IDENTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES XANTÍNICOS DO GUARANÁ (*Paullinia cupana* HBK)
POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA EM AMOSTRAS DE URINA.

Identification of xanthine alkaloids of guaraná in urine samples
using thin-layer chromatography.

MAURÍLIO DE CARVALHO MOUSINHO* e FERNANDO DE OLIVEIRA*

É proposto um esquema analítico, simples e sensível, para identificação de bases xânticas do guaraná em material biológico. Amostras de urina de consumidores de guaraná são submetidos à extração com cloro fórmio em meio alcalino. Após evaporação dos extratos, os resíduos são transferidos para uma cromatoplaça de sílica gel G (0,25 mm) e desenvolvidos em acetato de etilacilohexano-metanol-hidróxido de amônio, 70:15:10:5 (11,5 cm) e, a seguir, acetato de etilacilohexano-hidróxido de amônio, 50:40:0,1 (15,5 cm) na mesma direção. A revelação é feita com o reativo de DRAGENDORFF iodado.

UNITERMOS: Cafeinismo, Cafeína, Guaraná, Urina, Cromatografia em camada delgada, Toxicologia.

1 - INTRODUÇÃO

A cafeína proveniente de fontes naturais tem sido apreciada pela espécie humana em todo o mundo há centenas de anos, ROBERT & BARONE (16) acreditam que o uso desta base xantínica remonta a era paleolítica. Sua ocorrência em inúmeras espécies vegetais, caracterizadas pela frequência, em diversas regiões do mundo costuma ser apontada como uma das causas de sua grande utilização. Assim, os astecas já empregavam as sementes de *Theobroma cacao* L. na elaboração de alimentos antes do descobrimento da América. As folhas

Thea sinensis L. são empregadas a milênios no preparo de chá pelos asiáticos. O café bebida feita pelas selvícolas africanos com sementes de várias espécies do gênero *Coffea* L. e o chá-mate obtido por infusão das folhas de *Ilex paraguayensis* St Hillaire pelos povos primitivos do Sul do Brasil, Argentina e Uruguai continuaram a ser utilizadas (10,16,20).

Além do cacau, do chá, do café e do mate mais de 60 espécies de plantas foram identificadas como produtoras de cafeína (16). Outra espécie produtora de cafeína cujo interesse no Brasil e no mundo tem aumentado muito é o guaraná. Esse vegetal conhecido cientificamente como *Paullinia cupana* HBK é uma das espécies de maior potencial econômico na Amazônia. Seu cultivo, data da época pré-colombiana e era efetuado por diversas tribos indígenas, entre as quais os Maues e os Andiráis no baixo Amazonas e os Barés no alto Rio Negro (5,6,8). O uso do guaraná foi muito difundido desde a chegada dos primeiros colonizadores, sendo hoje utilizado em todo o Brasil, sob a forma de refrigerantes, xaropes, pós e comprimidos (9,15).

A literatura antiga sobre o guaraná relata porcentagem de cafeína até de 5,8% na droga em forma de bastões. Em análise procedida por MARAVALLHAS (13), foi encontrado de 2,7% a 3,5% de cafeína na amêndoa e 2,7% a 3,0% na casca. O autor encontrou ainda nas sementes, teofilina e teobromina.

O guaraná, seja na forma de pó, extrato ou chá é indicado para esgotamento físico e psíquico. Em associação com outros constituintes é utilizado no tratamento da desnutrição e da convalescença, como tônico e estimulante. É empregado ainda como antidiarréico (3).

Nos últimos anos, observa-se em alguns países desenvolvidos maior preocupação em relação à concentração de cafeína e teobromina ingerida em dieta normal de consumidor de produtos como o café, chá, chocolate e guaraná. Considera-se ainda no que diz respeito a estas bases xantínicas, outras fontes tais como medicamentos (10,14,16,20).

Doses de 3-5 mg/quilo resultam num nível máximo de cafeína no plasma de 15-30 µM. Nestes níveis os efeitos documentados incluem leve ansiedade, especialmente em pessoas que normalmente consomem cafeína estímulos respiratórios, efeitos cardiovasculares, diurese e aumento da secreção gástrica. A magnitude destes efeitos dependem de vários fatores, sendo o mais significativo provavelmente a história prévia de consumo de cafeína, posto que se desenvolve tolerância a vários de seus efeitos farmacológicos (12).

