CAPÍTULO 5

EXTRAÇÃO DE METILXANTINAS EM GUARANÁ EM PÓ E ANÁLISE DE EXTRATOS GLICÓLICOS DE GUARANÁ E ERVA MATE

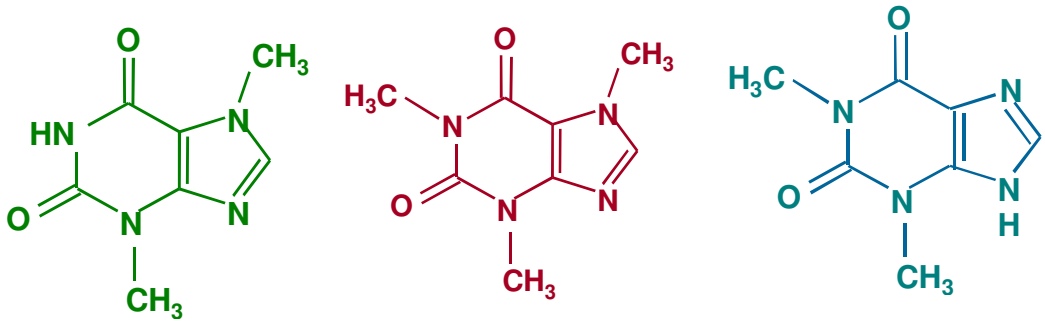
5.1 – O Guaraná e a Erva mate

O guaraná (*Paullinia cupana* KUNTH ex H.B.K., sapidaceae) e a erva mate (*Ilex paraguariensis* ST. HIL., aquifoliaceae) são plantas amplamente utilizadas na medicina tradicional brasileira, sendo empregadas em bebidas caseiras e industriais, como tônicos e em preparações cosméticas.[1,2,3]

Os constituintes químicos encontrados tanto no guaraná quanto na erva mate incluem taninos, polifenóis, aminoácidos, saponinas, alcalóides, entre outros.[1,2,3,4,5] Nos extratos de guaraná, a cafeína é o alcalóide predominante (4.3%)[4]; já nas folhas de erva mate, a cafeína representa 0,8-0,9%, sendo que encontramos também a teobromina (0,08-0,16%).[5]

A cafeína é a mais popular droga consumida mundialmente, sendo usada para dores de cabeça, fadiga, stress e controle de apetite. Dependendo da quantidade ingerida a cafeína pode levar a ansiedade moderada, insônia, depressão e indisposição do estômago.[6]

Cafeína, teobromina e teofilina são designadas como metilxantinas e fazem parte de um grupo de compostos por vezes classificados como alcalóides verdadeiros (alcalóides purínicos), em razão de sua marcante atividade biológica, distribuição restrita e presença estrutural de nitrogênio heterocíclico.[7] Entretanto, em razão de sua origem biogenética, provenientes de bases púricas e não de aminoácidos, como também de seu caráter anfotérico, as metilxantinas são mais propriamente classificadas como pseudoalcalóides. As estruturas das 3 metilxantinas deste estudo estão apresentadas na Figura 48.



Teobromina *Cafeína* *Teofilina*

Figura 48 – Estruturas das metilxantinas.

O guaraná é natural da região norte do Brasil, sendo encontrado principalmente na Amazônia. As partes utilizadas são as sementes secas e levemente torradas. O guaraná é comercializado em quatro formas diferentes: em rama, em bastão, em pó e na forma de xaropes e essências. Além de ser muito utilizado no preparo de bebidas refrigerantes devido às suas propriedades estimulantes, suas propriedades lipolítica e vasodilatadora o tornam adequado para o preparo de cosméticos indicados para o tratamento da celulite. O guaraná é ainda indicado nos casos de esgotamento e no combate à enxaqueca. [1,2] Esta planta tem sido cultivada a séculos pelos tribos Saterê-Mawé e anteriormente pela tribo Guaranis, do qual o nome é derivado.[8]

