

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

GISELE STARK

**Estudo de marcadores químicos de guaraná
(*Paullinia cupana*) por CLAE**

Manaus – Amazonas

2007

GISELE STARK

**Estudo de marcadores químicos de guaraná
(*Paullinia cupana*) por CLAE**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sergio Massayoshi Nunomura

Co-orientador: Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

Manaus – Amazonas

2007

STARK, Gisele

Estudo de marcadores químicos de guaraná (*Paullinia cupana*) por CLAE. Gisele Stark. Manaus: UEA, 2007. 105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, UEA, Biotecnologia, área da saúde.

1. Perfil cromatográfico. 2. Atividade antioxidante. 3. HPLC. 4. Certificação de origem. 5. Controle de qualidade. 6. Compostos fenólicos.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, que apesar da distância, sempre me apoiou nas minhas escolhas e batalhas, e ao meu filho Rafael, que está por nascer, por ter me acompanhado nestes últimos meses compartilhando comigo minhas alegrias e apreensões, dedico-lhes mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela infância maravilhosa e pelos princípios e valores transmitidos na minha educação, ao meu orientador, agradeço pelos valiosos ensinamentos, ao meu colega Herbert Theury pela valiosa ajuda no laboratório, aos meus amigos do INPA pelo apoio e bom humor no laboratório, à Fundação Desembargador Paulo Feitoza pela liberação parcial das minhas atividades, ao CNPQ e à FAPPEAM pelo financiamento da pesquisa, ao INPA pela infraestrutura, ao pesquisador Firmino José do Nascimento Filho (EMBRAPA-AM) pelo esforço em fornecer parte das amostras de guaraná e à minha cunhada Cris pela busca e envio dos artigos da Alemanha.

RESUMO

O guaraná, *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, é um dos produtos nativos da Amazônia de maior importância econômica para a região, muito apreciado no mercado externo. É consumido tradicionalmente pelos índios das regiões do baixo Amazonas pelas suas propriedades estimulante, fortificante e antidiarréica e atualmente vem sendo cultivado também em outros estados brasileiros. O principal produto do guaraná é obtido das amêndoas torradas, utilizadas principalmente em pó e xarope para a incorporação em bebidas. Os principais constituintes químicos do guaraná são as metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina) e os compostos fenólicos (catequinas). O aumento da procura pelos produtos do guaraná vem estimulando, infelizmente a sua adulteração, que ocorre principalmente pela adição de cafeína sintética, de baixo custo. Essa adulteração não pode ser detectada pelos principais métodos de controle de qualidade que se baseiam na quantificação de cafeína. Este trabalho relata o desenvolvimento de um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para estudar perfis cromatográficos do guaraná para emprego no controle de qualidade e avaliação de adulteração de amostras com base na análise dos multicomponentes presentes no guaraná. Os perfis cromatográficos obtidos foram bastante reprodutíveis, relativos a cinco marcadores químicos identificados nas amostras de guaraná (cafeína, catequina, epicatequina, teofilina e teobromina). Além disso, foi possível empregar o método para a quantificação de cafeína. Foram analisadas vinte amostras de três diferentes estados do país (Amazonas, Bahia e Mato Grosso), que apresentaram um perfil cromatográfico muito semelhante, independente de sua origem. Contudo foi possível associar a origem geográfica das amostras pelo teor de cafeína. A origem amazônica do produto é muito valorizada, o que torna o processo de certificação de origem de grande interesse para a região. Também foi avaliada a atividade antioxidante de amostras de guaraná produzidas de duas formas (torrada e seca ao sol), que foram comparadas com outras espécies consumidas no mundo todo como bebidas e reconhecidas por suas propriedades antioxidantes (chá verde, chá preto, café, erva-mate e cevada). Foi possível observar que a amostra de guaraná beneficiada pelo método tradicional apresentou excelentes resultados de atividade antioxidante inferiores somente ao chá verde, indicando o grande potencial do guaraná. A maior atividade antioxidante observada para as amostras de guaraná produzidas pela torrefação comparadas a produzidas por secagem ao sol, indicam que o beneficiamento pode aumentar significativamente as propriedades nutracêuticas do produto.

Palavras-chave: Perfil cromatográfico, atividade antioxidante, HPLC, controle de qualidade, fenólicos, metilxantinas.

ABSTRACT

Guaraná, *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, is one of the most important natural products of the Amazon basin and very appreciated abroad. The Indians of low Amazon due to its stimulating, fortifying and anti-diarrhea properties consume it and today guarana is also cultivated in other states of Brazil. Its seeds, powdered or as syrup, are used in many products (beverages). The main chemical constituents of guarana are methylxanthines (caffeine, theofiline, theobromine) and also phenolic compounds (catechins). Due to the increasing interest for guarana, adulteration based on synthetic caffeine addition (low cost) has been more often found. This adulteration cannot be detected by the main quality control methods based on the quantification of caffeine. This work describes the development of an analytical method developed by reversed phase high performance liquid chromatography to acquire chromatographic profiles (fingerprints) of guarana to quality control and assess adulteration of guarana based on the analysis of its multicomponents. The fingerprints were very reproducible, relative to five chemical markers (caffeine, catechin, epicatechin, theofiline and theobromine). The method was also able to quantify caffeine in the samples. Twenty samples from three different states in Brazil (Amazonas, Bahia and Mato Grosso) were analysed and a common fingerprint, independent from its origin, was obtained. The caffeine content of the samples could assess the geographical origin. The certification of origin of a natural product is one of the most important added values. The antioxidant power of powdered guarana seeds obtained in two different ways (toasted or sun dried) were also evaluated and compared to other plant species consumed worldwide as beverages and recognized for their antioxidant power (green tea, black tea, coffee, mate and barley). The sample of toasted guarana had a significant antioxidant power, inferior only to green tea, whereas the sun dried sample have much less activity. This indicates the great potential of guarana and the importance of the drying process of the seeds to keep its nutraceutical properties.

Key-words: Chromatographic profile, antioxidant activity, HPLC, quality control, phenolic, methylxanthines.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Arbusto (a) e frutos (b) de <i>P. cupana</i> var. <i>sorbilis</i> – Fonte: Embrapa, 2002.....	15
FIGURA 2.	Alguns produtos do guaraná.....	16
FIGURA 3.	Exemplos de espécies amazônicas do gênero <i>Paullinia</i> encontradas na Reserva Ducke (Fonte: RIBEIRO et al, 1999).....	18
FIGURA 4.	Região de ocorrência natural do guaraná.....	20
FIGURA 5.	Estruturas químicas das metilxantinas (1) cafeína, (2) teobromina e (3) teofilina.....	21
FIGURA 6.	Exemplos de taninos gálico (casuarinina) e condensado (procianidina B).....	22
FIGURA 7.	Estruturas químicas de catequina (1) e epicatequina (2).....	23
FIGURA 8.	Método tradicional de secagem, torrefação do guaraná – Fonte: Paulo Câmara.....	27
FIGURA 9.	Repetibilidade do perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato de <i>G. biloba</i> injetado no primeiro dia (a e b) e no dia seguinte (c e d).....	30
FIGURA 10.	Comparação de quimiotipos de <i>E. sinica</i> da Eurásia (A), <i>E. trifurca</i> da América do Norte (B) e <i>E. ochreatea</i> da América do Sul (C) por CLAE.....	31
FIGURA 11.	Cromatogramas dos extratos obtidos por maceração à frio da amostra 10.....	47
FIGURA 12.	Cromatogramas das frações (a) lipofílica CHCl_3 e (b) hidrofílica $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3) obtidas por partição de extrato de guaraná obtido por ultrassom com $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1).....	49
FIGURA 13.	Extração seqüencial por Soxhlet com (a) CHCl_3 e (b) $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) da amostra 10.....	50
FIGURA 14.	Extração seqüencial por Soxhlet com (a) DCM e (b) $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) da amostra 10.....	50
FIGURA 15.	Extração seqüencial por Soxhlet com (a) MTBE e (b) $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) da amostra 10.....	50
FIGURA 16.	Cromatograma do extrato integral obtido por ultrassom com aquecimento (a), cromatograma da fração Acetona/ H_2O de extrato integral de guaraná obtido por ultrassom, após tratamento com Na_2CO_3 (b), cromatograma da fração Acetona/ H_2O de amostra de guaraná obtida por extração seqüencial tratada com Na_2CO_3 e neutralizada antes da extração (c).....	52
FIGURA 17.	Cromatograma da fração hidrofílica do extrato de guaraná obtido por extração seqüencial em Soxhlet – fase móvel $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10:90).....	53
FIGURA 18.	Cromatograma da fração $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ da amostra 10 – fase móvel $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ nas seguintes condições: 0-15 min (1:99), 20-45 min (25:75), retornando a condição inicial em 50 min permanecendo até o final da corrida (55 min).....	54
FIGURA 19.	Cromatograma da fração $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ da amostra 10 – fase móvel $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (TFA 0,05%) nas seguintes condições: 0-15 min (2:98), 18-57 min (10:90), retornando a condição inicial em 60 min.....	54

FIGURA 20.	Cromatogramas do teste com colunas do tipo C18 – LiChrospher 100 RP 18e (a), LiChrospher 60 RP – Select B (b), Nucleosil C18 (c) Shim-pack CLC-ODS Shimadzu (d) e LiChrospher 100 NH ₂ (e) em gradiente MeOH/TFA (0,05%), nas seguintes condições: 0-5 min (7:93), 7-25 min (15:85), 27-37 (27:73), 39-68 (33:67) 70 min retornando a condição inicial, fluxo 1 mL/min.....	56
FIGURA 21.	Cromatograma da fração EtOH/H ₂ O da amostra 10 obtido nas mesmas condições da Figura 19. Coluna Nucleosil C-18, amostra 1mg/mL dissolvida em MeOH/TFA 0,05% (1:1).....	57
FIGURA 22.	Cromatograma da fração MeOH/TFA (1:1) da amostra 11 obtido nas seguintes condições: fase móvel MeOH/TFA (1:1) – 0-5 min (7:93), 7-15 min (17:83), 17-22 min (25:75), 24-50 min (30:70), 52-58 min (35:65) 60-70 min (7:93).....	58
FIGURA 23.	Cromatograma obtido em 254 nm (a) e cromatograma em 3D (b) de amostra de guaraná obtido pelo método otimizado.....	60
FIGURA 24.	Extração seqüencial com aquecimento com (a) DCM, (b) MeOH/TFA, (c) CHCl ₃ e (d) MeOH/TFA.....	59
FIGURA 25.	Cromatograma da mistura de padrões disponíveis analisado no método otimizado.....	62
FIGURA 26.	Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão (b) e espectro UV do pico extraído em 13.19 min (IP – 0.60) na amostra (c), espectro UV do padrão - λ máx 196, 215, 271 nm (d).....	63
FIGURA 27.	Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão (b), espectro UV do pico em 59.65 min (IP – 0,91) na amostra (c) e espectro UV do padrão - λ máx 199, 279 nm (d).....	64
FIGURA 28.	Cromatograma ampliado da amostra (a), cromatograma da amostra + padrão (b) e da amostra + padrão ampliado (c).	65
FIGURA 29.	Espectro UV do pico em 39.68 min na amostra (IP – 0.95) (a) e espectro UV do padrão - λ máx 218, 270 nm (b).....	65
FIGURA 30.	Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão (b), espectro UV do pico extraído em 62.70 min (PPI – 0.77) (c), em 64.16 min (d) na amostra (PPI – 0.77) e do padrão - λ máx 197, 274 nm (e).....	66
FIGURA 31.	Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão de galocatequina (b), espectro UV do pico extraído em 19.02 (c), em 20.22 min (d) na amostra e espectro UV do padrão - λ máx 205, 270 nm (e).....	68
FIGURA 32.	Cromatograma da amostra (a), amostra + mistura de padrões (b) e espectro UV extraído do pico em 34.98 min na amostra (IP – 1.00) (c) e espectro UV do padrão - λ máx 201, 279 nm (d).....	69
FIGURA 33.	Cromatograma da amostra (a), amostra + mistura de padrões (b), espectro UV extraído do pico em 76.77 (c) em 80.69 min (d) da amostra e espectro UV do padrão - λ máx 206, 274 nm (e).....	70
FIGURA 34.	Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão de TeoB (b), espectro UV extraído do pico em 23.32 min na amostra (IP – 0.74) (c) e espectro UV do padrão - λ máx 206, 272 nm (d).....	71
FIGURA 35.	Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão de TeoF (b), espectro UV extraído do pico em 31.03 min (IP – 1.00) (c), em 33.74 min (IP – 0.99) (d), em 35.01 min (IP – 0.40) (e) na amostra e espectro UV do padrão - λ máx 207, 270 nm (f).....	72

FIGURA 36.	PC das frações MeOH/TFA (1:1) das amostras provenientes do Estado do Amazonas.....	77
FIGURA 37.	PC das frações MeOH/TFA (1:1) das amostras provenientes da Bahia.....	79
FIGURA 38.	PC das frações MeOH/TFA (1:1) das amostras provenientes do Mato Grosso.....	80
FIGURA 39.	PC das frações diclorometano das amostras provenientes do Estado do Amazonas.....	84
FIGURA 40.	PC da fração diclorometano das amostras provenientes da Bahia.....	86
FIGURA 41.	PC da fração diclorometano das amostras 30, 31, 33 e 34 provenientes do Mato Grosso.....	87
FIGURA 42.	Curva de calibração da cafeína.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Principais métodos de análise e controle de qualidade de guaraná.....	28
TABELA 2.	Relação de amostras estudadas.....	35
TABELA 3.	Proporções de misturas binárias testadas na partição líquido-líquido.....	38
TABELA 4.	Condições de extração seqüencial por ultrassom com aquecimento.....	39
TABELA 5.	Concentração dos padrões na mistura de padrões.....	41
TABELA 6.	Estudos de recristalização da cafeína.....	48
TABELA 7.	Resultados dos estudos de partição líquido-líquido com a amostra 10 de guaraná.....	49
TABELA 8.	Rendimentos de extração seqüencial da amostra 10.....	50
TABELA 9.	Características principais das colunas de fase reversa tipo C-18 avaliadas.....	56
TABELA 10.	Médias dos tR dos padrões injetados isoladamente (duplicata) com a variação de pH da fase móvel.....	61
TABELA 11.	Resultado da quantificação de cafeína das diferentes amostras de guaraná analisadas.....	90
TABELA 12.	Teor de fenólicos totais em mg de ácido gálico/g de amostra...	92
TABELA 13.	Dados da curva de calibração com sulfato ferroso no ensaio FRAP.....	93
TABELA 14.	Atividade antioxidante de diferentes amostras pelo ensaio FRAP.....	94
TABELA 15.	Resultados da atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH.....	97

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.	Rendimento das extrações por diferentes métodos em diferentes solventes.....	45
GRÁFICO 2.	Teor médio de cafeína nas amostras provenientes do Estado do Amazonas, Bahia e Mato Grosso.....	89
GRÁFICO 3.	Curva de calibração de ácido gálico no ensaio de fenólicos totais.....	91
GRÁFICO 4.	Comparação do teor de fenólicos totais nas diferentes amostras analisadas.....	92
GRÁFICO 5.	Curva de calibração de sulfato ferroso no ensaio FRAP.....	93
GRÁFICO 6.	Comparação da atividade antioxidante pelo ensaio FRAP das amostras.....	94
GRÁFICO 7.	Gráficos dos resultados da atividade antioxidante pelo ensaio DPPH das diferentes amostras.....	96
GRÁFICO 8.	Comparação dos resultados do ensaio DPPH.....	97
GRÁFICO 9.	Relação entre teor de fenólicos totais e FRAP das amostras analisadas.....	98
GRÁFICO 10.	Relação entre teor de fenólicos totais e DPPH.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	absorbância
ACN	acetonitrila
AG	ácido gálico
AMP	adenosina mono fosfato
C	catequina
Caf	cafeína
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
Conc	concentração
CS	capacidade de seqüestro
CS ₅₀	capacidade de seqüestro mediana
CV	coeficiente de variância
DCM	diclorometano
DNA	ácido desoxi ribonucléico
DP	desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC	epicatequina
EGC	epigalocatequina
EGCG	epigalocatequina galato
EM	espectrometria de massa
Eq	equivalente
ERN's	espécies reativas de nitrogênio
ERO's	espécies reativas de oxigênio
FRAP	<i>ferric reducing antioxidant power</i>
GC	galocatequina
GCG	galocatequina galato
IP	índice de pureza
IRMS	<i>isotope ratio mass spectroscopy</i>
MeOH	metanol
MTBE	metil-terc-butil-éter
PC	perfil cromatográfico (<i>fingerprint</i>)
PD	padrão
p.ex.	por exemplo
pH	potencial hidrogeniônico
R	rendimento
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
SNC	sistema nervoso central
TeoB	teobromina
TeoF	teofilina
TFA	ácido trifluoracético
t _G	tempo do gradiente
t _R	tempo de retenção
TPTZ	tri-piridil triazina
UV	ultravioleta
var	variedade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Informações botânicas sobre a família Sapindaceae.....	17
1.2 Características e aspectos morfológicos do gênero <i>Paullinia</i>	18
1.3 Informações botânicas sobre <i>Paullinia cupana</i>	18
1.4 Distribuição geográfica de <i>P. cupana</i>	19
1.5 Constituintes químicos do guaraná e suas propriedades.....	20
1.6 Atividades farmacológicas do guaraná.....	25
1.7 Beneficiamento tradicional.....	26
1.8 Controle de qualidade e certificação de origem.....	27
OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
PARTE EXPERIMENTAL.....	33
3.1 Materiais.....	33
3.1.1 Solventes.....	33
3.1.2 Equipamentos.....	33
3.2 Métodos empregados.....	34
3.2.1 Obtenção das amostras.....	34
3.2.2 Otimização da preparação dos extratos.....	35
3.2.3 Otimização do método de preparo da amostra.....	36
3.2.3.1 Remoção parcial da cafeína.....	37
3.2.3.2 Extração seqüencial.....	38
3.2.4 Desenvolvimento do método de análise por CLAE.....	39
3.2.5 Preparação da amostra para análise do perfil cromatográfico e quantificação de cafeína nas amostras.....	40
3.2.6 Método de análise de perfis cromatográficos de guaraná e quantificação de cafeína nas amostras.....	40
3.2.7 Identificação dos principais metabólitos por CLAE.....	40
3.2.8 Avaliação da atividade antioxidante.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45

4.1 Preparação dos extratos.....	45
4.2 Estudos para remoção de cafeína pós-extração.....	48
4.3 Desenvolvimento de método de análise por CLAE.....	52
4.3.1 Modo isocrático.....	52
4.3.2 Modo gradiente.....	54
4.4 Descrição dos principais metabólitos por CLAE.....	61
4.5 Obtenção dos cromatogramas das amostras.....	73
4.5.1 Fração metanólica.....	73
4.5.2 Fração diclorometano.....	80
4.6 Determinação do teor de cafeína por CLAE nas amostras.....	88
4.7 Avaliação da atividade antioxidante.....	91
4.7.1 Quantificação de fenólicos totais.....	91
4.7.2 Teste da capacidade redutora de ferro – FRAP.....	93
4.7.3 Determinação da atividade antioxidante pelo seqüestro de radicais livres DPPH.....	95
CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

INTRODUÇÃO

O guaraná, *Paullinia cupana*, é um dos produtos típicos amazônicos mais conhecidos no Brasil e no exterior e muito apreciado por suas qualidades energéticas e gastronômicas. É conhecido desde a época pré-colombiana, quando era explorado por diversas tribos indígenas, entre as quais os Maués e Andirá, no Baixo Amazonas e os Barés no Alto Rio Negro. Os silvícolas descobriram os efeitos medicinais e estimulantes do produto, passando a usá-lo sob a forma de bebida, sendo o hábito posteriormente absorvido pelos colonos que viviam nas proximidades dos agrupamentos indígenas (PINTO, 2003).

É nativo da região Amazônica, cultivado pelos índios desde os tempos remotos, porém hoje é cultivado em outras regiões tanto do país como do exterior (LORENZI, 2002). A forma cultivada é geralmente referida como *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke e cresce nos solos ácidos amazônicos de terra firme (Fig. 1).



(a)



(b)

Fig. 1 – Arbusto (a) e frutos (b) de *P. cupana* var. *sorbilis* – Fonte: Embrapa, 2002.

O uso da planta pelos índios amazônicos é bem anterior à descoberta do Brasil. Utilizam suas sementes secas e tostadas em mistura com água até formar uma pasta, para preparar alimentos, bebidas e remédios (LORENZI, 2002). Os índios que cultivavam o guaraná, atribuíam-lhe propriedades estimulantes e o mesmo era tido como um fortificante especial, gozando também da fama de “elixir de longa vida” (MARVALHAS, 1965).

No século 19, Alexander von Humboldt e Alfred Wallace conheceram o guaraná em suas viagens pela Amazônia. Ambos mencionaram as propriedades terapêuticas da bebida,

incluindo a cura de certas febres, alívio de problemas cardíacos, tratamento de diarreia, dores de cabeça e redução do estresse originado pelas altas temperaturas nos trópicos (ERICKSON *et al.*, 1984). Atualmente é utilizado na medicina tradicional, principalmente como estimulante, adstringente e para tratamento de diarreias crônicas. A maneira mais tradicional de apresentação do guaraná para consumo é na forma de bastão, para ser ralado na língua do pirarucu (peixe nativo da Amazônia), transformado em pó e misturado à água.

A partir de 1921, com o lançamento em nível nacional do Guaraná Champagne, pela Companhia Antártica, o produto passou a ser conhecido em todo o território nacional sob a forma de refrigerante. Esse fato contribuiu para a diversificação de marcas que se processou no mercado de refrigerantes gasosos com sabor de guaraná desde então (PINTO, 2003).

Atualmente a principal matéria-prima do mercado é a amêndoa descascada, torrada e pulverizada, que é utilizada na produção de xaropes e bebidas; inclusive guaraná solúvel em pó, de cápsulas e cosméticos e de cafeína isolada (Fig. 2).



Fig. 2 – Alguns produtos do guaraná.

