

SEPARAÇÃO E ANÁLISE DE METILXANTINAS EM EXTRATOS DE GUARANÁ E ERVA MATE POR ELETROFORESE CAPILAR

► Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido um protocolo de separação de metilxantinas por eletroforese capilar em meio micelar, visando a determinação quantitativa de cafeína em extratos comerciais de guaraná e respectiva matéria-prima e extratos de erva-mate de interesse cosmético. Primeiramente foi realizado um estudo de otimização da extração de cafeína em amostras de guaraná em pó, utilizando-se extração exaustiva em Soxhlet como referência. O processamento da amostra em ultra-turrax (13000 rpm, 5 min) e ultra-som (40KHz, 10 min) apresentaram rendimentos satisfatórios, $100,01 \pm 0,94\%$ e $100,45 \pm 0,84\%$, respectivamente. A quantificação de cafeína foi realizada empregando-se um eletrólito composto de solução tampão de tetraborato de sódio a 20mmol L^{-1} contendo 70mmol L^{-1} SDS (pH 9,3), encontrando-se $6,84 \pm 0,20$ e $0,21 \pm 0,02\text{g/Kg}$ de cafeína nos extratos hidroglicólicos de guaraná e erva mate, respectivamente e cerca de 35g/Kg no guaraná em pó. Figuras de mérito do método proposto para cafeína incluem: boa seletividade, excelente linearidade ($r=0,999997$) no intervalo de concentração $35 - 550\mu\text{g mL}^{-1}$, com estimativas dos limites de detecção e quantificação de $2,00\mu\text{g mL}^{-1}$ e $6,07\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, precisão de área de $0,70\%$ CV para seis injeções consecutivas e tempo de análise de 7 min.

Palavras-chave: eletroforese capilar, extratos vegetais, metilxantinas, guaraná, erva mate

► Summary

In this work, a capillary electrophoresis protocol for the quantitative determination of caffeine in herbal extracts of guarana and erva mate as well as guarana powder was established. A preliminary study to optimize the extraction of caffeine from guarana powder was conducted using exhaustive Soxhlet extraction as reference. Samples processed by ultra-turrax (13000 rpm, 5 min) and ultra-sound (40KHz, 10 min) presented satisfactory yields ($100.01 \pm 0.94\%$ and $100.45 \pm 0.84\%$, respectively). The electrophoretic analysis was performed in 7 min with a 20mmol L^{-1} tetraborate pH 9.3 containing 70mmol L^{-1} SDS. Concentrations of caffeine of 6.84 ± 0.20 and $0.21 \pm 0.02\text{g/Kg}$ were found in hydroglycolic extracts of guarana and erva mate, respectively and c.a. 35g/Kg in guarana powder. A few method figures of merit include: good selectivity, excellent linearity ($r=0,999997$) in the concentration interval $35 - 550\mu\text{g mL}^{-1}$, with estimates of LOD and LOQ of $2.00\mu\text{g mL}^{-1}$ and $6.07\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and precision of 0.70% CV (peak area) for six consecutive injections.

Keywords: capillary electrophoresis, herbal extracts, methylxantines, guarana, erva mate

Maria de Lourdes L. de Moraes,
Gustavo A. Micke,
Neide M. Fujiya e
Marina F. M. Tavares*

Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Av. Prof. Lineu Prestes, 748
05508-900
São Paulo, SP

* Autor para correspondência
Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Av. Trabalhador São-carlense, 400
CEP: 13560-970. São Carlos. SP
Fone: (16) 273-9959
E-mail: mlourdes@iqsc.sc.usp.br

Introdução

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 (1-3).

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, depressão nervosa e no combate à enxaqueca (1,2).

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).

Os constituintes químicos encontrados tanto no guaraná quanto na erva mate incluem taninos, polifenóis, amino ácidos, saponinas, alcalóides, entre outros (1-5). 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).

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 (6). Entretanto, em razão de sua origem biogenética, provenientes de bases púricas e não de amino ácidos, como também de seu caráter anfetérico, as metilxantinas são mais propriamente classificadas como pseudoalcalóides.

