_y} * \frac{N_y}{N_x} \quad (2)$$

Por meio da equação (2), é possível calcular a razão molar levando em conta a área dos sinais e a quantidade de núcleos de cada componente, onde: M = número de mols do componente; I = área referente ao sinal de RMN; N = quantidade de núcleos que absorvem na frequência do sinal de RMN (Santos e Colnago, 2013).

Também é possível obter o teor de um analito em uma determinada matriz. O método para se obter este teor é chamado de quantificação absoluta, sendo necessária a utilização de um padrão interno conhecido, isto é, deve-se conhecer a pureza de tal padrão para que seja feita a análise. Este método é similar à quantificação relativa, ele faz uso da razão entre a área do sinal de RMN do analito e a área do sinal do padrão interno (Santos e Colnago, 2013).

$$P_x = \frac{A_x}{A_{PI}} * \frac{N_{PI}}{N_x} * \frac{M_x}{M_{PI}} * \frac{m_{PI}}{m_x} * P_{PI} \quad (3)$$

Onde: x = analito; PI= padrão interno; P = pureza; A= área referente à linha de ressonância; N = quantidade de núcleos que absorvem na frequência da linha de ressonância; M = massa molar; m = massa.

Este método de quantificação absoluta pode ser considerado um método de padronização primária, pois com ela não é necessária a construção de uma curva de calibração, podendo assim descartar a necessidade de um padrão da amostra em questão. Uma das vantagens da RMNq é a possibilidade de usar um padrão de referência diferente da amostra, isto é, o padrão não precisa ter a mesma estrutura química da amostra. Para ser um padrão interno ideal, é necessário que a substância esteja altamente pura, seja estável, quimicamente inerte, não volátil, não higroscópica e solúvel na maioria dos solventes usados para análise de RMN. Além disso, para ser um padrão é necessária a presença de um núcleo de hidrogênio para ser usado como sinal de referência, sinal este que deve estar isolado e preferencialmente ser um simpleto. Estas características são uma das vantagens de se utilizar a técnica de RMNq quando comparadas às outras técnicas espectroscópicas, pois dependendo do analito, a construção de uma curva de calibração é algo caro e demorado. Em certas

ocasiões, a aquisição do padrão do analito não é possível, pois nem sempre se encontra disponível no mercado (Santos e Colnago, 2013; Weber et al., 2013).

Outro benefício da utilização da técnica de espectroscopia de RMN é o fato de não haver destruição da amostra, sendo bastante seletiva e capaz de detecção ao mesmo tempo de vários compostos em misturas complexas sem a necessidade de extração e separação dos analitos (Maes et al., 2012). Uma característica que a amostra deve ter é não ser volátil nem higroscópica, para que se obtenha uma precisão na hora da pesagem (Weber et al., 2013).

Pinto e colaboradores utilizaram o método ERETIC que usa um sinal de RMN sintetizado eletronicamente como sinal de referência. Este método foi utilizado para analisar gasolinas comum e *premium* e assim verificar a qualidade dos combustíveis. A RMN de  $^1\text{H}$  mostrou utilidade para a caracterização dos principais grupos químicos pertinentes aos hidrocarbonetos das amostras. O método ERETIC foi aplicado para distinguir e verificar as proporções dos hidrocarbonetos aromáticos, olefínicos e parafínicos. Este estudo obteve sucesso na determinação quantitativa dos teores de álcool etílico nas gasolinas analisadas (Pinto et al., 2023).

Ribeiro (2018) utilizou o método ERECTIC para quantificar cafeína e taurina. Ele usou uma metodologia em que envolve o ajuste de pH para 11 para que o sinal em 3,25 ppm da taurina não ficasse sobreposto devido a presença dos sinais dos açúcares. Em um único espectro foi quantificado a cafeína e a taurina utilizando poucos reagentes. A análise foi feita em um menor tempo e gerou baixos resíduos. Ele relata que algumas amostras não apresentaram resultados que batem com os descritos nos rótulos, tanto para a taurina, quanto para a cafeína.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Determinar a concentração dos componentes presentes em bebidas energéticas, utilizando a técnica de RMNq de  $^1\text{H}$ .

#### **3.2. Objetivo específico**

- Identificar e determinar a concentração de cafeína em bebidas energéticas, utilizando RMNq de  $^1\text{H}$ , por meio do método PULCON.
- Identificar e determinar a concentração dos outros ingredientes existentes na matriz das amostras.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

- Micro tubos
- Pipetas de vidro
- Béquer
- Tubos RMN 5 mm
- Micro pipeta 1 mL
- Micro pipeta 100  $\mu$ L
- Banho Ultrassônico

### 4.2. Preparo da amostra

Foram selecionadas 5 marcas diferentes de bebidas energéticas disponíveis no comércio local (Tabela 1). Inicialmente, uma degaseificação prévia de uma alíquota (1 mL) da bebida energética foi realizada através de um banho ultrassônico por 15 min.

Após o preparo da amostra, 500  $\mu$ L das amostras foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm, e então adicionados 10% de D<sub>2</sub>O (50  $\mu$ L) e submetidos a análise no espectrômetro de RMN Bruker Avance III HD, operando em campo magnético de 14 T e à frequência de <sup>1</sup>H de 600 MHz, situado no Laboratório de RMN, no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília. As análises quantitativas foram realizadas em triplicata (totalizando 15 tubos).

Tabela 1 – Identificação das amostras analisadas

Marca do energético	Identificação
RedBull	Amostra 01
RedBull zero açúcar	Amostra 02
Monster	Amostra 03
Baly	Amostra 04
Vulcano	Amostra 05

Fonte: Elaborada pelo autor

Para padronizar as análises, os sabores escolhidos das amostras foram os tradicionais.

### 4.3. Análise por RMN

Além dos procedimentos usuais de *lock* e *shimming*, antes de cada aquisição, a sonda foi sintonizada manualmente e o pulso de 90° (P90) calibrado automaticamente (comando pulsecal). Para evitar a presença de artefatos do tipo *side band* e diminuir a possibilidade de sobreposição de sinais, os espectros foram obtidos sem o giro da amostra e com controle de temperatura de 25 °C. Os tempos de espera D1 utilizados na aquisição dos espectros (15 s) foram escolhidos de modo a garantir a obtenção de um espectro quantitativo e uma relação sinal-ruído acima de 10 para os sinais utilizados na quantificação. D1 se refere ao tempo entre a aplicação do pulso de radiofrequência e a aquisição dos sinais de RMN.

Os espectros foram processados com o software TopSpin que aplica automaticamente a transformada de Fourier. Os parâmetros de fase de ordem zero (comando apk0) e a linha de base com função polinomial de quinta ordem foram aplicados automaticamente. Ajustes manuais de fase e linha de base foram realizados quando necessário e os espectros foram referenciados em relação ao sinal do TSP (0 ppm). Os intervalos de integração foram definidos manualmente.

Além dos espectros de RMN monodimensionais ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), foram realizados experimentos bidimensionais para a elucidação das estruturas presentes nas amostras. O espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (heteronuclear single quantum coherence) é capaz de

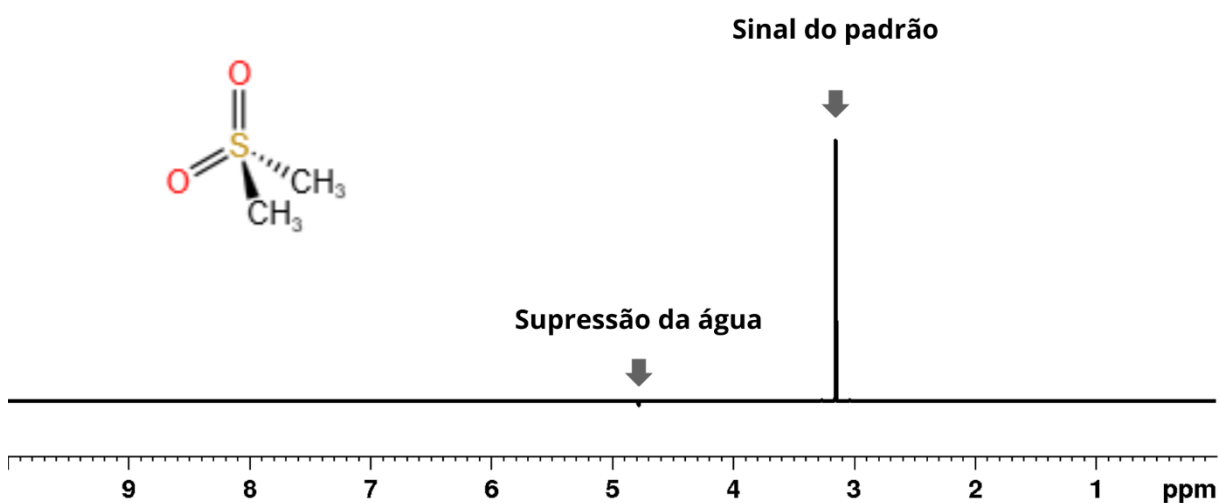
correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de hidrogênio com os núcleos de carbono que estão diretamente ligados. O HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation) mostra os acoplamentos entre núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  separados por duas ou três ligações de distâncias.

#### 4.4. Quantificação dos espectros

Após a análise dos espectros, o melhor sinal referente a um dos núcleos de  $^1\text{H}$  da cafeína foi escolhido para a quantificação. O sinal escolhido não apresentou sobreposição com nenhum outro sinal dos outros núcleos da amostra. Ao estudar os espectros obtidos, foi possível identificar sinais referentes a outras substâncias. Estes sinais foram utilizados para quantificação através da técnica de RMNq.

Para as quantificações realizadas neste trabalho, o composto dimetilsulfona (MM = 94,1338 g/mol) foi utilizado como padrão externo. Como esta molécula é simétrica, o sinal referente às suas metilas é equivalente, aparecendo como um simpleto em 3,15 ppm. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido e a estrutura da dimetilsulfona estão representados na Figura 5.

Figura 5 – Espectro de  $^1\text{H}$  do padrão dimetilsulfona (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ).



Fonte: Autor

A quantidade pesada de padrão foi de 13,2 mg diluída em um volume de 538,1  $\mu\text{L}$ , este volume foi previamente pesado e, através da densidade da água, foi obtido o volume final. Este procedimento de pesagem foi feito apenas para a água ultrapura, a água deuterada foi adicionada com uma micro pipeta. O cálculo de concentração foi efetuado resultando em uma concentração de 0,26 mol/L. As informações sobre o padrão estão descritas no seguinte link: <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mrc-descricao/informacoes-de-seguranca-transporte-mrc-8783.pdf>.

O método utilizado para a RMNq foi o método de padrão externo conhecido como PULCON. Benedito (2018) caracterizou amostras de cocaína que foram apreendidas pela polícia federal utilizando este método. Ele usou a área referente a diferentes sinais em diferentes espectros como base para efetuar um cálculo comparando a área e intensidade dos sinais.