O guaraná apresenta grande potencial para os mercados interno e externo. Em 1990, a empresa Antártica foi a primeira a oferecer a bebida comercialmente no mercado externo. Estudos mostram que tem sido crescente a participação relativa do produto, nesses mercados, nas formas de refrigerante e guaraná em pó, enquanto tem decrescido sensivelmente na forma de bastão. Muito embora a produção de xarope tenha sofrido incremento de mais de 70% nas últimas duas décadas, sua participação relativa no mercado tem decrescido se comparado às demais formas anteriormente mencionadas (MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, 1998).

A diversificação dos subprodutos do guaraná tem refletido na expansão da demanda por pó e extrato líquido. Isso se deve ao crescente interesse por parte dos laboratórios, farmácias e lojas de produtos naturais na utilização das metilxantinas (cafeína, teobromina e

teofilina) do guaraná, para a fabricação de produtos diversos, como é o caso de algumas bebidas energizantes que se encontram no mercado (MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, 1998).

Países como o Japão e os Estados Unidos vêm se tornando grandes consumidores da bebida. Nos Estados Unidos, o extrato de guaraná é usado como aromatizante natural em bebidas, como estimulante e como suplemento alimentar na forma de cápsulas que contém de 800-1200 mg de pó de sementes de guaraná (MAGNA *et al*, 2003).

Estima-se a produção atual de ramas (sementes torradas) de guaraná no país em torno de 4.300 toneladas/ano. Também se estima que dessa produção, 70% seja absorvido pelas indústrias de refrigerantes gaseificados, sob a forma de xarope, enquanto que os 30% restantes são comercializados sob a forma de pó, bastão e extrato para consumo interno e para a exportação (MDIC/SUFRAMA, 2003).

O Estado do Amazonas há muito tempo deixou de ser o maior produtor nacional, sendo ultrapassado pela Bahia nos quesitos produção e produtividade, e pelo Mato Grosso em produtividade. A diferença de produtividade se explica na utilização, pelos produtores baianos, de técnicas básicas de cultivo, ainda pouco utilizadas pelos seus pares no Amazonas. Mesmo assim, o cenário atual indica o crescimento sustentado da produção e produtividade de guaraná em sementes no Amazonas, com base na distribuição de clones resistentes a doenças e de alta produtividade pela EMBRAPA-AM. Além disso, a implantação de projetos empresariais de cultivo, que tendem a adotar padrões agrícolas tecnificados, vem contribuindo para o aumento da produção no estado (FGV/ISAE, 2003).

1.1 Informações botânicas sobre a família Sapindaceae

O gênero *Paullinia* é um dos 150 gêneros que compreendem a família Sapindaceae, representados por 2000 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais, raramente em regiões temperadas. São árvores de pequeno a grande porte, lianas lenhosas ou herbáceas, com flores pequenas e frutos com sementes frequentemente ariladas. Dentre os gêneros destacam-se *Paullinia*, *Talisia* e *Nephelium* com espécies conhecidas como guaraná, pitomba e rambotam, respectivamente. Na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no km 23 da estrada Manaus – Itacoatiara (AM-010), a família Sapindaceae está representada por 10 gêneros com cerca de 50 espécies (RIBEIRO, *et al.*, 1999).

1.2 Características e aspectos morfológicos do gênero *Paullinia*

O gênero *Paullinia* compreende cerca de 180 espécies (Fig. 3), todas lianas neotropicais com exceção da *P. pinnata* que também ocorre nos trópicos africanos. Em investigações realizadas para detectar a presença de alcalóides purínicos em espécies do gênero, apenas três apresentaram ocorrência de metilxantinas sendo: *P. cupana*, *P. yoco* e *P. pachycarpa* (WECKERLE, STUTZ e BAUMANN, 2003).



Paullinia cupana



Paullinia stipularis



Paullinia uloptera



Paullinia stipularis

Fig. 3 – Exemplos de espécies amazônicas do gênero *Paullinia* encontradas na Reserva Ducke (Fonte: RIBEIRO *et al*, 1999).

1.3 Informações botânicas sobre *Paullinia cupana*

O guaraná foi classificado inicialmente pelos botânicos Humboldt e Bonpland, em 1821 e, por ter sido coletado em região venezuelana, onde se chamava “cupana”, foi designado *Paullinia cupana*. Alguns anos mais tarde, von Martius encontrou a planta no Amazonas, especificamente na região de Maués, e julgando tratar-se de uma variedade distinta, identificou-a como *Paullinia sorbilis*. Havia, evidentemente, uma distinção entre o guaraná encontrado no Rio Negro e Orinoco (Venezuela) e o do Baixo Amazonas (ALMEIDA, 1953).

Finalmente essa questão foi devidamente esclarecida pelo ilustre botânico Adolpho Ducke, que concluiu tratar-se de duas variedades geográficas perfeitamente distintas: guaraná do Rio Negro e Orinoco – *Paullinia cupana* H.B.K. *typica* e guaraná de Maués ou Baixo Amazonas – *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. As duas variedades apresentam características distintas como tamanho e coloração dos frutos e presença ou não de gavinhas (CORRÊA, 1984).

O guaraná *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, é um arbusto trepador da família Sapindaceae, de crescimento vigoroso podendo seus ramos atingir até 10 m de altura. O caule, regularmente constituído, pode conservar-se em pé, sem apoio. Os galhos são quinqüeangulares. As folhas são alternas, compostas de cinco folíolos, dos quais quatro são opostos dois a dois, ficando o quinto na extremidade da folha (Fig. 1). Os folíolos são quase ovais, as brácteas são pequenas e caducas. Os pedúnculos das flores partem das axilas das folhas, dotadas de gavinhas. As flores são pequenas, compostas de cinco sépalas, quatro pétalas brancas e desiguais (Fig. 3). Os frutos são pequenos, em forma de pequenas cápsulas pontudas, com três lojas, contendo cada uma a semente coberta por espessa película branca (arilo). O fruto, quando maduro, tem coloração vermelha ou alaranjada. As sementes esféricas, de cor castanha escuro, apresentam-se em duas ou três partes (Fig.1) (ALMEIDA, 1953).

1.4 Distribuição geográfica de *P. cupana*

O guaraná da variedade *sorbilis* é originário da bacia Amazônica, de uma área antigamente denominada Mundurucânia, antiga província do Pará, entre os rios Tapajós, Amazonas e Madeira. A variedade *typica* é originária da região do rio Orinoco na Venezuela e segundo Monteiro (1965), encontra-se guaraná também na Colômbia, porém de variedade diferente.

O habitat preferencial da variedade *sorbilis* é a região de Maués, estendendo-se até Barreirinha, margens dos rios Andirá, Maués-Açú e Paraná do Ramos (Fig. 4). É onde se desenvolve com mais espontaneidade e em caráter silvestre (MONTEIRO, 1965).



Fig. 4 – Região de ocorrência natural do guaraná.

1.5 Constituintes químicos do guaraná e suas propriedades

A análise fitoquímica das sementes registrou a presença de pequena quantidade de óleo formado por constituintes voláteis e fixos, 30% de amido, 15% de proteína, 12% de taninos e até 5,8% de cafeína acompanhada de pequenas quantidades de teofilina e teobromina. Além de resina, também foram encontrados ácido málico, saponinas, catequina, epicatequina e alantoína. (LORENZI, 2002).

Trabalhos realizados entre 1920 e 1950 relatam a presença das metilxantinas cafeína, teobromina e teofilina em várias partes da planta (MARAVALHAS, 1965). No passado, o princípio ativo do guaraná foi denominado, por Martius, de guaranina, mas atualmente, sabe-se que se trata de uma forma impura de cafeína ou de um complexo da mesma com taninos ou fenóis (EDWARDS *et al*, 2005).

As metilxantinas são consideradas alcalóides purínicos (Fig. 5), derivados de bases púricas livres (hipoxantina, adenina e guanina), possuem caráter anfótero, podendo assim se comportar como ácidos ou bases. São solúveis em água e soluções ácidas a quente e etanol a quente, solventes organoclorados e soluções alcalinas. Ocorrem em famílias não

filogeneticamente relacionadas, porém com distribuição restrita, principalmente as regiões tropicais e subtropicais (SIMÕES *et al*, 2004).

Aproximadamente 60 espécies vegetais contem metilxantinas e estão distribuídas especialmente nos gêneros *Coffea* (Rubiaceae), *Cola* e *Theobroma* (Sterculiaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Illex* (Aquifoliaceae) e *Camellia* (Theaceae) (Simões *et al*, 2004). As metilxantinas são constituintes químicos importantes de várias bebidas alimentícias ou estimulantes não alcoólicas como: café, chá-da-índia, guaraná, chocolate e cola, consumidas em todo o mundo, sejam como preparações caseiras ou produtos industrializados, com grande importância econômica e cultural (SIMÕES *et al*, 2004).

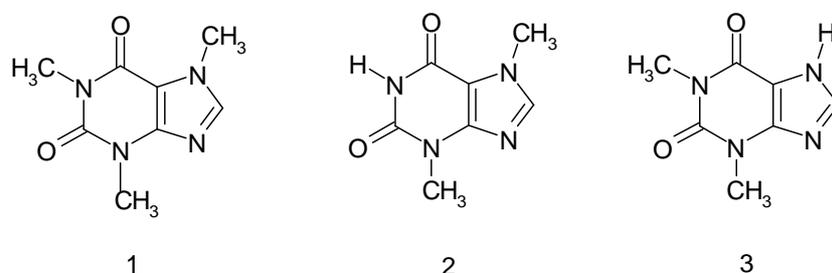


Fig. 5 – Estruturas químicas das metilxantinas (1) cafeína, (2) teobromina e (3) teofilina.

Estão associados às metilxantinas, efeitos estimulante sobre o sistema nervoso central e cardiovascular, além de atuarem como relaxante da musculatura lisa dos brônquios e diurético (DEWICK, 2001). Mais recentemente, Lima *et al* (2005) atribuíram às metilxantinas do guaraná, efeitos sobre o metabolismo lipídico de ratos e inibidor do apetite.

Contudo, segundo Benowitz (apud MATTEI *et al*, 1998), o conteúdo de xantinas do guaraná por si só não explica toda a sua ação terapêutica. Mattei *et al* (1998) postulam que parte dos efeitos revitalizantes do guaraná devem-se à presença de saponinas e altas concentrações de taninos, substâncias de comprovada ação antioxidante.

Em 1990, Marx investigou o conteúdo de taninos e saponinas em sementes de guaraná baseado em estudos de caracterização química das sementes de guaraná feitos por Angelucci *et al.*, em 1978. O conteúdo de taninos determinado foi de aproximadamente 9%, pertencendo predominantemente ao grupo das procianidinas.

Os taninos são compostos fenólicos que têm a capacidade de se combinarem com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos, provocando a sensação de

adstringência, que nada mais é que a perda do efeito de lubrificação da saliva por precipitação das proteínas (ALLEN apud CABRITA et al, 2003). Essas substâncias são particularmente importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias bem como para suas atividades farmacológicas (SIMÕES *et al*, 2004).

Os taninos podem ser classificados em hidrolisáveis e não hidrolisáveis (ou condensados). Os primeiros resultam da ligação de um açúcar, geralmente a glicose, cujos grupos hidroxilas estão esterificados com um composto fenólico, principalmente o ácido gálico ou o ácido elágico (galotaninos e elagitaninos). Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela condensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (também conhecidos com procianidinas) e não são facilmente hidrolisáveis (Fig. 6).

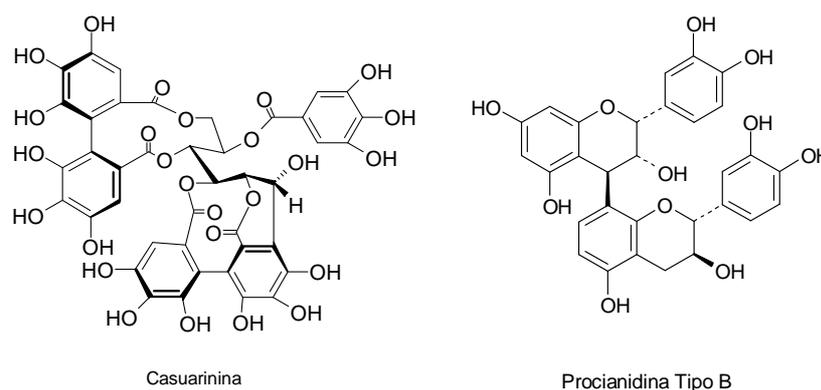


Fig. 6 – Exemplos de taninos gálico (casuarinina) e condensado (procianidina B).

De acordo com Simões (2004), as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais e comuns aos dois grupos de taninos: 1) complexação com íons metálicos, 2) atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e 3) habilidade de se complexar com outras moléculas tais como proteínas e polissacarídeos.

De acordo com análises de Marx (1990), catequina e epicatequina correspondem a aproximadamente 80% do conteúdo de taninos totais das sementes de guaraná. Em 2003, em seus estudos com o guaraná, Ushirobira isolou e identificou as substâncias: cafeína, catequina, epicatequina e procianidinas B2, B3 e B4 em subfrações de extrato de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke.

Catequinas são flavanóis e possuem um esqueleto básico comum C6-C3-C6. O anel A é derivado da via do acetato, enquanto o anel B é derivado da via do chiquimato. As catequinas podem formar oligômeros, os taninos condensados (ex. trímero de epicatequina), os quais contribuem para a adstringência de alimentos e bebidas (DEWICK, 2001).

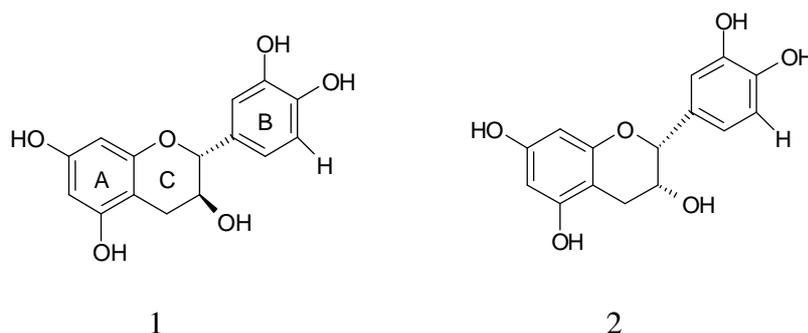


Fig. 7 - Estruturas químicas de catequina (1) e epicatequina (2).

As principais catequinas que podem ser encontradas no cacau, chá verde, chá preto, guaraná e frutas (uvas, ameixas, maçã, pêra e kiwi) são: catequina, epicatequina, epigalocatequina, epigalocatequina galato, galocatequina e epicatequina galato (OSAKABE *et al*, 2000; WANG, HELLIWELL e YOU, 2000; MARX, 1990; DIMITRIOS, 2006).

É crescente a comprovação de que alguns compostos fenólicos são particularmente benéficos, atuando como antioxidantes e protetores contra doenças cardiovasculares, câncer e degeneração celular (DEWICK, 2001). Antioxidantes são compostos que inibem ou atrasam a oxidação de outras moléculas pela inibição da iniciação ou propagação das reações oxidativas em cadeia.

As frutas e os vegetais são as principais fontes naturais de antioxidantes, principalmente pelo acúmulo de compostos fenólicos (DIMITRIOS, 2006). Recentemente foi demonstrada a relação entre o teor de compostos fenólicos antioxidantes em extratos aquosos de chá preto, chá verde e chá Rooibos (*Aspalathus linearis*) e a atividade antioxidante dessas espécies (DIMITRIOS, 2006).

Em seus estudos de correlação entre a capacidade antioxidante e o teor de polifenólicos Seeram *et al* (2006) atribuíram às catequinas (principalmente a epigalocatequina galato) os efeitos antioxidantes do chá verde.

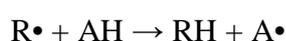
Os processos oxidativos em sistemas biológicos, das quais participam as chamadas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO's e ERN's), são reações essenciais para o

fornecimento de energia, desintoxicação, sinalização química e processos imunológicos. Essas reações são continuamente produzidas e devidamente controladas por enzimas endógenas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase). Entretanto quando ocorre uma super produção dessas espécies oxidativas (processo de estresse), uma exposição aos agentes oxidantes externos ou então uma falha nos mecanismos de defesa; podem ocorrer danos a biomoléculas como DNA, lipídeos e proteínas (ARUOMA apud DIMITRIOS, 2006). Esse processo oxidativo pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas tais como câncer e aquelas que envolvem os sistemas cardio- e cerebrovascular.

O consumo de frutas e vegetais contendo substâncias antioxidantes tem demonstrado ação protetora contra essas doenças, uma vez que antioxidantes naturais podem aumentar as defesas celulares e ajudar na prevenção dos danos oxidativos de componentes celulares (HALLIWELL apud WONG, LEONG e KOH, 2005).

Existem duas classes de antioxidantes, os sintéticos e os naturais (VELIOGLU *et al*, 1998). Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (BAILEY apud RAMALHO e JORGE, 2005).

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação de radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a seguinte reação em cadeia:



Onde: $R\bullet$ - radicais livres; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e $A\bullet$ - radical inerte.

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres $R\bullet$ com maior facilidade, por exemplo, que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Este radical, quando estabilizado (por efeito de ressonância por exemplo), não tem mais a capacidade de iniciar ou propagar reações oxidativas (SIMIC apud RAMALHO e JORGE, 2005). Os principais antioxidantes naturais desta classe são os tocoferóis e ácidos fenólicos.

Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. O ácido ascórbico, seus derivados e isômeros são os melhores exemplos desse grupo.

Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glicose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Essas enzimas são capazes de remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema biológico.

Os agentes quelantes/sequestrantes atuam complexando íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. O produto natural mais comum é o ácido cítrico.

1.6 Atividades farmacológicas do guaraná

Os estudos científicos com o guaraná foram iniciados por volta de 1940 por pesquisadores franceses e alemães cujos achados confirmaram as indicações preconizadas pelos indígenas. Ensaio farmacológicos pré-clínicos demonstraram como principal propriedade a ação estimulante sobre o sistema nervoso central (SNC), acompanhada de atividade relaxante dos brônquios e músculos (LORENZI, 2002). A presença de alcalóides purínicos como a cafeína, teobromina e teofilina, derivados metilados da xantina, justificam estas propriedades estimulantes. Essa classe de alcalóides inibe competitivamente a enzima fosfodiesterase, pelo bloqueio de receptores adenosina, resultando num aumento do AMP cíclico e subsequente liberação de adrenalina. Essa ação leva à estimulação do SNC, relaxamento da musculatura lisa dos brônquios e indução da diurese (DEWICK, 2001).

Extratos de guaraná demonstraram também atividade antiagregante plaquetária e claro efeito antioxidante pelo método de inibição espontânea do processo de lipoperoxidação *in vitro* de homogenatos de cérebro de ratos e pela capacidade de sequestrar radicais DPPH (MORS, RIZZINI e PEREIRA, 2000; MATTEI *et al*, 1998; MAJHENIC, SKERGET e KNEZ, 2007).

Segundo Espínola *et al* (1997), é possível que os efeitos terapêuticos adaptogênico e resistogênico atribuídos ao guaraná, sejam devido a uma ação não específica no organismo, possivelmente relacionada as saponinas, substâncias presentes em plantas como o ginseng (*Panax ginseng*), capaz de neutralizar os efeitos deletérios de metabólitos tóxicos no organismo e melhorar a resistência do mesmo.

Ainda em seus estudos farmacológicos, Espínola *et al* (1997) demonstraram os efeitos positivos do guaraná no desempenho físico e mental de ratos em doses 16,2 vezes menor do que a quantidade de cafeína usada como referência (0,1 mg/mL). Esses resultados

mostram que os efeitos estimulantes do guaraná devem-se, provavelmente também, à presença de outras substâncias tais como taninos e saponinas.

Também foram observados para os extratos de guaraná, atividade antimicrobiana (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris*) antifúngica (*Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* e *Penicillium cyclopium*) e efeito protetor contra danos induzidos ao DNA de hepatócitos de ratos (BASILE *et al.*, 2005; MAJHENIC, SKERGET e KNEZ, 2007; FUKUMASU *et al.*, 2006).

1.7 Beneficiamento tradicional

Segundo a Sra. Raimunda Paiva, produtora de guaraná em Maués, quanto mais cedo o guaraná for processado melhor será a qualidade do mesmo, atribuída a um guaraná de coloração mais clara. A colheita se realiza de outubro a janeiro quando os frutos estão maduros. O guaraná colhido é deixado amontoado para amolecer as cascas por três dias, em seguida pisado para despolpar (retirar a casca e arilo). Esse processo pode levar alguns dias o que promove a fermentação das sementes e a produção de um guaraná de coloração mais escura e tradicionalmente menos apreciado.

O guaraná tradicionalmente produzido pelos índios Maués, conhecido pela sua excelente qualidade, é um guaraná colhido e processado imediatamente, ou seja, não sofre o processo de fermentação, e origina um produto de coloração clara. A coloração do guaraná também pode variar de acordo com o grau de torrefação das sementes.

Após o despolpamento o guaraná é lavado e em seguida, as sementes vão ao forno de barro (Fig. 8) onde são torradas, com acréscimo de água, até que os casquilhos comecem a se quebrar. Em seguida, as sementes torradas são colocadas em sacos, batidas para separar os casquilhos e trituradas em moinhos ou em pilões de madeira (informação verbal).

O guaraná, devido ao alto teor de taninos, assim como é o caso de outros alimentos ricos em compostos fenólicos, apresenta sabor amargo e tendência a sofrer oxidação natural pela ação direta do oxigênio molecular com fenóis ou catalisada por enzimas na presença de oxigênio. Este processo natural é desejável em alguns casos, originando produtos de coloração marrom (chocolate e café), porém indesejável em outros casos afetando o sabor e o valor nutricional de frutas e verduras (FENNEMA apud BARRETO e RIBEIRO, 2003).



Fig. 8 – Método tradicional de secagem, torrefação do guaraná – Fonte: Paulo Câmara.

1.8 Controle de Qualidade e Certificação de Origem

A legislação brasileira (Decreto nº. 2.314/97) regulamenta que as bebidas com guaraná deverão conter no mínimo 0,02% por cento da semente de guaraná (gênero *Paullinia*), ou seu equivalente em extrato na composição. Entretanto, sabe-se que o aroma artificial é usado em muitas formulações sem qualquer adição do produto natural contrariando a legislação nacional.

