

Avaliação físico-química de sementes de guaraná secas por diferentes métodos

Ushirobira, T.M.A.¹; Yamaguti, E.²; Uemura, L.M.²; Audi, E.A.^{1,2}; Mello, J.C.P. de ^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; ²Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Recebido para publicação em: 01/09/2003
Aceito para publicação em: 26/02/2004

RESUMO: Amostras de sementes de guaraná provenientes da região amazônica e secas por diferentes métodos, foram analisadas por técnicas farmacopéicas e outras, e o extrato liofilizado foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Realizou-se o doseamento de metilxantinas (MX) e dos taninos totais (TT), através de métodos espectrofotométricos, para a comparação das amostras. O maior teor de MX foi obtido com as sementes secas em tacho metálico por 4 h com adição de água, enquanto que o maior teor de TT foi obtido com a amostra torrada em tacho metálico por 4 h sem água. A análise cromatográfica por CLAE apresentou tempos de retenção para catequina, epicatequina e cafeína de 6,17; 8,85 e 11,91 min, respectivamente.

Unitermos: *Paullinia cupana*; guaraná; Sapindaceae; testes farmacopéicos; controle de qualidade; CLAE.

ABSTRACT: Physico-chemical evaluation of guarana seeds dried by different methods. Control quality of the vegetable drug "guaraná", with samples of seeds obtained from Amazonian area, were carried out by pharmacopoeial assays, and the extract were analysed by HPLC. The determination of methylxantines (MX) and total tannins (TT) was performed by spectrophotometric methods. The most yield of MX were showed by the sample GTTB and for TT the best result were obtained by the sample GTTM4s. The analysis by HPLC showed retention times for catechin, epicatechin and caffeine of 6.17, 8.85 and 11.91 min, respectively.

Key words: *Paullinia cupana*; guarana; Sapindaceae; pharmacopoeial assays; quality control; HPLC.

INTRODUÇÃO

Paullinia cupana var. *sorbilis* (Mart.) Ducke desenvolve-se na região central da Bacia Amazônica, sendo rica em cafeína e tem sua utilização difundida na preparação de bebidas estimulantes (BECK, 1990). Além das atribuições de estimulante físico e/ou intelectual, também é utilizado popularmente no tratamento de enxaqueca, neuralgia, arteriosclerose, cólicas menstruais, perda de peso, para facilitar a diurese, entre outras (HENMAN, 1982).

Dados históricos levam a crer que o guaraná já era conhecido pelas tribos Maués, Andirás e Marabitanas da Amazônia, sendo usado como alimento e em preparações líquidas devido ao seu efeito estimulante, antes da chegada dos europeus na América (HENMAN, 1982). Devido a esse possível efeito estimulante do sistema nervoso central, a droga vegetal guaraná tem sido amplamente utilizada no mercado farmacêutico, o que contribuiu para que fosse colocada entre as drogas oficiais da Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004).

Vários trabalhos farmacológicos foram desenvolvidos, tendo em vista o interesse em se confirmar alguns dos vários efeitos atribuídos à essa planta; alguns foram realizados em animais de laboratório e relataram a baixa toxicidade do guaraná (ESPÍNOLA et al., 1997; MATTEI et al., 1998).

Neste trabalho, foram realizados ensaios de controle de qualidade farmacopéicos e não farmacopéicos com as sementes de guaraná proveniente da Embrapa – Manaus, comparando-a com amostras obtidas por diferentes métodos de secagem.

MATERIAIS E MÉTODOS

Droga vegetal

Todas as amostras de sementes foram coletadas em Maués, Amazonas, na mesma época, e a secagem e estabilização das mesmas foram realizadas pela EMBRAPA.¹ As sementes secas foram moídas em moinho Tecnal (mod. TE-048). A exsicata do vegetal encontra-se depositada no Herbarium da Universidade Estadual de Maringá (HUM) sob nº 9065.

Foram utilizadas as seguintes amostras, de acordo com o método de secagem: a) guaraná torrado em tacho metálico por 4 h com adição de água (GTTM4); b) guaraná torrado em tacho metálico por 4 h sem adição de água (GTTM4s); c) guaraná torrado em tacho metálico por 2h30 com adição de água (GTTM2,5); d) guaraná torrado em tacho de barro por 4 h (GTTB4); e) guaraná seco ao sol (GSS). Além destas amostras, foi utilizada uma amostra referencial denominada de EMB (torrado em tacho de barro por 2 h).

