

ANÁLISE DE EXTRATOS PADRONIZADOS DE GUARANÁ POR HPLC-UV E HPLC-MS

Gisele Cristina Oliveira MELO¹
Rita Cynara de Oliveira SALLES²
Sergio Massayoshi NUNOMURA³

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PAIC/FAPEAM;

²Colaboradora PPGQ/UFAM;

³Orientador COTI/INPA

INTRODUÇÃO

O guaraná é uma planta da família Sapindaceae, cujo nome científico é *Paullinia cupana* com duas variedades: *typica* encontrada na Venezuela e na Colômbia e a variação *sorbilis* oriunda da região amazônica, encontrada preferencialmente às margens dos rios Maués-açu, Andirá e Paraná dos Ramos (Monteiro 1965) e explorada economicamente (Schimpt *et al.* 2013). Entretanto, o Estado da Bahia é, há mais de dez anos, o principal produtor de guaraná do Brasil detendo mais de 70% da produção relativa anual, enquanto o estado do Amazonas detém cerca de 21% (Conab 2014).

O guaraná possui estudos fitoquímicos que comprovaram a presença de metilxantinas, taninos condensados e flavonoides, entre outros (Belliardo *et al.* 1985; Ushirobira *et al.* 2004), sendo utilizado como estimulante, adstringente e diurético (Sousa *et al.* 2010). Contudo esses componentes variam em quantidade de um indivíduo para outro, de acordo com as condições do solo e do clima de onde foi cultivado, conseqüentemente pode variar a qualidade da matéria prima pode variar (Ushirobira *et al.* 2004). Além de estudos químicos e biológicos do guaraná, existem estudos voltados para o desenvolvimento de métodos de controle de qualidade, principalmente voltados para a quantificação de cafeína e alguns fenólicos (Belliardo *et al.* 1985; Ushirobira *et al.* 2004; Sousa *et al.* 2010; Klien *et al.* 2012; Veiga *et al.* 2014).

Considerando a importância do desenvolvimento de um certificado de origem amazônica para o guaraná produzido no Estado do Amazonas, o nosso grupo de pesquisa vem avaliando diferentes técnicas analíticas. Uma das técnicas mais avaliadas é a análise de perfis cromatográficos, os chamados estudos de *fingerprint*, que podem ser empregados no controle de qualidade e na autenticação de uma planta, a partir de seu perfil químico (Xu *et al.* 2006). Normalmente uma espécie vegetal produz e acumula um grande número de produtos naturais, que podem ser analisados em sua integridade por técnicas analíticas que produzem perfis característicos (Liang *et al.* 2004). As informações geradas nesses perfis são abrangentes, pois caracterizam simultaneamente os multi-componentes presentes ou detectáveis num extrato e são obtidos de forma bastante rápida e reprodutível, se comparados com a abordagem fitoquímica clássica que se concentra no isolamento e na identificação dos constituintes químicos e eventualmente na quantificação de seus principais marcadores individuais (Xie *et al.* 2006).

Dentre as técnicas mais utilizadas para esta finalidade está a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta com arranjo de diodos (CLAE-DAD) e à espectrometria de massas (CLAE-EM). Para mapear a constituição metabólica completa de uma espécie são necessários equipamentos analíticos modernos e informativos (Funari *et al.* 2013). Para esse estudo foram selecionadas essas duas técnicas como

ferramenta para o desenvolvimento de um método de controle de qualidade mais abrangente de forma que seja possível comprovar a sua autenticidade e origem amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras autênticas de guaraná são oriundas de diferentes localidades do Amazonas, assim como dos Estados do Pará, Bahia e Mato Grosso, que já se encontravam disponíveis no grupo de pesquisa e armazenadas em freezer a -21°C . Dessas amostras, quatro foram previamente selecionadas: amostra 10 (fruto não comercial; Manaus-AM); amostra 29, (comercial-guaraná em pó; Ituberá-BA); amostra 33 (comercial-guaraná em pó; Alta floresta- MT); e amostra 5 (não comercial- semente torrada; Maués-AM).

Duas condições de extração foram avaliadas preliminarmente, banho de ultrassom a quente ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) e banho de ultrassom a frio ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), além de oito misturas de solventes extratores diferentes, M1A - MeOH/ H_2O (1:1); M1B - MeOH/sol. TFA (1:1); M2A - ACN/ H_2O (1:1); M2B - ACN/sol. TFA; M3A - Acetona/ H_2O (1:1); M3B - Acetona/sol. TFA (1:1); M3C - Acetona/ H_2O (7:3); M3B - Acetona/sol. TFA (7:3), para avaliar o melhor método de extração com melhor rendimento de componentes extraídos.