A facilidade de adulteração decorre devido ao difícil controle de qualidade dos produtos de guaraná que, normalmente, é feito pelo seu principal ativo, a cafeína. Considerando o baixo preço da cafeína sintética, é fácil de entender que é muito simples e barato falsificar produtos de guaraná (MAGNA *et al.*, 2003). Em consequência disso, a maior parte dos trabalhos científicos referentes ao guaraná, concentram-se no desenvolvimento de metodologias de análise e controle de qualidade, especialmente de adulteração por cafeína. Contudo, a distinção entre a cafeína de origem natural e sintética somente é possível pelo emprego de métodos de determinação de abundância de isótopos estáveis, que são sofisticados e caros (WECKERLE, RICHLING e SCHREIER, 2002).

Existem ainda outras formas de adulteração muito comuns. No Estado do Amazonas, existe um grande número de fabricantes de xarope de guaraná e refrigerantes vendidos com o nome de guaraná, porém são preparados pela infusão aquosa da casca (casquilho) do guaraná e não da amêndoa, que não tem valor no mercado de exportação.

Existem ainda adulterações que envolvem a adição de outros produtos como serragem e borra de café. Marx (1990) sugere que para a análise do guaraná é necessário, além do doseamento da cafeína, o doseamento de taninos pela presença de catequina.

Diversos autores têm proposto métodos para análise e controle de qualidade do guaraná, sendo as metodologias propostas por CLAE as mais abrangentes em termos de identificação e quantificação de marcadores químicos. Uma revisão destes métodos pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais métodos de análise e controle de qualidade de guaraná.

Compostos identificados	Método	Referência
Cafeína, teofilina e teobromina	CCD	Maravalhas, 1965
Cafeína, teofilina e teobromina	CCD e gravimétrico	Farm. Bras. 3 ^a ed, 1977
Cafeína e teofilina	CLAE	Belliardo, Martelli & Valle, 1985
Teofilina, teobromina e cafeína	CLAE	Marx, Pfeilsticker & Maia, 1985
Catequina, epicatequina e cafeína	CLAE	Marx, 1990
1,4-dimetilbenzeno, trimetilbenzeno, limoneno, estragol, anetol, carvacrol, cariofileno	Soxhlet e CG/MS	Benoni, Dallakian & Taraz, 1996
Teobromina, teofilina, catequina, cafeína e epicatequina	CLAE	Marx & Fabricius, 1997
Cafeína	CLAE	Silva, Cortesi & Rovellini, 2000
Cafeína natural e sintética	Espectrometria de massa por razão isotópica - IRMS	Weckerle, Richling & Schreier, 2002
Teobromina, teofilina e cafeína	CLAE	Weckerle, Stutz & Baumann, 2003
Catecol	Espectrofotometria UV	Magna <i>et al</i> , 2003
Catequina, epicatequina e cafeína	CLAE	Ushirobira <i>et al</i> , 2004
Cafeína natural e sintética	Espectroscopia Raman	Edwards <i>et al</i> , 2005
Cafeína, teofilina e teobromina	Eletroforese capilar	Sombra <i>et al</i> , 2005

Apesar de já existirem métodos de análise que comprovem a presença e o teor do da cafeína (natural ou sintética) nos produtos de guaraná, não existe ainda um método que

comprove tratar-se de um produto natural sem qualquer outra adulteração e que se possa determinar a sua origem.

Para o Estado do Amazonas, o processo de certificação de origem é de grande interesse, uma vez que produtos de origem amazônica, como é o caso do guaraná, podem ser cultivados em outros estados e comercializados com a menção “produto da Amazônia” a fim de valorizar o seu produto. Esta certificação de um produto amazônico agrega um valor significativo de mercado, especialmente no mercado externo; tanto que empresas tradicionalmente regionais estão cada vez mais buscando mercados fora das fronteiras brasileiras. É o caso da empresa Santa Cláudia, que mudou a logomarca do guaraná Real Champagne, para Real da Amazônia, deixando de ser um produto estritamente consumido na região Norte para ganhar o território nacional e internacional (SUFRAMA HOJE, 2005).

Esse interesse não se restringe apenas à área de alimentos e bebidas. Empresas da área de cosméticos como a *The Body Shop* da Inglaterra, a *Aveda* dos EUA e a *Ives Rocher* da França têm usado cada vez mais matérias-primas da Amazônia em seus produtos (BARATA, 2000). Portanto, estudos que permitam a certificação de origem e controle de qualidade por meio de análises químicas especializadas podem contribuir definitivamente para a agregação de valor aos produtos regionais de guaraná.

Além disso, a busca de propriedades terapêuticas em espécies vegetais com o intuito de valorizar os produtos derivados comercializados é uma prática constante. O guaraná, assim como outras bebidas estimulantes, tem sido usado há anos com esse apelo comercial. O vinho, o café, o chá verde, também são produtos de grande consumo, cujas pesquisas têm sido patrocinadas por empresas na busca de outras propriedades terapêuticas que possam incentivar ainda mais os seus consumos. Sabe-se que muitas vezes o efeito terapêutico das plantas medicinais está baseado em um efeito sinérgico dos seus principais constituintes (YANG *et al*, 2005). Em consequência disso, o controle de qualidade tradicional baseado na quantificação apenas de princípios ativos (p.ex. cafeína no guaraná) isoladamente muitas vezes não é adequado pela facilidade de adulterações.

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) possui papel relevante devido à capacidade de separação e identificação, além de auxiliar na quantificação de substâncias. Principalmente quando associada a outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria de UV, espectrometria de massas e mais recentemente associada à ressonância magnética nuclear, tem-se caracterizado como método principal de análise de extratos vegetais (HOSTETTMANN *et al*, 2003).

O emprego da CLAE pode gerar perfis cromatográficos (PC) que caracterizam os multicomponentes de uma amostra, como uma impressão digital (“fingerprints”). A construção de perfis cromatográficos tornou-se um dos mais poderosos métodos de controle de qualidade de plantas medicinais. Um perfil cromatográfico (“fingerprint”) é, na prática, uma representação gráfica dos constituintes químicos característicos da planta investigada com o intuito de identificar e determinar um padrão dos constituintes químicos observados (GONG *et al*, 2004). O estabelecimento de perfis cromatográficos foi inclusive capaz de identificar diferenças entre plantas de tabaco nativas e transgênicas provando ser uma técnica importante na identificação de alterações no metabolismo, aplicável na avaliação da segurança de alimentos e plantas transgênicas (CHOI *et al.*, 2004).

A figura 9 mostra o perfil cromatográfico do extrato de *Ginkgo biloba* desenvolvido por Nederkassel *et al.*, (2005) para fins de controle de qualidade.

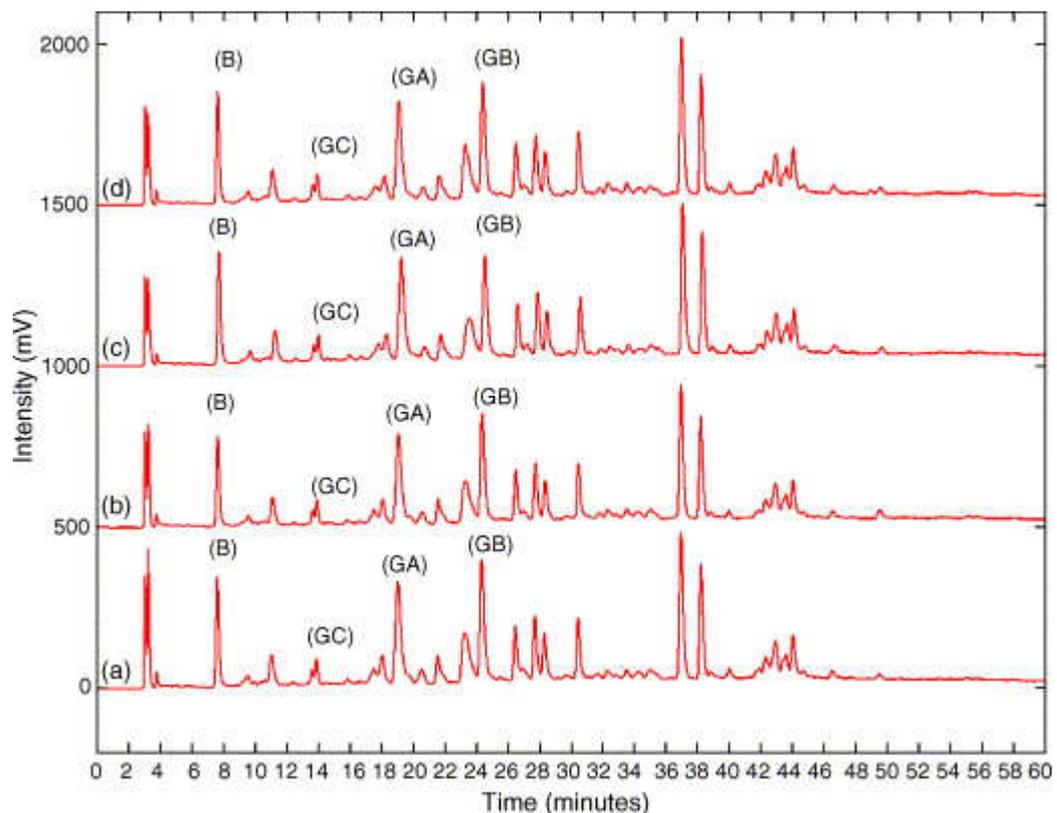


Fig. 9 – Repetibilidade do perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato de *G. biloba* injetado no primeiro dia (a e b) e no dia seguinte (c e d).

Nesse trabalho, os autores desenvolveram um PC para o extrato de *G. biloba* por CLAE-UV e CLAE-ELS e identificaram os principais marcadores, para fins de controle de qualidade de extratos de diferentes procedências.

Utilizando a análise de perfis cromatográficos obtidos por CLAE, Schaneberg *et al.* (2003), foram capazes de identificar diferentes quimiotipos de espécies de *Ephedra* presentes em material vegetal bruto, além de ainda ser capaz de distinguir entre espécies que crescem na América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia (Fig. 10).

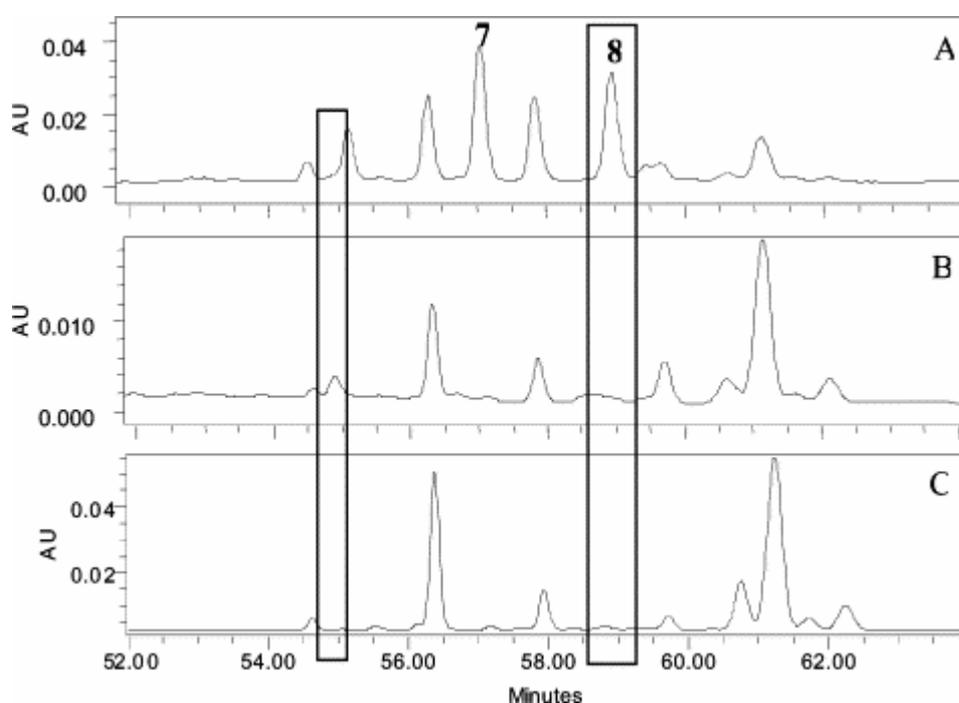


Fig. 10 – Comparação de quimiotipos de *E. sinica* da Eurásia (A), *E. trifurca* da América do Norte (B) e *E. ochreata* da América do Sul (C) por CLAE.

Nesse trabalho, procurou-se empregar a análise de perfis cromatográficos obtidos por CLAE na análise de amostras de guaraná de diferentes procedências para o desenvolvimento de um método de controle de qualidade mais abrangente. Procurou-se ainda avaliar o potencial antioxidante do guaraná frente a outras espécies também consumidas na forma de bebidas, com o intuito de agregar valor a esse importante produto regional.

OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar perfis cromatográficos obtidos de amostras de guaraná de diferentes procedências por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e comparar a atividade antioxidante frente a outras espécies também consumidas como bebidas.

2.2 Específicos

- Estabelecer metodologia de extração;
- Estabelecer metodologia de análise por CLAE;
- Analisar amostras de diferentes procedências por CLAE;
- Descrever os principais metabólitos por CLAE;
- Avaliar a atividade antioxidante de amostras de guaraná;
- Analisar e comparar a atividade antioxidante de guaraná com outras espécies com propriedades estimulantes;

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

3.1.2 Solventes

Todos os solventes usados neste trabalho foram purificados por destilação antes do uso. Os solventes para preparo das amostras analisadas por CLAE foram grau CLAE. Os reagentes usados nos ensaios foram grau analítico. Os padrões usados provenientes da Sigma-Aldrich foram: (+)- catequina hidrato (mínimo 98%), (-)- epicatequina, (-)-epigallocatequina galato de chá verde (mínimo 95%), (-)- epigallocatequina de chá verde (mínimo 98%), (-)-galocatequina galato de chá verde (mínimo 98%), teobromina (mínimo 99%), teofilina anidra (mínimo 99%), ácido gálico e cafeína anidra.

3.1.3 Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu Prominence com detector UV/Vis SPD-M20A do tipo arranjo de fotodiodos e injetor automático SIL-20; bomba LC-10ATVp e misturador de gradiente FCV-10ALVp, degaseificador in line DEG-20A e software de controle (LCSolution, V1.11 SP1);
- Balança Analítica (Ohaus Adventurer AR2140);
- Balança Semi-analítica (Ohaus Adventurer ARC120);
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804R);
- Espectrofotômetro UV/Vis (FEMTO 800 XJ);
- Cubetas para espectrofotômetro UV/Vis de vidro e quartzo;
- Banho de ultrassom (Unique USC 1400);
- pHmetro digital (Digimed DM-20);
- Ultrapurificador de água (Millipore Simplicity 185);
- Chapa aquecedora com agitação (Fisatom 752A e 753A);
- Agitador magnético (Ika modelo Squibbs);
- Rotaevaporador (Fisatom 802);
- Micropipetadores automáticos (Eppendorf P10, P100 e P1000 mL);
- Transferidor Multipette Plus (Eppendorf);

- Unidade filtrante com membrana filtrante de 0,22 μm (Durapore GV Millex);
- Coluna Lichrospher 100 RP 18e (250 x 4,0 mm de 5 μm),
- Coluna Lichrospher 60 RP Select B (250 x 4,0 mm de 5 μm),
- Coluna Lichrospher 100 NH₂ (250 x 4,0 mm de 5 μm);
- Coluna Nucleosil C18 Supelco (250 x 4,6 mm de 5 μm);
- Coluna Shim-pack CLC-ODS Shimadzu (250 x 4,6 mm de 5 μm),
- Vidrarias diversas.

3.2 Métodos empregados

3.2.1 Obtenção das amostras

As amostras de guaraná em pó foram obtidas das áreas de produção de guaraná no Estado do Amazonas (Maués, Urucará, Itacoatiara e Manaus) e de outros estados produtores, como Mato Grosso e Bahia, tendo-se o cuidado de trabalhar com quatro amostras por estado de diferentes fornecedores. Das 20 amostras analisadas, várias foram fornecidas pelo pesquisador Firmino José do Nascimento Filho, da EMBRAPA-AM.

As amostras 10, 11, 13, 14, 16, 17 e 18, fornecidas pela EMBRAPA, são clones recomendados para plantio, desenvolvidos visando o aumento da qualidade (resistência à antracnose) e quantidade da produção estadual. Alguns desses cultivares já foram lançados e outros serão lançados a partir de 2009 pela empresa. As amostras de guaraná fornecidas pela EMBRAPA (Manaus) com exceção da amostra 11 e as amostras provenientes do Mato Grosso não foram beneficiadas pelo modo tradicional e sim tiveram as sementes secas ao sol e trituradas em moinhos.

A Tabela 2 relaciona as amostras analisadas e suas respectivas procedências.

Tabela 2 – Relação de amostras estudadas

Amostra	Descrição	Procedência
10	EMBRAPA	Manaus - AM
11	EMBRAPA	Maués - AM
12	Agrofrut - Cetrú	Urucará - AM
13	EMBRAPA 624 (clone BRS-Andirá)	Manaus - AM
14	EMBRAPA 2259 (clone CMU 613)	Manaus - AM
15	EMBRAPA Matriz UEPAE	Manaus - AM
16	EMBRAPA 2205 (clone BRS-CG 612)	Manaus - AM
17	EMBRAPA 6Q (clone CMU 613)	Manaus - AM
18	EMBRAPA 611 (clone BRS-CG 611)	Manaus - AM
19	Fazenda Santa Maria	Itacoatiara - AM
20	Guarauna	Valença - BA
21	Produtor (71) 8867-7773	Valença - BA
28	Super polpa	Maués - AM
29	Guaranapis	Ituberá - BA
30	Tibiriçá	Cuiabá - MT
31	Guaraná GN	Cuiabá - MT
32	Guaraná Frutyba	Ituberá - BA
33	Caiabi	Alta Floresta - MT
34	Cooperagrepa	Terra Nova do Norte - MT
35	Tabatinga	Tabatinga - AM

3.2.2 Otimização da preparação dos extratos

A partir da amostra de guaraná em pó EMBRAPA (nº 10), foram realizados diversos estudos visando à otimização da preparação dos extratos. Os estudos de extração foram realizados por maceração, Soxhlet e ultrassom (com e sem aquecimento) empregando nove diferentes solventes, visando o melhor rendimento, tempo de extração e quantidade de componentes extraídos. Os solventes testados foram: éter metil-terc-butílico (MTBE), diclorometano (DCM), clorofórmio (CHCl_3), acetona, etanol, metanol, etanol/ H_2O (1:1), água e acetona/ H_2O (7:3). Após a determinação dos rendimentos, todas as amostras foram preparadas em metanol na concentração de 1mg/mL, filtradas em unidade filtrante de 0,22 μm e analisadas por CLAE.

- Extração por Ultrassom sem aquecimento

Foram pesados 10 g de pó de guaraná, adicionados 100 mL de solvente e extraído em ultrassom por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel de filtro pregueado, concentrado em rotaevaporador e seco até peso constante.

- Extração por Ultrassom com aquecimento

Foram pesados 10 g de pó de guaraná, adicionados 100 mL de solvente e extraído em ultrassom por 30 min à uma temperatura 15 graus inferior ao ponto de ebulição do solvente utilizado. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel de filtro pregueado, concentrado em rotaevaporador e seco até peso constante.

- Extração por Maceração

Foram pesados 10 g de pó de guaraná, adicionados 100 mL de solvente e deixado em maceração à temperatura ambiente por 9 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel de filtro pregueado, concentrado em rotaevaporador até securo e seco até peso constante.

- Extração por Soxhlet

10 g de pó de guaraná, adicionados de 300 mL de solvente foram extraídos em Soxhlet por 6 horas. O extrato foi filtrado em papel de filtro pregueado e concentrado em rotaevaporador até securo. A extração com acetona/H₂O (7:3) por Soxhlet não foi testada por não se tratar de uma mistura azeotrópica.

3.2.3 Otimização do método de preparo de amostra

Para a análise de perfis cromatográficos de extratos vegetais por CLAE (“fingerprints”) é necessário desenvolver a melhor separação possível dos seus multicomponentes, onde se prioriza a resolução e detectibilidade, em detrimento do tempo de separação (velocidade de análise). Consequentemente, a preparação da amostra deve considerar tais fatores.

No caso das análises de extratos de guaraná, observou-se que a presença do componente majoritário (caféina) limitava as análises dos PC. Decidiu-se então por avaliar diferentes formas de tratamento dos extratos obtidos de forma a remover seletivamente a caféina e aumentar a concentração relativa dos demais componentes presentes no guaraná nas amostras testadas. Foram avaliados os métodos de recristalização, solubilização fracionada, partição líquido-líquido e tratamento com Na₂CO₃.

Devido às propriedades da cafeína avaliou-se a remoção da mesma partindo-se de um extrato bruto de guaraná obtido por ultrassom em acetona/H₂O (7:3) obtido com bom rendimento.

3.2.3.1 Remoção parcial da cafeína

▪ Recristalização

Pesou-se 2 gramas de extrato de guaraná obtido por ultrassom em acetona/H₂O (7:3) e acrescentou-se 20 mL dos seguintes solventes: água, metanol, etanol, água e acetona. Em seguida adicionou-se gradativamente 4,5 mL de acetona, 7 mL de água, 5 mL de água, 10 mL de metanol e 5,5 mL de água respectivamente até se obter solubilização completa do extrato com aquecimento e uso do ultrassom quando necessário. Os extratos solubilizados foram deixados em repouso sob refrigeração para recristalização. Após recristalização as amostras foram filtradas sob vácuo, o filtrado recolhido e o resíduo lavado com o solvente gelado. Em seguida, o resíduo foi lavado várias vezes com clorofórmio e a fração recolhida para avaliação do rendimento após secagem.

▪ Solubilização fracionada

A solubilização fracionada foi testada com dois solventes, DCM e CHCl₃ no intuito de solubilizar seletivamente a cafeína do extrato. A 1 g de extrato de guaraná foi acrescentado 8 mL de solvente e o extrato solubilizado em ultrassom.

▪ Partição líquido-líquido

O método de partição foi testado com quatro combinações de solventes. A 0,1 g de extrato de guaraná e adicionou-se 2 mL do solvente 1 em tubo de ensaio. Após vigorosa agitação e solubilização do extrato adicionou-se 2 mL do solvente 2 conforme tabela 3.