Dessa maneira, ao conhecer a concentração da amostra de referência juntamente com seu pulso de  $90^\circ$  para que estejam corretamente calibradas nos parâmetros corretos, as concentrações das amostras a serem analisadas até então desconhecidas podem ser obtidas pela seguinte equação:

$$C_x = kC_{std} * \frac{I_x}{I_{std}} * \frac{T_x}{T_{std}} * \frac{\theta_{90x}}{\theta_{90std}} * \frac{n_{std}}{n_x}$$

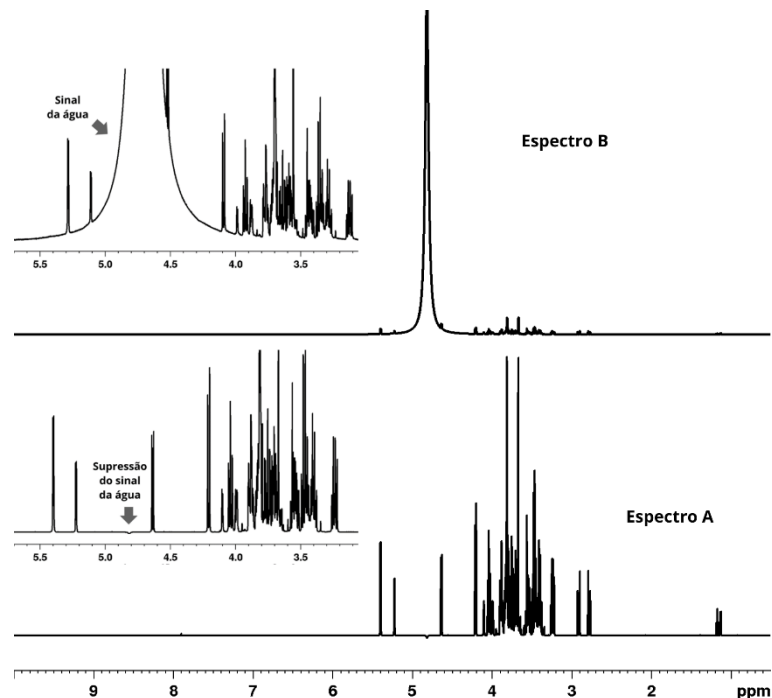
Onde  $k$  = fator de correção,  $C$  = concentração,  $I$  = área do sinal,  $\theta_{90}$  é o valor do pulso de  $90^\circ$  e por fim  $n$  = número de transientes. Os índices  $x$  representam a amostra e  $std$  é referente ao padrão de referência.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Análise dos espectros

Após desgaseificação das bebidas energéticas escolhidas para esse estudo, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos sem e com a supressão de água. Para exemplificar, foi escolhido o espectro de uma marca analisada para ser apresentado na Figura 6. Como é possível observar, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  mostram que a etapa de supressão de água é importante para que seja possível observar os sinais, em particular aqueles que estão sobrepostos pelo sinal referente aos hidrogênios da água. A sequência de pulso utilizada na aquisição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  para suprimir a frequência do sinal da água foi a noesygppr1d.

Figura 6 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) da bebida energética 01 a  $25^\circ\text{C}$ . Espectros (A) com a supressão do sinal da água e (B) sem a supressão do sinal da água.



Fonte: Autor



A análise dos espectros de bebidas energéticas mostrou uma grande quantidade de sinais, especialmente na região entre 3-4 ppm que é uma região característica das ligações C-H presentes nas moléculas de açúcares. Embora o objetivo inicial desse trabalho fosse quantificar a cafeína presente nas amostras de bebidas energéticas, foi observada a capacidade de identificação de outros compostos como a taurina, a niacina, o citrato, o álcool etílico, a sacarose e as duas formas da glicose. A atribuição dos sinais de cada um desses compostos será apresentada a seguir.

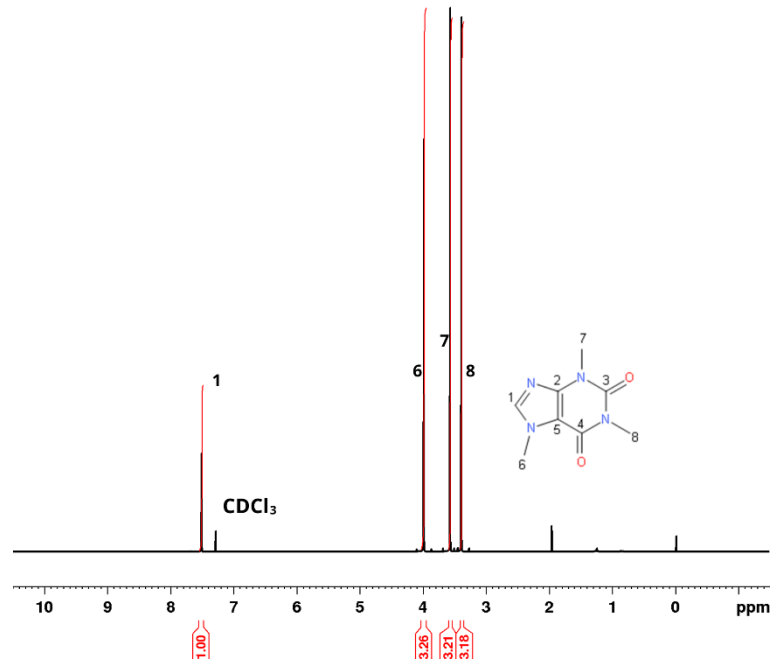
### 5.1.1. Cafeína pura

A Figura 7 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e a estrutura da cafeína pura (trimetilxantina, MM 194,19 g/mol). Este espectro foi obtido com o intuito da atribuição dos sinais característicos dos seus hidrogênios. É possível observar o sinal referente às três metilas (H-6, H-7 e H-8), entre 3-4 ppm sendo que normalmente metilas são observadas entre 0,7 – 1,3 ppm. Essa diferença no valor de deslocamento químico está relacionada ao fato delas estarem ligadas a um núcleo de nitrogênio que possui uma maior eletronegatividade em relação ao carbono e, conseqüentemente, desblinda o grupo metila. O H-1 está ligado a uma ligação C=C aparecendo em 7,50 ppm, região características de dupla ligação. As integrais de cada sinal também estão de acordo com o esperado.

A Figura 7 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  juntamente com a estrutura da cafeína. O espectro foi obtido com cafeína pura, portanto apresenta apenas sinais referentes aos carbonos da cafeína. Os sinais referentes às metilas estão na faixa de ligações C-N, algo em torno de 30-65 ppm, mas isto pode variar dependendo do solvente. A faixa de 100-150 ppm corresponde aos sinais das duplas ligações, região na qual caem as C=C presentes nos anéis da cafeína. Já as carbonilas representam o grupo funcional mais desblindado da cafeína, a alta eletronegatividade do oxigênio somado ao efeito de anisotropia da dupla ligação oferecem uma desblindagem mais eficiente ao carbono ligado diretamente ao O.

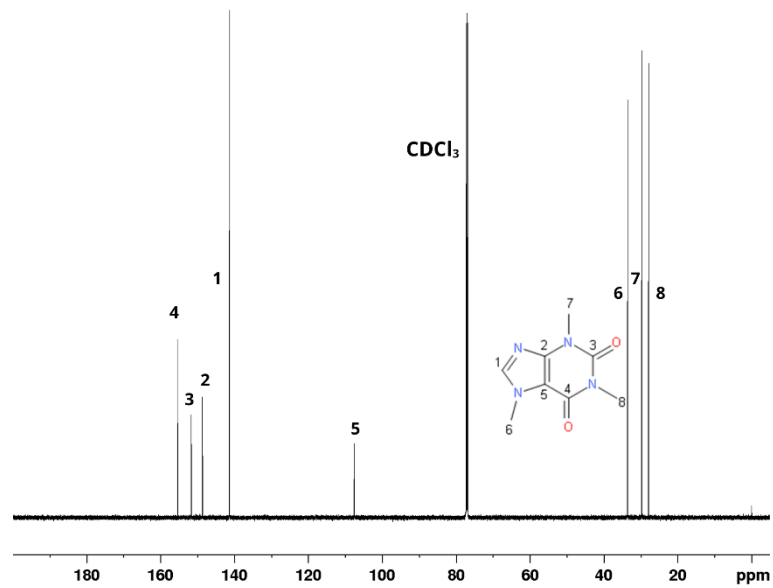
As atribuições e informações retiradas dos espectros (Figuras 7 e 8) bem como as informações de banco de dados estão descritos na Tabela 2.

Figura 7 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da cafeína pura a 25 °C.



Fonte: Autor

Figura 8 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de cafeína pura a 25°C.



Fonte: Autor

Através da comparação dos sinais experimentais obtidos com os descritos nos bancos de dados, podemos atribuir os sinais para cada átomo de hidrogênio e carbono presente na molécula da cafeína.

Tabela 2 – Atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da cafeína em  $\text{CDCl}_3$ .

Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ Literatura*	Multiplicidade	Integral	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ Literatura*
1	7,50	7,51	s	1	141,5	141,6
2	---	---	---	---	148,8	148,7
3	---	---	---	---	151,7	151,7
4	---	---	---	---	155,4	155,3
5	---	---	---	---	107,6	107,5
6	3,98	4,00	s	3	33,6	33,6
7	3,56	3,59	s	3	29,7	29,7
8	3,38	3,41	s	3	27,9	27,9

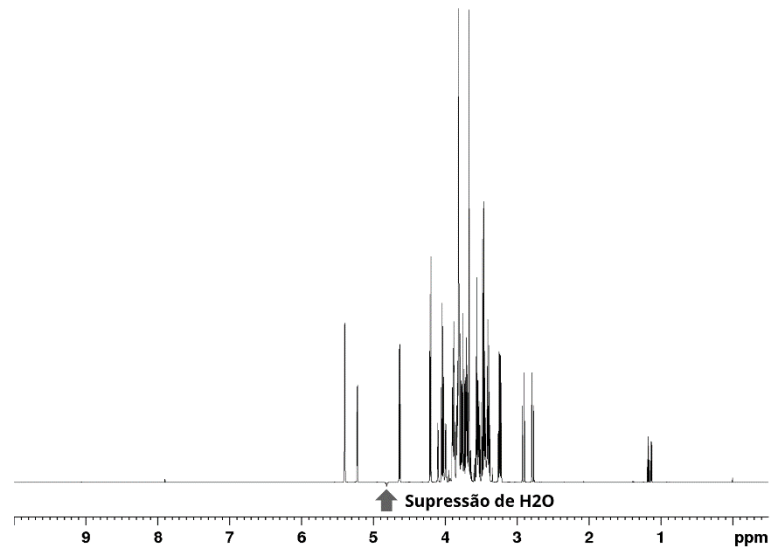
Human Metabolome\*

Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.1.2. Cafeína em bebidas energéticas

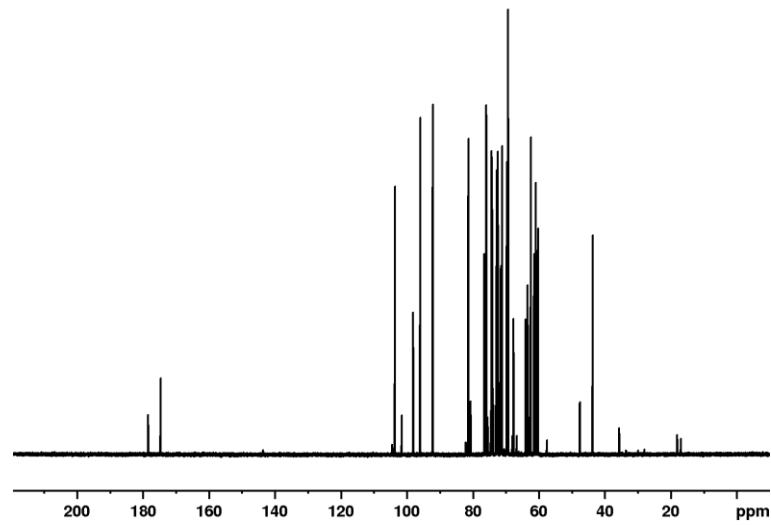
Inicialmente, foi obtido o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de apenas uma marca comercial com o objetivo de atribuir os sinais dos compostos presentes na mistura e avaliar se a concentração de cafeína presente no volume analisado seria alta o suficiente para a sua detecção e, conseqüentemente, quantificação. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos (Figura 9 e 10, respectivamente) foram analisados, entretanto apenas com ele não foi possível identificar os sinais da cafeína. O fato dos espectros de RMN da bebida energética terem sido obtidos em um solvente ( $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ ) diferente daquele obtido para a cafeína padrão ( $\text{CDCl}_3$ ) também trouxe incerteza na análise dos sinais.