Muitas técnicas analíticas tem sido desenvolvidas para a identificação

* Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 30.786 - São Paulo, SP - Brasil.

ção da cafeína e seus produtos de biotransformação em material biológico (1,2,4,7,17,22). Sendo bastante elevado em nosso país o número de consumidores de bebidas xantínicas, foi estudado o comportamento da cafeína, teobromina e teofilina, como produtos de biotransformação, em indivíduos consumidores de guaraná nas suas diferentes formas de uso.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

2.1.1 - Soluções-padrões em etanol (1 mg/ml) de: cafeína, teobromina, teofilina e nicotina.

2.1.2 - Amostras de urina selecionadas para o trabalho

As amostras de urina de acordo com a proveniência, foram distribuídas em quatro grupos, a saber:

Grupo I

Urina de indivíduos não consumidores (guaraná, café, chá, chocolate) "Branco controlado" 12 amostras.

Grupo II

Urina de indivíduos consumidores de guaraná, nas suas diferentes formas de uso:

Refrigerante 30 amostras.
Pó 05 amostras.
Xarope 08 amostras.
Refresco 02 amostras.

Grupo III

Urina de indivíduos consumidores de guaraná e outras bebidas xantínicas:

Guaraná e café 12 amostras.
Guaraná e chocolate 02 amostras.
Guaraná e chá 03 amostras.

Grupo IV

Urina de indivíduos consumidores de guaraná em pó, destinada ao ensaio de acompanhamento da eliminação de bases xantínicas e de seus produtos de biotransformação 59 amostras.

As amostras, 133 no total, foram obtidas de indivíduos que não utilizaram medicamentos pelo menos durante a semana da coleta e da semana que a antecedeu.

2.1.3 - Adsorvente, solventes de extração e reagentes: Silicagel G (tipo 60), clorofórmio e solução de NaOH 2%.

2.1.4 - Eluentes: Acetato de etila, ciclohexano, metanol, hidróxido de amônio 70:15:10:5 (11), acetato de etila, ciclohexano e hidróxido de amônio 50:40:0,1 (11),

2.1.5 - Agente cromogênico (revelador): Reativo de DRAGENDORFF iodado (18), reativo cloroplatínico (16)

2.1.6 - Equipamento: Conjunto DESAGA HEIDELBERG para cromatografia em camada delgada (placas de vidro 20x20 cm, espalhador, estante para placas, micropipetas e vaporizadores) e lâmpadas U.V. DANON.

2.2 - Método(20)

- Transferir 20 ml de urina para funil de separação e ajustar o pH para 8,0 com soluções de NaOH 2%;

- Extrair duas vezes com 40 ml de clorofórmio por agitação manual durante 1 minuto;

- Recolher a camada orgânica em bquer de 100 ml, filtrando-a sobre Na_2SO_4 anidro;

- Evaporar a 55°C até reduzir o volume do extrato para 5 ml, transferir para um bquer afunilado e completar a evaporação;

- Retomar o resíduo com 100 µl de CHCl_3 e transferi-lo a seguir para a cromatoplaça de silicagel G;

- Desenvolver no sistema-solvente de etila- ciclohexano - metanol - hidróxido de amônio 70:15:10:5 e, a seguir, acetato de etila- ciclohexano - hidróxido de amônio 50:40:0,1, numa distância de 11,5 e 14,5cm, respectivamente, na mesma direção;

- Secar a cromatoplaça ao ar e revelar com o reativo de DRAGENDORFF iodado ou FeCl_3 + Cloroplatínico.

3 - RESULTADOS

As Tabelas I e II apresentam os resultados obtidos pela análise das

TABELA I - Cromatografia em camada delgada de amostras de urina de consumidor de guaraná em pó, evidenciando a presença de bases xantínicas e de seus produtos de biotransformação.