Tabela 3 – Proporções de misturas binárias testadas na partição líquido-líquido.

amostra (g)	solvente 1 (2 mL)	solvente 2 (2 mL)
0,1004	MeOH/H ₂ O (7:3)	CHCl ₃
0,1007	MeOH/H ₂ O (1:1)	CHCl ₃
0,1000	MeOH/H ₂ O (7:3)	DCM
0,1006	MeOH/H ₂ O (1:1)	DCM

As fases formadas foram separadas, concentradas até secura e os rendimentos avaliados após secagem.

▪ Tratamento com Na₂CO₃

A 1 g de extrato de guaraná obtido por ultrassom com acetona/H₂O (7:3) foram adicionados 0,6 g de Na₂CO₃ e 10 mL de água destilada. O extrato foi homogeneizado em ultrassom e em seguida levado a secura em banho-maria. Em seguida a amostra foi extraída por 1 hora sob refluxo com 50 mL de DCM. Após filtragem a fração DCM foi reservada e o resíduo diluído em MeOH/TFA (1:1) na concentração de 1 mg/mL, pH ajustado para 3,0 e analisado por CLAE.

A mesma metodologia foi testada com a amostra de guaraná em pó, sendo que após a extração com DCM o resíduo foi extraído por ultrassom com aquecimento durante 120 min com acetona/H₂O (7:3).

3.2.3.2 Extração seqüencial

A extração seqüencial da amostra n°. 10 foi testada com os solventes MTBE, DCM e CHCl₃ usados para a primeira extração. Foram testados os métodos de extração por soxhlet, ultrassom e maceração nas mesmas condições já descritas anteriormente (item 3.2.2). Após a primeira extração, o extrato foi separado e o rendimento avaliado após secagem. Na segunda extração foi usado EtOH/H₂O (1:1) como solvente. Igualmente o extrato obtido foi separado e o rendimento avaliado após secagem. As frações lipofílicas e hidrofílicas foram avaliadas por CLAE.

Devido aos resultados obtidos, o método de extração seqüencial por ultrassom com aquecimento foi o mais otimizado. As amostras n° 10 e 11 foram pesadas diretamente em eppendorf, acrescentados 1,5 mL do primeiro solvente e extraídas em ultrassom com

aquecimento. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, o extrato obtido removido e o segundo solvente adicionado e as amostras novamente extraídas em ultrassom com aquecimento. As frações foram filtradas em unidade filtrante Millipore e analisadas por CLAE. Um resumo das condições testadas é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições de extração sequencial por ultrassom com aquecimento.

Amostra	Peso (g)	Solvente 1	Tempo de extração (min)	Temp (°C)	Solvente 2	Tempo de extração (min)	Temp (°C)
10.1	0,1	DCM	60	25	Acetona/H ₂ O (7:3)	60	41
10.2	0,1	DCM	120	25	Acetona/H ₂ O (7:3)	120	41
10.3	0,1	DCM	60+60	25	Acetona/H ₂ O (7:3)	60+60	41
11.4	0,1	DCM	60	25	MeOH/TFA (1:1)	60	50
11.5	0,1	DCM	60	25	MeOH/H ₂ O (1:1)	60	50
11.6	0,1	DCM	60	25	MeOH/H ₂ O (7:3)	60	50
11.7	0,05	DCM	120	25	MeOH/TFA (1:1)	60	50
11.8	0,05	DCM	120	25	MeOH/TFA (7:3)	60	50
11.9	0,05	DCM	30	25	MeOH/TFA (1:1)	30	50
11.10	0,05	DCM	15	25	MeOH/TFA (1:1)	15	50
11.11	0,05	DCM	30	25	MeOH/TFA (1:1)	15	50
11.12	0,05	DCM	120	25	MeOH/TFA (1:1)	30	50
10.4	0,05	DCM	120	25	MeOH/TFA (1:1)	30	50
10.5	0,05	DCM	60	40	MeOH/TFA (1:1)	30	65
10.6	0,05	CHCl ₃	60	62	MeOH/TFA (1:1)	30	65

3.2.4 Desenvolvimento do método de análise por CLAE

Todos os extratos obtidos foram analisados por CLAE. As condições de análise (preparo de amostra, eluição e detecção) foram definidas visando à obtenção dos perfis cromatográficos de forma a possibilitar a melhor separação possível e menor tempo de análise. As análises foram realizadas à temperatura ambiente e as condições de detecção foram otimizadas para obtenção do melhor sinal analítico.

Todas as amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL e filtradas em unidade filtrante Millipore antes de serem injetadas. O desenvolvimento do método cromatográfico para obtenção do “fingerprint” envolveu além dos estudos de preparo da amostra, testes com diversos tipos de colunas, testes em modo isocrático e gradiente, variações na composição da fase móvel e tempo de análise. As colunas testadas foram: Lichrospher 100 RP 18e, Lichrospher 60 RP Select B, Nucleosil C18 Supelco, Shim-pack CLC-ODS Shimadzu e Lichrospher 100 NH₂, todas empacotadas com partículas esféricas e porosas de 5 µm em colunas de 250 x 4 mm (comprimento x diâmetro interno).

3.2.5 Preparação da amostra para análise do perfil cromatográfico e quantificação de cafeína nas amostras

As amostras empregadas nas análises de perfis cromatográficos foram obtidas da seguinte forma:

À 50 mg de amostra pesada em tubos Eppendorf, adicionou-se 1,5 mL de DCM e extraiu-se em ultrassom por 60 min à 40°C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 20.000 rcf por 1 h. O sobrenadante (fração DCM) foi cuidadosamente retirado, filtrado em unidade filtrante Millipore, injetado em CLAE (20 µL) e analisado pelo método de análise de perfis cromatográficos. O resíduo foi deixado secar à temperatura ambiente, em seguida, acrescentou-se 1,5 mL de MeOH/TFA (0,05%), e extraiu-se em ultrassom por 30 min à 65°C. Em seguida, o extrato MeOH/TFA foi centrifugado, filtrado e injetado em CLAE (20 µL) pelo método de análise de PC.

3.2.6 Método de análise de perfis cromatográficos de guaraná e quantificação de cafeína nas amostras

Após os testes iniciais com diversas colunas e solventes o método de análise foi otimizado empregando-se coluna Nucleosil C18 Supelco (5 µm), 250 x 4,6 mm, fluxo 1 mL/min, volume de injeção 20 µL, amostra diluída em MeOH/TFA (1:1) e eluente MeOH/TFA (0,05 %) em modo gradiente da seguinte forma: 0-5 min MeOH/TFA 7:93, 7-25 min MeOH/TFA 15:85, 27-47 min MeOH/TFA 18:82, 48-60 min MeOH/TFA 22:78, 62-90 min MeOH/TFA 26:74 (método de análise) e de 92-102 min retornando a condição inicial MeOH/TFA 7:93 (recondicionamento da coluna), faixa de detecção 190-400 nm.

3.2.7 Identificação dos principais metabólitos por CLAE

A identificação dos principais metabólitos no perfil cromatográfico do guaraná foi adotado o método de padronização externa pela adição de padrões em concentrações conhecidas ao extrato de guaraná. Os marcadores químicos estudados foram, além das metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), flavonóides e outros polifenólicos, como catequina (C), epicatequina (EC), galocatequina (GC), galocatequina galato (GCG), epigalocatequina (EGC), epigalocatequina galato (EGCG) e ácido gálico (AG). Esses

polifenólicos foram selecionados por terem sido anteriormente identificados em outras espécies vegetais consumidas também como bebidas estimulantes.

Inicialmente os padrões foram preparados na concentração de 1 mg/mL em MeOH e injetados isoladamente no método de análise de perfis cromatográficos. Foram injetados diferentes volumes (20, 5 e 1 μ L) em diferentes dias a fim de se estabelecer uma média nos tempos de retenção (t_R) e também avaliar a concentração de amostra ideal para se obter um melhor fator de resposta (área do pico/concentração do padrão). A fim de se obter uma clara resposta na coeluição com padrões, multiplicou-se a área observada para o pico em questão por dois e chegou-se a provável concentração do padrão a ser coinjectada no método.

A mistura de padrões foi preparada adicionando-se quantidades exatas das soluções mãe (1mg/mL) e o volume completado para 1000 μ L com solução de MeOH/TFA 0,05% (1:1). A preparação da mistura de padrões foi realizada conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5 – Concentração dos padrões na mistura de padrões.

Padrão	C (ug/mL)
ácido gálico (AG)	20
galocatequina (GC)	10
teobromina (TeoB)	10
teofilina (TeoF)	10
catequina C	200
epigalocatequina (EGC)	20
epicatequina (EC)	200
epigalocatequina galato (EGCG)	200
galocatequina galato (GCG)	50

A solução de padrões assim preparada, foi analisada por CLAE no mesmo método de análise de PC a fim de se verificar o efeito de matriz (fenômeno de variação da eluição de um determinado componente, isto é variação do t_R , de uma substância pura ou da mesma substância numa mistura, devido às interações intermoleculares).

Finalmente, para a identificação dos picos no cromatograma da amostra foram efetuadas várias coinjeções da amostra e da mistura de padrões e em alguns casos da amostra com o padrão isoladamente a fim de identificar no cromatograma da fração hidrofílica da amostra o provável pico correspondente a cada padrão.

3.2.8 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do guaraná foi determinada por diferentes ensaios juntamente com outras espécies vegetais usadas como bebidas e com atividade estimulante para fins de comparação. As espécies analisadas foram: chá preto (*Camellia sinensis*), chá verde (*Camellia sinensis*), erva mate (*Illex paraguayensis*), café (*Coffea arabica*) e cevada (*Hordeum vulgare*). No caso do guaraná, foram testadas duas amostras fornecidas pela EMBRAPA-AM, uma seca ao sol (nº 10) e a outra pelo método tradicional, ou seja, sementes torradas em fornos de barro (nº 11). As amostras foram preparadas pelo método da infusão em água fervente por 10 min na concentração de 10 mg de pó em 1 mL de água. Em seguida, foram filtradas em funil de Büchner e centrifugadas. Outra porção do extrato aquoso assim obtido foi levada ao rotaevaporador, o resíduo transferido e levado à secura para determinação do teor de extrativos. Em todos os ensaios, a catequina foi empregada como substância controle.

- **Quantificação de fenólicos totais**

Este ensaio baseia-se na quantificação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Velioglu *et al.*, 1998). As amostras foram preparadas por infusão (10 min) com água Mili-Q nas concentrações iniciais de 10 mg de pó em 1 mL de água, centrifugadas e filtradas em papel. Para cada amostra foram realizadas diluições em água a partir da solução-mãe, a fim de se obter valores de absorbância dentro da curva de calibração previamente elaborada.

À 0,2 mL da solução da amostra adicionou-se 1,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes). Após 5 min, adicionou-se 1,5 mL de solução de bicarbonato de sódio (60 g/L) e deixou-se incubar por 90 min. O branco foi preparado adicionando-se 0,2 mL de água Mili-Q a 1,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes) e 1,5 mL de solução de bicarbonato de sódio (60 g/L). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 725 nm em cubeta de vidro.

A curva de calibração foi preparada utilizando-se como padrão o ácido gálico diluído em metanol. Partindo-se de uma solução mãe a 1 mg/mL, foram preparadas por diluição, utilizando pipetador automático, soluções de 0,40; 0,30; 0,20; 0,10 e 0,05 mg/mL para obtenção da curva, seguindo o procedimento normal para a realização do teste. O procedimento foi realizado em duplicata.

O resultado obtido pela extrapolação na curva de calibração foi expresso em equivalentes de ácido gálico em mg/g de amostra.

- **Teste da capacidade redutora de ferro – FRAP**

O ensaio denominado FRAP (“ferric reducing antioxidant power”) vem sendo empregado para comparar o poder antioxidante de diferentes amostras com o teor de compostos fenólicos em diversos estudos com extratos vegetais aquosos (Tsai *et al.*, 2002; Wong, Leong e Koh, 2005). O método baseia-se na redução dos íons Fe^{3+} para Fe^{2+} , em pHs baixos, na presença de tripiridil-triazina (TPTZ), cuja formação de complexo com Fe^{2+} (coloração azul), causa uma alteração na absorção em 593 nm (Benzie e Strain, 1996).

Soluções aquosas de Fe^{2+} nas concentrações de 125 – 2000 $\mu\text{mol/L}$ ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – Sigma) foram usadas para calibração. O reagente FRAP foi preparado fresco misturando-se 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de solução de cloreto férrico 20 mM em 25 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,25 M (pH 3,5).

A avaliação das amostras efetuou-se da seguinte forma: a 0,1 mL da amostra adicionou-se 0,3 mL de água Mili-Q e 3 mL do reagente FRAP. Após 4 min de incubação à temperatura ambiente mediu-se a absorbância em 593 nm em cubeta de vidro. O branco foi obtido com água no lugar da amostra. As amostras foram preparadas no dia do ensaio por infusão (10 min) nas concentrações iniciais de 10 mg de pó em 1 mL de água e posteriormente diluídas em água a fim de se obter resultados dentro da curva de calibração previamente realizada.

- **Determinação da atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres DPPH**

Esse ensaio mede a capacidade de sequestro de radicais livres com o reagente radicalar 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). A forma radicalar é estável e de coloração roxa e ao ser reduzida à sua forma não radicalar muda para a coloração amarela (Braca *et al.*, 2002 e Choi *et al.*, 2004).

O ensaio fotométrico com DPPH é baseado na determinação da concentração de uma amostra capaz de seqüestrar 50% de radicais livres de uma solução de DPPH. As amostras foram preparadas a partir dos extratos aquosos secos diluídos em etanol em diferentes concentrações.

À 2,5 mL de cada amostra foram adicionados 1 mL de solução de DPPH a 0,2 mg/mL (recém preparado em etanol) e após incubação por 30 min, ao abrigo da luz, mediu-se a absorbância em 518 nm em cubeta de vidro. O branco foi preparado adicionando-se 1 mL de etanol a 2,5 mL da amostra e o controle adicionando-se 1 mL da solução de DPPH a 2,5 mL de solvente (EtOH). Como padrão de referência usou-se a catequina. Foram preparadas diferentes concentrações da cada amostra. As absorbâncias medidas foram então expressas em porcentagem de capacidade de sequestro (CS) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ CS} = 100 - [(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) \times 100 / Abs_{\text{controle}}]$$

Depois de calculadas as porcentagens de capacidade de sequestro, plotou-se gráfico de % de CS pela concentração da cada amostra e obteve-se a regressão linear dos pontos. A partir da equação da reta obtida calculou-se a CS_{50} (quantidade de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais livres de DPPH), extrapolando-se o valor da concentração para % CS igual a 50.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação dos extratos

Os resultados de teor de extrativos são apresentados no Gráfico 1. Os melhores rendimentos de extração foram obtidos com mistura de solventes EtOH/H₂O (1:1) e Acetona/H₂O (7:3) pelas técnicas de ultrassom com aquecimento, maceração e soxhlet. Os solventes lipofílicos (MTBE, diclorometano e clorofórmio), apresentaram os mais baixos rendimentos, em todos os processos testados. Os solventes hidrofílicos (água e acetona) também não tiveram bons resultados.

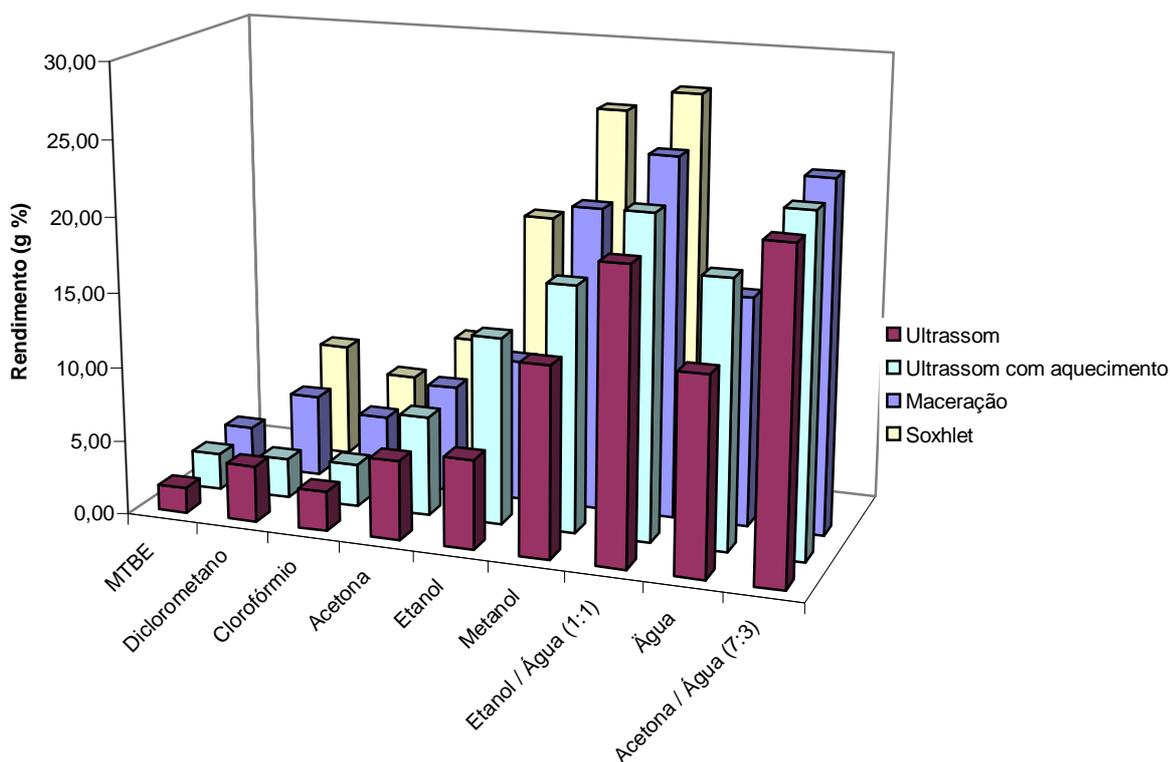
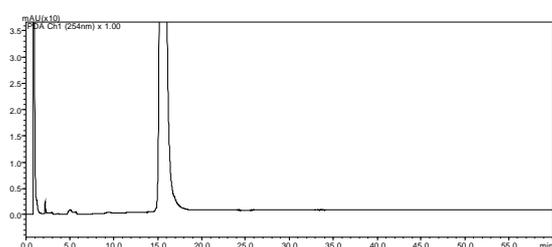


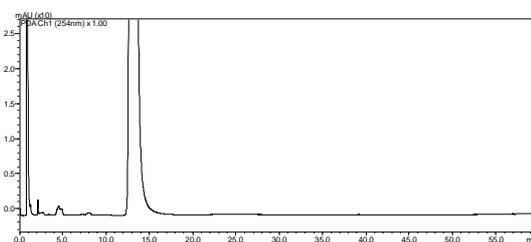
Gráfico 1 – Rendimento das extrações por diferentes métodos em diferentes solventes.

Observou-se ainda que a técnica de extração por Soxhlet foi a mais eficiente para todos os solventes. Contudo essa técnica normalmente não pode ser empregada para uma combinação de solventes.

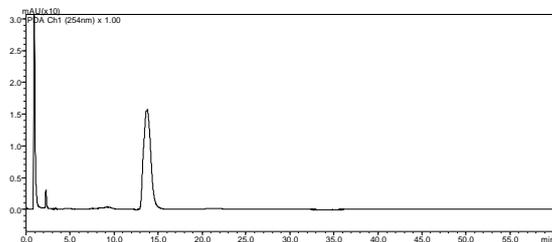
Após a determinação do teor de extrativos, os extratos foram analisados por CLAE, a fim de detectar possíveis diferenças qualitativas de metabólitos extraídos. As condições de análise foram: coluna Lichrospher 100 RP 18e (5 μ m), 250 x 4 mm, fluxo 1 mL/min, fase móvel MeOH/H₂O (20/80), volume de injeção 20 μ L, tempo de análise 60 min, faixa de detecção 190-400 nm, amostra 1 mg/mL em metanol. Como os perfis cromatográficos foram semelhantes para todas as técnicas, são apresentados na Figura 11. os diferentes cromatogramas obtidos apenas por maceração com diversos solventes (R = rendimento).