O mate é uma planta natural da América do Sul, encontrada principalmente na região sul do Brasil, da qual são extraídas as folhas que, quando secas, obtêm-se a erva mate e quando tostadas, o chá mate. Os indígenas a utilizavam para aumentar a resistência à fadiga e reduzir a sede e a fome. Possui efeitos antioxidante, depurativo e vasodilatador, sendo também utilizado como remédio para perda de peso,[3] possui propriedades anti-inflamatórias, terapêuticas, antireumáticas, estimulante diuréticas.[9]

5.1.1 - Análise das metilxantinas em plantas

Pela Farmacopéia Brasileira IV 2003,[10] para verificar a presença de metilxantinas em guaraná é realizada análise por cromatografia em camada delgada, utilizando sílica gel como suporte e mistura de clorofórmio, etanol e ácido fórmico como fase móvel. Após deixar secar a placa, examina-se sob luz UV a 254 nm e a análise é realizada juntamente com os padrões. A presença da teofilina é verificada após nebulização da placa com iodo/iodeto, produzindo coloração violácea. A planta é extraída com hidróxido de amônio 25 % e 40 mL de diclorometano, agitada por 15 min em agitador magnético, seca e ressuspendida em metanol.

Metodologias para a análise de metilxantinas em extratos e preparações de interesse cosmético ou fitoterápico envolvem principalmente a cromatografia em meio líquido[8,11,12,13] e gasoso.[14] Sendo os extratos vegetais constituídos por uma grande variedade de compostos, a maioria dos protocolos de análise necessita a inclusão de um procedimento de

extração ou limpeza prévio. Uma técnica de separação alternativa, com crescente emprego na determinação de metabólitos secundários vegetais,[15,16] é a eletroforese capilar,[17] pois além de características marcantes de desempenho analítico, esta permite a injeção direta de amostras naturais, sem tratamento prévio.

A separação de cafeína de várias drogas de abuso foi demonstrada por Tagliaro e colaboradores,[18] que utilizaram dois modos de eletroforese capilar com detecção de absorbância na região do UV: eletroforese capilar de zona (FSCE), em meio ácido e básico e cromatografia eletrocinética micelar (MEKC). Os dois modos de separação apresentaram resultados equivalentes para as drogas investigadas, porém, a cafeína (que é um composto neutro) foi resolvida apenas no modo MEKC. Zhao e Lunte[19] demonstraram a separação de metilxantinas por MEKC empregando tampões de fosfato de sódio em meio ácido e básico. Investigaram a influência da concentração do tensoativo empregado, dodecilssulfato de sódio, e do eletrólito na qualidade da separação, entre outros parâmetros instrumentais. Condições otimizadas para a determinação de metilxantinas em bebidas (refrigerantes, chá e café) e fluidos biológicos foram alcançadas. Outros investigadores[20,21] desenvolveram metodologias simples empregando MEKC para a determinação de cafeína em amostras de chá, enquanto que Pomilio e colaboradores[22] investigaram o teor de metilxantinas em 14 amostras comerciais e erva mate. Wang e colaboradores[23] obtiveram resultados satisfatórios na análise das metilxantinas em preparações farmacêuticas, empregando MEKC com detecção amperométrica.

5.1.2 - Extração da metilxantinas em plantas

De acordo com Pomilio e colaboradores a extração da erva mate (*Ilex paraguariensis*) foi realizada com água destilada, a 75° C por 30 min, seguido de filtração e limpeza de amostra em cartucho Sep-Pack RP-18.[22]

Segundo Adam e Mainwaring a extração foi feita em 10 g de café em pó sendo refluxado em 100 mL de etanol, por 1,5 a 2 h, o extrato foi evaporado, sendo adicionado água destilada, mantido a 100° C por 30 min.[24]

As folhas de chá (*Camellia sinensis*) foram mantidas a 100° C por

30 min, sendo o extrato obtido filtrado e analisado por HPLC para análise de polifenóis e cafeína por Lin e colaboradores.[13]