Figura 9 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca 01 a 25 °C



Fonte: Autor

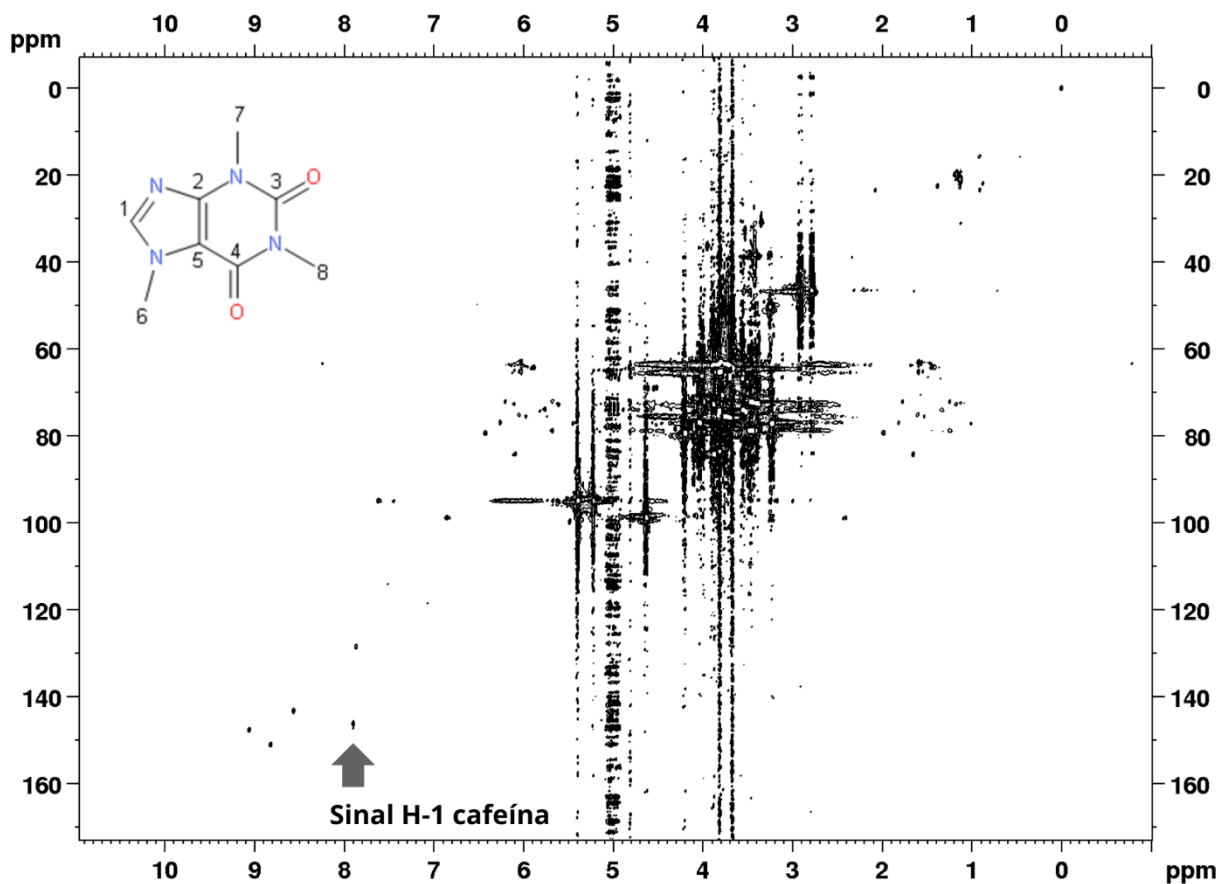
Figura 10 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca 01 a 25 °C.



Fonte: Autor

Para a identificação da cafeína e a atribuição dos sinais desse composto na matriz da bebida, foi necessário o auxílio dos espectros de RMN bidimensionais (RMN 2D).

Figura 11 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca 01 a 25 °C.



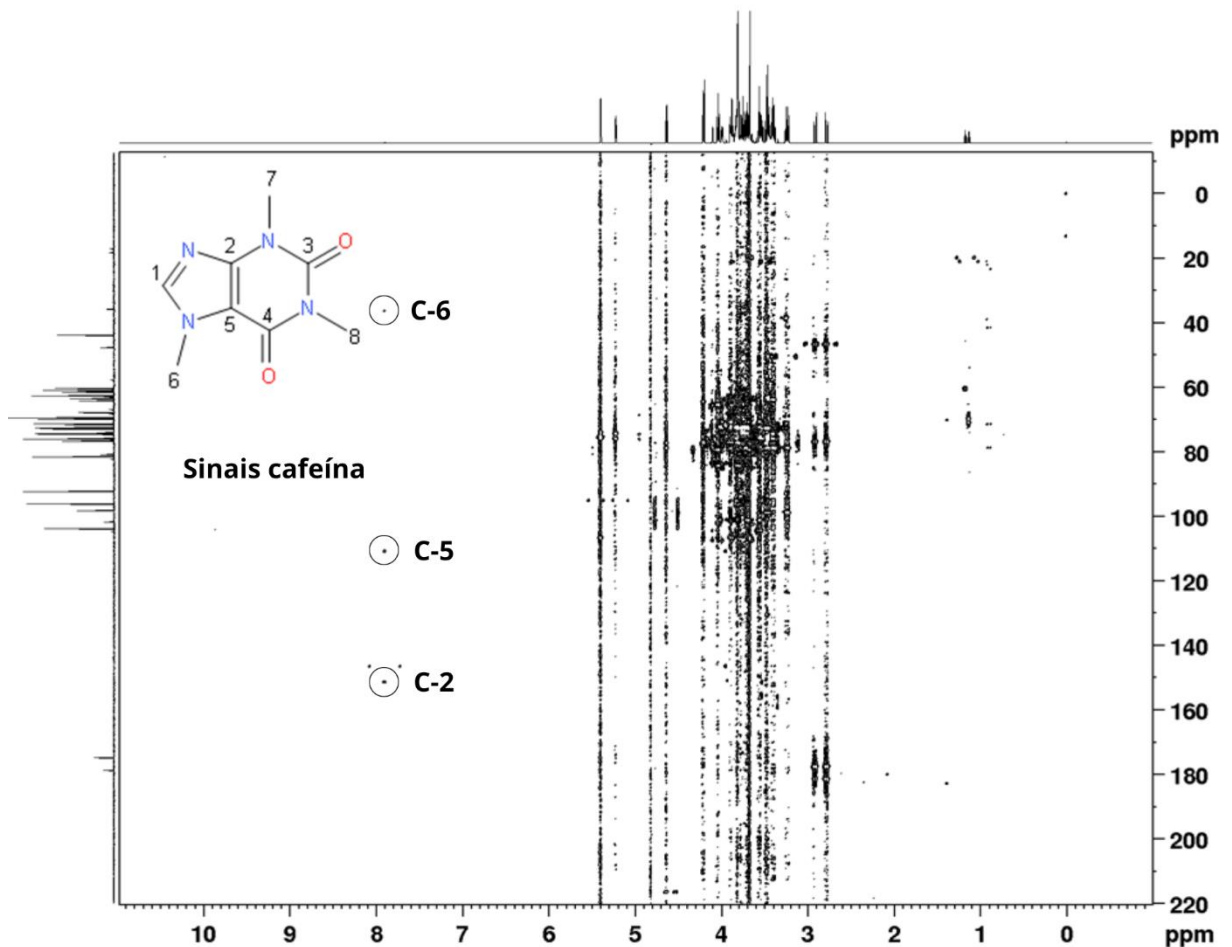
Fonte: Autor

Analisando a região do sinal pertencente a cafeína em 7,9 ppm e comparando com as informações do banco de dados, esse sinal (indicado na Figura 11) foi atribuído ao H-1 e o deslocamento químico 146,3 ppm para o C-1 da molécula. Entretanto, esta atribuição sozinha não garante a veracidade da atribuição tão pouco confirma a cafeína. Para uma atribuição inequívoca dos outros sinais da estrutura, foi utilizado o espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Figura 12).

Pelo fato de a razão isotópica de carbono ser inferior ao hidrogênio, usou-se o método de detecção inversa, ou seja, o núcleo de carbono menos abundante e conseqüentemente menos sensível fica mais próximo à bobina receptora, e o núcleo de hidrogênio mais sensível fica mais longe. Esta característica permite fazer experimentos bidimensionais com melhor sinal para o átomo de carbono, entretanto no caso de

haver pouco analito, o sinal no HMBC fica comprometido. Este tipo de sonda foi capaz de detectar os sinais referentes à cafeína mesmo em uma baixa concentração, entretanto foi necessário cerca de 1 dia de aquisição para chegar nesta sensibilidade.

Figura 12 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca 01 a 25 °C.



Fonte: Autor

No espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para a bebida energética 01 (Figura 12), pode-se notar a presença de sinais relativos à cafeína, O H-1 acopla com os C-6, C-5 e C-2. Este espectro funciona de maneira similar a um quebra cabeça pois o C-2 por exemplo, seria capaz de acoplar com o H-7. E o H-7 consegue acoplar com o C-3 e C-2. O C-3 enxerga o H-7 e o H-8 e desta maneira podemos atribuir cada sinal

referente a cada núcleo. A atribuição completa dos sinais está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Atribuição dos sinais: deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , multiplicidade e integral da cafeína da amostra 01.

Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ Literatura	Multiplicidade	Integral	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC H→C
1	7,90	7,88	s	1	146,3	2,5,6
2	---	---	---	---	151,8	----
3	---	---	---	---	155,7	---
4	---	---	---	---	159,4	---
5	---	---	---	---	111	---
6	3,94	3,87	s	3	36,3	1,5
7	3,52	3,37	s	3	32,7	2,3
8	3,34	3,08	s	3	30,8	3,4

Human Metabolome\*

Fonte: Elaborada pelo autor

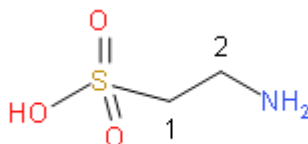
Por meio da análise dos espectros obtidos, o sinal identificado pertencente à cafeína escolhida para realizar a quantificação foi o simpleto em 7,90 ppm, referente ao H-1 ligado à dupla ligação C=C do anel de 5 membros. Este sinal não apresentou sobreposição para nenhuma amostra e, portanto, será utilizado para a quantificação desta espécie nos energéticos.

### 5.1.3. Identificação de outras substâncias

#### *Taurina*

Ao analisar o rótulo do recipiente das amostras, notam-se outras substâncias que seriam interessantes a identificação e uma possível quantificação. Um desses compostos foi a taurina (Figura 13).

Figura 13 – Estrutura química da taurina.

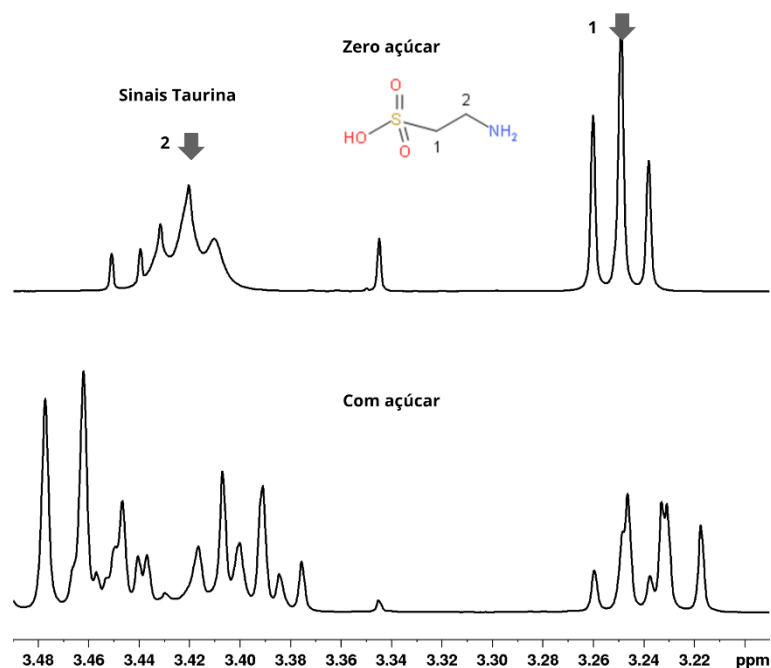


Fonte: autor

Com o auxílio de espectros de um banco de dados (disponíveis em: <[https://hmdb.ca/spectra/nmr\\_one\\_d/1277](https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1277)> e <[https://hmdb.ca/spectra/nmr\\_one\\_d/1218](https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1218)>), os sinais referentes aos átomos de hidrogênio e carbono foram atribuídos. Ambos os sinais em 3,24 e 3,42 ppm se apresentam como um tripleto, por conta do acoplamento spin-spin com seus vizinhos, entretanto, nos espectros de 4 das marcas, os sinais da taurina estavam sobrepostos aos sinais dos açúcares presentes na bebida energética. Esse fenômeno não foi observado apenas para a amostra zero açúcar (Figura 14). O sinal em 3,24 ppm no espectro da amostra de bebida energética sem açúcar apareceu com a constante de acoplamento de 6,7 Hz que está de acordo com o valor encontrado no banco de dados.