Metodologias para a análise de metilxantinas em extratos e preparações de interesse cosmético ou fitoterápico envolvem principalmente a cromatografia em meio líquido (7-10) e gasoso (11). 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 clean-up prévio. Uma técnica de separação alternativa, com crescente emprego na determinação de metabólitos secundários vegetais (12,13), é a eletroforese capilar (14), 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 (15), que utilizaram dois modos de eletroforese capilar com detecção de absorvância na região do UV: eletroforese capilar de zona (CZE), em meio ácido e básico e cromatografia electrocinética 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 (16) 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, dodecilsulfato 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 (17,18) desenvolveram metodologias simples empregando MEKC para a determinação de cafeína em amostras de chá, enquanto que Pomilio e colaboradores (19) investigaram o teor de metilxantinas em 14 amostras comerciais de erva mate. Wang e colaboradores (20) obtiveram resultados satisfatórios na análise das metilxantinas em preparações farmacêuticas, empregando MEKC com detecção amperométrica.

Neste trabalho, foi desenvolvido um novo protocolo de análise para metilxantinas por MEKC, especificamente visando a determinação quantitativa de cafeína em extratos comerciais de guaraná e erva mate de uso tópico, cuja separação é complicada pela presença de conservantes. Algumas figuras de mérito do método para cafeína foram estabelecidas e extratos de guaraná e erva mate, assim como amostras de guaraná em pó, foram quantificados.

Experimental

Equipamento e parâmetros instrumentais

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar (modelo HP₃DCE Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado com um detector de arranjo de diodos, operando em 274nm e um controlador de temperatura mantido a 25°C. As dimensões do capilar foram: 75µm de diâmetro interno, 375µm de diâmetro externo e 58,0cm de comprimento total (50,0cm até o detector). A injeção foi feita hidrodinamicamente, aplicando 10mbar de pressão por 3s no *vial* contendo a amostra. A tensão aplicada durante a aquisição de dados foi de +20kV. Entre

corridas, o capilar era condicionado apenas com o eletrólito por 2min. No início de cada dia, o capilar era condicionado com NaOH 1mol L⁻¹ (5 min), seguido de água desionizada (5 min) e eletrólito (20 min).

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, USA). Padrões de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) e dissolvidos em água na concentração de 1000µg mL⁻¹, perfazendo as soluções estoque. Soluções aquosas de cafeína nas concentrações 34,3; 68,5; 137; 274 e 548µg mL⁻¹ foram preparadas para a construção da curva de calibração, por diluição apropriada dos estoques. O eletrólito consistiu de uma solução tampão de tetraborato de sódio a 20mmol L⁻¹ contendo 70mmol L⁻¹ de dodecilssulfato de sódio (SDS), pH 9,3.

Amostras e seu preparo

Os extratos 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 (São Paulo, SP). As amostras foram estocadas sob refrigeração até a análise. Os extratos foram diluídos em água na proporção 1:30, enquanto que as amostras de matéria-prima foram dissolvidas em água na proporção 100mg para 20,00mL, antes de se proceder à análise eletroforética. Soluções aquosas da amostra de guaraná em pó (lote 11530-0702/MP) foram preparadas na proporção de 100mg para 20,00mL para os testes de extração. Estas soluções foram processadas em ultra-turrax (modelo Q1252-21, IKA Works do Brasil Ltda, Rio de Janeiro), com 13000 rpm, em intervalos de 30s, 1min e 5min, ou em ultra-som (modelo T7, Thronton Eletronica, São Paulo), de 40KHz, em intervalos de 5, 10 e 30min. A extração exaustiva de uma amostra de guaraná em pó (2g), mesmo lote, foi realizada em etanol (200mL), utilizando um extrator do tipo Soxhlet. Após um período de 24h, o extrato obtido foi seco sob nitrogênio e o resíduo suspenso em água na proporção 1:5.

Resultados e Discussão

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 (21). Sendo assim, o composto é neutro na faixa de pH útil para separação eletroforética em capilar, ou seja de pH 2 a 11. 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 (14). A escolha do pH recai então no controle do fluxo eletrosmótico e, portanto pH elevados são mais convenientes, pois propiciam separações mais rápidas.

A separação dos padrões das metilxantinas estudadas neste trabalho, empregando-se MEKC como modo de separação, assim como as respectivas estruturas químicas são apresentadas na Figura 1. 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-hydroxi-benzóico), 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. A Figura 1 estabelece a seletividade do método proposto para cafeína.

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 2). Como observado na Fig. 2, 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.

