

INTRODUÇÃO DA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA NA DETECÇÃO DA CAFEÍNA EM GUARANÁ*

Mariângela T. AURICCHIO**
Mônica A. BATISTIC**
Vânia R. HOPPEN**

RIALA6/625

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A. & HOPPEN, V.R. — Introdução da técnica espectrofotométrica na detecção da cafeína em guaraná. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):39-44, 1987.

RESUMO: Foram comparados os resultados da determinação quantitativa da cafeína em guaraná de acordo com o método gravimétrico descrito na Farmacopéia Brasileira, 3ª edição, com os da determinação espectrofotométrica dos resíduos obtidos dissolvidos em ácido clorídrico 0,1 N, com leitura a 273 nm. A presença de outras substâncias de natureza não xantínica no resíduo foi mostrada através de cromatografia em camada delgada, usando-se fases móveis de diferentes polaridades. Os valores obtidos por espectrofotometria foram sempre menores do que os obtidos por gravimetria.

DESCRITORES: guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), determinação de cafeína em; cafeína, determinação em guaraná; espectrofotometria.

INTRODUÇÃO

O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) é uma planta nativa característica do norte da América do Sul², tendo seu uso difundido como tônico, estomáquico e estimulante⁵.

As primeiras notícias de seu estudo químico foram dadas por Theodor Martius, segundo CAGNO², 1942. Posteriormente, foram realizadas várias pesquisas visando a caracterização dos componentes químicos do guaraná. Isolou-se, dessa forma, um composto denominado inicialmente de guaranina, que mais tarde ficou demonstrado tratar-se de cafeína, cujo teor tem sido utilizado como parâmetro de qualidade do produto vegetal². A quantificação da cafeína em guaraná, entretanto, tem sido realizada apenas através da determinação gravimétrica^{2,3,4,6} embora alguns autores¹⁶ tenham utilizado métodos espectrofotométricos. Muitos métodos analíticos existem, para quantificação da cafeína e/ou teobromina e teofilina em café, chá, chocolate^{8,9,12}. Estes métodos incluem a cromatografia em fase gasosa e cromatografia líquida de alta resolução^{1,4} que, no entan-

to, não têm sido aplicados ao estudo do guaraná, pois a maioria dos laboratórios brasileiros não dispõe destes equipamentos especializados.

Mais recentemente, Simão et alii¹⁵ assinalaram a importância da detecção do pigmento vermelho, componente secundário do guaraná, para confirmação do seu grau de pureza.

A Farmacopéia Brasileira^{7,13} tem sido ao longo de suas revisões o único Código Oficial que apresenta monografia para guaraná e, em sua última edição (1977)⁶, estabelece para sementes de guaraná teores de cafeína que variam de 3,25% a 6,98%.

A determinação do teor de trimetilxantina (cafeína) em guaraná baseia-se no tratamento do pó da droga com carbonato de sódio e óxido de chumbo, seguido da extração com clorofórmio em aparelho de Soxhlet. O resíduo assim obtido é pesado e o resultado final é expresso em porcentagem de cafeína. Observa-se, no entanto, que o aspecto do resíduo é heterogêneo, sendo formado por cristais aciculares característicos da cafeína e

* Realizado na Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

por uma massa amarelo-pálida, demonstrando ser a extração não seletiva para cafeína. Tal constatação levou-nos a considerar a determinação espectrofotométrica deste resíduo como uma possibilidade de se quantificar seletivamente a cafeína presente no mesmo, devido à sua simplicidade, rapidez e seletividade, podendo ser realizada em qualquer laboratório. Como última etapa do estudo, foram realizadas cromatografias em camada delgada em diferentes fases móveis para comprovação da presença de outras substâncias.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Foram estudadas 29 amostras de pó de guaraná, recebidas pela Seção de Farmacognosia para análises fiscais e de orientação.

Método para determinação gravimétrica e espectrofotométrica

Para a extração da cafeína do pó de guaraná foi empregado o método descrito na Farmacopéia Brasileira, 3.^a edição⁶.

O resíduo obtido pela análise gravimétrica foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com solução de ácido clorídrico 0,1 N; a partir desta solução foram feitas diluições de modo a obter-se uma solução final com concentração de cafeína de 10 µg/ml, a qual foi utilizada para leitura de U.V. a 273 nm.

Método para cromatografia em camada delgada

Foram desenvolvidas cromatografias em camada delgada nos resíduos obtidos nas análises gravimétricas visando-se, primeiramente, a identificação da cafeína¹⁶ (Sistema I). Posteriormente, foram utilizados outros sistemas cromatográficos com diferentes polaridades na fase móvel, com o objetivo de observar o comportamento das outras substâncias presentes no resíduo juntamente com a cafeína (Sistemas II, III, IV, V, VI).