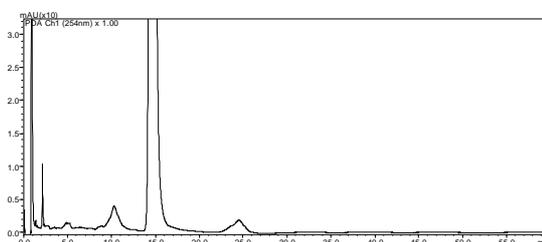
Diclorometano – R = 5,50 %



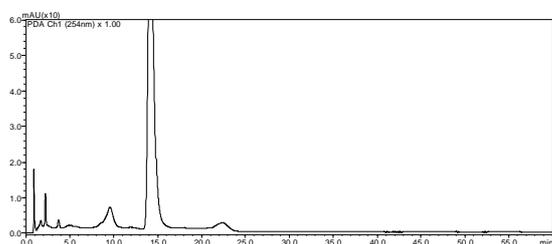
Clorofórmio – R = 4,61 %



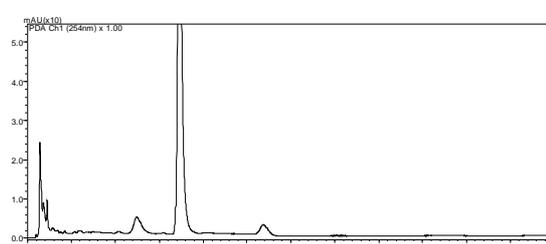
MTBE – R = 2,76 %



Acetona – R = 7,24 %



Metanol – R = 20,28 %



Água – R = 15,32 %

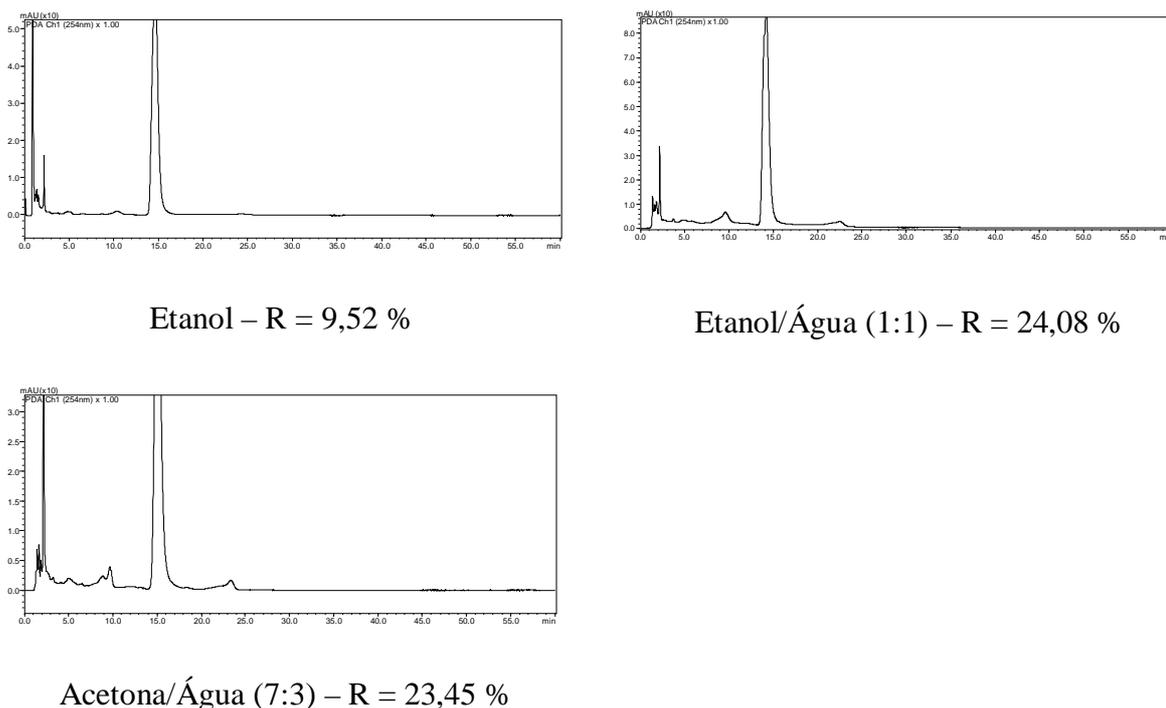


Fig. 11 – Cromatogramas dos extratos obtidos por maceração à frio da amostra 10.

Pela análise dos cromatogramas pode-se notar que os solventes mais lipofílicos como clorofórmio, diclorometano e MTBE se mostraram capazes de extrair praticamente somente a cafeína das amostras com rendimento bastante baixo em termos de extrato total, não sendo viável sua utilização quando se pretende obter um perfil com o maior número de constituintes possível.

Em todos os extratos nota-se presença majoritária da cafeína, em relação aos outros constituintes (análise do percentual das áreas dos picos). Nos extratos obtidos com mistura de solventes, observou-se uma extração de um maior número de constituintes, porém ainda limitada pela presença majoritária de cafeína nos extratos.

Considerando esses resultados e que o objetivo do trabalho foi de analisar os metabólitos produzidos e acumulados em sementes de guaraná, constatou-se que as amostras deveriam sofrer um tratamento que minimizasse a presença majoritária da cafeína, de forma a intensificar a detecção dos demais componentes. Foram avaliados diferentes métodos de tratamento de amostra, pré e pós-extração.

4.2 Estudos para remoção de cafeína pós-extração.

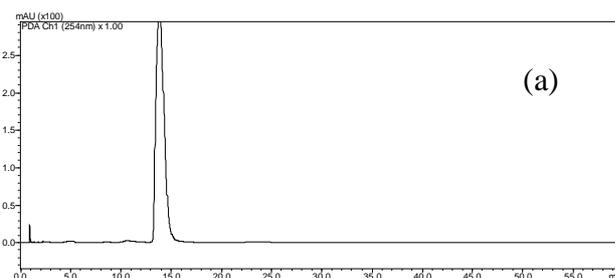
Os estudos para a remoção da cafeína por recristalização foram baseados na facilidade de recristalização da cafeína (MARIA e MOREIRA, 2007), porém, não se mostraram satisfatórios devido à dificuldade de formação de cristais. Em alguns casos houve a formação de um precipitado amorfo, porém de coloração escura indicando a precipitação de outros constituintes além da cafeína. As condições e resultados encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Estudos de recristalização da cafeína

Amostra (g)	Solvente 1 (20 mL)	Solvente 2	Obs
2,0030	H ₂ O	Acetona (4,5 mL)	não formou cristal, pp
2,0017	MeOH	H ₂ O (7 mL)	não formou cristal, pp
2,0030	EtOH	H ₂ O (5 mL)	não formou cristal, pp
2,0026	H ₂ O	MeOH (10 mL)	não formou cristal, pp
2,0000	Acetona	H ₂ O (5,5 mL)	não formou cristal

O procedimento de solubilização fracionada se baseou nos resultados obtidos de extração por solventes lipofílicos (MTBE, DCM e CHCl₃), que indicaram ser seletivos para a cafeína. Contudo, também não se mostrou viável, pois não houve solubilização dos extratos nos solventes testados.

Ainda com base nesses resultados, testou-se a técnica de partição líquido – líquido com os extratos obtidos com rendimentos superiores. A análise cromatográfica das frações obtidas por partição líquido - líquido (Figura 12) mostrou que, como esperado, houve uma intensificação do sinal referente aos demais constituintes (cromatograma b), em detrimento da remoção da cafeína.



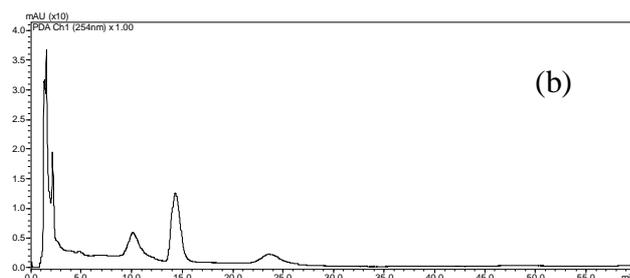


Figura 12 – Cromatogramas das frações (a) lipofílica CHCl_3 e (b) hidrofílica $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3) obtidas por partição de extrato de guaraná obtido por ultrassom com $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1).

Contudo a análise do rendimento das frações (Tabela 7) indicou que a fração lipofílica extraiu não apenas cafeína, pois análises prévias de quantificação de cafeína nessa amostra indicaram um teor de cafeína de 4,68 %.

Tabela 7 – Resultados dos estudos de partição líquido-líquido com a amostra 10 de guaraná.

Amostra (g)	Solvente 1 ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$)	Solvente 2	R fração lipofílica (%)	R fração hidrofílica (%)
0,1004	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3)	CHCl_3	18,92	73,80
0,1007	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)	CHCl_3	12,91	78,45
0,1000	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3)	DCM	13,90	79,50
0,1006	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)	DCM	11,93	85,88

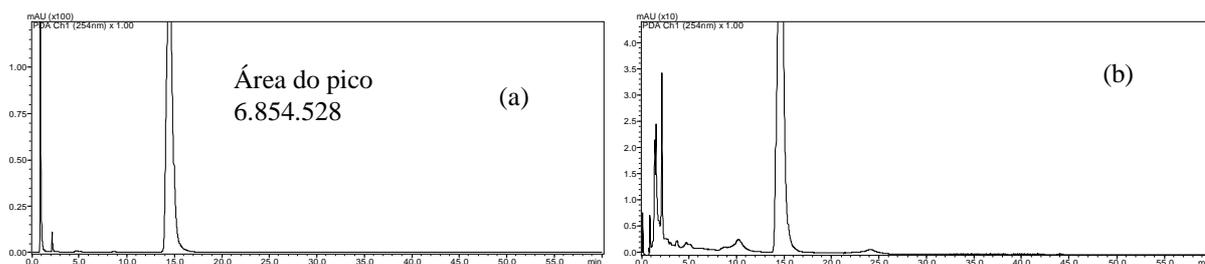
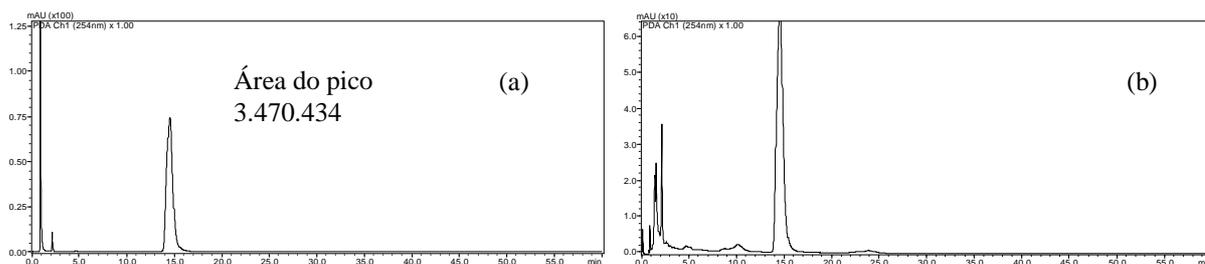
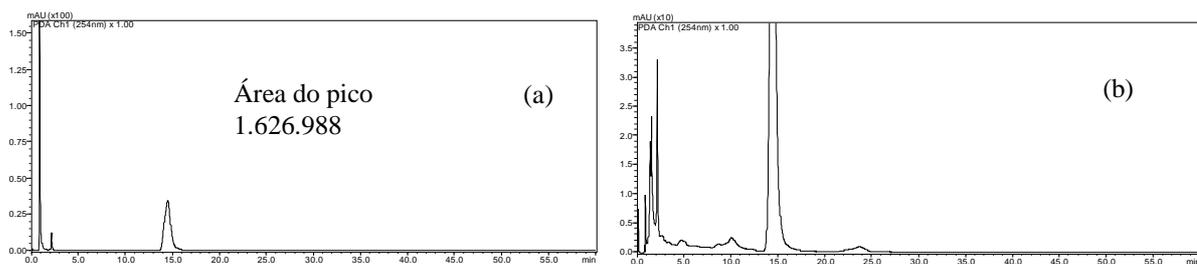
O tratamento de amostras de guaraná para a remoção de cafeína também foi avaliado pelo método de extração seqüencial envolvendo um par de solventes (lipofílico seguido de hidrofílico). Esse tratamento foi baseado nos resultados preliminares de extração, que indicaram que os solventes lipofílicos, especialmente DCM e CHCl_3 , eram bastante seletivos para a cafeína e os hidroalcoólicos, aqueles com maior capacidade de extração.

Os resultados dos teores de extrativos da avaliação do procedimento de extração seqüencial podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8 – Rendimentos de extração seqüencial da amostra 10.

Amostra (g)	Solvente	Soxhlet R (%)	Ultrassom R (%)	Maceração R (%)
10,00	MTBE	4,07	3,90	3,33
	EtOH/H ₂ O (1:1)	24,60	20,71	21,40
10,00	DCM	4,40	2,26	3,10
	EtOH/H ₂ O (1:1)	25,56	20,83	21,07
10,00	CHCl ₃	4,89	3,45	2,02
	EtOH/H ₂ O (1:1)	23,78	23,40	20,54

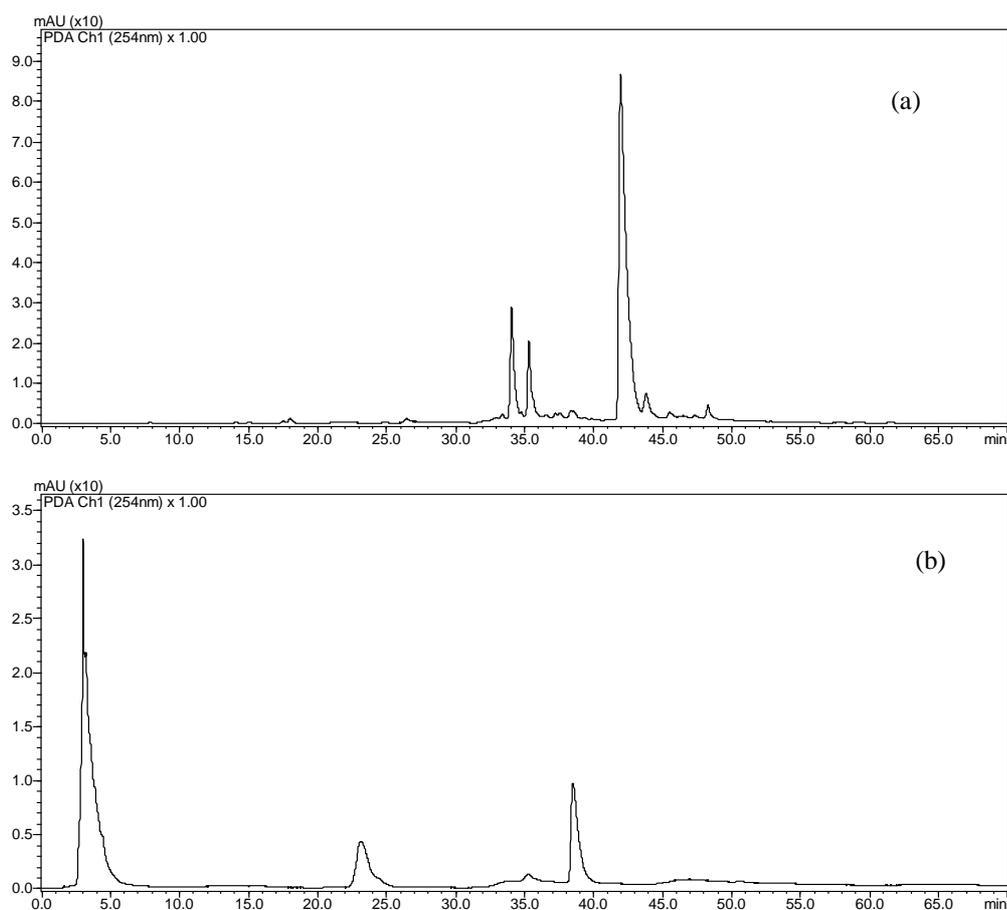
A eficiência do procedimento de extração seqüencial foi avaliada por CLAE. Os solventes lipofílicos, usados para a primeira extração, se mostraram seletivos na remoção da cafeína, pois houve menor remoção dos demais constituintes da amostra se comparados com os outros métodos testados anteriormente (Figuras 13,14 e 15).

Fig. 13 – Extração seqüencial por Soxhlet com (a) CHCl₃ e (b) EtOH/H₂O (1:1) da amostra 10Fig. 14 – Extração seqüencial por Soxhlet com (a) DCM e (b) EtOH/H₂O (1:1) da amostra 10Fig. 15 – Extração seqüencial por Soxhlet com (a) MTBE e (b) EtOH/H₂O (1:1) da amostra 10

Pela análise das áreas do pico da cafeína pode-se concluir que o clorofórmio se mostrou mais eficaz na extração da mesma se comparado com o DCM e MTBE, dados confirmados pelos métodos oficiais recomendados em literatura para extração e doseamento de cafeína (FARMACOPÉIA BRASILEIRA e AOAC).

Devido a esses resultados obtidos, testou-se o uso preliminar do Na_2CO_3 na extração sequencial. Esse procedimento se baseou na propriedade da cafeína em meio básico de se manter na sua forma não protonada e favorecer assim a sua extração em solvente lipofílico (DCM), porém este tratamento mostrou-se capaz de interferir com os outros constituintes da amostra prejudicando a obtenção de um bom perfil cromatográfico.

Os perfis cromatográficos das frações hidrofílicas mostraram picos sem resolução e com capacidade de separação inferior quando comparados ao extrato integral sem tratamento. A comparação pode ser observada na Figura 16.



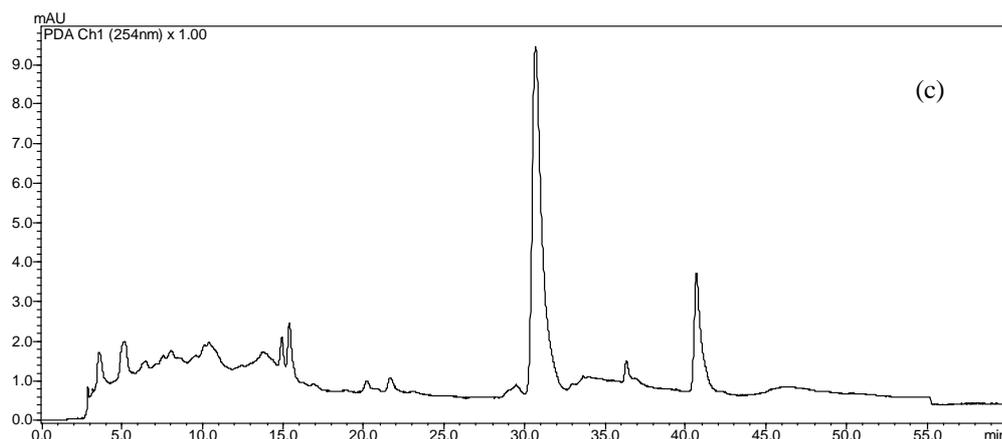


Fig. 16 - Cromatograma do extrato integral obtido por ultrassom com aquecimento (a), cromatograma da fração Acetona/H₂O de extrato integral de guaraná obtido por ultrassom, após tratamento com Na₂CO₃ (b), cromatograma da fração Acetona/H₂O de amostra de guaraná obtida por extração seqüencial tratada com Na₂CO₃ e neutralizada antes da extração (c).

4.3 Desenvolvimento de método de análise por CLAE

A CLAE em fase reversa é normalmente a primeira escolha para a maioria das amostras. É mais conveniente e reprodutível do que outras formas de cromatografia líquida e mais provável de promover separações satisfatórias dos constituintes das amostras (SNYDER, 1997).

O desenvolvimento do método de análise dos perfis cromatográficos por CLAE foi realizado com a fração hidrofílica (EtOH/H₂O) de extrato de guaraná em pó obtido por extração seqüencial em Soxhlet. Foram testados inicialmente o modo isocrático (composição da fase móvel constante) e gradiente (composição da fase móvel variável).

4.3.1 Modo Isocrático

A partir dos cromatogramas mostrados na Figura 11 (preparação dos extratos) pode-se observar que todos os constituintes eluíram da coluna nos primeiros 25 min de análise. Na tentativa de se obter uma melhor separação desses constituintes e baseado nas propriedades da cromatografia em fase reversa onde, o aumento da polaridade da fase móvel promove uma diminuição da força de eluição do solvente, maior retenção dos constituintes na coluna e conseqüentemente uma melhor separação, a proporção da fase móvel foi inicialmente alterada de MeOH/H₂O 20:80 para 10:90. As condições de análise foram: coluna Lichrospher 100, RP

18e (5 μm), 250 x 4 mm, fluxo 1 mL/min., fase móvel MeOH/H₂O (10/90), volume de injeção 20 μL , tempo de análise 60 min, faixa de detecção 190-400 nm, amostra 1mg/mL em metanol. A figura 17 mostra o cromatograma obtido nessa condição.

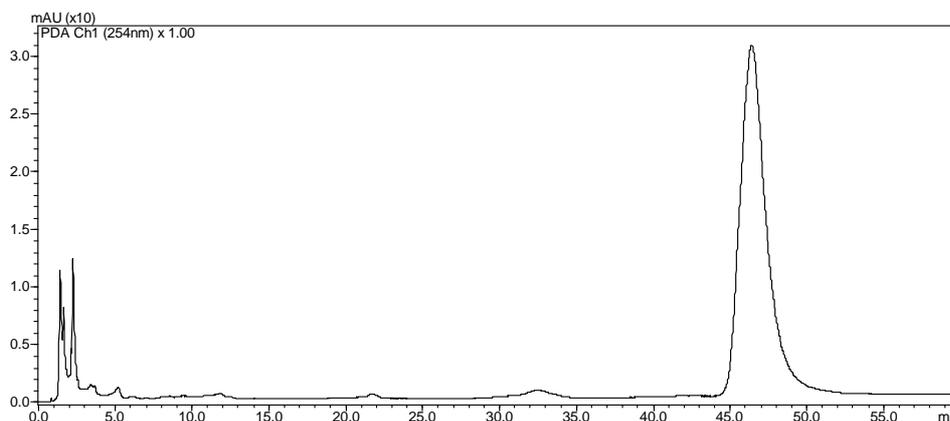


Fig. 17 – Cromatograma da fração hidrofílica do extrato de guaraná obtido por extração seqüencial em Soxhlet – fase móvel MeOH/H₂O (10:90).

A separação em modo isocrático é aconselhável quando a variação do tempo de retenção dos picos eluídos é relativamente pequena. Essa variação pode ser determinada pela seguinte equação:

$$\Delta t_R/t_G \text{ onde : } \Delta t_R = \frac{t_R \text{ do último pico eluído} - t_R \text{ do primeiro pico}}{\text{tempo de análise}}$$

Assim sendo, no caso acima temos: $\Delta t_R/t_G = 46 - 0,85 / 60$

$$\Delta t_R/t_G = 0,75$$

Valores maiores que 0,5 indicam que uma eluição em modo gradiente é recomendável (SNYDER, 1997). Também se pode observar que as substâncias mais polares eluíram praticamente todas juntas sem qualquer separação no início do cromatograma, indicando ser necessário reduzir ainda mais a proporção de metanol na mistura. Todos esses resultados indicaram a necessidade do emprego do modo gradiente.

4.3.2 Modo Gradiente

Os estudos em modo gradiente se iniciaram com as mesmas condições anteriores, alterando-se apenas a fase móvel. De início testou-se a mistura ACN/H₂O nas seguintes condições: 5:95 (0 min) com gradiente linear (15 min) até chegar a 20:80 permanecendo isocrático nessa proporção até 50 min e retornando a condição inicial até o final da corrida (60 min).

A partir daí foram testadas variações no gradiente de ACN/H₂O, com separação parcial dos constituintes (figura 18). Em seguida testou-se o uso da fase aquosa acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) a 0,05% (pH 2). O controle de pH em CLAE favorece com que prevaleçam substâncias em uma das suas formas dissociada ou não dissociada, o que gera picos mais simétricos e melhor separação dos constituintes da amostra (figura 19) (SNYDER, 1997).

