

Estudo da metodologia de análise de cafeína em sementes de guaraná (*Paullinia cupana*)*

Analytical methodology study of caffeine in guarana seeds

Liamara Andrade¹, Eloir Paulo Schenkel² & Ana Maria Bergold²

RESUMO – Foram desenvolvidos métodos empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do ultravioleta para determinação quantitativa de cafeína em sementes de guaraná, e seus resultados comparados com o método preconizado pela F. Bras. III (método gravimétrico). O método cromatográfico consistiu na utilização de coluna de fase reversa e detecção a 271 nm, empregando como fase móvel metanol:água (25:75). O método espectrofotométrico foi padronizado a 271 nm, empregando solução de ácido sulfúrico 2,5% (V/V) como solvente. A técnica gravimétrica foi considerada inadequada por apresentar baixa precisão e exatidão. A exatidão dos métodos por CLAE e espectrofotometria no ultravioleta foi confirmada por ensaios de recuperação. Das amostras comerciais analisadas, cerca de 27%, apresentaram teores de cafeína abaixo do limite preconizado pela F. Bras. III.

PALAVRAS-CHAVE – Guaraná; *Paullinia cupana*; cafeína.

SUMMARY – HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods for the determination of caffeine in guarana seeds were developed, and its results were compared with the method recognized by the Brazilian Pharmacopoeia, 1977. Using methanol:water (25:75) as a mobile phase, the chromatographic determination was made by a reversed phase column with ultraviolet detection at 271 nm. The spectrophotometric method was standardized at 271 nm, using a solution of 2,5% (v/v) sulfuric acid as solvent. The gravimetric method was considered inadequate because it shows low accuracy and precision. The accuracy of HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods was confirmed by recovery tests. Around of 27% of the analyzed market products exhibit content of caffeine under recommended by Brazilian Pharmacopoeia.

KEY WORDS – Guarana; *Paullinia cupana*; caffeine.

INTRODUÇÃO

O guaraná, preparado a partir da semente de *Paullinia cupana*, tem amplo uso no Brasil e também no exterior. É considerado como suplemento alimentar e também como medicamento, segundo o Catálogo Brasileiro de Medicamentos¹, onde estão listadas 121 especialidades farmacêuticas contendo o produto. Sua principal utilização se deve à ação estimulante do sistema nervoso central, a qual é atribuída ao elevado teor de cafeína (em torno de 5%) presente em suas sementes^{2,5,7,8,9}.

Pesquisas realizadas em vários órgãos oficiais levam a concluir que a produção de guaraná não atende à demanda, o que leva a supor a existência de fraude no preparo do pó de guaraná. Isto é confirmado por análises oficiais condenando estes produtos¹³. Estes fatos denotam a necessidade de desenvolvimento de métodos de controle de qualidade aplicáveis, tanto em laboratórios sofisticados, como em pequenas empresas. O objetivo do presente trabalho é padroni-

zar métodos analíticos precisos, sensíveis, reprodutíveis, de fácil execução e baixo custo, aplicáveis ao doseamento de cafeína em amostras de guaraná em pó, e realizar comparação com o método proposto pela Farmacopéia Brasileira III (F. Bras. III)⁶.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Reagentes, substância química de referência e amostras

Foram utilizados reagentes de grau analítico, procedência Merck. A substância química de referência utilizada foi cafeína, com pureza estimada em 100%, de procedência Merck. As amostras de guaraná analisadas foram sementes íntegras, de diferentes procedências, denominadas 1 e 1a, respectivamente, e amostras comerciais (na forma de pó) obtidas do comércio de Manaus, Porto Alegre, Natal e Alemanha, em número de 11, denominadas pelos números de 2 a 12.

Equipamentos

- Cromatógrafo líquido Waters, equipado com duas bombas de fluxo Waters, injetor manual Rheodyne, com alça dosadora de 20,0 µL, detector UV variável e integrador Waters.
- Coluna Nova Pak C8, 4 µm e pré-coluna LiChrosorb RP 18,5 µm.
- Espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, mod. 2201.

Métodos

Cromatografia líquida de alta eficiência

A padronização do método foi feita através da elaboração da curva padrão utilizando solução aquosa de cafeína em concentração variando de 1,0 a 5,0 µg/mL, obtida a partir de uma solução aquosa de 100 µg/mL de cafeína.