De acordo com Breneli, o café e chá mate (*Ilex paraguariensis*) foram dissolvidos em água quente, esfriados, posteriormente sendo adicionado óxido de magnésio, para precipitação de taninos. Acidificou-se o meio com ácido sulfúrico e extraiu-se a cafeína com diclorometano. Em outro procedimento a cafeína foi extraída com Soxhlet em etanol, por 2 h. Evaporou-se o etanol, sendo o resíduo ressuspendido em diclorometano.[25]

Pan e colaboradores extraíram cafeína das folhas do chá verde por microondas, 700 W por 45 s, na temperatura de 85 a 90° C.[26]

No estudo de Nishitani e Sagesaka o chá preto em pó foi extraído com água:acetonitrila (1:1, v:v) por 40 min, em temperatura ambiente.[27]

Folhas de chá verde e preto foram extraídas com água a 100° C por 5 min sendo diluída adequadamente por Bonoli.[28]

Extração de metilxantinas das sementes de guaraná, folhas de mate e cacau foi feita usando fluido supercrítico utilizando como co-solvente etanol, com rendimento de 98% de cafeína em guaraná e mate.[29]

Saldana *et al.* extraíram cafeína, teobromina e teofilina do mate (*Ilex paraguariensis*) usando fluido supercrítico CO_2, após 7 h de extração obteve-se quantidade de cafeína, teobromina e teofilina de 94, 68 e 57%, respectivamente.[30]

5.2 - OBJETIVO

Neste trabalho, foram empregados diferentes modos de extração em duas amostras de guaraná em pó; também foi avaliado um novo protocolo de análise para metilxantinas por MEKC, especificamente visando à determinação quantitativa de cafeína em extratos comerciais de guaraná e erva mate de uso tópico, cuja separação é dificultada pela presença de conservantes.

5.3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.3.1 - Intrumentação

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar (modelo $HP^{3D}CE$ Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com um detector de arranjo de diodos, operando em 274 nm e um controlador de temperatura mantido a 25 °C. As dimensões do capilar foram: 75 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo e 58,0 cm de comprimento total (50,0 cm até o detector). A injeção foi feita hidrodinamicamente, aplicando 10 mbar de pressão por 3 s no frasco contendo a amostra A tensão aplicada durante a aquisição de dados foi de +20 kV. Entre as corridas, o capilar foi condicionado apenas com o eletrólito por 2 min. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L^{-1} (5 min), seguido de água deionizada (5 min) e eletrólito (20 min).

5.3.2 - Reagentes, Padrões e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, os solventes de grau cromatográfico e a água utilizada no preparo das soluções foi desionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, E.U.A.) e dissolvidos em água na concentração de 1000 μg mL^{-1}, perfazendo as soluções estoque. Soluções aquosas de cafeína nas concentrações 34,3, 68,5, 137, 274 e 548 μg mL^{-1} foram preparadas para a construção da curva analítica, por diluição apropriada da solução estoque. O eletrólito consistiu de uma solução tampão de tetraborato de sódio a 20 mmol L^{-1} contendo 70 mmol L^{-1} de dodecilssulfato de sódio (SDS), pH 9,3.

5.3.3 - Amostras e seu preparo

Os extratos comerciais de guaraná (GUARANÁ HG, lote FS 84970600) e erva mate (ERVA MATE HG, lote FS 84270500), assim como a matéria-prima para o extrato de guaraná, que consistia do fruto seco pulverizado (lotes 11530-0702/MP e 11540-0702/MP), foram obtidos da Farma Service Bioextract Ltda. (São Paulo, SP). As amostras foram

estocadas sob refrigeração até a análise. Os extratos foram diluídos em água na proporção 1:30. Soluções aquosas da amostra de guaraná em pó (lote 11530-0702/MP) foram preparadas na proporção de 100 mg para 20,00 mL para os testes de extração. Estas soluções foram processadas em ultra-turrax (modelo QI252-21, IKA Works do Brasil Ltda, Rio de Janeiro), com 13000 rpm, em intervalos de 30 s, 1 min e 5 min, ou em ultra-som (modelo T7, Thronton Eletronica, São Paulo, SP), de 40 kHz, em intervalos de 5, 10 e 30 min. A extração exaustiva de uma amostra de guaraná em pó (2 g), mesmo lote, foi realizada em etanol (200 mL), utilizando um extrator do tipo Soxhlet. Após um período de 24 h, o extrato obtido foi seco sob nitrogênio e o resíduo suspendido em água na proporção 1:5.