Figura 14 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) das amostras 01 e 02.



Fonte: Autor

As atribuições dos sinais da taurina foram confirmadas por meio dos espectros de RMN 2D (HSQC e HMBC) e estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Atribuição dos sinais: deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , multiplicidade e integral referentes à taurina da amostra 01.

Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ Literatura*	J (Hz)	Multiplicidade	Integral	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ Literatura*	HMBC H→C
1	3,25	3,25	6,6	Tripleto	2	50,3	50,3	2
2	3,42	3,42	6,7	Tripleto	2	38,4	38,3	1

Human Metabolome\*

Fonte: Elaborada pelo autor

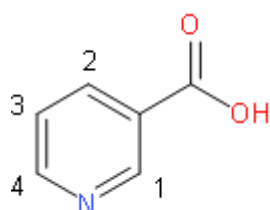
Os valores referentes aos sinais H-1, H-2, C-1, C-2 encontrados estão de acordo com as comparações feitas pelo banco de dados, e não deixam dúvida de que

estes sinais são realmente da taurina. Os valores de  $J$  foram medidos usando o espectro da amostra sem açúcar, pois havia menos sobreposição no H-2 e nenhuma no H-1.

### *Niacina*

Além da taurina, a niacina (Figura 15) é adicionada na composição da maioria das bebidas energéticas.

Figura 15 – Estrutura química da niacina.

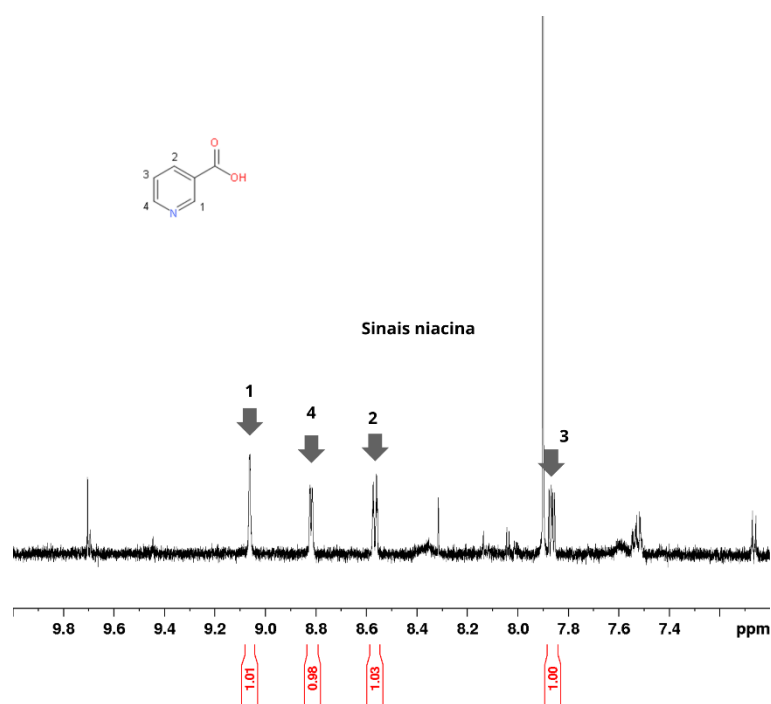


Fonte: autor

Na Figura 16, está apresentada a expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da bebida energética de marca 01 cuja região é possível observar os sinais relativos à molécula da niacina. Os sinais atribuídos à niacina apresentam uma diferença nos valores de deslocamento químico quando comparados às informações do banco de dados (Tabela 5). Isso deve ter ocorrido devido à diferença de matrizes em que se encontram as amostras. Os sinais do banco de dados são referentes à niacina pura (50 Mm) em água, já no caso dos dados experimentais, embora o solvente seja o mesmo ( $\text{H}_2\text{O}$ ), outras moléculas presentes na mistura podem afetar o ambiente químico da niacina. Não foi possível atribuir os sinais referentes à niacina pelo espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HBMB, pois o analito não estava em concentração suficiente para ser detectado. A identificação desta espécie foi feita através do banco de dados e da integração dos sinais. Como os sinais referentes aos núcleos de hidrogênio são proporcionais à área do sinal do H da substância, a integração pode nos dar uma informação valiosa acerca da proporção de hidrogênios. Como os sinais referentes à nia-

cina são pertencentes ao seu anel aromático e cada um deles possui apenas 1 hidrogênio, a integração de todos os sinais deram próximos a 1, o que indica que estes sinais realmente pertencem aos núcleos de hidrogênio da molécula.

Figura 16 – Expansão de espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) da amostra 01.



Fonte: Autor

Tabela 5 – Atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , constante de acoplamentos, multiplicidade e integral referentes a molécula da niacina.

Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^1\text{H}$ Literatura*	J (Hz)	J (Hz) Literatura*	Multiplicidade	Integral	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	9,05	8,94	2,1	2,2	s	1	147,6
2	8,56	8,26	8,1 1,9	---	dt	1	143,3
3	7,86	7,53	8,0	8	dd	1	128,6

			5,1	5			
4	8,81	8,61	5,4	5,0	dt	1	151,1
			1,5	1,7			

Human Metabolome\*

Fonte: Elaborada pelo autor

Ao se analisar os espectros obtidos para todas as marcas de bebidas energéticas, pode-se observar nos sinais atribuídos à niacina o acoplamento dos hidrogênios no anel aromático (Figura 16). Os valores estão diferentes dos da literatura devido a composição da matriz, que pode interferir diretamente na anisotropia magnética do analito em questão. O hidrogênio na posição 1 é um Simpleto, o que comprova que este átomo não possui vizinhos indicando que possa ser o H-1.

O hidrogênio na posição 2 é um duplo tripleto. O maior acoplamento com valor de 8,1 Hz é resultante do acoplamento do H-2 com o H-3 em posição *-orto*. O menor valor de acoplamento provavelmente é referente ao acoplamento *-meta* do H-2 com os hidrogênios H-1 e H-4. Infelizmente não há informações no banco de dados sobre os acoplamentos deste H-2.

Já o hidrogênio H-3 acopla com os hidrogênios H-2 e H-4 (em posição *-orto*), dando origem a uma multiplicidade de duplo duplete. O H-3 acopla com H-2,4 com um valor de 8,0 Hz. O H-3 também acopla com o H-1 em posição *para*, mas não aparece este valor de acoplamento no espectro, devido a ser um valor pequeno haver pouco analito.

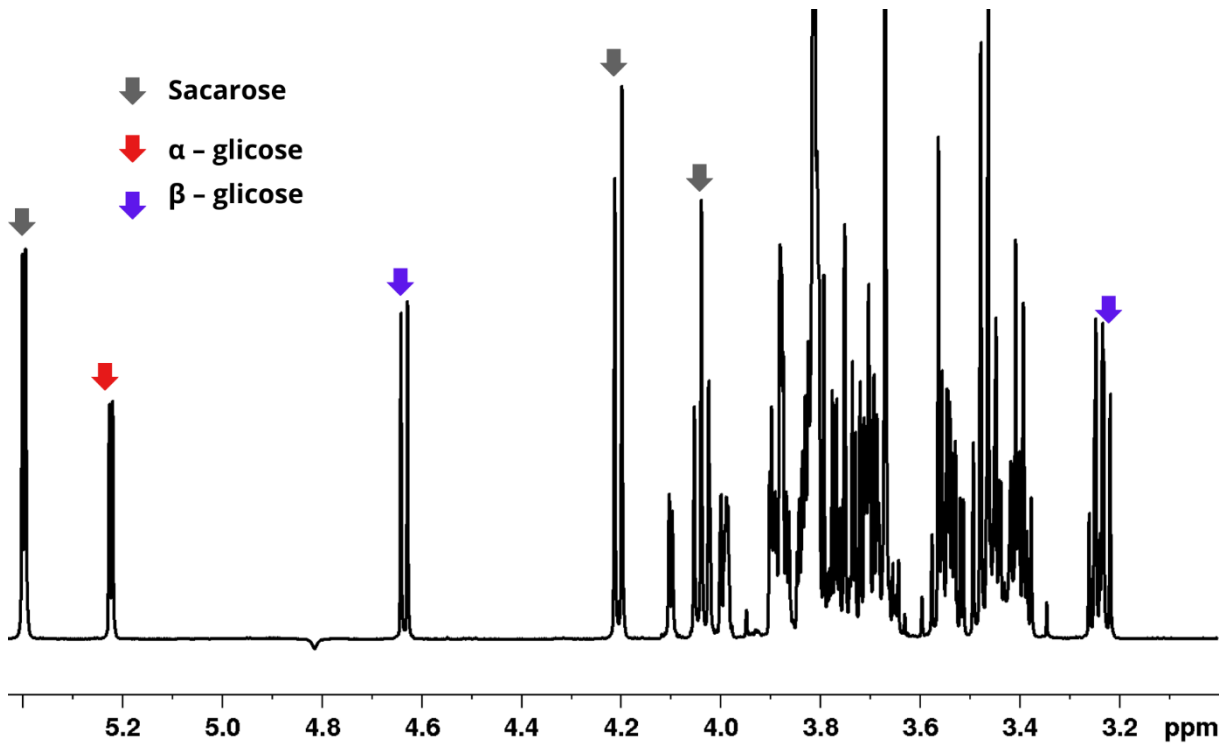
Para o hidrogênio 4 que possui uma multiplicidade de duplo tripleto por conta do seu vizinho seguindo o triângulo de pascal e do seu acoplamento. Ele acopla com H-3 em *orto* dando origem a um acoplamento de 5,4 Hz, e com o H-1 e H-2 em posição *meta* com um valor de  $J$  de 1,5 Hz.

### Açúcares

Na Figura 17, está apresentada a expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da bebida energética de marca 01, na região entre 3,0 e 5,0 ppm. Os sinais assinalados

são referentes aos açúcares presentes nas amostras. Nas 5 marcas escolhidas, temos a presença de apenas 3 moléculas de carboidratos: sacarose, alfa- e beta-glicose.

Figura 17 – Expansão do espectro de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) da amostra 01: sinais não sobrepostos de açúcares.

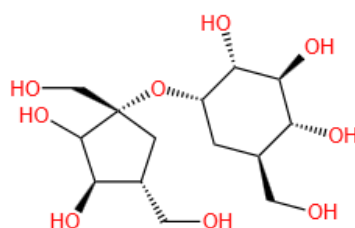


Fonte: Autor

Pelo fato de ser uma região característica de carboidratos, vários sinais dos açúcares estão sobrepostos. Porém, apesar de alguns sinais dos açúcares estarem sobrepostos, a análise dos espectros de RMN 2D permitiu a identificação de cada núcleo de hidrogênio dessas moléculas.

Os carboidratos descritos nos rótulos das amostras dizem respeito aos açúcares adicionados. Um deles é a sacarose, que se trata de uma molécula de glicose ligada por uma ligação glicosídica a uma molécula de frutose (Figura 18). Os sinais referentes a esta molécula estão descritos na tabela 6.

Figura 18 – Estrutura química da sacarose.



Fonte: autor

Tabela 6 – Atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , constantes de acoplamento, multiplicidades e integrais referentes à molécula da sacarose.

Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ Literatura*	$J$ (Hz)	$J$ (Hz) Literatura*	Multipl- cidade	Inte- gral	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC H $\rightarrow$ C
1	5,39	5,40	3,90	3,9	d	---	95	2,5,11
2	3,55	3,55	---	---	---	---	75,4	1,3
3	3,75	3,75	---	---	---	---	75,6	2,4
4	3,46	3,46	---	---	---	---	72,5	3,5
5	3,83	3,87	---	---	---	---	74,1	1,4,6
6	3,75	3,82	---	---	---	---	63,1	5
7	4,20	4,21	8,8	8,6	d	---	79,4	1,9,12
8	4,04	4,04	8,6	8,7	t	---	77	7,9,10,11
9	3,75	3,75	---	---	---	---	84,2	8,1
10	3,82	3,82	---	---	---	---	65,6	8,9
11	---	---	---	---	---	---	106	1,7,9,12
12	3,67	3,67	---	---	s	---	64,3	7,11

Human Metabolome\*

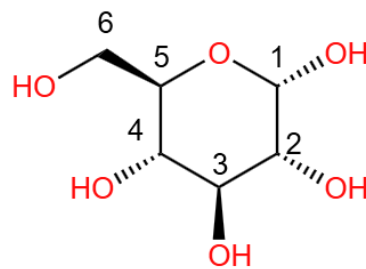
Fonte: Elaborada pelo autor

Outro açúcar identificado foi a glicose. A  $\alpha$ -glicose se diferencia da sua forma beta por intermédio de um único carbono. A glicose pode ser encontrada em sua forma aberta, entretanto quando ela fecha um ciclo em sua própria estrutura, o carbono 1 se

torna um centro assimétrico, onde a hidroxila pode estar orientada para dentro e fora do plano.

A  $\alpha$ -glicose possui o grupo hidroxila ligado ao C-1 (Figura 19) para trás do plano (ligação tracejada). Esta diferença entre as formas da glicose concede a elas diferentes ambientes químicos e conseqüentemente diferentes deslocamentos químicos.

Figura 19 – Estrutura química da  $\alpha$ -glicose.



Fonte: autor

Como a quantidade de açúcares é muito superior à das demais substâncias presentes na amostra (com a exceção da própria água), seus sinais surgem de maneira bem intensa principalmente entre 3-4 ppm. Essa é uma região de alta sobreposição, o que dificulta a atribuição dos demais sinais dessa região, como as metilas 6,7 e 8 da cafeína (Figura 9).

Tabela 7 – Atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , constantes de acoplamento, multiplicidades e integrais referentes à molécula da  $\alpha$ -glicose.

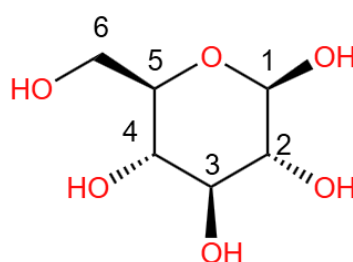
Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ Literatura*	$J$ (Hz)	$J$ (Hz) Literatura*	Multiplicidade	Integral	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC H→C
1	5,22	5,22	3,8	3,7	d	1	94,8	2,5
2	3,52	3,52	---	---	---	---	75,4	1,3
3	3,75	3,72	---	---	---	---	75,8	2,4
4	3,39	3,39	---	---	---	---	72,6	3,5
5	3,83	3,82	---	---	---	---	74,4	1,4,6
6	3,88	3,88	---	---	---	---	63,6	5

Human Metabolome\*

Fonte: Elaborada pelo autor

Os sinais referentes à alfa glicose estão descritos na Tabela 7. Devido às sobreposições de sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , os sinais dos açúcares só foram identificados com a ajuda dos espectros de RMN 2D (HSQC e HMBC) e dos bancos de dados. As multiplicidades dos sinais também se mostraram difíceis de observar, sendo possível apenas observar a multiplicidade do H-1 que está vizinho a 1 hidrogênio (H-2). A outra conformação da glicose é  $\beta$ -glicose, cuja estrutura está apresentada na Figura 20 e seus respectivos sinais descritos na Tabela 8. Inicialmente, a diferenciação da forma alfa da beta foi feita através do banco de dados, e desta maneira os sinais referentes a cada conformação foi diferenciado com o RMN 2D.

Figura 20 – Estrutura da química da  $\beta$ -glicose



Fonte: autor



Tabela 8 – Atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , constantes de acoplamento, multiplicidades e integrais referentes à molécula da  $\beta$ -glicose.

Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ Literatura*	$J$ (Hz)	$J$ (Hz) Literatura*	Multiplicidade	Integral	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC H→C
1	4,63	4,63	8,0	8,0	d	1	98,8	2,5
2	3,23	3,23	8,1 9,2	8,1 9,2	dd	---	78,8	1,3
3	3,47	3,52	---	---	---	---	78,9	2,4
4	3,39	3,40	---	---	---	---	75,5	3,5
5	3,46	3,46	---	---	---	---	78,8	1,4,6
6	3,80	3,82	---	---	---	---	63,1	5

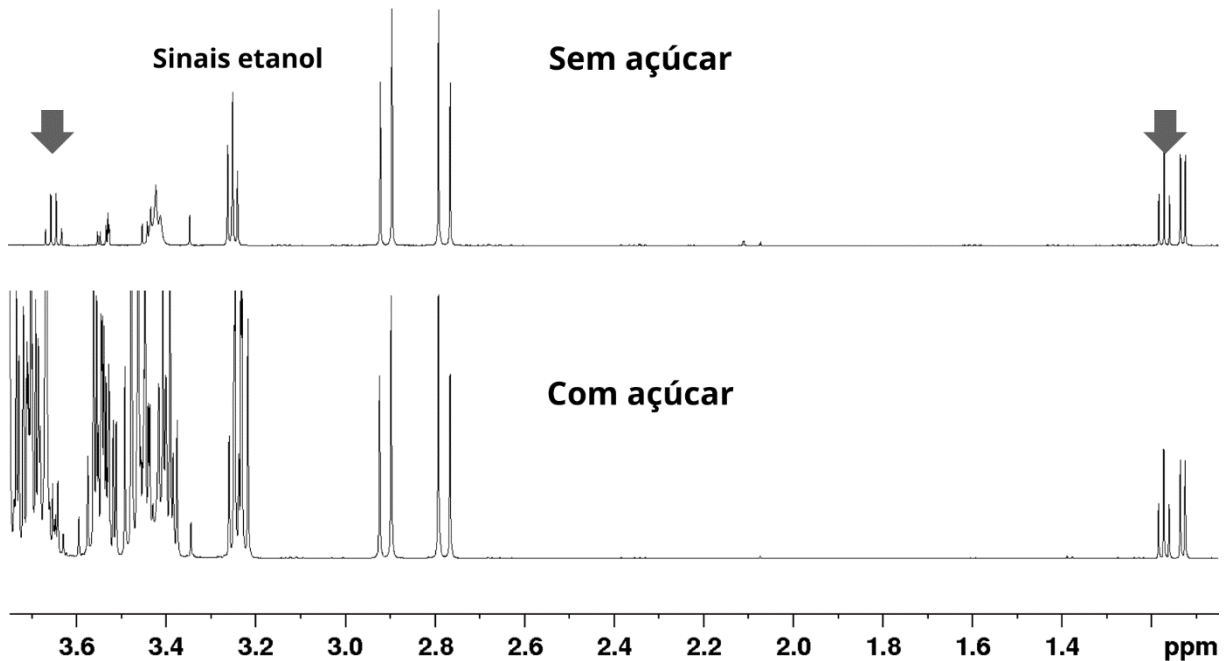
Human Metabolome\*

Fonte: Elaborada pelo autor

### *Etanol*

Quando a molécula de glicose passa por um processo chamado fermentação, há a produção de etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ). Devido a sobreposição de sinais (figura 21), esta molécula também foi analisada através dos espectros de RMN 2D e o auxílio de banco de dados. Os sinais referentes a ela estão descritos na seguinte Tabela 9.

Figura 21 - Comparação de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) das amostras 01 e 02.



Fonte: Autor

Tabela 9 – Atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , constantes de acoplamento, multiplicidades e integrais referentes à molécula de etanol.

Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^1\text{H}$ Literatura*	$J$ (Hz)	$J$ (Hz) Literatura*	Multiplicidade	Integral	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC H→C
1	1,17	1,17	7,1	7,1	t	3	19,8	2
2	3,64	3,65	7,1	7,1	q	2	60,6	1

Human Metabolome\*

Fonte: Elaborada pelo autor

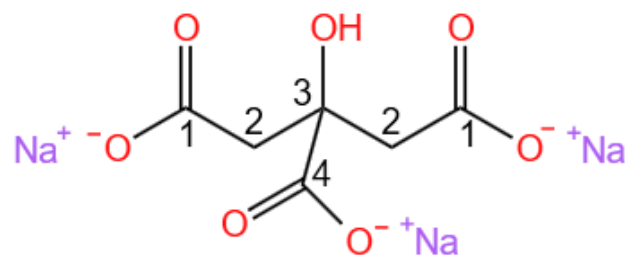
Por conta da sobreposição dos sinais e devido à quantidade de carboidrato presente na amostra com açúcar, o sinal referente ao hidrogênio 2 fica sobreposto e, portanto, não é possível verificar o valor do  $J$  (Hz), entretanto a amostra zero açúcar permite uma visualização desta região do espectro. A comparação com um espectro

de um banco de dados permitiu visualizar os sinais correspondentes ao etanol juntamente com os acoplamentos dos hidrogênios descritos na tabela 9 confirmaram a presença de etanol na amostra com e sem açúcar.

### *Citrato de sódio*

O citrato de sódio (Figura 22) pode ser usado como um aditivo alimentar ou como conservante e está presente em todas as amostras analisadas.

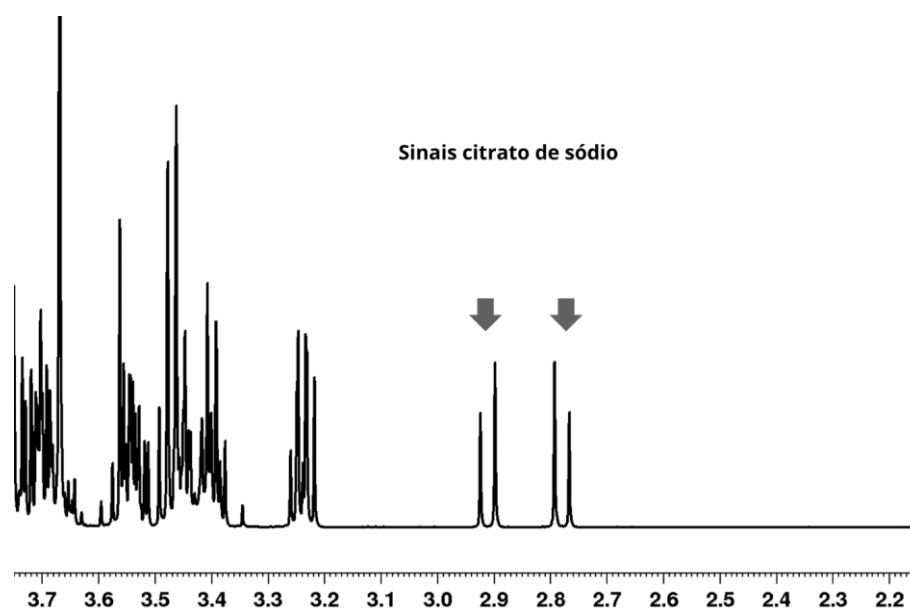
Figura 22 – Estrutura química do citrato de sódio



Fonte: autor

O citrato de sódio, embora tenha um centro simétrico localizado no C-3 os H's no C-2 caem em deslocamentos químicos distintos. Os hidrogênios presentes na molécula são diastereotópicos, ou seja, não são equivalentes, eles aparecem em diferentes deslocamentos químicos no espectro de RMN, eles se dividem com uma constante de acoplamento geminal. Este carbono C-2 é pró-quiral, ou seja, se fizer uma substituição de um dos hidrogênios, o carbono se torna um centro assimétrico quiral, esta diferença entre os hidrogênios pode ser visualizada na Figura 23 e seus sinais estão na tabela 10.