Sistema I

As placas sílica gel 60 GF₂₅₄ foram submetidas à atmosfera amoniacal em cuba de vidro por 20 minutos, à temperatura ambiente.

As amostras a serem aplicadas consistiram do resíduo obtido por extração da trimetilxantina segundo a técnica oficial, dissolvido em 1 ml de clorofórmio.

Foram dissolvidas cerca de 20 mg de cafeína pa-

drão (cafeína anidra — USP) em 1 ml de clorofórmio (solução-padrão).

A fase móvel empregada foi clorofórmio-etanol (99:1).

O desenvolvimento foi unidimensional de 15 cm e cuba com saturação total. Após o desenvolvimento, a placa foi seca ao ar por 30 minutos.

A revelação foi obtida empregando-se, primeiramente, 10 ml da solução I e após 2 minutos, 5 a 10 ml da solução II (Reativo n.º 41), segundo STAHL et alii¹⁶:

Solução I— Dissolver 1 g de iodeto de potássio e 2 g de iodo em 100 ml de etanol a 96%.

Solução II— Misturar 5 ml de ácido clorídrico a 25% em etanol a 96%.

Sistemas II, III, IV, V, VI

As placas de sílica gel GF₂₅₄ foram ativadas a 105°C por uma hora e as amostras foram aplicadas juntamente com o padrão de cafeína, como descrito acima no Sistema I. O desenvolvimento foi unidimensional, ascendente de 15 cm, com cuba saturada por uma hora. A revelação foi feita com iodo sublimado.

As diferentes fases móveis utilizadas nos Sistemas II, III, IV, V e VI assim como as respectivas proporções, encontram-se relacionadas na tabela 1.

TABELA 1

Fases móveis que foram utilizadas para cromatografia em camada delgada do resíduo obtido da amostra de guaraná

Sistema	Fase móvel	Proporção
II	Benzeno-Metanol	1:3
III	Benzeno-Metanol	1:1
IV	Benzeno-Metanol	3:1
V	Benzeno-Metanol	1:3
VI	Benzeno-Clorofórmio	1:1

RESULTADOS

Baseado nos dados da tabela 2 foi verificada a correlação entre os valores obtidos pelo método gravimétrico e pela determinação espectrofotométrica, observando-se uma boa correlação (coeficiente de correlação = 0,75).

TABELA 2

Teores de cafeína obtidos nas amostras pelos métodos gravimétrico e espectrofotométrico

Amostra Nº	Método gravimétrico g/100 g	Método espectrofotométrico g/100 g
1	4,44	2,38
2	4,40	2,26
3	3,96	2,44
4	5,06	2,95
5	4,76	3,25
6	5,82	3,87
7	5,13	3,09
8	5,87	3,50
9	6,98	3,82
10	6,05	4,14
11	6,25	3,25
12	5,69	3,59
13	5,64	3,89
14	7,43	4,00
15	4,52	3,08
16	6,21	3,12
17	2,90	1,37
18	5,28	2,95
19	5,59	1,70
20	2,31	0,97
21	3,43	2,75
22	6,08	2,59
23	7,17	3,07
24	6,60	2,75
25	6,85	3,90
26	5,44	3,33
27	4,47	2,33
28	6,49	3,25
29	4,99	2,78

A fim de se verificar a significância da correlação quanto ao número de amostras estudadas, foi feito o teste t de Student e Fisher, onde se verificou que o valor calculado era bem superior ao valor crítico de tabela, ao nível de significância de 99,5%, confirmando-se assim a existência da correlação entre os valores dos métodos gravimétrico e espectrofotométrico.

A reta de regressão linear está traçada no gráfico na página seguinte.

Da observação do cromatograma obtido no sistema I foi desenvolvida outra série de cinco sistemas cromatográficos utilizando-se diferentes fases móveis, o que permitiu a verificação do comportamento do resíduo em diferentes polaridades. Em todos os sistemas de fases móveis empregados

sempre se obteve uma mancha para o padrão de cafeína com Rf(s), variando de 0,1 a 0,43.

No caso das amostras, entretanto, foram observadas as seguintes manchas:

Sistema I: boa resolução, com manchas em toda a extensão do percurso.

Sistema II e III: mancha única, difusa, sem efetiva separação da cafeína tanto quanto dos demais componentes.

Sistema IV: boa resolução, com separação dos componentes em várias manchas nítidas de Rf(s) superiores ao da cafeína.

Sistema V e VI: boa resolução, com separação dos componentes em várias manchas nítidas de Rf(s) superiores ao da cafeína que apresentou Rf de 0,1.