5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 - Análise de metilxantinas por MEKC

Alcalóides em geral possuem caráter básico e, portanto, são passíveis de protonação em meio ácido, resultando em espécies catiônicas facilmente separáveis por eletroforese capilar em solução livre. Porém, as metilxantinas, embora sejam compostos nitrogenados, apresentam propriedades diferentes dos demais grupos de alcalóides. No caso extremo, a cafeína, onde apenas um átomo de nitrogênio é sujeito à protonação, sendo os demais metilados, o composto possui pK_a de 0,6 e 14.[31] Sendo assim, o composto é neutro na faixa de pH útil para separação eletroforética em capilar, ou seja de pH 2 a 12. Dessa forma, a separação simultânea das metilxantinas só é viável se conduzida em meio micelar, onde a seletividade é obtida pela interação diferenciada dos compostos neutros com o interior hidrofóbico da micela, usualmente com carga negativa.[17] A escolha do pH recai então no controle do fluxo eletrosmótico e, portanto pH elevados são mais convenientes, pois propiciam separações mais rápidas.

Com 70 mmol L^{-1} de SDS a separação foi satisfatória, como mostra a Figura 51, juntamente com os extratos avaliados neste estudo (Figura 52 e 53).

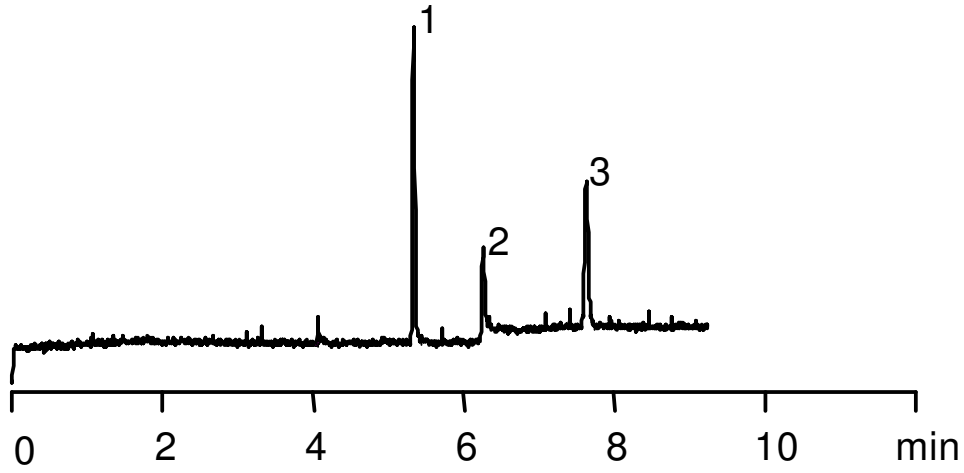


Figura 51 – Separação das metilxantinas em meio micelar. Condições de separação: 274 nm, 25 °C, capilar de 58 cm x 75 µm d.i., 375 µm d.e, injeção 10 mbar / 3 s, tensão de 20 kV, tampão: TBS 20 $mmolL^{-1}$, SDS 70 $mmolL^{-1}$, pH 9,3. 1 - Teobromina, 2 – Cafeína e 3 – Teofilina.