Figura 23 - Espectro de  $^1\text{H}$  ampliado no sinal do citrato de sódio (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ).



Fonte: Autor

10 – Atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , constantes de acoplamento, multiplicidades e integrais referentes à molécula de citrato de sódio.

Sinal	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^1\text{H}$ Literatura*	$J$ (Hz)	$J$ (Hz) Literatura*	Multiplicidade	Integral	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	---	---	---	---	---	---	177,6
2 - A	2,91	2,66	15,6	---	d	2	46,6
2 - B	2,78	2,52	15,6	---	d	2	
3	---	---	---	---	---	----	76,9
4	---	---	---	---	---	---	181,4

Human Metabolome\*

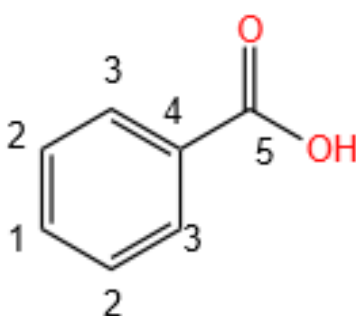
Fonte: Elaborada pelo autor

As diferenças entre os sinais obtidos experimentalmente e os da literatura podem ser devido ao efeito que a matriz causa no analito, isto é, o efeito que a anisotropia magnética da matriz pode interferir na anisotropia magnética do analito.

### Ácido benzoico

O ácido benzoico pode ser adicionado em alimentos como um conservante, sua estrutura está representada na Figura 24.

Figura 24 – Estrutura química do ácido benzoico.

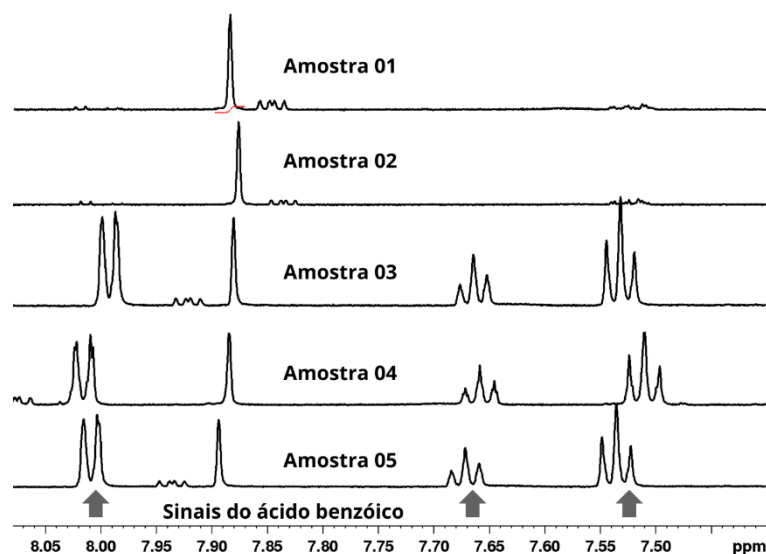


Fonte: Autor

Trata-se de um ácido carboxílico aromático. Há 2 hidrogênios equivalentes na molécula, o que nos diz que haverá apenas 3 sinais provenientes dos núcleos de  $^1\text{H}$  da molécula.

Os H-1 e H-2 se apresentam como um tripleto e o H-3 aparece como um duplete. Um ponto a se levar em consideração é que esta molécula só foi identificada nas amostras 3, 4 e 5, o que leva a deduzir que a adição deste composto pode variar dependendo do fabricante (Figura 25).

Não há valores referentes aos deslocamentos químicos de carbono, pois os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  não foram obtidos para estas amostras. Por conta do tempo necessário para a aquisição, os espectros de RMN 2D (HSQC e HMBC) foram obtidos apenas para a amostra 01. Assim, não foi possível identificar os sinais de carbonos dessa molécula.

Figura 25 - Espectros de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) das amostras 01-05.

Fonte: Autor

A identificação do ácido benzoico foi feita após a comparação dos sinais com um banco de dados. Outro método utilizado para a identificação dos sinais de  $^1\text{H}$  da molécula de ácido benzoico foi comparar as multiplicidades e integrais, uma vez que não foi observada sobreposição destes sinais. Após levar estes aspectos em consideração, os sinais em aproximadamente 7,65, 7,52 e 7,99 ppm foram atribuídos aos H's do anel aromático e as informações obtidas estão na Tabela 11.

Tabela 11 – Atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , constantes de acoplamento, multiplicidades e integrais referentes à molécula de ácido benzoico.

Si- nal	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^1\text{H}$ Litera- tura*	$J$ (Hz)	$J$ (Hz) Litera- tura*	Multipli- cidade	Inte- gral	$\delta$ $^{13}\text{C}$ Litera- tura*
1	7,65	7,54	7,5	7,3	t	2	133,9
2	7,52	7,47	7,4	7,3	t	1	130,9
3	7,99	7,86	7,8	7,1	d	2	131,4
4	---	---	---	---	---	---	---
5	---	---	---	---	---	---	---

Human Metabolome\*

Fonte: Elaborada pelo autor

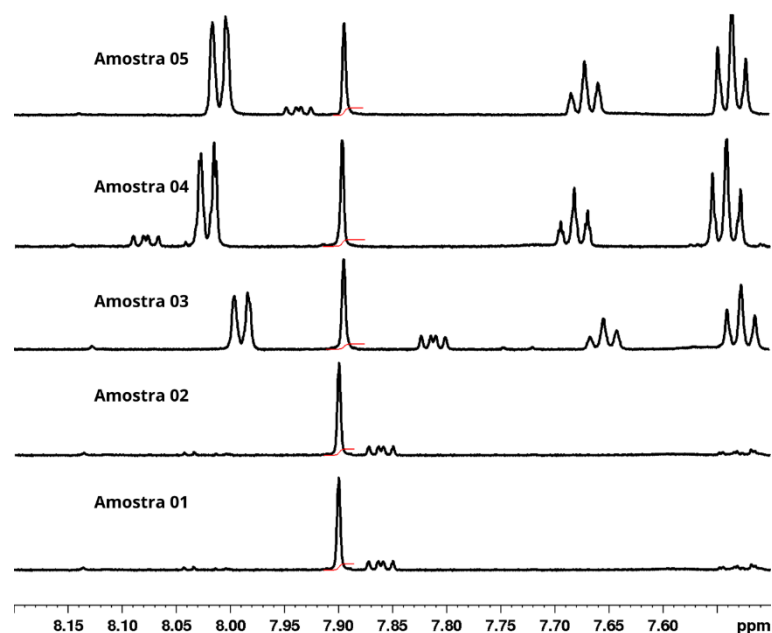
## 5.2. Quantificação de cafeína das amostras comerciais

### Cafeína

O primeiro passo para realizar a quantificação da cafeína nas amostras comerciais foi a análise de todos os espectros obtidos. Ficou evidente que o melhor sinal para a quantificação da cafeína foi o sinal em aproximadamente 7,90 ppm que pertence a um hidrogênio ligado a uma ligação C=C. Esse sinal foi escolhido pelo fato de não haver sobreposição com nenhuma outra substância. Os espectros mostram que há poucos sinais nesta região e praticamente nenhuma sobreposição. Após descartar a possibilidade de interferência, os sinais relativos à cafeína foram integrados manualmente e, então, usando o método PULCON foram feitas suas respectivas quantificações.

As matrizes das amostras são diferentes e podem ser capazes de alterar alguns deslocamentos químicos. O sinal em 7,90 ppm, referente ao simpleto pertencente ao H-1 da cafeína, foi observado nas 5 amostras analisadas com uma pequena variação no deslocamento químico (Figura 26).

Figura 26 - Espectros de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) ampliados no sinal da cafeína usado na quantificação.



Fonte: Autor

Ajustando a equação (3), temos uma equação que correlaciona a concentração do analito com a concentração do padrão.

$$C_x = \frac{RG_{std}}{RG_x} * \frac{A_x}{A_{std}} * \frac{N_{std}}{N_x} * \frac{T_x}{T_{std}} * \frac{\theta_{90x}}{\theta_{90std}} * C_{std}$$

Onde, C: concentração, RG: ganho do receptor, A: área do sinal, N: nº de núcleos, T: temperatura,  $\theta_{90}$ : valor do pulso de 90°. X é referente ao analito e std referente ao padrão.

Substituindo os valores para uma replicata, obtemos o valor

$$C_x = \frac{8}{20,2} * \frac{2217831,63}{251199322,5} * \frac{6}{1} * \frac{298}{298} * \frac{11,26}{11,01} * 0,260 \frac{mol}{L} = 1,397 \text{ mmol/L}$$

Este valor obtido é para a amostra diluída no solvente deuterado 10%, fazendo um simples cálculo de  $C_1V_1=C_2V_2$ , temos que:

$$C_x = \frac{1,397 * 0,55}{0,5} = 1,537 \frac{mmol}{L}$$

O próximo passo é transformar esta concentração obtida em massa por volume:

$$C_x = \frac{1,537mmol}{L} * \frac{194,19g}{1 \text{ mol}} * \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} * \frac{1L}{4 * 250 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 74,6 \text{ mg/250 mL}$$

O cálculo descrito anteriormente foi feito para os demais sinais. Para cada amostra, foi feita uma análise em triplicata. Os resultados obtidos estão na Tabela 12.

Tabela 12 – Concentração de Cafeína nas amostras de bebidas energéticas.

Amostra	[Cafeína] (mg)	Média (mg)	Rótulo (mg)	Desv. Pad	C.V
Marca 01	74,6	74,8 ± 1,3	80	1,16	1,55
	73,6				
	76,0				
Marca 02	74,1	74,7 ± 0,7	80	0,58	0,78
	75,0				
	75,2				



Marca 03	74,2	74,9 ± 1,0	81,25	0,87	1,16
	75,8				
	75,6				
Marca 04	71,5	69,9 ± 2,0	80	1,76	2,51
	70,2				
	68,0				
Marca 05	79,3	79,2 ± 4,4	80	3,91	4,94
	75,2				
	83,1				

Valores para 250 mL

Fonte: Elaborada pelo autor

Considerando as concentrações descritas nos rótulos, a média das triplicatas mostra que as bebidas atendem às normas impostas pela Anvisa, que permite um máximo de 85,7 mg/250 mL. O único valor encontrado que bate com o valor do rótulo foi o da marca 05, os demais valores ficaram abaixo do descrito nos rótulos, 6,5%, 6,6%, 8,1% e 12,6% para as amostras 01, 02, 03 e 04 respectivamente. Em todas as marcas analisadas, tanto o desvio padrão quanto o CV ficaram abaixo de 5 indicando assim que as medidas possuem alta consistência e precisão.

### 5.3. Quantificação simultânea de outras substâncias.

Com o intuito de demonstrar a viabilidade de realizar a quantificação simultânea de outras substâncias, além da cafeína, em misturas complexas, como é o caso de bebidas energéticas, a seguir serão apresentados os resultados de quantificação dos compostos anteriormente identificados.