Para a preparação dos extratos, foram pesados em frascos do tipo Eppendorf de 2,0 mL, aproximadamente 100 mg de cada amostra, extraído com a mistura de solventes, de acordo com as dezesseis condições de extração citadas anteriormente, tendo como volume final 1,5 mL da mistura. Ao fim de cada extração, esses materiais foram centrifugados por duas vezes e em seguida, os extratos foram separados do material sedimentado e transferidos para frascos previamente identificados.

Posteriormente, foi preparada uma amostra de cada extrato em frasco Eppendorf na concentração de 1 mg/mL solubilizados em mistura de MeOH (grau LC-MS) com 0,1% ácido fórmico e sol. ácido fórmico (0,1%) na proporção (1:1), na concentração de 1 mg/mL.

As amostras foram centrifugadas e transferidas para vials de cromatografia e analisados por CLAE-UV-DAD em equipamento da marca Shimadzu, modelo Prominence 20, equipado com sistema de injeção automática, bomba quaternária LC-10AT Vp e detector do tipo de arranjo de diodos. A separação foi feita alcançada em uma coluna cromatográfica Supelco HS F5 (250 X 4,6 mm de 5 μm). As amostras foram detectadas no comprimento de onda de 220 nm e o melhor método de análise teve como fase móvel: Sol. A de ácido fórmico (0,1%) e solvente B MeOH (0,1% ácido fórmico) em modo gradiente linear 0 a 50min- 20% a 42,2% de B. O fluxo de análise foi de 1 mL/min e volume de injeção 20 μL .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os tratamentos dos dados, foi possível notar a existência de similaridades entre ambos os métodos de extração, porém apenas na extração à frio houve um padrão para todas as amostras, que obtiveram melhores rendimento com a mistura de solventes ACN/sol. de TFA (1:1), condição (M2B) (Figura 1). Também foi possível perceber o efeito da temperatura nas diferentes condições de extrações.

A Figura 2 mostra o comportamento das amostras de acordo com a temperatura, onde a amostra 29 teve menor rendimento no geral em torno de 16% e que as amostras 10, 33 e 5, apresentam rendimento crescente entre 20 e 21%. Assim, apesar do maior resultado em termos de rendimento ser os da extração utilizando ultrassom à temperatura de aproximadamente 40°C , nota-se uma baixa variação entre os dois métodos de extração, o que sugere como vantagem a escolha da extração a frio por ser uma forma mais branda para a extração dos metabólitos.

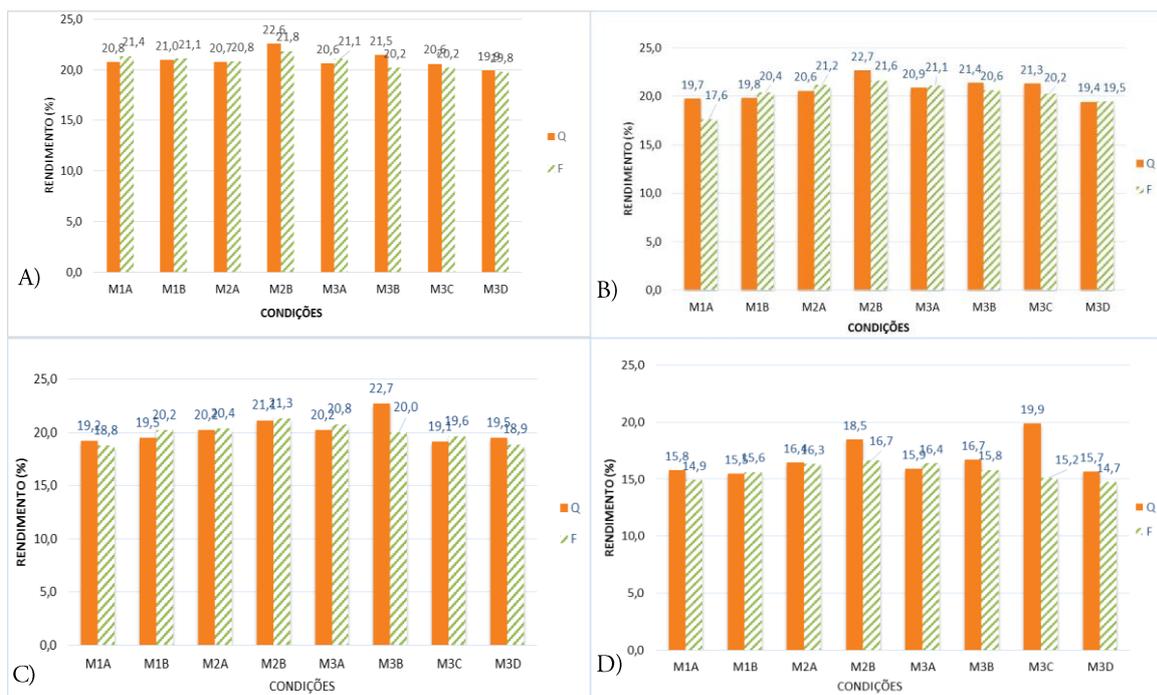


Figura 1. Gráficos de rendimento nas oito condições de extrações a quente e a frio. A) amostra 5; B) amostra 10; C) amostra 33 e D) amostra 29.