Muito embora a resolução entre a cafeína e os demais compostos seja completa, a análise não ocorre em tempo curto, em função do alto teor de SDS e relativamente alta concentração de borato no eletrólito. Cabe ressaltar que a composição do eletrólito foi otimizada em função da composição da amostra a ser investigada, ou seja, extratos vegetais de uso tópico. Nos extratos, a presença de uma mistura de parabenos (ésteres do ácido 4-hydroxibenzóico), em alta concentração, interfere com a migração dos analitos e, portanto a concentração salina do eletrólito foi aumentada para que a eluição dos parabenos ocorresse em tempos maiores.[32]

Conservantes são comumente adicionados a vários alimentos, farmacêuticos e produtos cosméticos para prolongar o tempo de vida do produto, evitando alteração e degradação por microorganismos durante a estocagem. Micelas de SDS com interior hidrofóbico têm forte interação com os quatro parabenos metil, etil, propil e butil-parabenos, com o qual possui maior propriedade hidrofóbica que os demais conservantes, produzindo facilmente complexos carregados negativamente com micelas de SDS.[32]

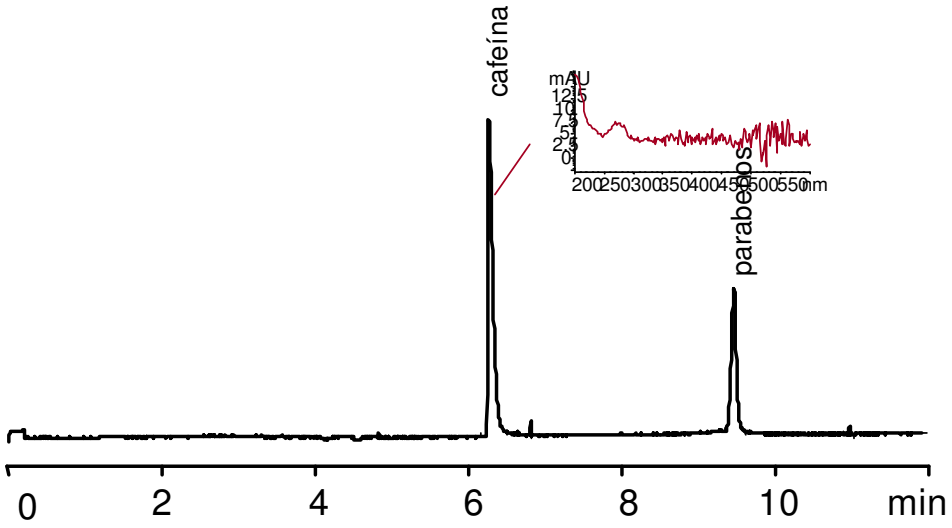


Figura 52 - Eletroferograma de um extrato comercial hidroglicólico de guaraná de uso tópico. Condições como na Fig. 51.

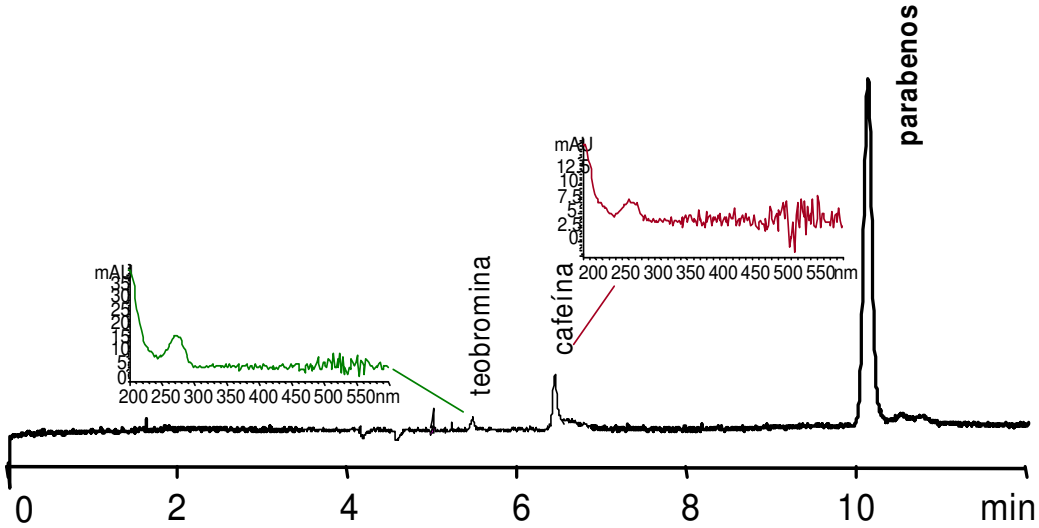


Figura 53 - Eletroferograma de um extrato comercial hidroglicólico de erva mate de uso tópico. Condições como na Fig. 51.