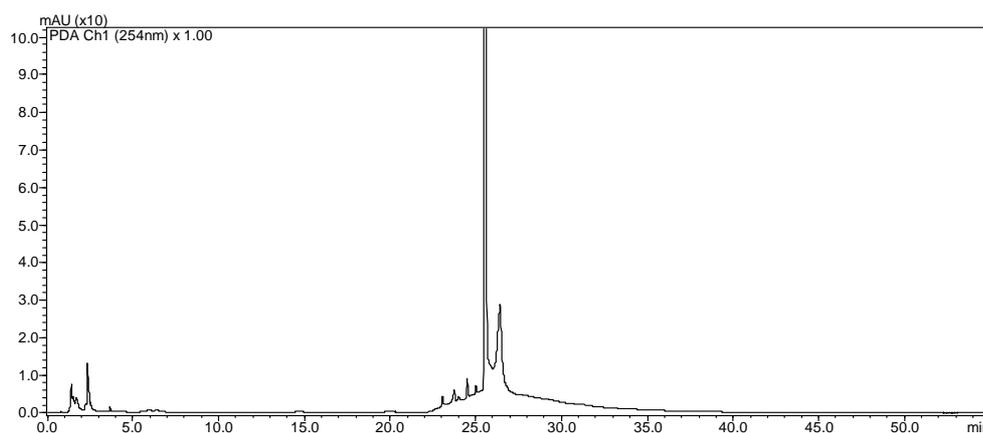


Fig. 18 – Cromatograma da fração EtOH/H₂O da amostra 10 – fase móvel ACN/H₂O nas seguintes condições: 0-15 min (1:99), 20-45 min (25:75), retornando a condição inicial em 50 min permanecendo até o final da corrida (55 min).

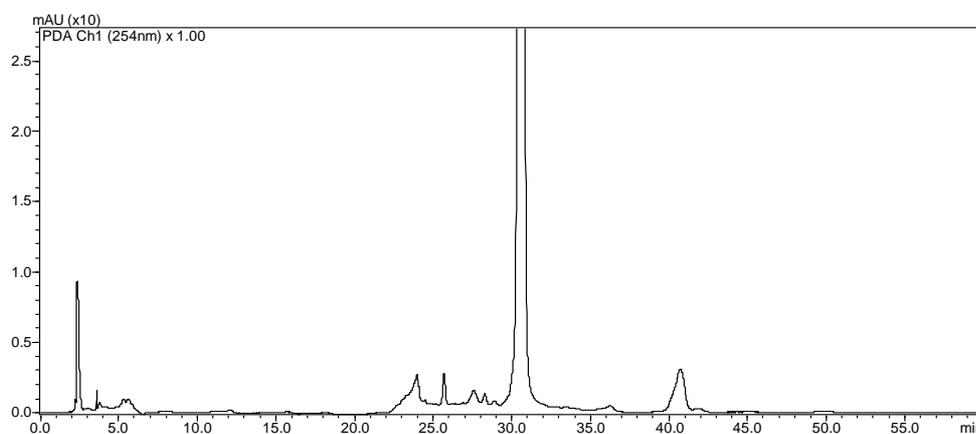
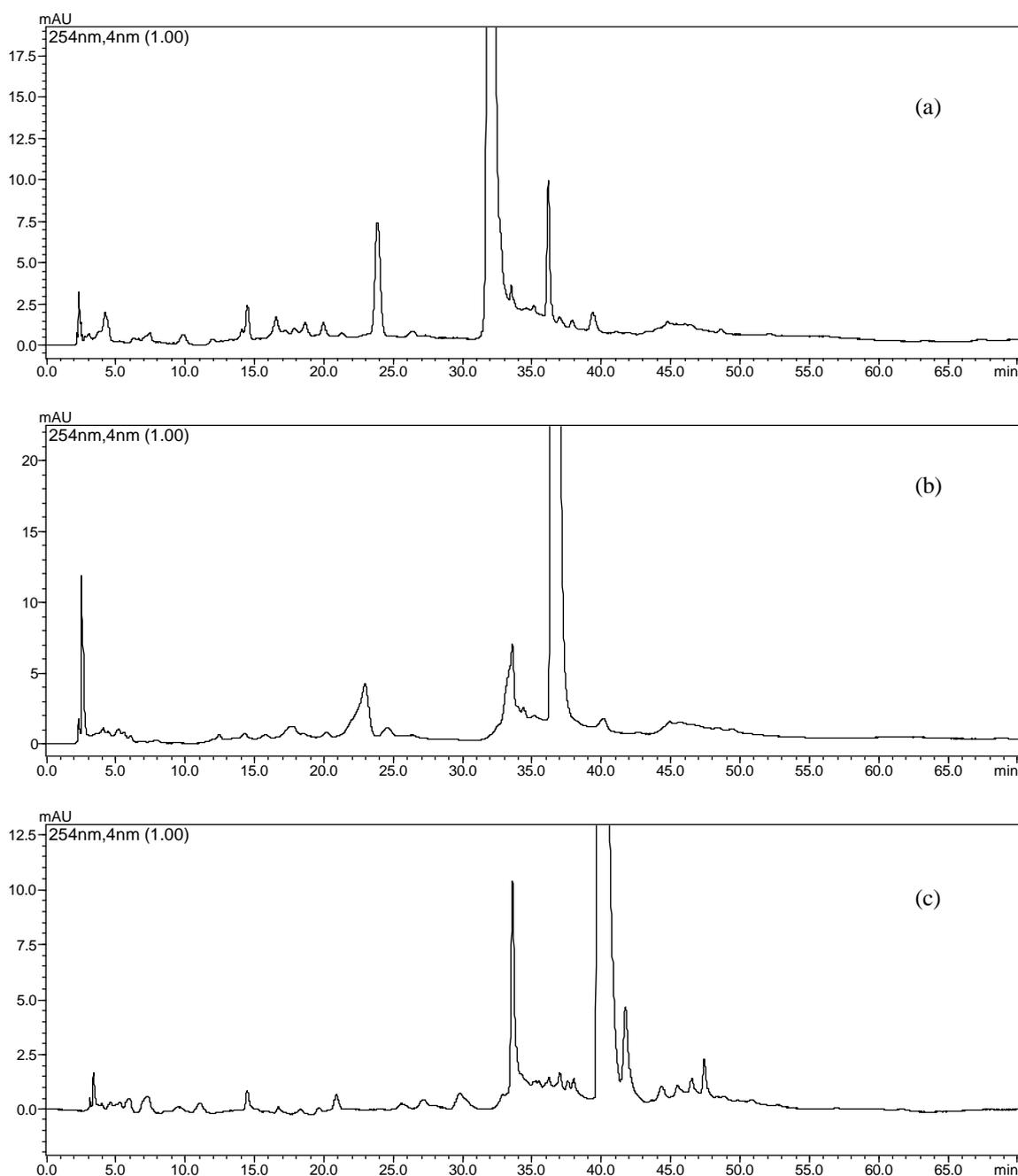


Fig. 19 – Cromatograma da fração EtOH/H₂O da amostra 10 – fase móvel ACN/H₂O (TFA 0,05%) nas seguintes condições: 0-15 min (2:98), 18-57 min (10:90), retornando a condição inicial em 60 min.

Não se observou uma melhor separação para o modo gradiente com uma mistura ACN/H₂O. Procurou-se então testar o uso de gradiente com a fase móvel MeOH/TFA. Essa mistura promoveu uma melhor separação dos constituintes sendo que a programação de gradiente apresentado na figura 20 foi testado em diferentes colunas de fase reversa tipo C-18 com partículas esféricas e porosas: LiChrospher 100 RP 18e, Lichrospher 60 RP – Select B, LiChrospher 100 NH₂, Nucleosil C18 – Supelco e Shim-pack CLC-ODS Shimadzu.



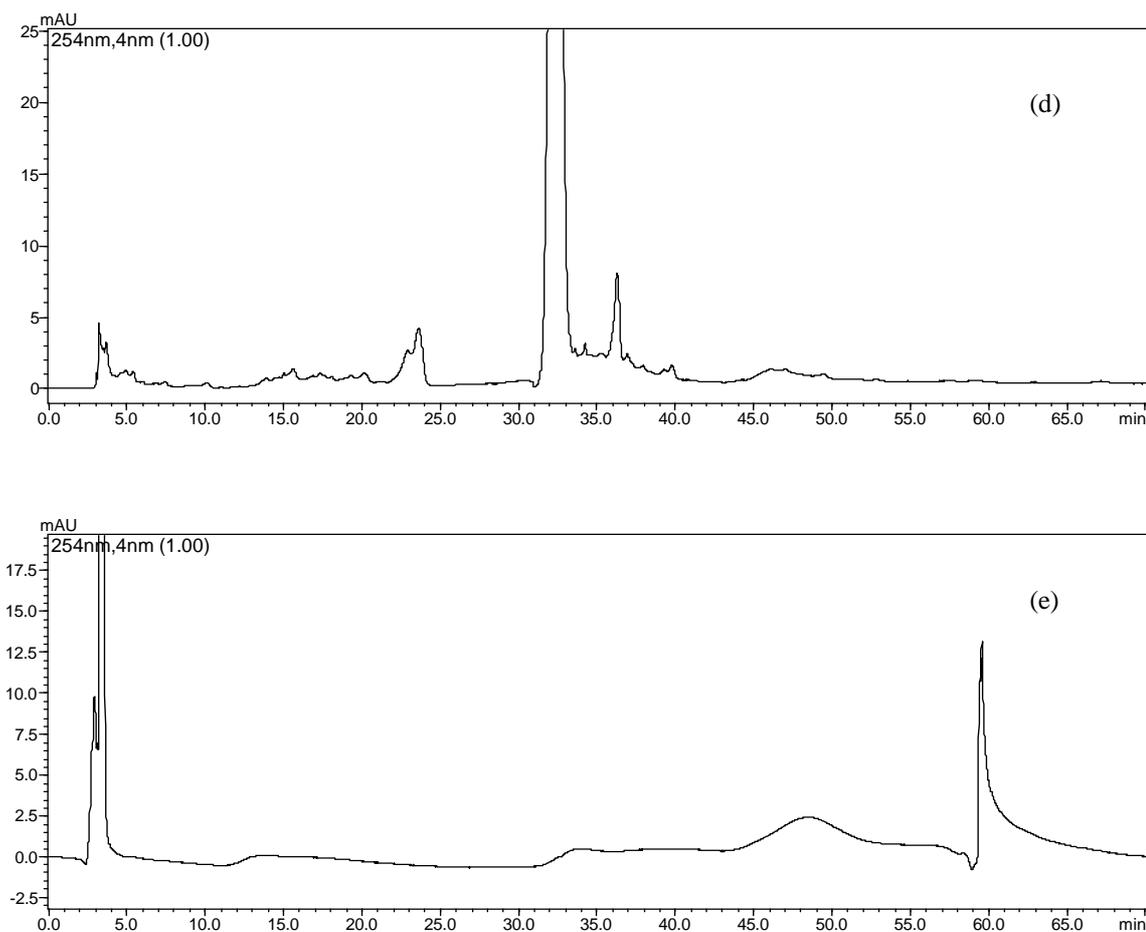


Fig. 20 – Cromatogramas do teste com colunas do tipo C18 – LiChrospher 100 RP 18e (a), LiChrospher 60 RP – Select B (b), Nucleosil C18 (c) Shim-pack CLC-ODS Shimadzu (d) e LiChrospher 100 NH₂ (e) em gradiente MeOH/TFA (0,05%), nas seguintes condições: 0-5 min (7:93), 7-25 min (15:85), 27-37 (27:73), 39-68 (33:67) 70 min retornando a condição inicial, fluxo 1 mL/min.

Essas colunas são empacotadas com fases estacionárias que apresentam entre si pequenas diferenças, mas responsáveis por uma melhor separação (Tabela 9).

Tabela 9 - Características principais das colunas de fase reversa tipo C-18 avaliadas.

Coluna	% de C	Tamanho dos poros (Å)
LiChrospher 100 RP-18e	21	100
LiChrospher 60 RP Select B	12	60
Nucleosil C-18	25	100
CLC-ODS Shimadzu	20	150

C = Cobertura média

Dentre as colunas testadas, aquela que apresentou melhores resultados (resolução, simetria de picos e fator de retenção) foi a coluna Nucleosil C-18, uma coluna do tipo “endcapped”, que elimina os grupos silanóis residuais, responsáveis por uma maior interação de substâncias ionizáveis com a fase estacionária.

Uma vez selecionada a coluna, procurou-se testar o solvente a ser empregado na solubilização da amostra. A solubilização da amostra em solvente com composição próxima a da fase móvel normalmente é a melhor opção como método de preparo da amostra (CIOLA, 1998). A figura 21 mostra claramente um melhor resultado para amostras dissolvidas em MeOH/TFA 0,05% (1:1) do que em metanol (apresentado na figura 19 c) para o mesmo sistema gradiente.

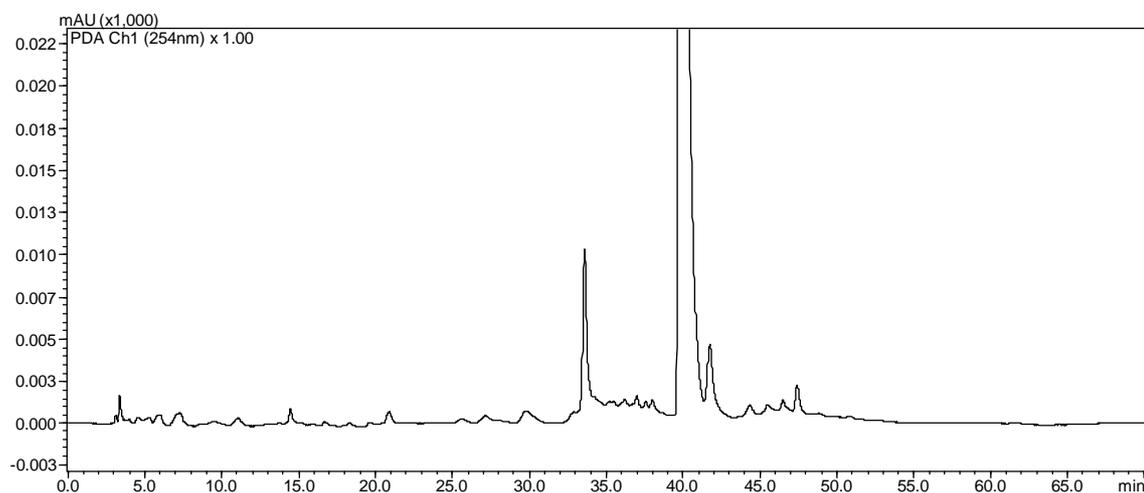


Fig. 21 – Cromatograma da fração EtOH/H₂O da amostra 10 obtido nas mesmas condições da Figura 19. Coluna Nucleosil C-18, amostra 1mg/mL dissolvida em MeOH/TFA 0,05% (1:1).

Considerando os resultados até então obtidos, procurou-se trabalhar na otimização final do método que conciliasse uma melhor resolução, sensibilidade (nível de detecção), reprodutibilidade e tempo de preparo de amostra.

Testou-se por fim a extração seqüencial em ultrassom com uma fase lipofílica e outra hidrofílica MeOH/TFA (1:1). A fase hidrofílica foi preparada diretamente em mistura de solvente igual ao empregado na fase móvel usada no método cromatográfico, o que facilitou também o procedimento de preparação das amostras já que não existe a necessidade de se obter extrato seco. A figura 22 mostra o cromatograma de uma amostra obtido num gradiente: 0-5 min MeOH/TFA (7:93), 7-15 min MeOH/TFA (17:83), 17-22 min MeOH/TFA (25:75),

24-50 min MeOH/TFA (30:70), 52-58 min MeOH/TFA (35:65), 60-70 min MeOH/TFA (7:93).

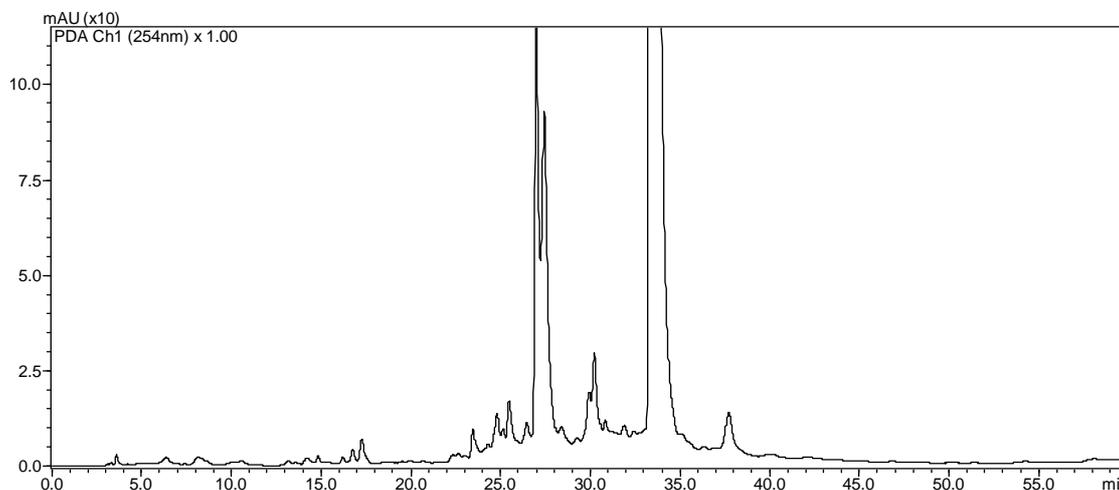


Fig. 22 - Cromatograma da fração MeOH/TFA (1:1) da amostra 11 obtido nas seguintes condições: fase móvel MeOH/TFA (1:1) – 0-5 min (7:93), 7-15 min (17:83), 17-22 min (25:75), 24-50 min (30:70), 52-58 min (35:65) 60-70 min (7:93).

A partir dessa condição, foram testados diversos sistemas com pequenas variações a fim de se obter a melhor separação dos constituintes. A condição final adotada para obtenção do “fingerprint” é mostrada na Figura 23 (a).

A obtenção de um bom perfil cromatográfico para fins de controle de qualidade, requer a visualização do maior número de constituintes (picos) por isso, dentre os solventes testados que se mostraram mais específicos para a remoção da cafeína pode-se concluir, pela análise dos cromatogramas da Figura 24, que a utilização de DCM como primeiro solvente na extração sequencial promoveu a extração mais seletiva da cafeína e menor extração de outros constituintes, apenas 6 picos, de interesse para obtenção do fingerprint. A amostra extraída primeiro com clorofórmio detectou 26 picos, comprometendo, portanto, a análise dos mesmos na outra fração de análise do perfil cromatográfico.

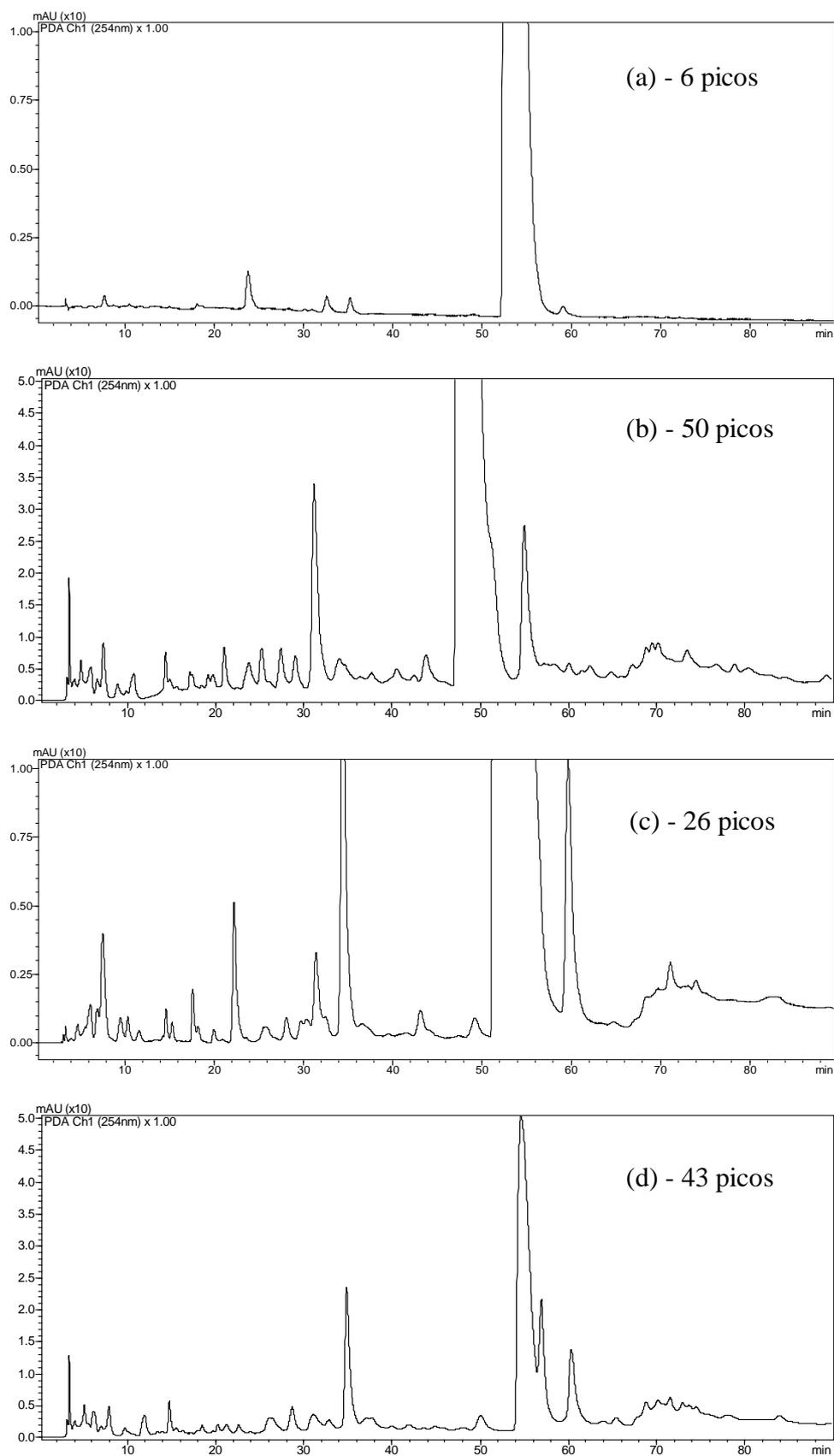


Fig. 24 – Extração sequencial com aquecimento com (a) DCM, (b) MeOH/TFA, (c) CHCl_3 e (d) MeOH/TFA.