Para análise das amostras, 50 mg de guaraná em pó foram aquecidos sob reflu-

Recebido em 05.01.99

*Parte do trabalho de Mestrado do primeiro autor / Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

¹Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica - RS. Av. Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre - RS

²Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS

FIGURA 1
Cromatograma obtido para extrato aquoso

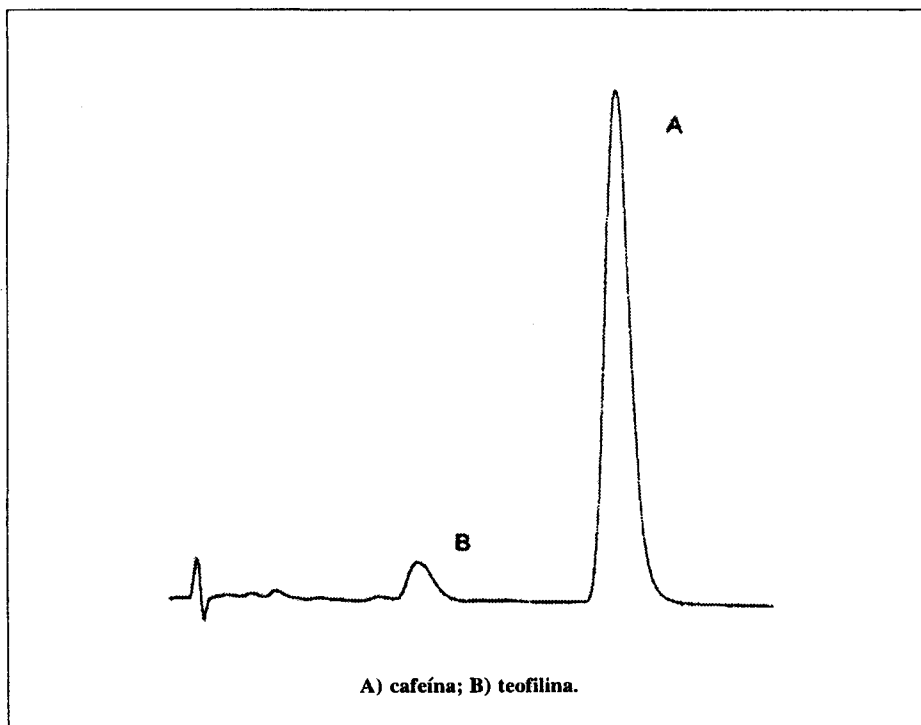


TABELA I
Valores experimentais médios obtidos para determinação de cafeína nas amostras 1 e 1a de guaraná, através de CLAE

Amostra	Teor médio (%)	CV%
1	5,07	1,6
1a	4,95	

TABELA II
Valores experimentais obtidos no teste de recuperação realizado nas amostras 1 e 1a de guaraná, através de CLAE

Amostra	Quant. adicionada (µg/mL)	Quant. recuperada (µg/mL)	Recuperação R%
1	1,00	1,01	100,10
	2,00	1,93	96,50
	3,00	2,94	98,00
1a	1,00	0,99	99,00
	2,00	2,02	101,00
	3,00	3,00	100,00

xo por 15 minutos em 20 mL de água e uma gota de ácido clorídrico R. Após resfriamento, a solução decantada foi filtrada sobre algodão para balão volumétrico de 250 mL. O resíduo foi extraído 3 vezes com 20 mL de solução aquosa ácida, sendo essas soluções adicionadas ao balão volumétrico de 250 mL. Após completar o volume com água, transferiu-se uma alíquota de 25,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se a concentração teórica de 2,5 µg/mL de cafeína³.

A detecção foi efetuada a 271 nm, com fluxo de 0,5 mL/min. Os teores encontrados representam a média de nove determinações.

Com objetivo de determinar a exatidão do método, foram adicionadas quantidades conhecidas da substância química de referência às amostras¹.

Espectrofotometria na região do ultravioleta

Traçaram-se espectros da solução padrão de cafeína (12,5 µg/mL) e da solução amostra de guaraná, com concentração teórica de 12,5 µg/mL de metilxantinas.