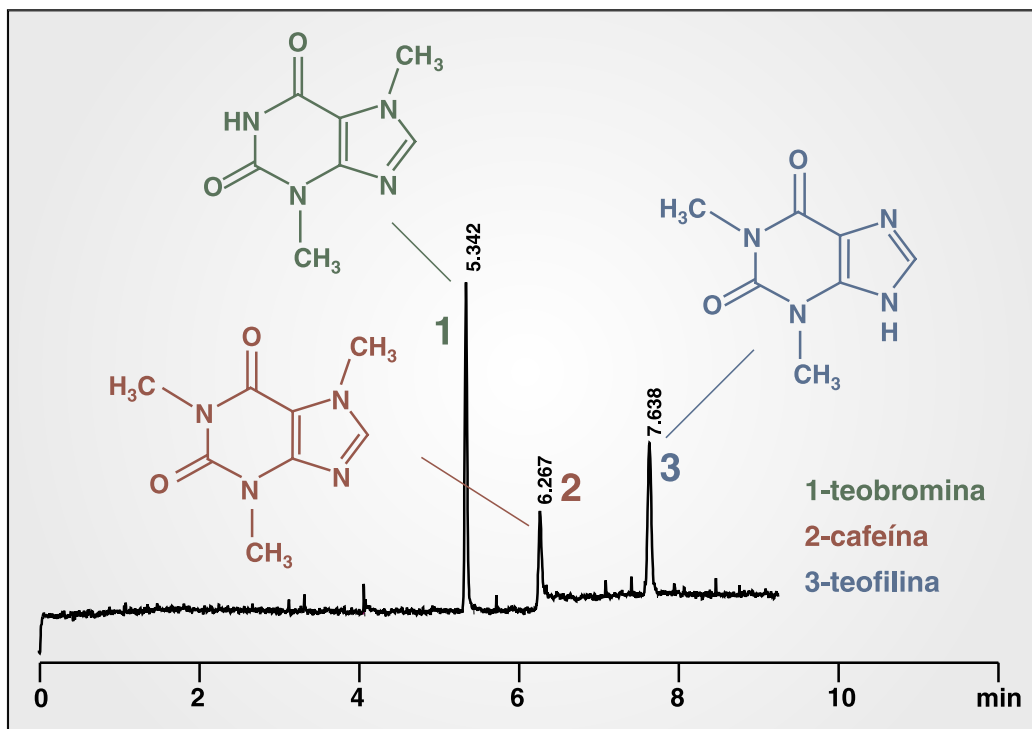


Figura 1. Separação de metilxantinas por eletroforese capilar. Soluções padrão de concentração 100g mL^{-1} . Eletrólito: 20 mmol L^{-1} tetraborato de sódio e 70 mmol L^{-1} SDS, pH 9,3. Condições eletroforéticas: capilar de 58 cm de comprimento total (50 cm até o detector) e $75\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno; injeção hidrodinâmica com 10 mbar por 3 s; tensão aplicada de +20 kV; detecção direta em 274 nm.