Os seguintes testes farmacopéicos e não farmacopéicos foram realizados com todas estas amostras: a) determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988); b) determinação do teor de extrativos (MELLO; PETROVICK, 2000); c) determinação do teor de resíduo seco (MELLO; PETROVICK, 2000); d) teor de extrativos com quatro diferentes misturas de solventes (v/v): acetona: água (7:3); acetona: água (1:1); metanol: água (1:1); etanol: água (1:1) (MELLO; PETROVICK, 2000); e) doseamento de taninos por espectrofotometria a 691 nm (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2004) e f) determinação de metilxantinas por espectrofotometria a 271 nm (ANDRADE et al., 1999).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo Gilson modelo 321, Degasser 184 e temperatura do forno para a coluna de 30 °C. Coluna preenchida com gel de sílica em fase reversa de 10 mm (LiChrospher® 100 RP-18; 250 mm x 4 mm) com sistema eluente metanol-ácido acético 5% em água (Tabela 1), com fluxo de 0,9 ml/min. A detecção UV foi realizada a 272 nm com detector Gilson UV/VIS 156. Foram utilizadas catequina, epicatequina e cafeína como substâncias referências. O extrato para CLAE foi preparado por turbólise, 15 min, com acetona:água (7:3; v/v). Após eliminação do solvente orgânico por evaporador rotatório sob pressão reduzida, o

¹ Eng. Agrônomo, José Firmino Nascimento Filho, EMBRAPA de Manaus.

mesmo foi liofilizado (EB). Uma amostra de 1 mg/ml foi solubilizada em metanol:água e filtrada em filtro Milliporeâ (FHLPO1300).

Tabela 1. Gradiente da fase móvel utilizada para a cromatografia líquida de alta eficiência

Tempo (min)	Metanol (%)	Ácido acético 5% (%)
0	10	90
15	50	50
20	100	0
25	100	0
35	10	90

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego de sementes de guaraná para a produção de medicamento fitoterápico está condicionado ao controle da matéria-prima, dentro de limites pré-estabelecidos, como aqueles constantes da Farmacopéia Brasileira (2004).

A análise da perda por dessecação (PD) da amostra referencial EMB ($10,55 \pm 0,25\%$) e do teor de extrativos (TE) com água ($33,63 \pm 0,66\%$) representam algumas das características da droga vegetal. Os resultados da PD e TE das amostras analisadas estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Perda por dessecação (PD) e teor de extrativos (TE) calculados para as diferentes amostras analisadas de guaraná

AMOSTRA ^a	PD \pm DP % (CV%)	TE \pm DP % (CV%)
EMB	$10,55 \pm 0,25$ (2,38)	$33,63 \pm 0,66$ (1,97)
GTTM4	$6,30 \pm 0,38$ (3,15)	$32,13 \pm 0,16$ (0,50)
GTTM4s	$7,51 \pm 0,87$ (2,80)	$30,54 \pm 0,56$ (1,82)
GTTM2,5	$6,98 \pm 1,10$ (1,38)	$29,86 \pm 0,14$ (0,48)
GTTB4	$4,79 \pm 1,16$ (1,56)	$28,66 \pm 0,36$ (1,26)
GSS	$8,98 \pm 0,51$ (2,87)	$23,46 \pm 0,49$ (2,10)

^a n = 5

Para que fosse possível estabelecer o melhor líquido extrator, comparando-se com a água, optou-se por empregar diferentes misturas de solventes, analisando-se a amostra referencial (EMB) (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de resíduo seco (RS) da amostra referencial de guaraná, extraída sob refluxo com misturas de solventes.