Para padronização do método, transferiram-se alíquotas definidas da solução contendo 500 µg/mL de cafeína, variando de 1,0 a 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com solução de ácido sulfúrico 2,5% (V/V).

Para análise das amostras, 250 mg de guaraná em pó foram extraídos com 20 mL de solução de ácido sulfúrico 2,5% (V/V)¹² com agitação mecânica, durante 15 minutos, por 4 vezes, filtrando as porções para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume e transferiram-se 10,0 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se a concentração teórica de cafeína em torno de 15 µg/mL.

As absorvâncias das soluções padrão e das amostras foram medidas a 271 nm, utilizando solução de ácido sulfúrico 2,5% (V/V), como solução de compensação. Os resultados obtidos para as amostras representam a média de nove determinações.

Para o teste de recuperação foram preparadas soluções de amostra e soluções de substância química de referência. Diferentes quantidades de solução de substância química de referência foram adicionadas às soluções de amostra, e a determinação efetuada de acordo com a técnica preconizada¹.

Gravimetria

Para determinação de cafeína em amostra de guaraná foi utilizada técnica descrita na F. Bras. III.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para análise por CLAE foi utilizado a

técnica de extração proposta por Belliaro e colaboradores (1985)³.

O cromatograma apresentado na Fig. 1 mostra a predominância de cafeína, junto com teofilina em teor significativamente menor. Teobromina não foi detectada. O tempo de retenção da cafeína foi de aproximadamente 8 minutos.

Para determinação do teor de cafeína foi preparada uma curva padrão, para a qual foi calculada a seguinte equação da reta ($y = a + bx$), $y = 0,11447 + 2,97814x$ e coeficiente de correlação, $r = 0,9988$.

O teor de cafeína das amostras 1 e 1a, por este método, variou entre 4,95% e 5,07%, conforme mostra a Tab. I. O coeficiente de variação percentual médio foi 1,6%, indicando que o método tem boa reprodutibilidade.

O teste de recuperação, cujos resultados para as amostras 1 e 1a estão representados na Tab. II, indica a exatidão do método.

Com o objetivo de verificar a existência de interferentes no comprimento de onda de absorção máxima, foram medidos espectros da solução de substância química de referência cafeína e solução de amostra de guaraná, sendo obtidas curvas de absorção idênticas. Para a curva padrão calculou-se a respectiva equação da reta ($y = a + bx$), $y = -0,01079 + 0,04672x$ e seu coeficiente de correlação, $r = 0,9990$.

Na Tab. III encontram-se os resultados obtidos pela espectrofotometria no ultravioleta para as amostras I e Ia. O teor encontrado por este método variou entre 5,27% e 5,46%. O coeficiente de variação percentual médio foi 1,9%, indicando a boa reprodutibilidade do método. A exatidão do método é comprovada pelo teste de recuperação, cujos resultados para as amostras I e Ia são apresentados na Tab. IV.

Observou-se que em relação à CLAE, os teores de cafeína determinados por esta técnica são mais elevados e apresentam diferença significativa na análise comparativa dos resultados, através do teste "t" de Student¹¹. Esta diferença, provavelmente, se deve à detecção de teofilina, além de cafeína, no método espectrofotométrico¹⁰. Na

prática, esta diferença pode ser considerada quimicamente não significativa¹⁴. Por isso sugere-se para o controle de rotina do guaraná a utilização do método espectrofotométrico na região do ultravioleta em razão de sua simplicidade, facilidade de execução e menor custo. Em função disso, utilizou-se espectrofotometria na região do ultravioleta para determinação de cafeína em amostras comerciais de guaraná, cujos resultados estão mostrados na Tab. V. As amostras 4, 9 e 11 apresentaram teores de cafeína inferiores a 3,5%, o que indica que não deveriam ser comercializados⁶.