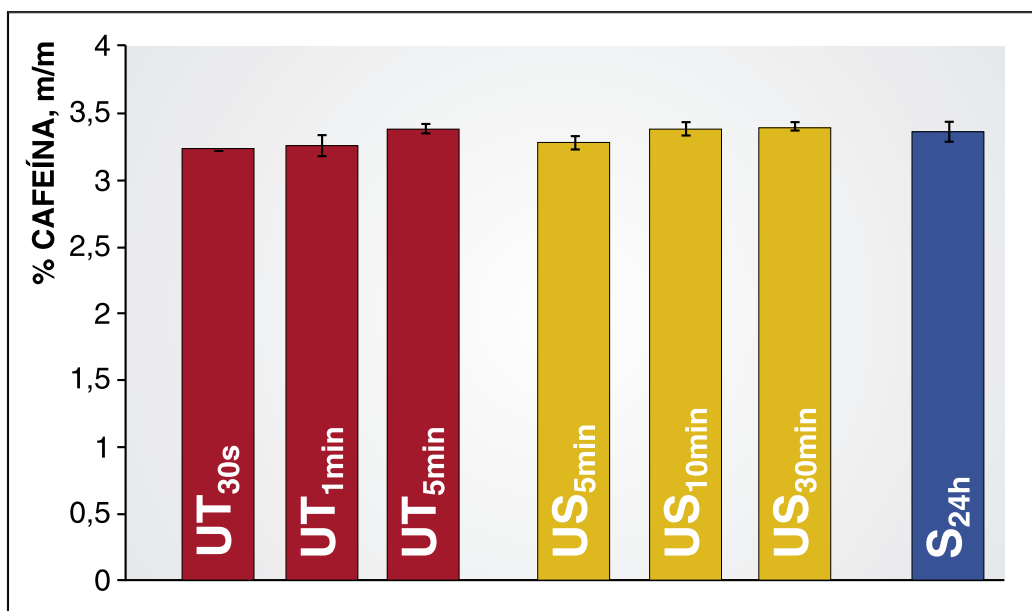


Figura 2. Otimização das condições de extração de cafeína de amostras de guaraná em pó. Concentração da amostra: 100 mg de guaraná em pó (matéria-prima, lote 11530-0702/MP) para 20,00 mL de água. Legenda: ultra-turrax a 13000 rpm (UT), ultrassom com potência de 40 KHz W (US) e soxhlet (S).

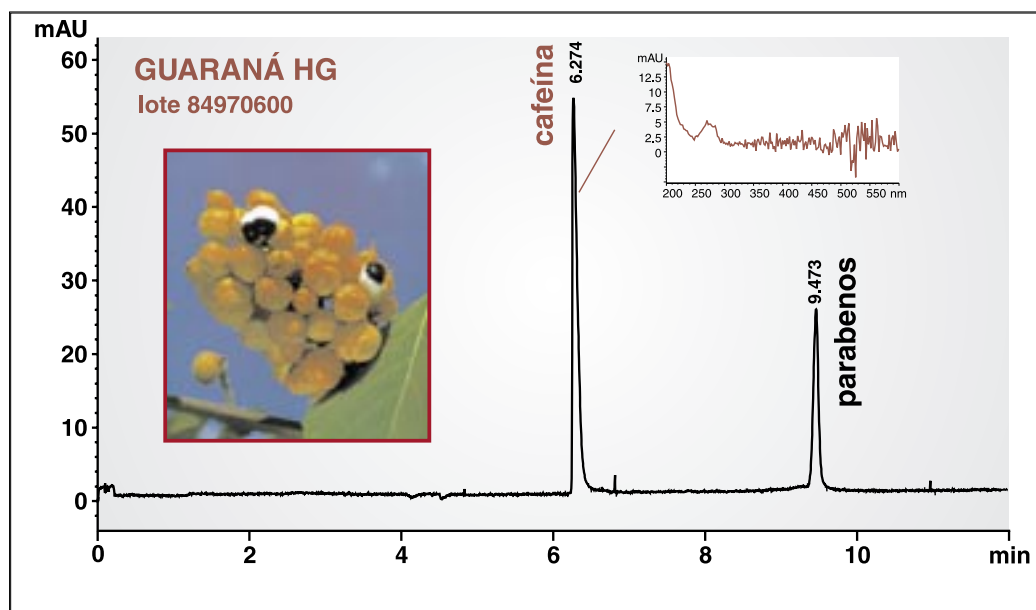


Figura 3. Eletroferograma de um extrato comercial hidroglicólico de guaraná de uso tópico. Condições como na Fig. 1.