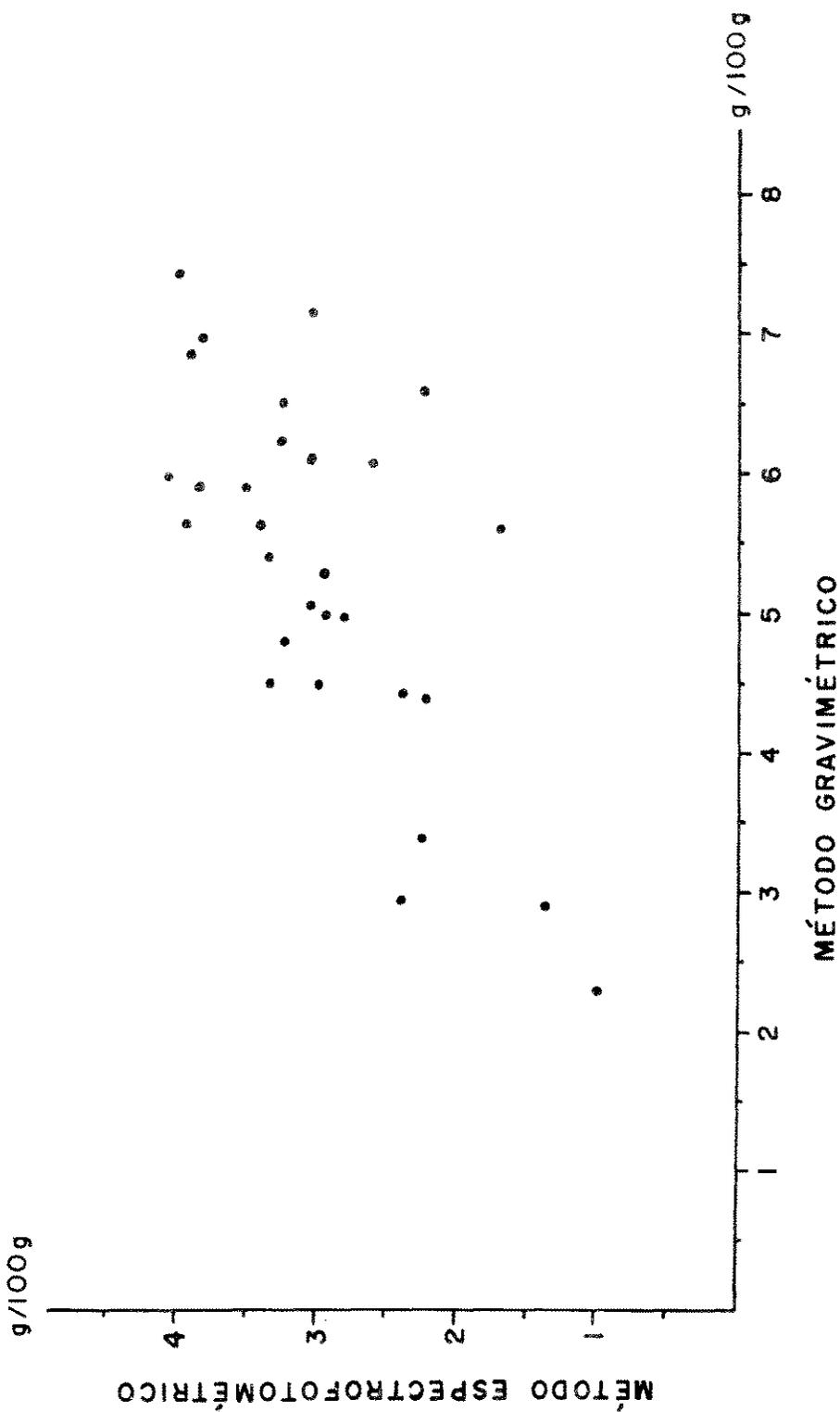


FIGURA — Estudo da correlação entre os valores do teor de cafeína obtidos pelos métodos gravimétrico e espectrofotométrico.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A tabela 2 mostra que os resultados obtidos pela determinação espectrofotométrica foram sempre menores que os obtidos pela gravimetria.

Este dado confirma a observação inicial de que os resíduos obtidos não eram homogêneos, constituídos apenas por trimetilxantina (cafeína) e outras xantinas (teobromina e teofilina), mas sim compostos por outras substâncias, extraídas pelo clorofórmio nas condições de análise.

Tendo como preocupação a adequação da amostragem, foi feito um estudo estatístico dos resultados em função do número de amostras ($n = 29$), que revelou a existência da correlação linear-positiva entre os dados da tabela 2, onde o coeficiente de correlação foi de 0,75. O teste t de Student e Fisher indicou que a amostragem foi representativa para a realização do estudo.

Procurou-se mostrar de uma forma simples e rápida, usando a cromatografia em camada delgada, que o resíduo era constituído por uma mistura de substâncias. Esse fato ficou demonstrado já na execução da cromatografia em camada delgada, específica para drogas xantínicas onde, além da mancha característica da cafeína, observaram-se outras manchas em toda extensão do percurso cromatográfico. Com o emprego de solventes apolares como fase móvel, obteve-se melhor resolução das manchas, indicando assim a natureza lipofílica das substâncias presentes no

resíduo, o que concorda com a constatação da não solubilização total do resíduo em ácido clorídrico 0,1 N, quando da diluição para determinação espectrofotométrica.