Líquido Extrator (V/V)	RS ± DP% (CV%)
acetona : água (7:3)	29,33 ± 0,28 (0,95)
acetona : água (1:1)	24,50 ± 0,37 (1,53)
metanol : água (1:1)	28,08 ± 0,42 (1,48)
etanol : água (1:1)	23,41 ± 0,41 (1,74)
Água	33,63 ± 0,66 (1,97)

n = 5

A comparação entre os dados das Tabelas 2 e 3 demonstra que, sem critério seletivo, a água tem grande capacidade de extração. Por outro lado, empregando-se tanto a acetona como o metanol em misturas com a água, obteve-se entre 62 e 65% do rendimento daquele obtido com a água. O incremento de solventes como a acetona e o metanol podem, por outro lado, favorecer seletivamente a obtenção de substâncias, como no caso dos taninos condensados (CORK; KROCKENBERGER, 1991)

Neste trabalho, procedeu-se ao doseamento de metilxantinas e de taninos totais, por métodos espectrofotométricos, para todas as amostras (Tabela 4).

Tabela 4. Teores de metilxantinas (MX) e de taninos totais (TT) obtidos por métodos espectrofotométricos para as diferentes amostras analisadas de guaraná.

AMOSTRA ^a	MX ± DP µg/ml (CV%)	TT ± DP % (CV%)
EMB	8,69 ± 0,34 (3,98)	4,14 ± 0,25 (6,13)
GTTM4	8,39 ± 0,18 (2,20)	5,05 ± 0,30 (5,91)
GTTM4s	7,06 ± 0,15 (2,13)	5,30 ± 0,14 (2,62)
GTTM2.5	6,78 ± 0,18 (2,70)	4,88 ± 0,19 (3,95)
GTTB4	7,17 ± 0,21 (3,01)	4,74 ± 0,04 (0,80)
GSS	5,80 ± 0,27 (4,65)	3,00 ± 0,21 (6,93)

^a n = 5

Os métodos espectrofotométricos empregados para MX e TT foram discutidos e validados, conforme relatado por Andrade et al. (1999) e Glasl (1983), respectivamente. Os resultados demonstraram que a amostra seca ao sol (GSS) perdeu quantidades significativas, tanto de MX quanto de TT. Entretanto, o maior teor de MX em relação à amostra referencial EMB foi obtido com as sementes secas em tacho metálico por 4 h com adição de água (GTTM4). Quanto ao teor de TT, observou-se que o tempo de secagem, independentemente da presença ou não da água, influenciou positivamente, em relação à amostra referencial EMB, na seguinte seqüência: GTTM4s, GTTM4, GTTM2.5 e GTTB4. Assim, nas condições estabelecidas, pode-se afirmar que tanto as amostras GTTM4 como GTTM4s podem substituir a amostra referencial (EMB) do ponto de vista

analítico. Entretanto, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2004), todas as amostras encontram-se dentro dos limites mínimos especificados para o teor de MX. Em relação ao teor de taninos, somente a amostra GSS encontra-se abaixo do limite mínimo especificado.

A avaliação do extrato liofilizado (EB) foi realizada através de CLAE, apresentando um cromatograma semelhante ao obtido por Marx (1990). Catequina, epicatequina e cafeína apresentaram tempos de retenção de 6,17; 8,85 e 11,91 min, respectivamente (Figura 1).

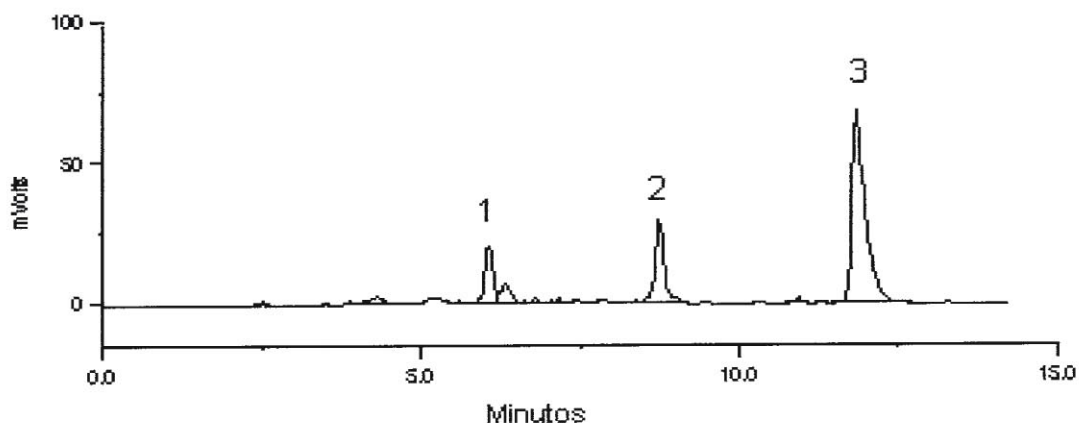


Figura 1. Cromatograma (CLAE) do extrato bruto de sementes de guaraná contendo catequina (1), epicatequina (2) e cafeína (3) (n=5). Coluna LiChrospherâ 100 RP-18 (250 mm x 4mm), velocidade de fluxo de 0,9 ml/min, entre metanol e ácido acético 5% em água, detecção a 272 nm