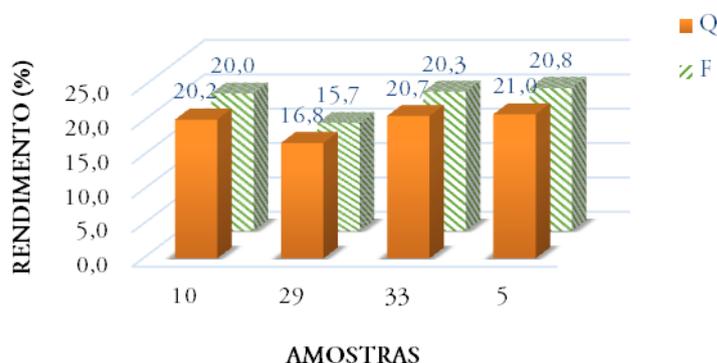


Figura 2. Gráfico de comparação do rendimento das amostras extraídas com ultrassom a quente e frio.

Para uma melhor comparação dos resultados das análises cromatográficas, cada um dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD das amostras extraídas a quente foram exportados e tratados no software Unscrambler, versão 10.4, onde foram empregados algoritmos de alinhamento do tipo COW (“Correlation Optimized Warping”). Pode se observar que nos cromatogramas compilados nas figuras 3A a 3D, que após o alinhamento dos picos, as análises em triplicatas foram bastante reproduzíveis. As amostras apresentaram perfis cromatográficos bastante semelhantes, onde pelo menos 5 picos cromatográficos de maior intensidade, com os tempos de retenção em aproximadamente, 15,0, 16,0, 18,0, 20,0 e 28,0 minutos, foram bastante semelhantes; o que indica que existem metabólitos em comum entre as amostras. A identificação de alguns

desses constituintes foi realizada através da comparação das amostras com padrões autênticos, onde foi possível verificar a presença da cafeína, catequina e epicatequina.

As análises cromatográficas por CLAE-UV-DAD também indicaram a presença de vários constituintes minoritários, os quais podem ser determinantes na diferenciação da origem geográfica entre as amostras. Pretende-se ainda analisar as amostras pela técnica de CLAE-EM, a fim de verificar a existência de alguma diferença no “*fingerprint*”, pois se trata de um detector mais informativo e mais sensível, se comparado ao de UV-DAD. Com relação aos perfis cromatográficos obtidos (Figuras 3A a 3D), foi possível perceber que a mostra 33 apresentou o menor número de picos, em relação às demais amostras, o que pode indicar a influência da origem geográfica, sendo necessário concluir as análises de mais amostras da mesma região.