TABLE I - Thin-layer chromatography in urine samples of consumers of powdered guaraná evidencing the presence of xanthic bases and its biotransformation products.

MANCHAS			MIDÕES										PADRÕES	
Desl. Rel.*	Cor	Formas	M ₀	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	M ₁₀	Caf. Teob. Teof.
12,6	0,90	cast. claro	arred.	+	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	
10,2	0,72	cast. claro	achad.	+	++	+	+	+	+	-	tr	tr	tr	+++
9,61	0,68	cast. esc.	arred.	+++	+++	++	+	+	+	-	tr	tr	-	+++
6,94	0,49	castanho	arred.	++	+	+	+	+	+	-	+	+	tr	
5,69	0,40	cinza	arred.	+++	+++	++	tr	++	++	++	+	+	tr	+++
4,09	0,29	castanho	arred.	+	+++	++	+	+	++	+	++	+	+	
3,38	0,24	castanho	arred.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	tr	
2,0	0,14	castanho	arred.	+	+++	+	+	+	++	tr	+	tr	+	+++
1,8	0,13	alaranjado	arred.	+	+	+	+	+	+	tr	+	tr	+	
0,0	0,0	cast. claro	arred.	+	+	+	tr	+	+	tr	+	+	+	

Volume emitido (ml) 93 90 84 92 75 90 93 87 92 93 87

Horas após a ingestão 3h20' 6h15' 9h30' 11h30' 16h30' 23h 30h 35h 38h05' 44h35'

Sistema cromatográfico

Duplo desenvolvimento: 1º desenvolvimento - Sistema solvente: acetato de etila: ciclohexano: metanol: hidróxido de amônio (70:15:10:5) - Percursos= 11,5cm.

2º desenvolvimento - Sistema solvente: acetato de etila: ciclohexano: hidróxido de amônio (50:40:0,1) - Adsorvente: Silicagel G - Percursos= 14cm - Revelador: Dragendorff lodado

Intensidade das manchas

- ausência, tr= traços, + pouco intensa, ++ medianamente intensa e +++ muito intensa.

*Deslocamento relativo (análogo a Rf) calculado em relação ao segundo desenvolvimento. Quantidade ingerida: 2g do suco pendido em aproximadamente 100ml de água.

TABELA II - Cromatografia em camada delgada de amostras de urina de consumidores de xarope de guaraná

TABLE II - Thin-layer chromatography in urine samples of consumers of the syrup guaraná.

MANCHAS			AMOSTRAS										PADRÕES		
Desl.	Desl.Rel.*	Cor	Formas	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	Caf.	Teob.	Teof.	
12,4	0,88	castanho claro	arredondado	++	++	++	++	+	++	+	tr				
11,7	0,83	castanho claro	achadado	+	+	+	tr	-	-	-	-				
10,9	0,78	alaranjado	achadado	+	+	-	+	-	-	-	-				
10,1	0,72	castanho claro	achadado	-	+	+	tr	-	-	-	-				
9,3	0,66	castanho escuro	arredondado	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+++			
8,0	0,57	castanho claro	arredondado	+	+	+	+	+	+	tr	tr				
7,3	0,52	castanho claro	arredondado	+	tr	tr	-	tr	-	-	-				
6,6	0,47	castanho claro	arredondado	+	+	+	+	tr	tr	-	-				
5,3	0,38	cinza	arredondado	+++	++	+++	+	++	++	+	+	+++			
3,9	0,28	castanho escuro	arredondado	++	++	++	+	++	+	+	+				
3,2	0,23	castanho escuro	circular	+	+	+	+	+	+	tr	+			+++	
1,8	0,13	castanho	elíptica	+++	+++	++	++	++	++	+	++				
0,0	0,0	castanho	circular	+	+	+	tr	tr	tr	-	-				
Quantidade ingerida expressa				45ml	45ml	45ml	30ml	30ml	30ml	15ml	15ml				

Quantidade ingerida expressa 45ml 45ml 45ml 30ml 30ml 15ml 15ml

Sistema cromatográfico

Duplo desenvolvimento: 1º desenvolvimento - Sistema solvente: acetato de etila: ciclohexano: metanol: hidróxido de amônio (70:15:10:5) - Percursos= 11,5cm.