Sabe-se que os frutos de *Paullinia cupana* Kunth, variedade *sorbilis*, têm como componentes: cafeína, teobromina e teofilina, apesar de alguns autores admitirem a ausência de dimetilxantinas (teobromina e teofilina) nos frutos, encontrando-se apenas cafeína^{5,10,11}. A teobromina apresenta baixa solubilidade em clorofórmio e em água, sendo que seu coeficiente de partição no sistema clorofórmio/água favorece a solubilização parcial¹⁰ na água durante a lavagem do extrato clorofórmico, eliminando em parte a interferência da teobromina no resultado final.

Por outro lado, as bases xantínicas têm um comportamento espectral próximo, apresentando picos de máxima absorção na mesma faixa de comprimento de onda (270 nm-274 nm), o que deveria aumentar a absorção da solução-amostra no ultra-violeta, como resultado da soma das outras metilxantinas presentes. Ainda assim, os resultados obtidos pela determinação espectrofotométrica foram menores que os obtidos pela gravimétrica.

Os resultados obtidos permitem-nos sugerir a introdução da espectrofotometria na determinação da cafeína em guaraná, em complementação à técnica descrita pela Farmacopéia Brasileira, 3ª edição, 1977.

RIALA6/625

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A. & HOPPEN, V.R. — Use of the spectrophotometric method in the caffeine determination in guarana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):39-44, 1987.

ABSTRACT: The results of the quantitative determination of caffeine in guarana according to the gravimetric method specified by the 3rd edition of Brazilian Pharmacopoeia were compared to the spectrophotometric determination of the residues dissolved in HCL 0.1 N at 273 nm. Substances other than xanthinic compounds in the residue were shown by thin-layer chromatography using different solvent systems. The values obtained by spectrophotometric method were always smaller than those obtained by the gravimetric method.

DESCRIPTORS: guarana (*Paullinia cupana* Kunth), determination of caffeine in; caffeine in guarana, determination; spectrophotometry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLAUCH, J.L. & TARKA, S.M., JR. — HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea, and instant hot cocoa mixes. *J. Food Sci.*, **48**:745-50, 1983.
2. CAGNO, N. — Sobre alguns aspectos importantes do guaraná (*Paullinia cupana*). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **42**(1):69-99, 1942.
3. CLARKE, E.G.C., ed. — *Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*. London, Pharmaceutical Press, 1969. p. 234.
4. Ibid. p. 567-8.
5. COSTA, A.F. — *Farmacognosia*. 2ª ed., atualizada. Lisboa, Calouste Gulbenkian [1978]. v. 2, p. 748-9.
6. FARMACOPÉIA brasileira. 3ª ed. São Paulo, Andrei, 1977. p. 829-31.
7. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2ª ed. São Paulo, Siqueira, 1959. p. 512-3.
8. GARRATT, D.C.; BREALEY, L.; JOHNSON, C.A.; SMITH, K.L. & SYKES, G. — *The quantitative analysis of drugs*. 3rd ed. London, Chapman & Hall, 1964. p. 138-43.
9. LEBEAU, P.; JANOT, M.M. et alii — *Traité de pharmacie chimique*. Paris, Masson, 1955-56. Tome 4, p. 3285-324.
10. MARAVALHAS, N. — *Estudos sobre o guaraná e outras plantas produtoras de cafeína*. [Manaus] Inst. Nac. Pesquisa da Amazônia, 1965. p. 5-12. (publ. nº 10 — Química).
11. Ibid. p. 17-23.
12. PHARMACOPÉE française. Paris, L'Adrapharm [1976]. 1ère part. [Kola (*Cola nitida*)].
13. PHARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo, Editora Nacional [1929]. p. 498
14. REID, S.J. & GOOD, T.J. — Use of chromatographic mode sequencing for sample preparation in the analysis of caffeine and theobromine from beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **30**:775-8, 1982.
15. SIMÃO, A.M.; MURADIAN, J. & CARVALHO, J.P.P. — Isolamento do pigmento vermelho natural do pó de guaraná e doseamento de cafeína no extrato clorofórmico. *Rev. Agricult.*, Piracicaba, **59**(2):187-202, 1984.
16. STAHL, E.; DUMONT, E.; JORK, H.; KRAUS, L.; ROZUMEK, H.-E., & SCHORN, P.-J. — *Analyse chromatographique et microscopique des drogues*. Trad. de l'allemand par M. Denayer-Tournay. Paris, Entreprise Moderne d'edition, c1970. p. 219-222.

Recebido para publicação em 29 de abril de 1987.