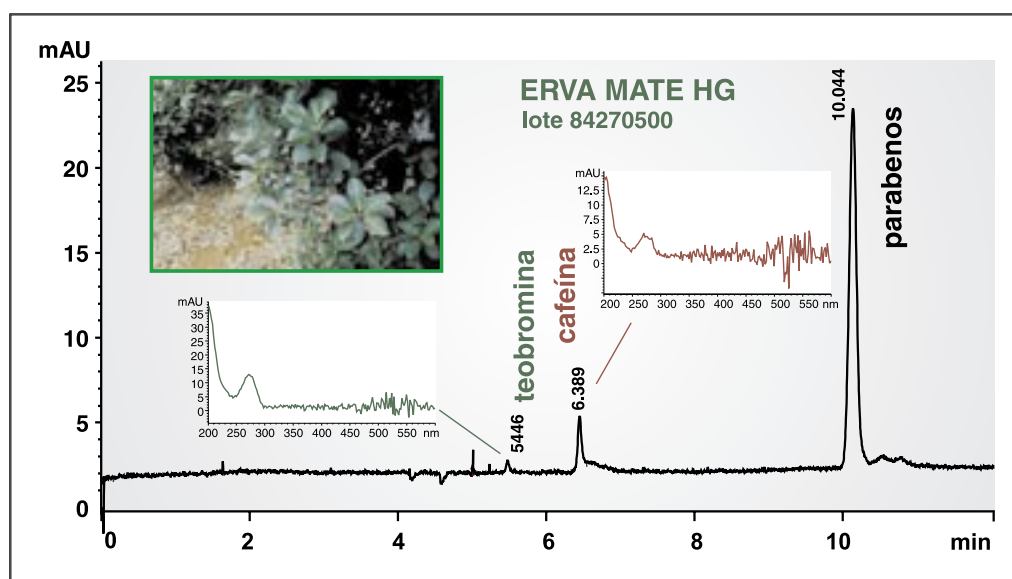


Figura 4. Eletroferograma de um extrato comercial hidroglicólico de erva mate de uso tópico. Condições como na Fig. 1.

Quantificação de cafeína nas amostras

Algumas figuras de mérito do método proposto para cafeína estão apresentadas na Tabela I. O método apresenta uma excelente linearidade ($r > 0,99$) no intervalo de concentração estudado, com estimativas de limite de detecção e quantificação de $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $6,07 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, a partir dos dados estatísticos de ajuste da curva (22). A repetibilidade do método para seis injeções consecutivas de uma solução padrão de cafeína a $274 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou um coeficiente de variação de 0,70%.

Foram analisados extratos comerciais hidroglicólicos de guaraná e erva mate que empregam propilenoglicol, etanol, água e glicerina em sua formulação. Os extratos foram inje-

tados diretamente sem tratamento prévio (Figuras 3 e 4). Na condição empregada para análise é possível visualizar a cafeína como a metilxantina predominante no extrato de guaraná (Fig. 3), não sendo observado o pico da teobromina. Já o extrato de erva mate (Fig. 4) apresenta além de cafeína, um pequeno teor de teobromina. O pico eluindo em cerca de 10min corresponde a mistura de parabens, utilizados como conservantes nos extratos.

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



A **LDM** representa exclusivamente produtos e equipamentos de última geração para limpeza, desinfecção e esterilização de vidrarias e materiais de laboratório, aumentando a qualidade dos procedimentos laboratoriais, propiciando ótimas condições de assepsia e sensível redução dos níveis de contaminação.



LDM - Equipamentos Ltda.

Rua Backer, 526 Cambuci São Paulo SP Brasil

Telefax (11) 3275.1166

e-mail: ldm@ldmequipamentos.com.br

www.ldmequipamentos.com.br

LABNEWS

Labnews Indústria Química Ltda.

Completa linha de produtos para limpeza e conservação de vidrarias laboratoriais.

Linha Pro: detergentes laboratoriais de última geração concentrados e biodegradáveis, formulados para limpeza por imersão.

Prolab Alcalino: indicado para limpeza de sujidades de difícil remoção, tem como característica especial retirar etiquetas e tintas das vidrarias.

Prolab Neutro: indicado para limpeza de sujidades de vidrarias sensíveis a alcalinidade.

Prolab Lav: detergente alcalino não espumante específico para ser utilizado em lavadoras automatizadas.

Prolab Ácido: detergente ácido não espumante específico para ser utilizado em lavadoras automatizadas.

Prozime: detergente não iônico com enzimas para limpeza de matéria orgânica.

Proxi: Detergente ácido indicado para remoção de oxidação de materiais em aço inoxidável.

Proinox: Solução que protege e dá brilho em superfícies de aço inoxidável.



Lavadoras, termodesinfetadoras e secadoras

Automatiza a limpeza e a desinfecção.

Várias capacidades e acessórios.

Sistema de barreira (dupla porta).

Aumento de qualidade, limpeza e produtividade.

Cromatografia & Espectrometria

Consumíveis

*colunas para HPLC

*colunas para GC

*vials e inserts

*micro seringas

*sistema para filtração

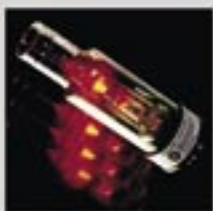
*cartuchos para SPE

*lâmpadas de catodo oco
(inclusive Perkin Elmer)

*frascos para Tekmar

*cubetas

*acessórios para FTIR



analítica

Rua Assungui, 432 04131-000 - São Paulo, SP
Fone (11) 5062-9070 Fax (11) 5062-3502 e-mail: consumiveis@novanalitica.com.br

www.analiticaweb.com.br

Tabela 1. Figuras de mérito do método proposto para a determinação de cafeína em extratos vegetais.