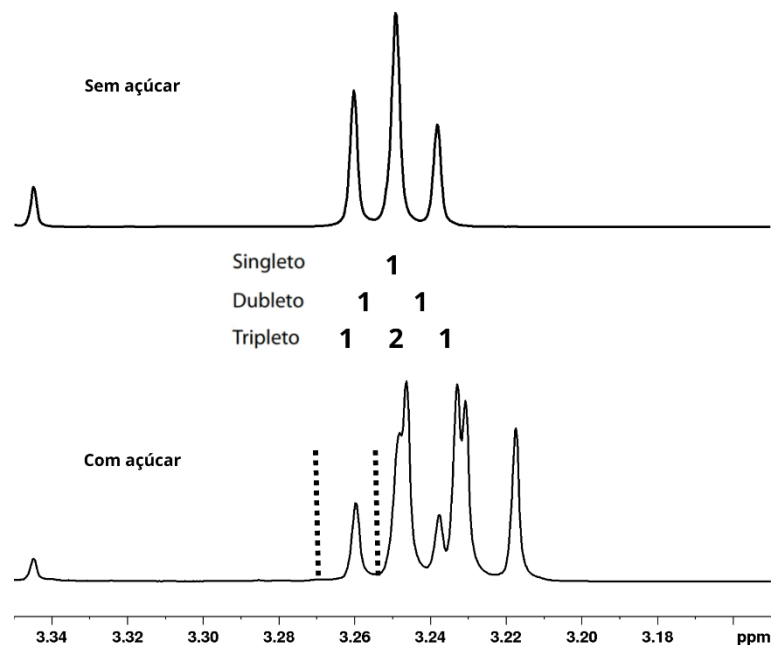
#### *Taurina*

A taurina é um aminoácido não essencial normalmente adicionado em bebidas energéticas por conta das suas propriedades estimulantes e a capacidade de melhorar a resistência física e mental.

Como descrito anteriormente, a identificação da taurina nas amostras foi feita, entretanto seus sinais estão sobrepostos pelos sinais dos açúcares. Em uma tentativa de quantificação com o sinal mesmo sobreposto, foi utilizada a proporção do sinal descrito pelo triângulo de Pascal.

O triângulo de Pascal segue a regra  $n+1$ , sendo cada entrada a soma dos dois acima, à direita e à esquerda. O sinal de RMN é regido pelo triângulo de Pascal que também dita as intensidades. Por exemplo, em um duplete, o desdobramento das duas linhas é praticamente igual em tamanho e em área do sinal. Já em um tripleto, temos uma proporção de 1:2:1. Esta proporção foi usada em uma tentativa de realizar uma quantificação usando a parte da linha tracejada (Figura 27) que corresponde a  $\frac{1}{4}$  da área do sinal da taurina. O sinal escolhido para a quantificação foi o de 3,25 ppm.

Figura 27 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) ampliado das amostras 01 e 02 no sinal da taurina usado na quantificação.



Fonte: Autor

A quantificação foi realizada usando o mesmo cálculo usado para a cafeína, a única diferença foi levar em conta a diferença explicada acima e a quantidade de núcleos que dão origem ao sinal, que no caso é referente a dois hidrogênios.

Tabela 13 – Concentração de Taurina nas amostras.

Amostra	[Taurina] (mg)	Média (mg)	Rótulo (mg)	Desv. Pad	C.V
Marca 01	1185,4	1162,7 ± 26,6	1000	23,52	2,02
	1138,5				
	1164,3				
Marca 02	998,3	1012,8 ± 18,2	1000	16,08	1,59
	1010,2				
	1030,1				
Marca 03	1246,2	1196,9 ± 79,8	1000	70,52	5,89
	1228,3				
	1116,1				
Marca 04	1091,7	1077,7 ± 14,5	1000	12,78	1,19
	1071,9				
	1067,8				
Marca 05	1195,4	1193,4 ± 95,2	1000	84,16	7,05
	1108,3				
	1276,6				

. Valores para 250 mL

Fonte: Elaborada pelo autor

Como explicado anteriormente, o sinal que sobrepõe o da taurina em 3,25 ppm é pertencente à molécula da  $\beta$ -glicose. A aproximação do triângulo de pascal não apresentou resultados satisfatórios (Tabela 12). As amostras 01, 03, 04 e 05 que contêm açúcar tiveram valores excedentes levando-se em conta o intervalo de confiança, o que descarta a possibilidade da utilização desta aproximação para as amostras de energéticos estudados. As amostras 01, 03, 04 e 05 apresentaram um erro relativo de

14%, 16,4%, 7,2% e 16,2% e dessa forma mostra uma disparidade dos valores obtidos com o valor de referência do rótulo, evidenciando ainda mais o descarte dos valores obtidos.

Para a marca 02 que não contém açúcar, os resultados obtidos apresentaram uma boa resposta estando dentro do intervalo de confiança, vale ressaltar que como não há sobreposição do sinal da taurina em 3,25 ppm, o valor da integral utilizado foi o total levando em conta todo o tripleto do sinal.

### *Niacina*

A niacina, possui uma ação no metabolismo energético importante para a reparação do DNA. Ela se mostrou presente em todas as marcas analisadas. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos não apresentaram nenhuma sobreposição no espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, então qualquer um dos sinais poderia ser usado na quantificação. Entretanto, foi escolhido o sinal em torno de 9,05 ppm que se apresenta como um simpleto. Na Tabela 14, temos os resultados de quantificação obtidos para a niacina.

Tabela 14 – Concentração de niacina nas amostras.

Amostra	[Niacina] (mg)	Média (mg)	Rótulo (mg)	Desv. Pad	C.V
Marca 01	16,8	15,9 ± 0,9	16	0,80	5,05
	15,3				
	15,6				
Marca 02	7,3	8,1 ± 0,7	8,5	0,65	7,88
	8,5				
	8,4				
Marca 03	23,0	23,5 ± 0,9	20	0,83	3,52
	24,5				
	23,1				

Marca 04	14,1	14,0 ± 0,1	16	0,09	0,63
	13,9				
	14,0				
Marca 05	13,3	13,7 ± 2,1	16	1,84	13,4
	12,0				
	15,7				

Valores para 250mL

Fonte: Elaborada pelo autor

As amostras 01 e 02 apresentaram valores próximos aos rótulos levando em consideração o intervalo de confiança, entretanto as amostras 03, 04 e 05 apresentaram um erro relativo de 14,9%, 14,3% e 16,8% respectivamente, mostrando que os valores obtidos estão bem distantes dos descritos nos rótulos.

Foram observadas diferentes concentrações para a niacina nas 5 amostras analisadas, mostrando que a adição de niacina pode variar conforme o fabricante. Embora os cálculos tenham apresentados bons desvios padrões, alguns C.V deixam a desejar por estarem em um valor acima de 5. A quantificação deste composto mostra que a RMNq possui sensibilidade o suficiente para detectar concentrações pequenas como 0,064 mg/mL (valor obtido ao dividir a massa encontrada da marca 01 pelo seu volume).

### *Açúcares*

As concentrações obtidas para os açúcares (sacarose,  $\alpha$ - e  $\beta$ -glicose) estão descritas nas tabelas 15, 16 e 17. A amostra 02 não apresentou resultados, pois se trata de um energético zero açúcar. Para os açúcares, o rótulo cita apenas a quantidade dos açúcares totais e não as concentrações individuais de cada açúcar.

Tabela 15 – Concentração de sacarose nas amostras.

Amostra	[Sacarose] (g)	Média (g)	Desv. Pad	C.V
Marca 01	10,16	10,17 ± 0,036	32,03	0,31
	10,21			
	10,15			
Marca 02	---	---	---	---
	---			
	---			
Marca 03	13,04	13,02 ± 0,065	58,05	0,45
	13,05			
	12,95			
Marca 04	2,03	2,02 ± 0,02	17,89	0,45
	2,00			
	2,03			
Marca 05	10,07	10,05 ± 0,515	455,02	4,53
	9,58			
	10,49			

Valores para 250 mL

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 16 – Concentração de  $\alpha$ - glicose nas amostras.

Amostra	[ $\alpha$ - glicose] (g)	Média (g)	Desv. Pad	C.V
Marca 01	3,55	3,56 ± 0,0 20	17,83	0,50
	3,58			
	3,55			
Marca 02	---	---	---	---
	---			
	---			
Marca 03	3,2	3,19 ± 0,004	3,36	0,11
	3,19			
	3,19			

Marca 04	5,15	5,16 ± 0,045	40,23	0,78
	5,13			
	5,20			
Marca 05	3,43	3,41 ± 0,19	171,71	5,03
	3,24			
	3,58			

Valores para 250 mL

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 17 – Concentração de  $\beta$ glicose nas amostras.

Amostra	[ $\beta$ - glicose] (g)	Média (g)	Desv. Pad	C.V
Marca 01	6,24	6,29 ± 0,065	58,09	0,92
	6,27			
	6,35			
Marca 02	---	---	---	---
	---			
	---			
Marca 03	5,59	5,62 ± 0,069	60,67	1,08
	5,69			
	5,58			
Marca 04	8,89	8,97 ± 0,13	116,74	1,30
	8,91			
	9,10			
Marca 05	5,74	5,90 ± 0,456	402,85	6,82
	5,60			
	6,36			

Valores para 250 mL

Fonte: Elaborada pelo autor

As amostras apresentaram bons desvios padrões e C.V. Entretanto, a soma das quantidades de açúcares quantificados ficou muito abaixo das descritas nos rótulos conforme está representado na Tabela 18, o que indica uma possível presença de um ou mais açúcares não identificados.

Tabela 18 – Concentração de açúcares nas amostras.

Amostra	Média (g)	Rótulo (g)
Marca 01	20	27
Marca 02	---	---
Marca 03	21,83	28,75
Marca 04	16,15	22
Marca 05	19,36	27

Valores para 250 mL

Fonte: Elaborada pelo autor



## Etanol

Os valores de etanol presentes nas amostras não estão descritos nos rótulos e, portanto, não temos um valor de referência. As amostras apresentaram um bom desvio padrão, mas para o C.V a marca 05 mostrou um valor acima de 5 (Tabela 19).

Tabela 19 – Concentração de etanol nas amostras.

Amostra	[Etanol] (mg)	Média (mg)	%	Desv. Pad	C.V
Marca 01	88,7	88,7 ± 0,05	0,04	0,04	0,05
	88,6				
	88,7				
Marca 02	99,0	100,2 ± 2,0	0,05	1,78	1,77
	99,4				
	102,3				
Marca 03	272,3	272,5 ± 2,2	0,14	1,95	0,72
	274,6				
	270,7				
Marca 04	78,3	78,4 ± 0,3	0,04	0,27	0,35
	78,1				
	78,7				
Marca 05	72,8	73,6 ± 4,9	0,04	4,33	5,88
	69,7				
	78,2				

Valores para 250 mL

Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar de conter etanol nas bebidas energéticas, elas não são consideradas bebidas alcoólicas. De acordo com a resolução RDC n° 42 de 2009 da ANVISA, as bebidas não alcoólicas podem conter concentrações de até 0,5%, portanto, apesar de ter etanol proveniente da fermentação de açúcares em sua composição, o teor alcoólico delas não é o suficiente para ser considerado uma bebida alcoólica. Em alguns

casos, o etanol pode ser adicionado para aumentar a solubilidade de alguns ingredientes ativos, pode ser usado para a estabilização e conservação de ingredientes e processos de fabricação específicos podem adicionar etanol

### *Citrato de sódio*

Diferente do etanol, a presença de citrato de sódio está descrita nos rótulos de todas as amostras analisadas. As quantidades presentes em cada uma delas estão descritas na Tabela 20. Com exceção da marca 05, todas as outras apresentaram desvios padrões e CV abaixo de 5, mostrando assim uma baixa variabilidade, levando-se em consideração os dados obtidos.

Tabela 20 – Concentração de citrato de sódio nas amostras.

Amostra	[Citrato de sódio] (mg)	Média (mg)	Desv. Pad	C.V
Marca 01	2117,7	2106,7 ± 15,58	13,77	0,65
	2111,2			
	2091,3			
Marca 02	2191,2	2219,6 ± 34,28	30,29	1,36
	2216,1			
	2219,6			
Marca 03	2004,1	1996,1 ± 10,90	9,63	0,48
	1998,8			
	1985,4			
Marca 04	2174,8	2175,7 ± 7,97	7,05	0,32
	2169,1			
	2183,1			
Marca 05	1642,4	1661,0 ± 128,89	113,90	6,86
	1557,6			
	1783,1			

. Valores para 250ml

Fonte: Elaborada pelo autor

Os rótulos dos energéticos, embora relatem a presença de acidulantes, não dizem qual o teor e tampouco suas quantidades. O presente trabalho mostra presença do citrato de sódio em bebidas energéticas. Todas as amostras apresentam uma quantidade parecida de citrato de sódio, indicando que se trata de um padrão entre diversas marcas.