O método final adotado para análise de todas as amostras foi obtido em coluna Nucleosil C18 (5 μ m) Supelco (250 x 4.6 mm) em gradiente binário solução aquosa de TFA (0,05%) e metanol: 0-5 min MeOH/TFA (7:93), 7-25 min MeOH/TFA (15:85), 27-47 min MeOH/TFA (18:82), 48-60 min MeOH/TFA (22:78), 62-90 MeOH/TFA (26:74) (método de análise) e de 92-102 min retornando a condição inicial MeOH/TFA (7:93) (recondicionamento da coluna), fluxo 1 mL/min. O volume de injeção adotado foi de 20 μ L e os cromatogramas obtidos entre 200 e 400 nm (figura 23).

Dois critérios foram adotados para a escolha do comprimento de onda adequado: número de picos detectados e fator de assimetria dos picos. O cromatograma em 3D demonstra que a maioria dos constituintes teve maior absorção entre 200 e 300 nm e de 15 a 80 min (figura 23 b).

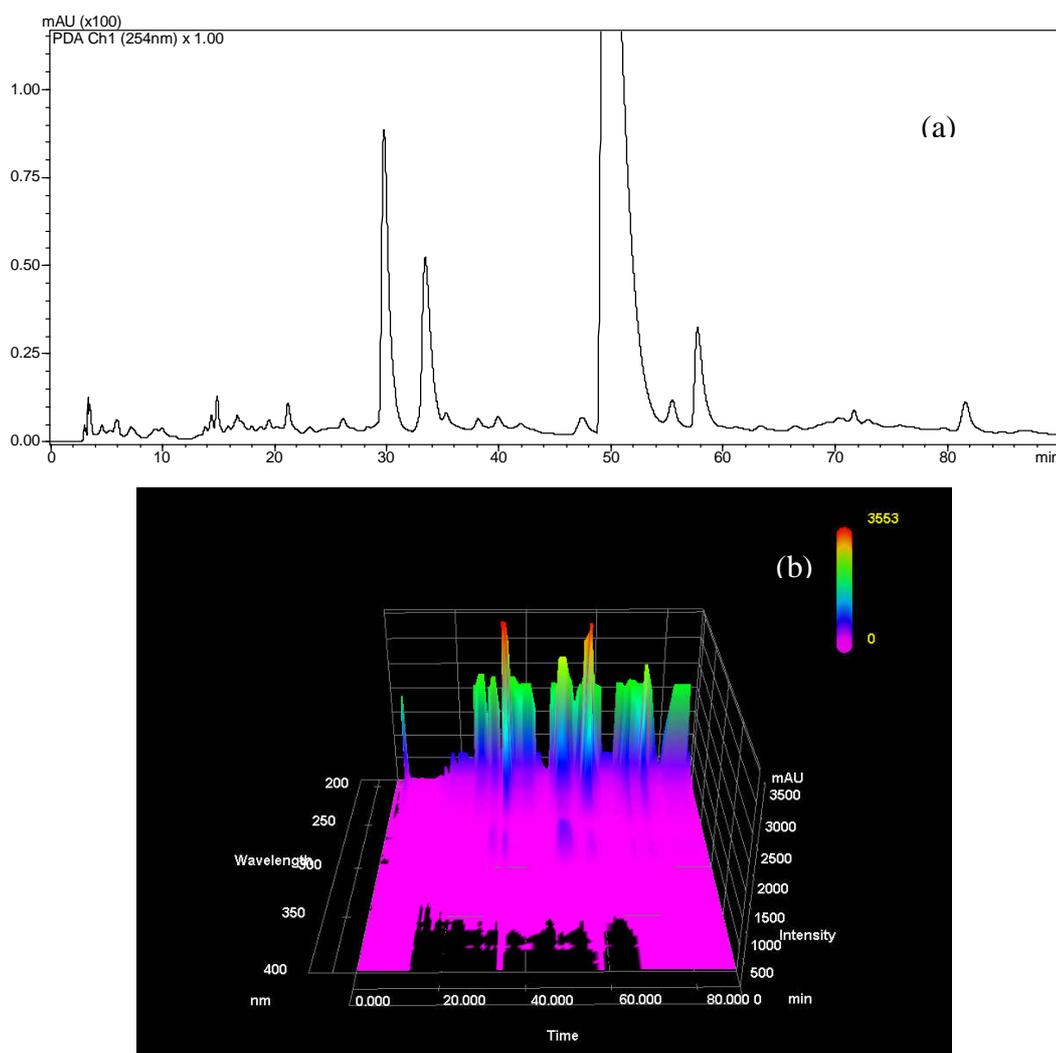


Fig. 23 – Cromatograma obtido em 254 nm (a) e cromatograma em 3D (b) de amostra de guaraná obtido pelo método otimizado.

4.4 Descrição dos principais metabólitos por CLAE

Uma vez otimizado o método de análise, procurou-se identificar os metabólitos presentes, a partir de padrões comerciais disponíveis de fenólicos (taninos) e metilxantinas. O resultado da injeção isolada dos padrões para identificação dos respectivos tempos de retenção (t_R) pode ser visto na Tabela 10.

Observou-se que uma pequena variação no pH da fase móvel MeOH/TFA (1:1) teve uma grande influência no t_R dos padrões. A partir desta conclusão as análises subsequentes foram efetuadas com pH controlado ajustado para $2,00 \pm 0,05$.

Na seqüência, com o intuito de verificar o efeito de matriz entre os constituintes, os padrões foram injetados em mistura no método desenvolvido para análise do guaraná. O resultado pode ser visto na figura 25.

Tabela 10 – Médias dos t_R dos padrões injetados isoladamente (duplicata) com a variação de pH da fase móvel.

Padrão	t_R (min)	
	pH 2,30	pH 2,0
Ácido gálico (AG)	11,95	11,27
Galocatequina* (GC)	18,62	17,61
Teobromina (TeoB)	22,55	21,9
Teofilina (TeoF)	32,38	30,69
Catequina (C)	34,96	34,35
Epigalocatequina (EGC)	37,33	35,43
Cafeína (Caf)	54,52	52,15
Epicatequina (EC)	58,89	58,44
Epigalocatequina galato (EGCG)	60,29	57,51
Galocatequina galato (GCG)	81,25	78,85

A análise do cromatograma da figura 25 mostra que os padrões quando injetados em mistura apresentam t_R um pouco diferentes dos t_R quando injetados isoladamente. Este comportamento (efeito de matriz) dificulta a identificação das substâncias na amostra. Procurou-se então fazer o método de adição de padrão à amostra e realizar a identificação pelo aumento do pico correspondente no cromatograma (coeluição de padrão). Realizou-se ainda a comparação dos espectros UV (extraídos da amostra com o dos padrões).

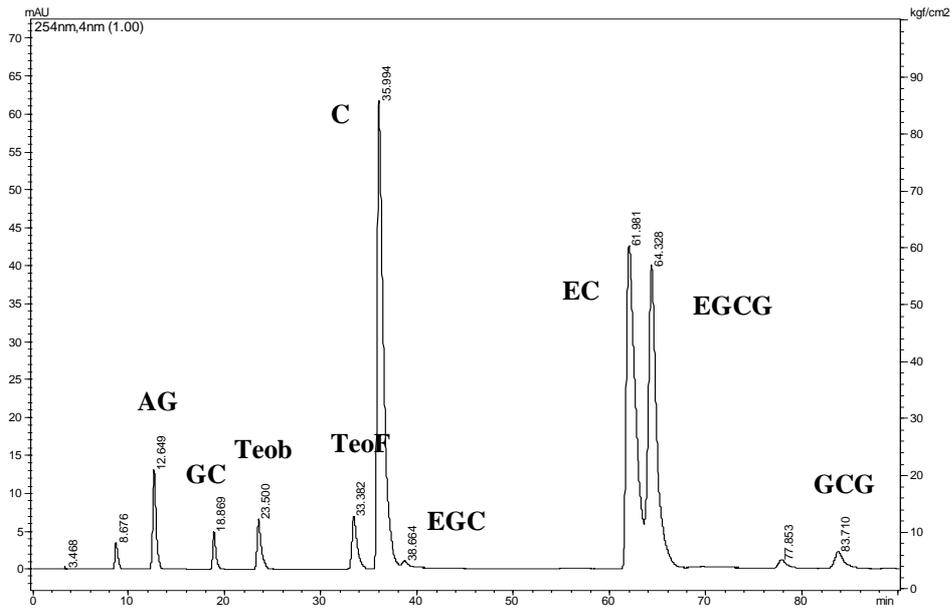
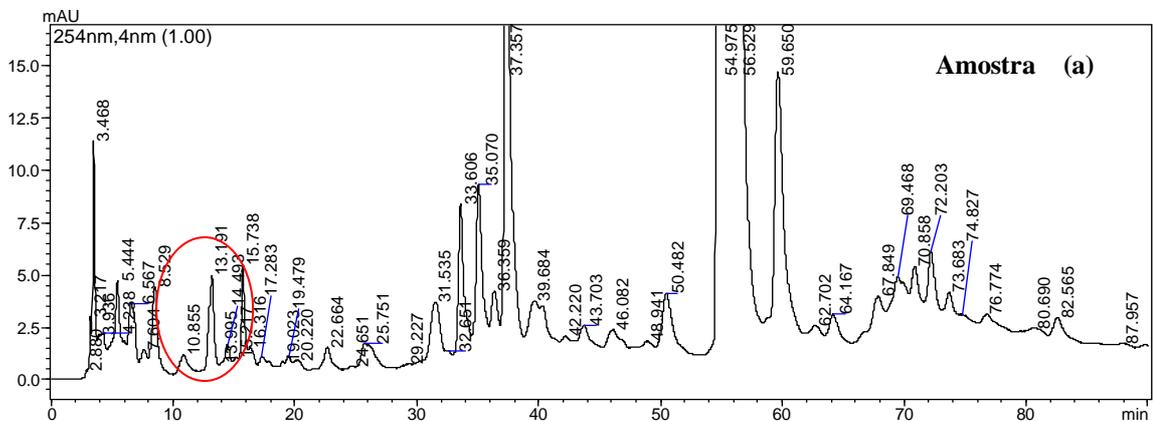


Fig. 25 – Cromatograma da mistura de padrões disponíveis analisado no método otimizado.

Contudo, tais técnicas se mostraram inconclusivas para a maioria dos padrões, pois alguns constituintes se encontram em concentrações muito baixas na amostra ou são eluídos com outras substâncias.

O ácido gálico, quando eluído com a amostra foi detectado a 11.97 min, porém, dentre os possíveis picos na amostra, 10.85 e 13.19 min, o primeiro não foi possível extrair UV (muito diluído) e o segundo não coincide com o espectro UV do padrão (figura 26).



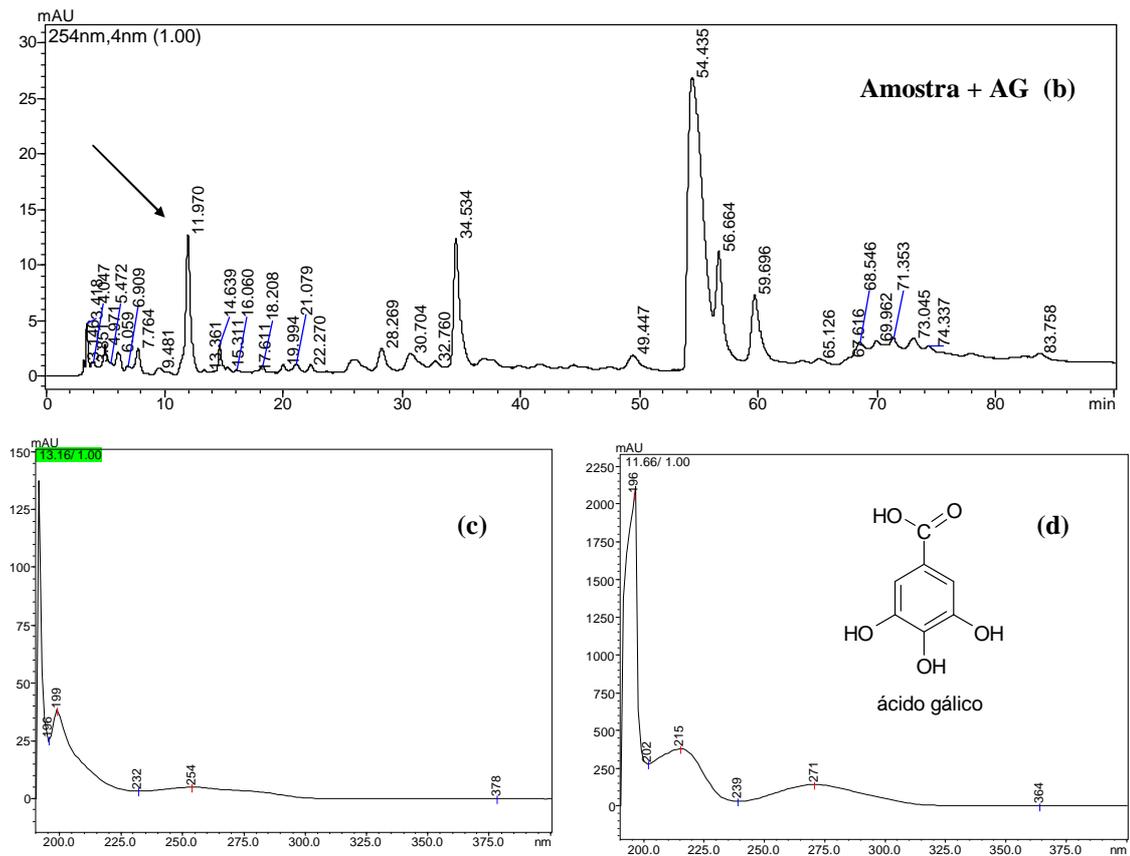
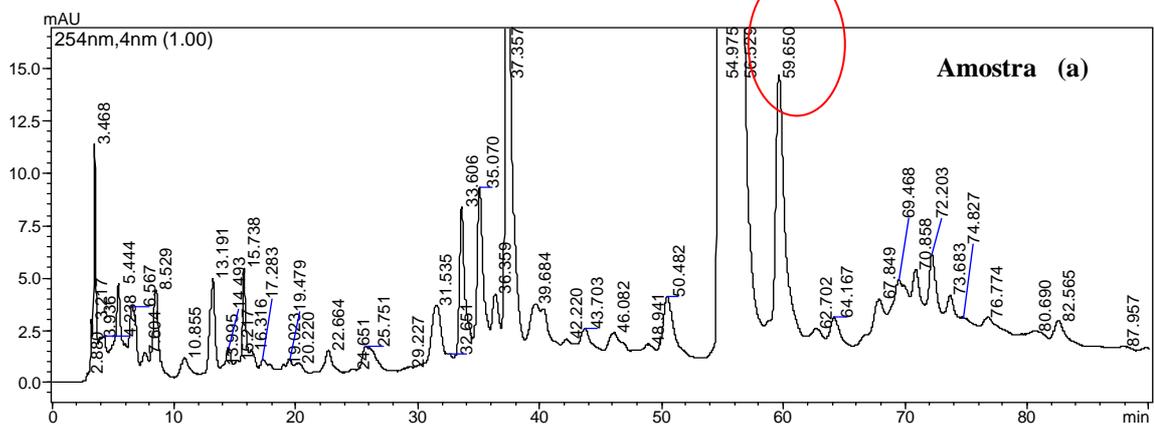


Fig. 26 – Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão (b) e espectro UV do pico extraído em 13.19 min (IP – 0.60) na amostra (c), espectro UV do padrão - λ máx 196, 215, 271 nm (d).

A epicatequina quando eluída com a amostra foi detectada a 59.86 min. O espectro UV do provável pico correspondente na amostra em 59.65 min, corresponde ao do padrão (figura 27).



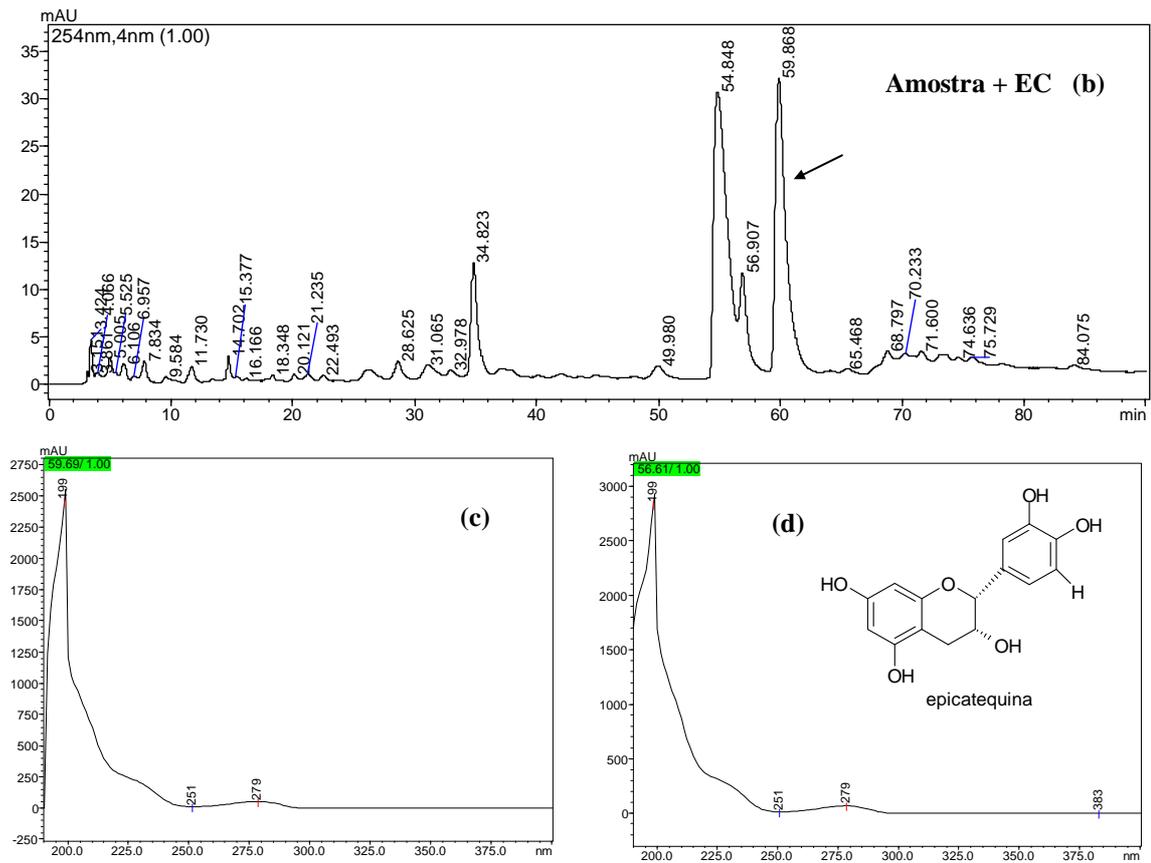
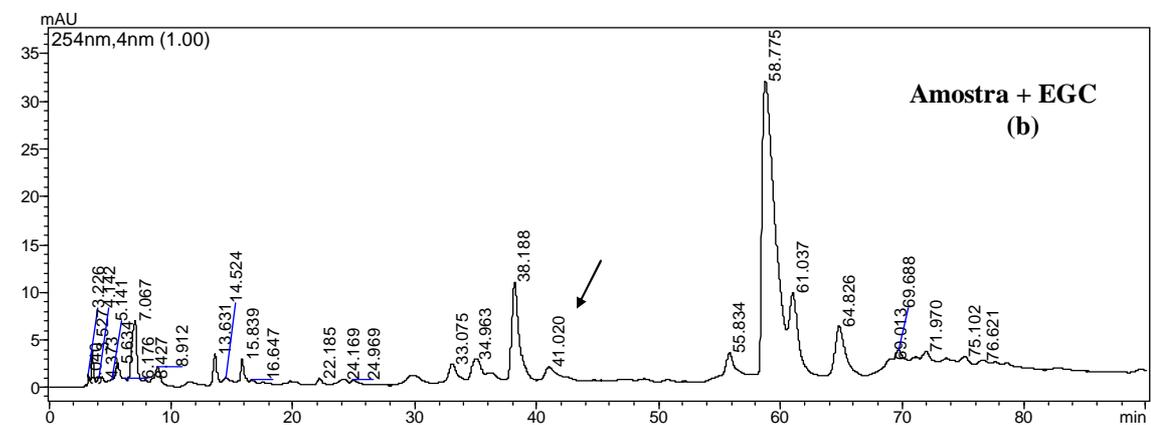


Fig. 27 – Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão (b), espectro UV do pico em 59.65 min (IP – 0,91) na amostra (c) e espectro UV do padrão - λ máx 199, 279 nm (d).

Para a epigalocatequina, a figura 28 (c) mostra a ampliação da região onde houve aumento do pico em 41.02 min, sendo analisado o pico em 39.68 min (b) na amostra cujo espectro não coincide com o espectro do padrão (Fig. 29).