Os resultados obtidos no doseamento de cafeína na amostra de guaraná, utilizando o método preconizado pela F. Bras. III, estão representados na Tab. VI. O teor de cafeína

em amostra de guaraná encontrado através do método gravimétrico (0,94%) foi bastante inferior aquele preconizado pela F. Bras. III (no mínimo 3,5%)⁶, o que mostra ser totalmente inadequada sua utilização, além de não apresentar reprodutibilidade (CV% = 57) e sensibilidade (R% = 47,33).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*, 15 ed., Arlington, v. 1, p. XVII, 1990.
2. Beck, H. T. A survey of the useful species of *Paullinia* L. (Sapindaceae). *Adv. Econ. Bot.*, 8: 41-56, 1990.
3. Belliardo, F.; Martelli, A. & Valle, M. G. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and *Cola* spp. samples. *Zeit. für Lebensm.-Unters. und Fors.*, 180: 398-401, 1985.
4. Brasil. Ministério da Saúde. *Catálogo Brasileiro de Produtos Farmacêuticos*. Brasília, 1984, v. 3.
5. Briggs, C. Guarana. *Can. Pharm. J.*, 125: 222-224, 1992.
6. *Farmacopéia Brasileira*. 3 ed. São Paulo: Andrei, 1977. p. 829-831.
7. Henman, A. R. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. *J. Ethnopharm.*, 6: 311-338, 1982.
8. Katzung, W. Guarana-ein natur Produkt mit hohem Coffeingehalt. *Med Mo Pharm.*, 16(11):330-332, 1993.
9. Lautenbacher, L. Guarana. Wunderdroge oder Genußmittel?. *Deut. Apoth. Zeit.*, 134(31), 1994.
10. Marx, F; Pfeilsticker, K. & Maia, J. G. S. Zur Analytik von Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Deut. Lebensm. Runds.*, 12: 390-392, 1985.
11. Miller, J. C. & Miller, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*. 2. ed. Chichester: Horwood, 1988.
12. Sattler, H. Spektralphotometrische Methoden zur Bestimmung von Arzneistoffen in Pharmazeutischen Präparaten. *Pharmaz. Zeit.*, 34: 1269-1272, 1964.
13. Simão, G. L.; Muradian, J.; Carvalho, J. P. P. Isolamento do pigmento vermelho natural do pó do guaraná e doseamento de cafeína no extrato clorofórmico. *Rev. Agric.*, 59(2): 187-202, 1984.
14. Youden, W. J. Accuracy of analytical procedures. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 45: 169-173, 1962.

TABELA III

Valores experimentais médios obtidos para determinação de cafeína nas amostras I e Ia de guaraná, através de espectrofotometria na região do UV a 271 nm

Amostra	Teor médio (%)	CV%
I	5,46	1,9
Ia	5,27	

TABELA V

Valores experimentais médios obtidos para determinação de cafeína nas amostras comerciais de guaraná, através de espectrofotometria na região do UV a 271 nm.

Amostra	Teor médio (%)	CV%
2	6,10	2,20
3	5,73	1,75
4	3,05	0,19
5	5,01	1,84
6	5,42	0,26
7	5,88	1,99
8	5,92	0,57
9	2,95	1,34
10	5,41	1,52
11	2,99	0,83
12	5,72	0,70

TABELA IV

Valores experimentais obtidos no teste de recuperação realizado nas amostras I e Ia de guaraná, através de espectrofotometria na região do UV a 271 nm

Amostra	Quant. adicionada (µg/mL)	Quant. recuperada (µg/mL)	Recuperação R%
I	5,00	5,18	103,60
	10,00	9,88	98,80
	15,00	15,11	100,73
Ia	5,00	5,07	101,40
	10,00	9,93	99,30
	15,00	14,99	99,93

TABELA VI

Valores obtidos para o doseamento de cafeína na amostra I de guaraná, através do método preconizado pela F. Bras. III

Amostra	Teor médio (%)	CV%
A	0,60	57
B	1,08	
C	1,74	
D	0,33	
E	0,95	

Isolamento de triterpenos de *Schinus molle* inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ACE)

Olaessom, K. e col. - *Planta Medica* 63(4): 352-355, 1997

A conduta do fracionamento da bioatividade de extrato das folhas de *Schinus molle* (anacardiacea), usando um ensaio *in vitro* levaram os isolamento de triterpeno esteroidal inibidor de ACE.

O uso de inibidores conversores da angiotensina para o tratamento da hipertensão é uma terapêutica bem estabelecida na moderna medicina.