5.4.2 - Otimização da extração de cafeína em guaraná em pó

Antes de proceder-se à quantificação de cafeína nas amostras de matéria-prima para o extrato de guaraná, um estudo comparativo de eficiência de extração foi conduzido. Neste estudo, a extração exaustiva de cafeína de guaraná em pó, utilizando um extrator do tipo Soxhlet, foi usada como referência. O conteúdo de cafeína do extrato resultante foi comparado com extratos preparados por processamento de soluções de mesma relação massa:volume, em ultra-turrax e ultra-som, em tempos variados (Figura 54).

Como observado na Fig. 54, o processamento das amostras em ultra-turrax (5 min) e ultra-som (10 min), rapidamente atinge o teor de cafeína do extrato de referência, com recuperações de 100,01 ± 0,94 % e 100,45 ± 0,84 %, respectivamente. Na avaliação quantitativa do teor de cafeína em amostras de guaraná em pó, uma extração em ultra-turrax por 5 min foi selecionada.

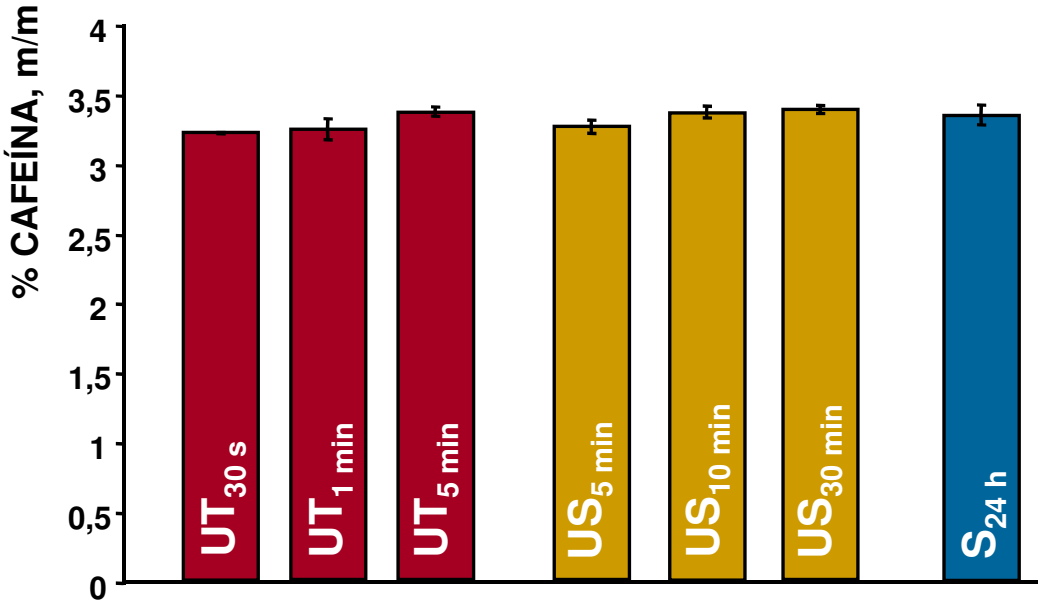


Figura 54 - Otimização das condições de extração de cafeína de amostras de guaraná em pó. Concentração da amostra: 100 mg de guaraná em pó (matéria-prima, lote 11530-0702/MP) para 20,00 mL de água. Legenda: ultra-turrax a 13000 rpm (UT), ultra-som com potência de 40 kHz W (US) e Soxhlet (S).