A CLAE vem sendo cada vez mais utilizada por apresentar elevada sensibilidade e seletividade, mesmo sendo uma técnica de custo elevado. O uso de coluna em fase reversa tem sido empregada amplamente oferecendo boa separação para procianidinas (LEA, 1980 e 1982).

O uso desse sistema cromatográfico auxiliou sobremaneira na obtenção de um perfil cromatográfico (*fingerprint*), podendo, assim, ser utilizado na análise qualitativa do EB.

Entretanto, a análise quantitativa de procianidinas por CLAE tem demonstrado diversos problemas. Esse fato está relacionado com a mistura complexa de substâncias, não possibilitando, de maneira geral, a separação das mesmas para a sua quantificação (STICHER; MEIER, 1998). A dificuldade, entretanto, não se relaciona com os monômeros de flavan-3-óis, mas sim com os seus dímeros, presentes no EB e descritos por Ushirobira (2003) (procianidinas B₂, B₃ e B₄). As quantidades obtidas por esta autora não foram significativas impossibilitando, assim, utilizá-las na identificação cromatográfica e, portanto, quantificá-las por CLAE.

Assim, uma alternativa para a determinação de procianidinas é através de análise espectrofotométrica (STICHER; MEIER, 1998), como a realizada neste trabalho (Tabela 4), empregando-se reagente de Folin-Ciocalteu.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L.; SHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M. Estudo da metodologia de análise de cafeína em sementes de guaraná (*Paullinia cupana*). *Revista Brasileira de Farmácia*, v.80, n. 1/2, p.7-9, 1999.
- BECK, H.T. A survey of the useful species of *Paullinia* L. (Sapindaceae). *Advances in Economic Botany*, v.8, p.41-56, 1990.

- CORK, S.J.; KROCKENBERGER, A.K. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. *Journal of Chemical Ecology*, v.17, p.123, 1991.
- ESPÍNOLA, E.B.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Pharmacological activity of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v.55, n.3, p.223-229, 1997.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed., Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988. V.2.9.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed., Parte II., Fasc. 5. São Paulo: Atheneu, 2004.
- GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v.123, p.1979-1983, 1983.
- HENMAN, A.R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. *Journal of Ethnopharmacology*, n.6, p.311-338, 1982.
- LEA, A.G.H. Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatography of procyanidins and their oxidation products in ciders and wines, optimised by Snyder's procedures. *Journal of Chromatography*, n.194, p.62-68, 1980.
- LEA, A.G.H. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of procyanidins and other phenolics in fresh and oxidizing apple juices using a pH shift technique. *Journal of Chromatography*, n.238, p.253-257, 1982.
- MARX, F. Analysis of guaraná seeds. II. Studies on the composition of the tannin fraction. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und Forschung*, v.190, p.429-431, 1990.
- MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPÍNOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioural effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, n.60, p.111-116, 1998.
- MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (*Asteraceae*) hydroalcoholic extracts. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.19, n.3, p.211-215, 2000.
- STICHER, O.; MEIER, B. Hawthorn (*Crataegus*) biological activity and new strategies for quality control. In: *Phytomedicines of Europe Chemistry and Biological Activity*. ACS Symposium, Series 691, American Chemical Society, cap.17, p.241-62, 1998.
- USHIROBIRA, T.M.A. *Estudo químico, avaliação microbiológica e toxicológica pré-clínica (aguda e subcrônica) de extratos de sementes de Paullinia cupana H.B.K. var. sorbilis (Mart.) Ducke (guaraná)*. 194p. Dissertação (Mestrado) – UEM – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2003.

*** Autor para correspondência:**

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Universidade Estadual de Maringá
Av. Colombo, 5790
87020-900 – Maringá – Paraná
E-mail: mello@uem.br