2º desenvolvimento - Sistema solvente: acetato de etila: ciclohexano: hidróxido de amônio (50:40:0,1) - Adsorvente: Silicagel G - Revelador: Dragendorff lodado. Percursos= 14cm.

Intensidade das manchas

- ausência, tr= traços, + pouco intensa, ++ medianamente intensa e +++ muito intensa.

*Deslocamento relativo (análogo a Rf) calculado em relação ao segundo desenvolvimento.

amostras.

Na urina de todos os consumidores de guaraná foi verificada a presença de cafeína (cor castanho e deslocamentos 9,61 Tabela I e 9,3 Tabela II), teobromina (cor cinza e deslocamentos 5,69 Tabela I e 5,3 Tabela II) e teofilina (cor castanho-claro e deslocamentos 2,0 Tabela I e 1,8 Tabela II).

No acompanhamento da eliminação das bases xantínicas, na urina de consumidores de pó de guaraná, foi observado que o tempo gasto para a eliminação da cafeína é menor do que para a teobromina e desta menor do que para a teofilina. A variação do tamanho da mancha bem como de sua intensidade dependem da quantidade ingerida e não do tipo de apresentação.

4 - DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi propor um método analítico adequado para a identificação de bases xantínicas em amostras de urina de consumidores de guaraná. Os eluentes coletados na literatura para o estudo das metil-purinas não são muito convenientes. Os Rf obtidos para a teofilina são muito próximos dos da cafeína quando o meio é ácido e se aproxima da teobromina em meio alcalino. Procurando obter melhor separação desenvolvemos o método proposto por KAISTHA (11), para o controle de fármacos. Esta adaptação do método promoveu nítida separação das substâncias extraídas. A Tabela II reúne e mostra dados referentes a eliminação de bases xantínicas e de seus produtos de biotransformação. As urinas ensaiadas foram provenientes de indivíduos inicialmente controlados com referência à ingestão de bases xantínicas. Esses indivíduos abstiveram-se de ingerir alimentos, bebidas e medicamentos que contivessem bases xantínicas nos 7 dias, que antecederam o início do ensaio. Os dados da Tabela I mostram os resultados encontrados na análise da amostra de urina antes da ingestão do guaraná em pó. Pode-se verificar a ausência de cafeína e teobromina nesta coluna; entretanto mesmo após 168 horas de abstinência a presença de teofilina bem como de produtos não identificados de bases xantínicas, pode ser verificada.

A análise de urina de consumidores de guaraná e de outra bebida xantínica, mostrou que é difícil diferenciar entre si os consumidores das diversas formas de guaraná. A variação do tamanho das manchas bem como de sua intensidade dependem da quantidade ingerida e não do tipo de apresentação.

5 - DISCUSSÃO

É possível identificar as bases xantínicas em amostras de urina de consumidores de guaraná.

O tempo gasto para eliminação da cafeína é menor do que para a teobromina e desta menor do que para a teofilina.

Após 3 horas e 20 minutos da ingestão de guaraná, já é possível se evidenciar a presença de bases xantínicas, na urina do consumidor.

Com referência as bases xantínicas a variação do tamanho das manchas bem como de sua intensidade dependem da quantidade ingerida e não do tipo de apresentação.

SUMMARY

A simple and sensitive thin-layer chromatographic analytical method is proposed for the identification of xanthine bases of guarana Paullinia cupana HBK in urine samples. The samples were obtained from the consumers of the stimulant drink and submitted to extraction with chloroform in alkaline medium. After evaporation of the extracts residues were transferred to silicagel G (0,25 mm) thin-layer plates and developed with ethylacetate-cyclohexane-methanol, ammonium hydroxide 50:40:0,1 for 14,5 cm in the same dimension. The spots were revealed with Dragendorff-iodate chromogen agent.