### *Ácido benzoico*

A quantificação desta espécie só foi possível ser efetuada nas amostras 3, 4 e 5, evidenciando que a marca RedBull não adiciona este composto em nenhum dos seus energéticos (marcas 01 e 02).

Tabela 21 – Concentração de ácido benzoico nas amostras.

Amostra	[Ac. benzoico] (mg)	Média (mg)	Desv. Pad	C.V
Marca 01	---	---	---	---
	---			
	---			
Marca 02	---	---	---	---
	---			
	---			
Marca 03	37,2	37,4 ± 0,66	0,58	1,56
	38,0			
	36,9			
Marca 04	52,0	51,4 ± 0,76	0,67	1,31
	51,6			
	50,7			
	71,3			

Marca 05	69,2	72,6 ± 4,66	4,12	5,68
	77,2			

Valores para 250 mL

Fonte: Elaborada pelo autor

Os rótulos das amostras que contem esta substancia indica apenas a presença delas, não estando disponível o teor e nem a concentração dela. Analisando a Tabela 21, vemos que as amostras apresentam bons desvios padrões e C.V com a exceção da amostra 5, mostrando a precisão das triplicatas das amostras.

O presente trabalho teve como objetivo analisar e quantificar a cafeína presentes em bebidas energéticas. A metodologia atingiu não só estes objetivos, com ela foi possível identificar e quantificar diversos componentes presentes nas matrizes das amostras.

Um trabalho já citado aqui, elaborado por Ribeiro (2018) identificou boa parte dos ingredientes da matriz, entretanto não fez a quantificação de todos eles, se limitando apenas a cafeína e taurina. Este trabalho teve como objetivo não só a identificação dos componentes das matrizes, mas também a quantificação destes.

Um ponto a se destacar é que a amostra 02 em praticamente todos os resultados obtidos de quantificação apresentou valores altos para o coeficiente de variação, indicando assim que as medidas realizadas não apresentaram boa precisão. É notável a diferença entre os valores obtidos nas triplicatas. Uma explicação para este fenômeno é a possibilidade de erro no preparo da amostra ou durante a transferência do volume da amostra para o tubo de RMN.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou uma metodologia que demonstrou a viabilidade de identificar e quantificar a cafeína em bebidas energéticas, juntamente a outros compostos. Para alcançar este objetivo, em particular a identificação dos sinais dos componentes da mistura, realizou-se uma extensa busca em banco de dados e revisão de artigos que empregaram esta técnica para a quantificação de diversos compostos.

A análise quantitativa da cafeína revelou que todos os desvios padrões e CV estão abaixo de 5, indicando que os dados obtidos estão bem próximos à média, o que sugere consistência e precisão nas medidas. Em 4 amostras, os valores de cafeína estão abaixo dos indicados nos rótulos, mas dentro do limite permitido pela AN-VISA.

Nem todas as substâncias presentes nas bebidas energéticas puderam ser identificadas, pois a baixa concentração não permitiu a análise por RMN 2D. Além da cafeína, outras 8 substâncias foram identificadas e quantificadas com baixos valores de desvio padrão e CV abaixo de 5. São elas: taurina, niacina, sacarose,  $\alpha$ - e  $\beta$ -glicose, etanol, citrato de sódio e o ácido benzoico. Para alguns casos, os resultados não puderam ser comparados com um valor rotulado, pois a embalagem apenas indica a presença da substância e não a quantidade. Em alguns casos, o deslocamento referente aos sinais estava um pouco deslocado, mas este efeito pode ser devido ao efeito que a matriz causa nos analitos.

Este estudo demonstra a eficácia da RMNq como uma poderosa ferramenta para análise de misturas complexas, podendo assim ter aplicações significativas em várias áreas, desde o controle de qualidade até a pesquisa e desenvolvimento de produtos. Entretanto, é importante conhecer algumas limitações inerentes à técnica, como a baixa sensibilidade às condições experimentais, pois os demais componentes presentes em bebidas energéticas, tais como as vitaminas B2, B5, B6 e B12, não puderam ser quantificados.

## 7. REFERÊNCIAS

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF: ANVISA, 2005. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0273\\_22\\_09\\_2005.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0273_22_09_2005.html)

Alves, R.C.; Casal, S.; Oliveira, B.; Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, v.32, n.8, p.2169-2180, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000800031>.

Ballistreri, M.C.; Corradi-Webster, C.M.; O uso de bebidas energéticas entre estudantes de educação física. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.16 n.spe, p.558-564, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0106-11692008000700009>.

Berigan T.; An anxiety disorder secondary to energy drinks: a case report. *Psychiatry (Edgmont)* 2005; 2:10.

Bharti, S.K.; Roy R.; Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol.35, p.5-26. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>.

Chen Ye, et al. “Trends of Caffeine Intake from Food and Beverage among Chinese Adults: 2004–2018”. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 173, 2023, p.113629. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113629>.

Daly, J.W.; Caffeine Analogs: Biomedical Impact. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2007, v.64, n.16, p. 2153-2169, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7051-9>.

De La Figuera Von Wichmann, Mariano. “Café y enfermedades cardiovasculares”. **Atención Primaria**, v.41, n.11, p 633-36, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2009.09.002>

Fredholm B. B.; Battig K.; Holmen J.; Nehlig A.; Zvartau E.E.; Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Reviews**. v.51, n.1, p.83-133, 1999. PMID: 10049999

De Maria, C.A.B.; Moreira, R.F.A.; Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v.30, n.1, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100021>.

Giráldez-Costas, Verónica, et al. “The Long Way to Establish the Ergogenic Effect of Caffeine on Strength Performance: An Overview Review”. *Nutrients*, vol. 15, no 5, fevereiro de 2023, p. 1178. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/nu15051178>.

Greer, F.; Morales, J.; Coles, M.; Wingate performance and surface EMG frequency variables are not affected by caffeine ingestion. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v.31, n.5, p.597-603, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/h06-030>.

Griffiths R.R.; Woodson P.P.; Reinforcing effects of caffeine in humans. **J Pharmacol Exp Ther**. v.246, n.1, p.21-29, 1988. PMID: 3392652.

Hage, Maria Cristina Ferrarini Nunes Soares, e Masao Iwasaki. “Imagem por ressonância magnética: princípios básicos”. *Ciência Rural*, vol. 39, nº 4, março de 2009, p. 1275–83. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000041>.

Higgins et al., Energy drinks: A contemporary issues paper. *Current Sports Medicine Reports*, v.17, n.2, p.65-72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000454>.

Lee R.A.; Balick M.J.; Rx: Caffeine. *Explore*, v.2, n.1 p.55-59. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.explore.2005.10.012>.

Lopes, D.M.; Cardoso, J.L.; Freitas, R.F.; Avaliação da cafeína em associações medicamentosas. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v.25, n.2, p.71-75, 2013. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v25.e2.a2013.pp71-75>.

Luiz Eduardo Celino Benedito. Desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação da qualidade de cafés torrados, bebidas energéticas e medicamentos contendo esteroides anabolizantes utilizando a espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H. 2018.98. Tese de doutorado – Química, UnB, 2018.

Maes, P; et al.; Qualitative and quantitative control of carbonated cola beverages using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, n.11, p. 2778-2784, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf204777m>.

Mazzola, A.A; et al; Ressonância Magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional; *Revista Brasileira de Física Médica*, v.29, p.117, 2009. Disponível em: [http://hpc.ct.utfpr.edu.br/~charlie/docs/PPGFCET/052\\_Reson%C3%A2ncia.pdf](http://hpc.ct.utfpr.edu.br/~charlie/docs/PPGFCET/052_Reson%C3%A2ncia.pdf)

Nadeem, I.M.; Shanmugaraj, A.; Sakha, S.; Horner, N.S.; Ayeni, O.R.; Khan, M.; Energy Drinks and Their Adverse Health Effects: A Systematic Review and Meta-analysis. **Sports Health: A Multidisciplinary Approach**, v.13, n.3, p.265-277, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1941738120949181>.

Nawrot, P.; Jordan, S.; Eastwood, J.; Rotstein, J.; Hugenholtz, A.; Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.1, p.1–30. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0265203021000007840>.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. **Introdução à espectroscopia**. [Digite o Local da Editora]: Cengage Learning Brasil, 2016. *E-book*. ISBN 9788522123391. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522123391/>. Acesso em: 17 nov. 2023.

Pinto, Vinícius, et al. “ESTUDO DE GASOLINAS PREMIUM E COMUM COMERCIALIZADAS NO BRASIL ATRAVÉS DO MÉTODO ERETIC-RMN E QUIMIOMETRIA”. *Química Nova*, 2023. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230004>.

Protano, Carmela, et al. "Consumption Patterns of Energy Drinks in University Students: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Nutrition*, vol. 107, março de 2023, p. 111904. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111904>.

Quirino, A.A.; Gimenez, F.M.; **Métodos de análise de cafeína em bebidas: Estudo descritivo**. In: XIX Congresso de Iniciação Científica, 2020, Ourinhos-SP. Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica. Ourinhos-SP: Unifio, 2020, v.1, p.83. Disponível em: <http://www.cic.fio.edu.br/anaisCIC/anais2020/pdf/09.01.pdf>

Rahimi, Mohammad Rahman, et al. "The ADORA2A TT Genotype Is Associated with Anti-Inflammatory Effects of Caffeine in Response to Resistance Exercise and Habitual Coffee Intake". *Nutrients*, vol. 15, no 7, março de 2023, p. 1634. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/nu15071634>.

Rath, M.; Energy drinks: What is all the hype? The dangers of energy drink consumption. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v.24, n.2, p.70-76. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2011.00689.x> .

Ribeiro, J.A.; Sebastião, A.M.; Caffeine and Adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease*, v.20, n.1, p.3-15, 2010. Disponível em: <https://doi:10.3233/JAD-2010-1379>. (htt10)

Ribeiro, M.V.M.; Desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação de cafés torrados, bebidas energéticas e medicamentos contendo esteroides anabolizantes utilizando a espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H. 2018.178 p.Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Araraquara, 2018.

Rodrigues, M.M.; Ação da cafeína no sistema nervoso central e na variabilidade da frequência cardíaca. **Revista de Psicologia**, v.14, n.54, p.405-409, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/idonline.v5i54.2985>.

Santana, L.C. et al.; Consumo de Estimulantes Cerebrais por Estudantes em Instituições de Ensino de Montes Claros/MG. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v.44, n.01, p.e036, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-5271v44.1-20190182>.

Santos, M.S.; Colnago, L.A.; Validação de método quantitativo por RMN de <sup>1</sup>H para análises de formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v.36, n.2, p.324-330 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200020> .

Snyder et al; Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. *Proc Natl Acad Sci*. v.78, p.3260-3264, 1981. Doi: 10.1073/pnas.78.5.3260.

Song, Xinjie, et al. "Current Therapeutic Targets and Multifaceted Physiological Impacts of Caffeine". *Phytotherapy Research*, setembro de 2023, p. ptr.8000. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/ptr.8000>.



Tavares, C; Sakata, R. K.; Cafeína para o tratamento de dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.62, n.3, p. 394-401, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-70942012000300011>.

Teng, T.K; O consumo de bebidas energéticas e seus efeitos a saúde. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Wolk, B.J.; Ganetsky, M; Babu, K.M.; Toxicity of energy drinks. **Current Opinion in Pediatrics**, v.24, n.2, p.243-251, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283506827>.

Worthley M.I.; Prabhu A.; De Sciscio P.; et al. Detrimental effects of energy drink consumption on platelet and endothelial function. **The American Journal of Medicine**, v.123, n.2, p.184-187, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.09.013>.

Weber, M.; Hellriegel C.; Rück A. Using high-performance quantitative NMR (HP-qNMR®) for certifying traceable and highly accurate purity values of organic reference materials with uncertainties <0,1%. **Accreditation and Quality Assurance**, v.18, n.2, p.91-98. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00769-012-0944-9>.