Parâmetro	Dado Estatístico
Intervalo de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	35 - 550
Coefficiente linear	-2,131
Coefficiente angular	1,403
Coefficiente de correlação, r	0,999997
Erro padrão	0,8511
Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,00
Limite de quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6,07
Precisão da injeção (área do pico)	0,7% CV
Recuperação da extração (ultra-turrax por 5 min)	100,01 \pm 0,94%

Tabela 2. Quantificação de metilxantinas em extratos hidroglicólicos de erva mate e guaraná e amostras de guaraná em pó.

Amostras	Cafeína (g/Kg)	Teobromina* (g/Kg)
GUARANÁ HG# lote FS 84970600	6,84 \pm 0,20	-
ERVA MATE HG# lote FS 84270500	0,21 \pm 0,02	0,050 \pm 0,006
Guaraná em pó## lote 11540-0702/MP	36,8 \pm 0,9	-
Guaraná em pó## lote 11530-0702/MP	33,4 \pm 0,7	-

extratos hidroglicólicos de uso tópico

matéria-prima

* estimado a partir de um ponto de calibração

Conclusões

Neste trabalho foi comprovado 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.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 301201/1994-3; 141551/2001-1; 140862/2000-5) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 00-04414-4; 01/14123-0) pelo suporte financeiro e ao Sr. Nestor Pinto Neto e Levi De Oliveira Jr. (Farma Service Bioextract, São Paulo, SP) pelas amostras.

Referências

1. Teske M, Trentini AMM. **Herbarium Compêndio de Fitoterapia**, Herbarium Laboratório Botânico Ltda., Curitiba, 1995.
2. www.rain-tree.com.br/yerbamate.htm
3. www.rain-tree.com.br/guarana.htm
4. Baumann TW, Schulthess BH, Hänni K. **Phytochemistry** 1995, 39(5), 1063-1070.
5. Ashihara H, Crozier A. **Trends in Plant Science** 2001, 6(9), 407-413.
6. Rates SMK. **Metilxantinas em Farmacognosia. Da planta ao medicamento**, Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (eds), 3a. edição, Editora da UFSC Florianópolis, SC e Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.
7. Carlson M, Thompson RD. **J. AOAC Int.** 1998, 81(4), 691-701.
8. Camargo MCR, Toledo MCF. **J. Sci. Food Agric.** 1999, 79, 1861-1864
9. Liang Y, Lu J, Ahzng L, Wu S, Wu Y. **Food Chem.** 2003, 80, 283-290.
10. Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK. **J. Agric. Food Chem.** 2003, 51(7), 1864-1873.
11. Pagliarussi RS, Freitas LAP, Bastos UK. **J. Sep. Sci.** 2002, 25(5-6) 371-374.
12. Tomás-Barberán FA. **Phytochem. Anal.** 1995, 6, 177-192.
13. Suntornsuk L. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 2002, 27, 679-698.
14. Tavares MFM. **Quím. Nova** 1996, 19, 173-181; *ibid* 1997, 20, 493-511.
15. Tagliaro F, Smith FP, Turrina S, Equisetto V, Marigo M. **J. Chromatogr. A** 1996, 735, 227-235.
16. Zhao Y, Lunte CE. **J. Chromatogr. B** 1997, 688, 265-274.
17. Vogt C, Conradi S, Rohde E. **J. Chem. Educ.** 1997, 74(9), 1126-1130.
18. Watanabe T, Nishiyama R, Yamamoto A, Nagai S, Terabe S. **Anal. Sci.** 1998, 14, 435-438.
19. Pomilio AB, Trajtemberg S, Vitale AA. **Phytochem. Anal.** 2002 13(4), 235-241.
20. Wang A, Lijun L, Zang F, Fang Y. **Anal. Chim. Acta** 2000, 419, 235-242.
21. **Comprehensive Medicinal Chemistry. The Ratio-nary Design, Mechanistic Study & Therapeutic Application of Chemical Compounds**, Vol. 6, Pergamon Press: Oxford, 1990.
22. Swartz ML, Krull IS. **Pharm. Tech.** 1998, 2, 12-20.