5.4.3 - Quantificação de cafeína nas amostras

Algumas figuras de mérito do método proposto para cafeína estão apresentadas na Tabela 28. O método apresenta uma excelente linearidade (r^2>0,99) no intervalo de concentração estudado, com estimativas de limite de detecção e quantificação de 2,00 µg mL^{-1} e 6,07 µg mL^{-1}, respectivamente, a partir dos dados estatísticos de ajuste da curva.[33] A repetibilidade do método para seis injeções consecutivas de uma solução

padrão de cafeína a 274 μg mL^{-1} apresentou um coeficiente de variação de 0,70 %.

Tabela 28 - Figuras de mérito do método proposto para a determinação de cafeína em extratos vegetais.

PARÂMETRO	DADO ESTATÍSTICO
Intervalo de concentração (μg mL^{-1})	35 - 550
Equação da reta	y = 1,403 x – 2,131
Coeficiente de correlação, r^2	0.999997
Limite de detecção (μg mL^{-1})	2,00
Limite de quantificação (μg mL^{-1})	6,07
Precisão da injeção (área do pico)	0,7 % CV
Recuperação da extração (ultra-turrax por 5 min)	100,01

Foram analisados extratos comerciais hidroglicólicos de guaraná e erva mate que empregam propilenoglicol, etanol, água e glicerina em sua formulação. Os extratos foram injetados diretamente sem tratamento prévio (Figuras 52 e 53). Na condição empregada para análise é possível visualizar a cafeína como a metilxantina predominante no extrato de guaraná (Figura 52), não sendo observado o pico da teobromina. Já o extrato de erva mate (Figura 53) apresenta além de cafeína, um pequeno teor de teobromina. O pico eluindo em cerca de 10 min corresponde a mistura de parabenos, utilizados como conservantes nos extratos.

A quantificação de cafeína nos extratos e em duas amostras de guaraná em pó é apresentada na Tabela 29, confirmando o alto teor de cafeína no extrato de guaraná comparado ao extrato de erva mate.

Tabela 29 - Quantificação de metilxantinas em extratos hidroglicólicos de erva mate e guaraná e amostras de guaraná em pó.

AMOSTRAS	CAFEÍNA (g kg^{-1})	TEOBROMINA*(g kg^{-1})
GUARANÁ HG#		-
lote FS 84970600	6,84 ± 0,20	
ERVA MATE HG#	0,21 ± 0,02	0,050 ± 0,006
lote FS 84270500		
Guaraná em pó##		-
lote 11540-0702/MP	36,8 ± 0,9	
Guaraná em pó##		-
lote 11530-0702/MP	33,4 ± 0,7	

extratos hidroglicólicos de uso tópico

matéria-prima

* estimado a partir de um ponto analítica

5.5 - CONCLUSÕES

A extração por ultra turrax (5 min) da cafeína em guaraná mostrou ser rápida, de baixo custo, sem a presença de interferentes, sendo uma alternativa prática no controle de qualidade de cafeína em amostras comerciais.

Neste trabalho foi verificado que a eletroforese capilar é uma técnica alternativa interessante para a análise de metilxantinas em extratos vegetais, obtidos a partir de folhas e frutos, principalmente devido à possibilidade de injeção direta do extrato sem necessidade de tratamento prévio. O método proposto é relativamente rápido, livre de interferentes e com desempenho analítico adequado para a quantificação de cafeína em extratos de guaraná e erva mate.

5.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M., *Herbarium Compêndio de Fitoterapia, Herbarium Laboratório Botânico Ltda.*, Curitiba,1995.

2 - www.rain-tree.com.br/yerbamate.htm, acessado em outubro / 2005.

3 - www.rain-tree.com.br/guarana.htm, acessado em outubro / 2005.

4 - BAUMANN, T.W.; SCHULTHESS, B.H.; HÄNNI, K., *Phytochemistry*, v.39, n.5, p.1063-1070, 1995.

5 - ASHIHARA, H.; CROZIER, A., *Trends Plant Sci.*, v.6, n.9, p.407-413, 2001.