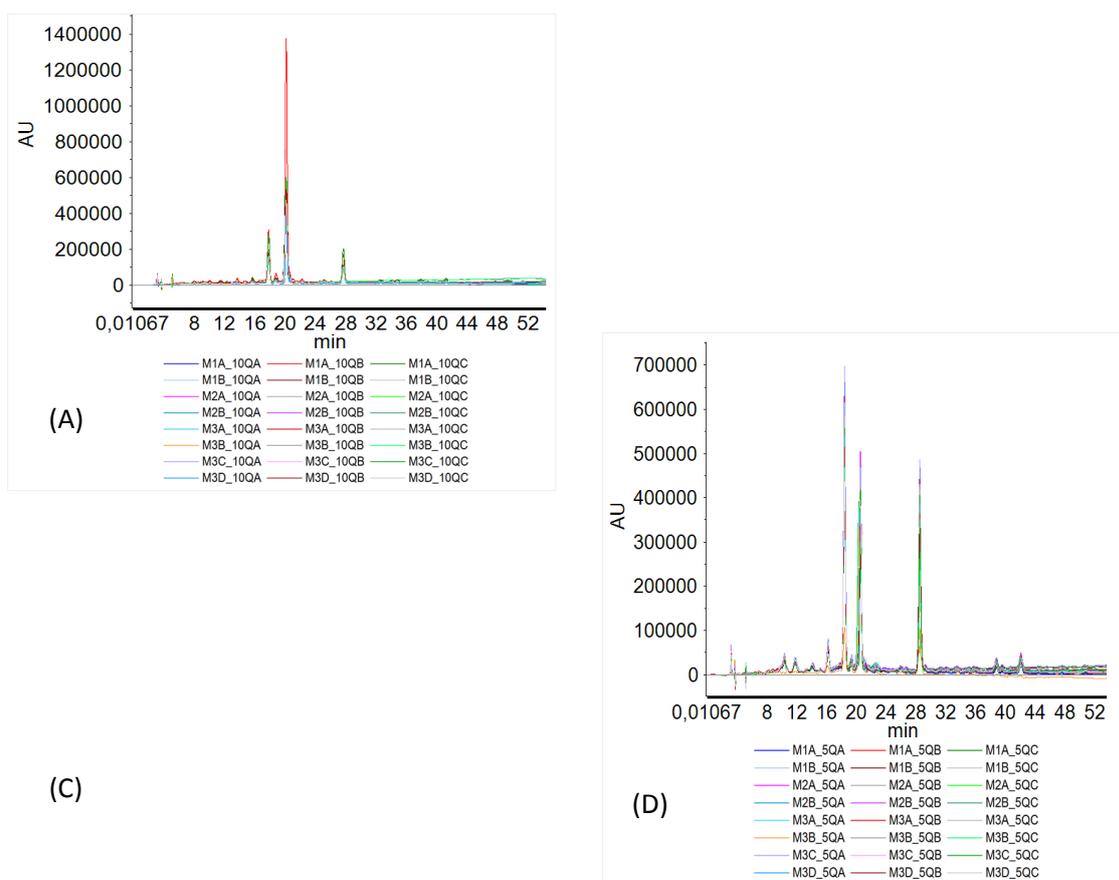


Figura 3: Cromatogramas obtidos após o alinhamento nas oito condições de extração: (A) amostra Manaus (AM); (B) amostra Ituberaba (BA); (C) amostra Alta Floresta (MT) e (D) amostra Maués (AM).

CONCLUSÃO

Pôde-se concluir que o melhor método de extração para as amostras de guaraná foi obtido pela extração em banho de ultrassom a 25°C, utilizando uma mistura de solventes, acetonitrila e solução de TFA (1:1). E que o método de análise utilizado por CLAE-UV-DAD, mostrou ser sensível e reprodutível nas condições de análise realizadas (replicatas), pois permitiu a visualização de constituintes minoritários de forma reprodutível. As análises por CLAE-UV-DAD também permitiu a confirmação da presença de constituintes previamente identificados na literatura para o guaraná como a cafeína, catequina e a epicatequina.

De acordo com a análise de PCA, as condições de extração não tiveram diferenças significantes em relação aos componentes extraídos por amostra. Além disso, a amostra 5 se diferenciou por ter como componente principal a catequina, enquanto que as demais amostras mostraram presença majoritária da cafeína. Apenas as amostras 5 e 29 correlacionaram com variáveis de correspondentes aos componentes minoritários. Dessa forma, torna-se necessário a obtenção e a análise dos dados de CLAE-EM para uma avaliação mais abrangente dos perfis cromatográficos das amostras de diferentes localidades.

REFERÊNCIAS

- Belliardo, F.; Martelli, A.; Valle, M.G. 1985. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (Guarana) and *Cola* spp. samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung* 180: 398-401.
- Conab, 2014. Conjuntura mensal: Guaraná. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/-arquivos/14_09_09_17_32_05_guarana_agosto_2014.pdf. Acesso em: 13/05/2016.
- Funari, C. S.; Castro-Gamboa, I.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. da S. 2013. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. *Química Nova* 36, 10: 1605-1609.
- Klien, Traudi; Longhini, Renata; de Mello, João Carlos Palazzo. 2012. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). *Talanta*, 88: 502– 506
- Liang, Yi-Zeng; Xie, Peishan; Chan, K. 2004. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, 812(1): 53-70.
- Monteiro, M. Y., 1965. Antropogeografia do guaraná - Cadernos da Amazônia, 6. Manaus: Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pág. 11.
- Schimpl, F.C.; da Silva, J.F.; Gonçalves, J.F.d.C.; Mazzafera, P. 2013. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 150:14–31.
- Sousa, S.A., Alves, S.F., de Paula, J.A.M., Fiuza, T.S., Paula, J.S., Bara, M.T.F. 2010. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20:866-870.
- Veiga, L.L.; Amorim, H.; Moraes, J.; Silva, M.C.; Raices, R.S.L.; Quiterio, S.L. 2014. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted guaraná (*Paullinia cupana*) by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. *Food Chemistry*, 152:612–618.
- Ushirobira, T.M.A.; Yamaguti, E.; Uhemura, L. M.; Palazzo de Mello, J. C. 2004. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23:383-386.
- Xie, P.; Che, S.; Liang, Y. Z.; Wang, X.; Tian, R.; Upton, R. 2006. Chromatographic fingerprint analysis - a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *Journal of Chromatography A*, 1112:171–180.
- Xu, C.; Liang, Y.; Chau, F.; Heyden, Y. V. 2009. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography A*, 1216: 2156-2162.