Key words: Caffeine, Guarana, Urine, Thin-layer chromatography, Toxicology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AXELROD, J. & REICHENTHAL, J. - The fate of caffeine in man and a method for its estimation in biological material. J. Pharmacol. Exp. Ther. (Baltimore), **107**:519-23, 1953.
- 2 - BASTOS, M.L.; KANANEN, G.E.; YOUNG, R.M.; MONFORT, J.R.; SUNSHINE, I. Detection of basic organic drugs and their metabolites in urine. Clin. Chem. (Winston-Salem), **16**(11):931-40, 1970.
- 3 - BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P.E. - Plante medicinali Chimica farmacologia e terapia. Milano, Invernizzi S Della Belfa, 1962. v.2. 312p.

- 4 - BURG, A.W. & STEIN, M.E. - Urinary excretion of caffeine and its metabolites in the mouse. Biochem. Pharmacol. (Oxford), 21(7):909-22, 1972.
- 5 - CABRAL, C. - O guaraná, a planta, propriedades gerais e classificação botânica. Agricultura e Pecuária, Rio de Janeiro, 94:727-9, 1932.
- 6 - CAGNO, N. - Sobre alguns aspectos importantes do guaraná Paullinia cupana, estudo e caracterização do seu alcalóide. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 2(1):69-92, 1942.
- 7 - CORSMITH, H.H. & CHRISTMAN, A.A. - A study of the metabolism of theobromine, theophylline and caffeine in man. J. Biol. Chem. (Baltimore), 228:315-23, 1957.
- 8 - DUCKE, A. - Plantas da cultura pré-colombiana na Amazônia brasileira. Belém, Instituto Agronômico do Norte, 1946 (Boletim técnico 8).
- 9 - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Sistemas de produção para guaraná. Manaus, 1983. 31p. (Série Sistemas de Produção, Boletim nº 1).
- 10 - GRAHAM, D.M. - Caffeine - its identity, dietary sources, intake and biological effects. Nutr. Rev. (New York), 36(4):97-102, 1978.
- 11 - KAISTHA, K.K.; TADRUS, R.; JANDA, R. - Simultaneous detection of a wide variety of commonly abused drugs in a urine screening program using thin-layer identification techniques. J. Chromatogr. (Amsterdam), 107:359-79, 1975.
- 12 - LEVITON, A. - Biological effects of caffeine. Behavioral effects. Food Technol. (Chicago), 37(9):44-7, 1983.
- 13 - MARAVALHAS, N. - Teofilina e teobromina, metil-purinas constantes nas plantas produtoras de cafeína. In: INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA). Estudos sobre o guaraná e outras plantas produtoras de cafeína. (Manaus), 17-25, 1965.
- 14 - MILES, C.I. - Biological effects of caffeine. FDA Status. Food Technol. (Chicago), 37(9):48-50, 1983.
- 15 - PANTOJA, A. - Pequena contribuição ao estudo do guaraná. Bol. Inspec. Reg. Fom. Agric. Est. Pará. (Belém), s.d.p. 35-51.
- 16 - BANDERATH, K. - Thin layer chromatography. New York, Academic Press, 1963, 74p.
- 17 - ROBERTS, H.R. & BARONE, J.J. - Biological effects of caffeine. History and use. Food Technol. (Chicago), 37(9):33-9, 1983.
- 18 - ROUTH, J.I.; SHANE, N.A.; ARREDONDO, E.G.; PAUL, W.D. - Determination of caffeine in serum and urine. Clin. Chem. (Washington), 15(8):661-8, 1969.
- 19 - RUBIA, L.B. & GOMEZ, R. - TLC sensitivity of six modifications of Dragendorff's reagent. J. Pharm. Sci. (Washington), 66(11):1656-7, 1977.
- 20 - SILVA, O.A. - Identificação cromatográfica de fármacos em urina para controle de dopagem. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 17(2):234-52, 1981.
- 21 - STEPHENSON, P.E. - Physiologic and psychotropic effects of caffeine on man. A review. J. Am. Diet. Assoc. (Chicago), 71(3):240-7, 1977.
- 22 - SYED, I.B. - The effects of caffeine. J. Am. Pharm. Assoc. (Washington), 16(10):568-72, 1976.
- 23 - WARREN, R.N. - Metabolism of xanthine alkaloids in man. J. Chromatog. (Amsterdam), 40:468-9, 1969.