6 - HARLAND, B.F., *Nutrition*, v.16, n.7/8, p.522-526, 2000.

7 - RATES, S.M.K., *Metilxantinas em Farmacognosia. Da planta ao medicamento*, SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., 3.ed., Florianópolis – Porto Alegre Editora da UFSC e Editora da UFRGS, 2001.

8 - CARLSON, M.; THOMPSON, R.D., *J. AOAC Int.*, v.81, n.4, 691-701, 1998.

9 - ESMELINDRO, A.A.; GIRARD, J.S.; MOSSI, A.; JACQUES, R.A.; DARIVA, C., *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.1990-1995, 2004.

10 - Farmacopéia Brasileira IV – 4 ed., São Paulo, Atheneu Editora, 1988.

11 - CAMARGO M.C.R.; TOLEDO, M.C.F., *J. Sci. Food Agric.*, v.79, p.1861-1864, 1999.

12 - LIANG, Y.; LU, J.; AHZNG, L.; WU, S.; WU, Y*., Food Chem.*,v.80, p.283-290, 2003.

13 - LIN, Y.S.; TSAI, Y.J.; TSAY, J.S.; LIN, J.K., *J. Agric. Food Chem.*, v.51, n.7, p.1864-1873, 2003.

14 - PAGLIARUSSI, R.S.; FREITAS, L.A.P.; BASTOS, U.K., *J. Sep. Sci.*, v.25, n.5-6, p.371-374, 2002.

15 - TOMÁS-BARBERÁN, F.A., *Phytochem. Anal.* v.6, p.177-192, 1995.

16 - SUNTORNSUK, L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* v.27, p.679-698, 2002.

17 - TAVARES, M.F.M., *Quím. Nova* v.19, p.173-181, 1996; ibid, v.20, p.493-511, 1997.

18 - TAGLIARO, F.; SMITH, F.P.; TURRINA, S.; EQUISETTO, V.; MARIGO, M., *J. Chromatogr. A*, v.735, p.227-235, 1996.

19 - ZHAO, Y., LUNTE, C.E., *J. Chromatogr. B,* v.688, p.265-274, 1997.

20 - VOGT, C.; CONRADI, S.; ROHDE, E., *J. Chem. Educ.*, v.74, n.9, p.1126-1130, 1997.

21 - WATANABE, T.; NISHIYAMA, R.; YAMAMOTO, A.; NAGAI, S.; TERABE, S., *Anal. Sci.,* v.14, p.435-438, 1998.

22 - POMILIO, A.B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A.A., *Phytochem. Anal*. v.13, n.4, p.235-241, 2002.

23 - WANG, A.; LIJUN, L.; ZANG, F.; FANG, Y., *Anal. Chim. Acta,* v.419, p.235-242, 2000.

24 - ADAM, D.J.; MAINWARING , J, QUIGLEY, M.N., *J. Chem Education,* v.73, n.12, p. 1171-1173, 1996.

25 BRENELLI, E.C. *Quím. Nova,* v.26, n.1, 136-138, 2003.

26 PAN, X.; NIU, G.; LIU, H,

27 NISHITANI, E.; SAGESAKA, Y.M., *J. Food Compos. Anal.,* v.17, n.5, 675-685, 2004.

28 BONOLI, M.

29 - SALDANA, M.D.A.; ZETZL,C.; MOHAMED, R.S.; BRUNNER, G., *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.4820-4826, 2002.

30 - SALDANA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; BAER M.G.; Mazzafera, P., *J. Agric. Food Chem.,* v.47, p.3804-3808, 1999.

31 - TAYLOR, J.B., TRIGGLE, D.J., *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rationary Design, Mechanistic Study & Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Vol. 6, Pergamon Press, Oxford, 1990.

32 - HUANG, H-Y.; LAI, Y-C.; CHIU, C-W.; YEH, J-M., *J. Chromatogr*. A, v.993, p.153-164, 2003.

33 - SWARTZ M.L.; KRULL I.S., *Pharm. Tech*. v.2, p.12-20, 1998.