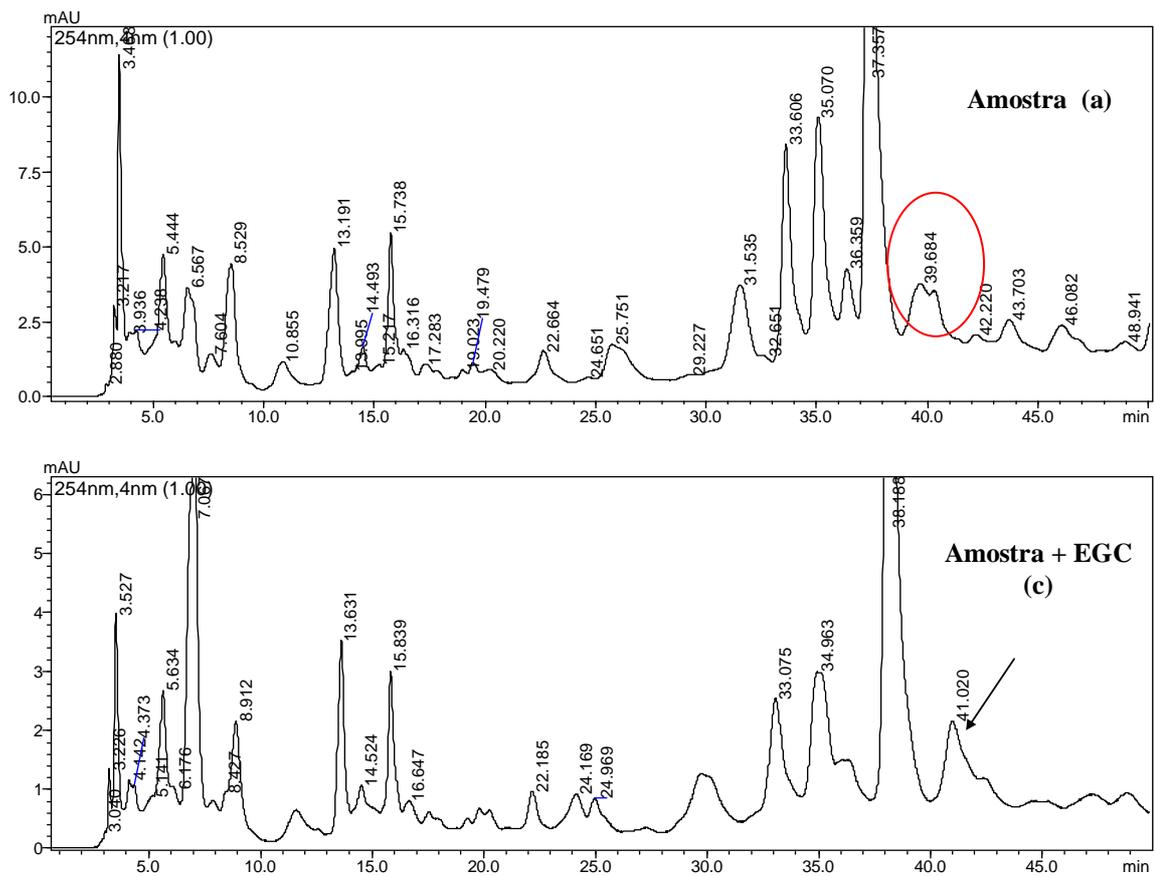


Fig. 28 – Cromatograma ampliado da amostra (a), cromatograma da amostra + padrão (b) e da amostra + padrão ampliado (c).

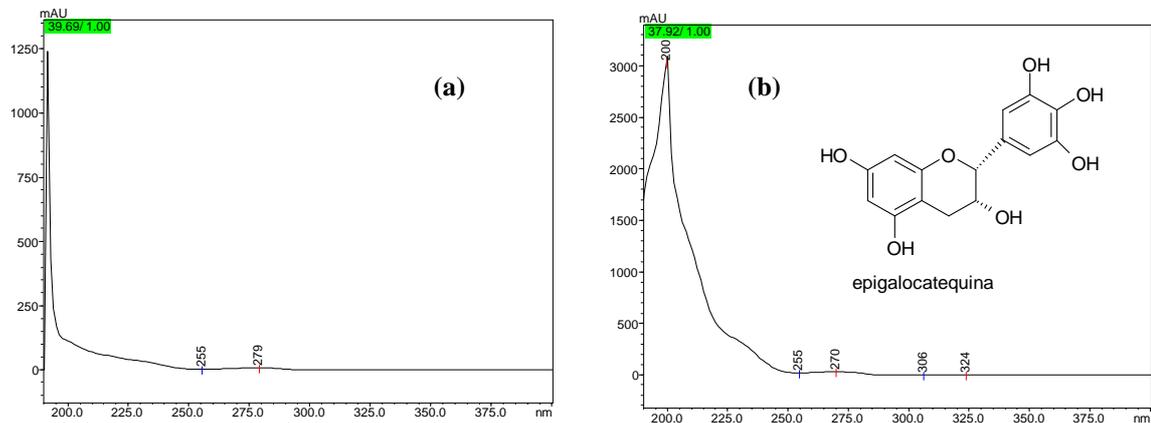


Fig. 29 – Espectro UV do pico em 39.68 min na amostra (IP – 0.95) (a) e espectro UV do padrão - λ máx 218, 270 nm (b).

Na coeluição com a epigallocatequina galato foi detectado aumento do pico em 62.51 min. Os prováveis picos correspondentes na amostra em 62.70 e 64.16 min tem seus espectros demonstrados na figura 30 e se mostraram diferentes do padrão.

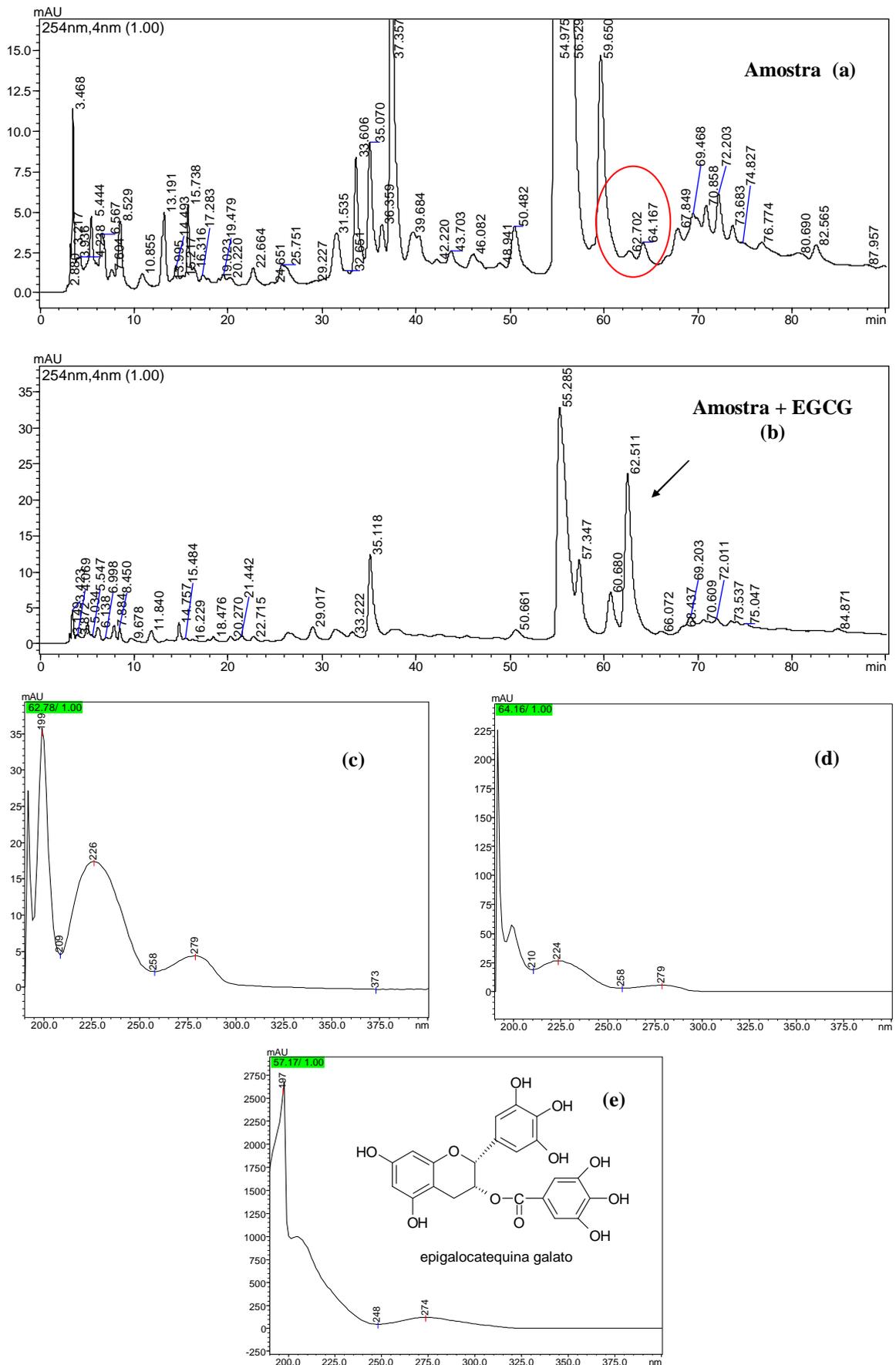
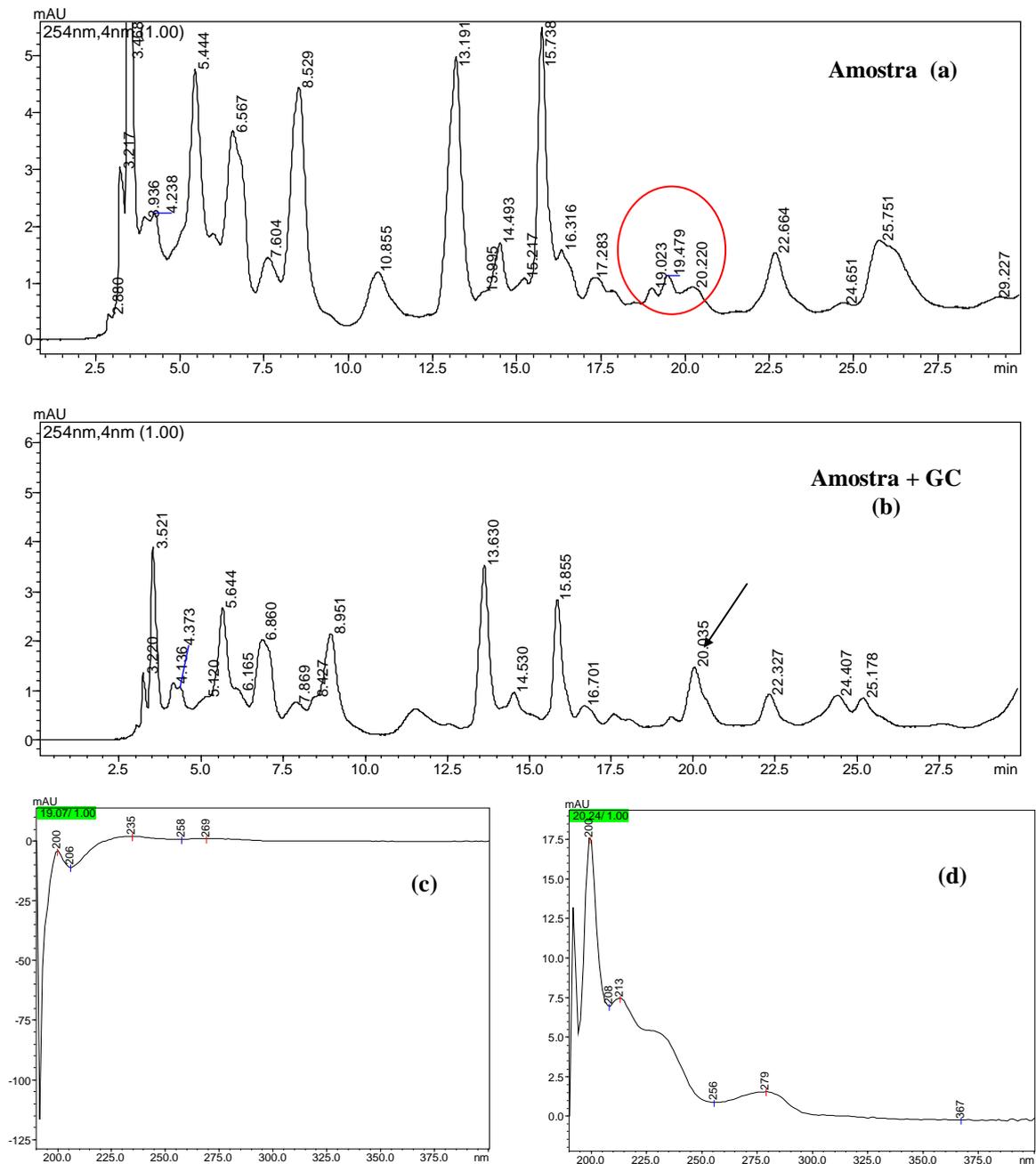


Fig. 30 – Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão (b), espectro UV do pico extraído em 62.70 min (PPI – 0.77) (c), em 64.16 min (d) na amostra (PPI – 0.77) e do padrão - λ máx 197, 274 nm (e).

A coeluição com a galocatequina foi detectada em 20.03 min e os picos cujos espectros foram analisados na amostra em 19.02, 19.47 e 20.22 min (Fig. 31). O espectro UV do pico em 19.02 na amostra (Índice de pureza IP = 0.95) está demonstrado abaixo, o do pico em 19.47 min não foi possível extrair (muito diluído) e o do pico em 20.22 min está demonstrado abaixo (IP = 0.99). Pela análise realizada não foi possível confirmar a presença de GC na amostra.



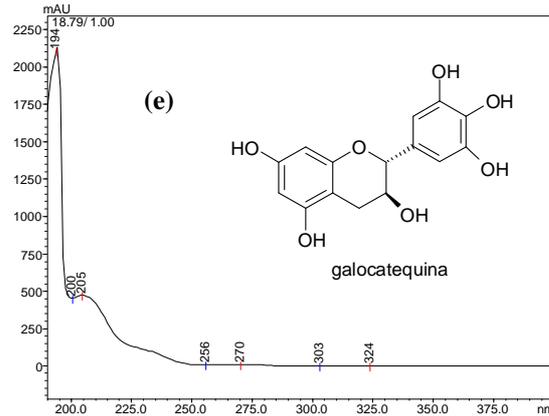
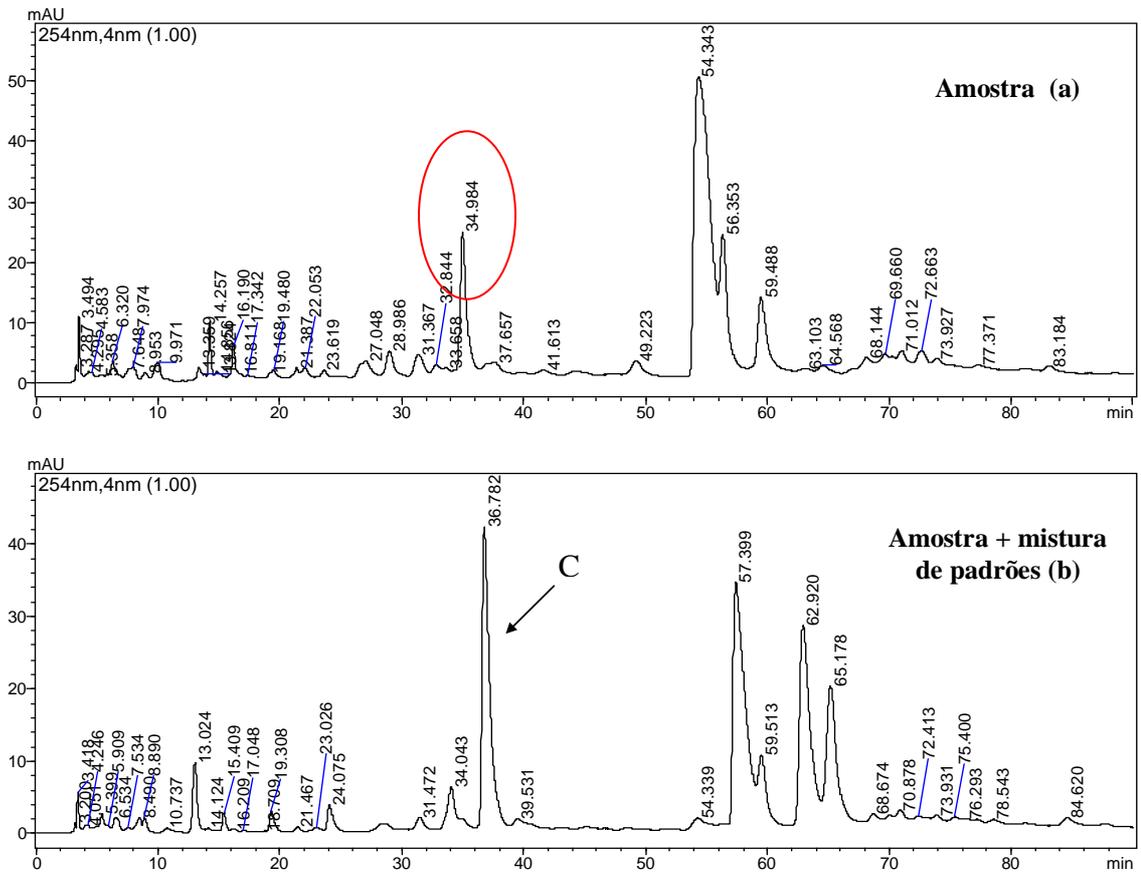


Fig. 31 – Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão de galocatequina (b), espectro UV do pico extraído em 19.02 (c), em 20.22 min (d) na amostra e espectro UV do padrão - λ máx 205, 270 nm (e).

A catequina foi identificada pela coeluição da amostra e da mistura de padrões. O aumento do pico em 36.78 min e a confirmação do espectro UV do pico em 34.98 min na amostra confirmam a identificação da catequina (Fig. 32).



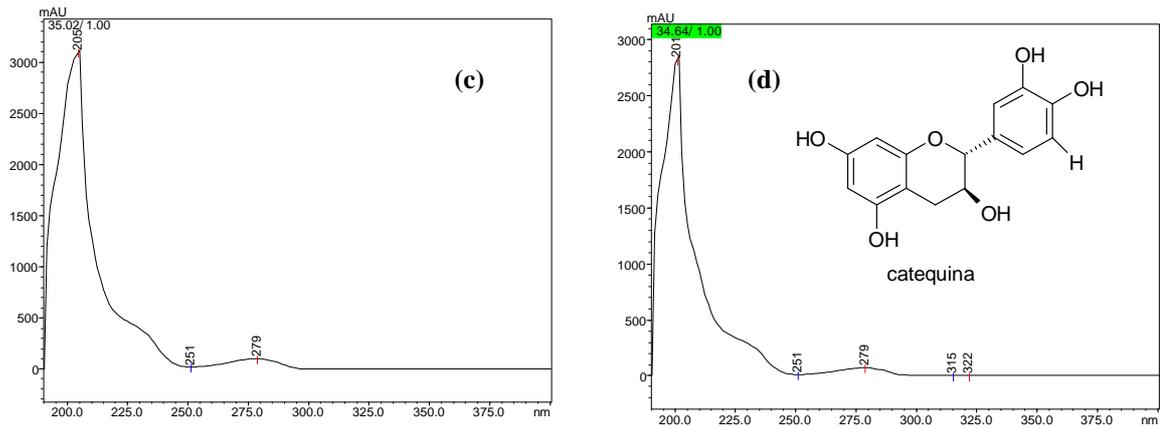
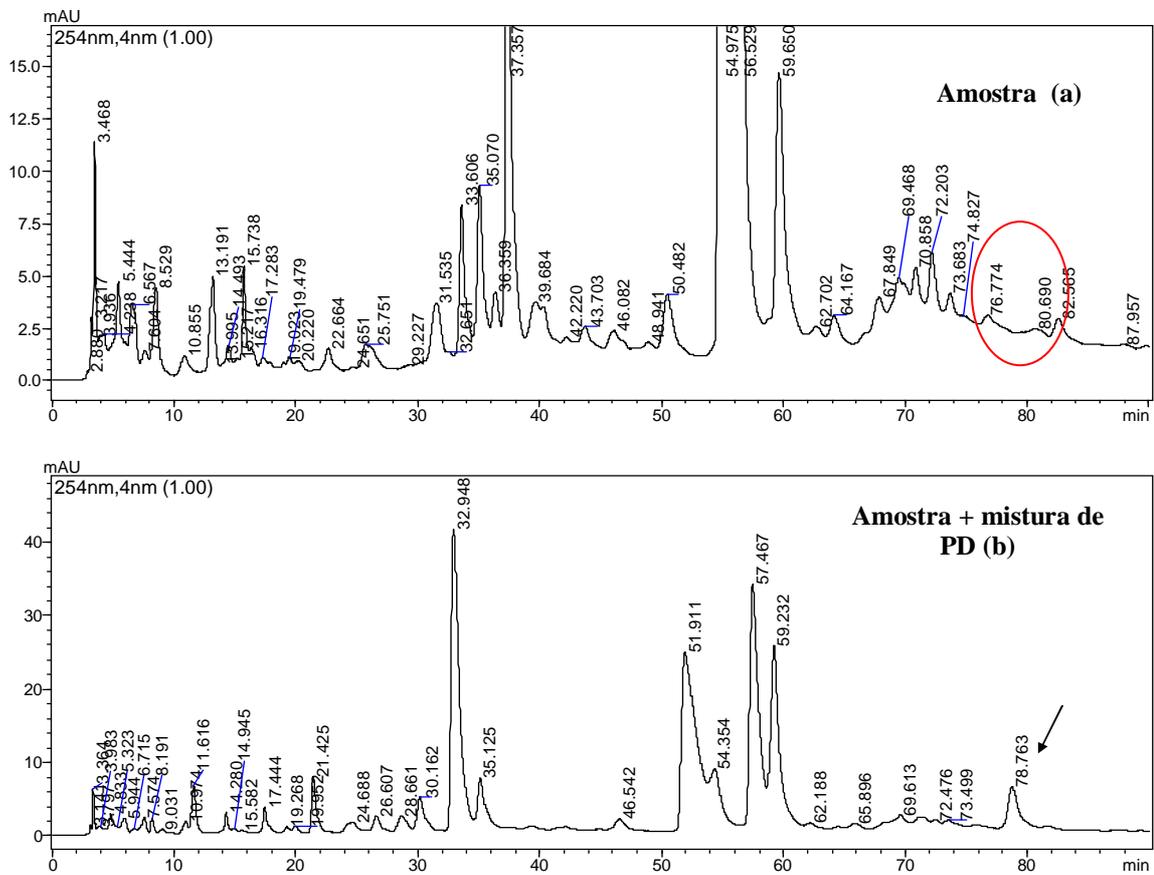


Fig. 32 – Cromatograma da amostra (a), amostra + mistura de padrões (b) e espectro UV extraído do pico em 34.98 min na amostra (IP – 1.00) (c) e espectro UV do padrão - λ máx 201, 279 nm (d).

O aumento do pico em 78.76 min, região de detecção para a galocatequina galato, sugere a investigação dos picos em 76.77 (IP = 0.83) e 80.69 min (IP = 0.47). Os espectros UV são mostrados na figura 33 e não são conclusivos para ambos os picos analisados.



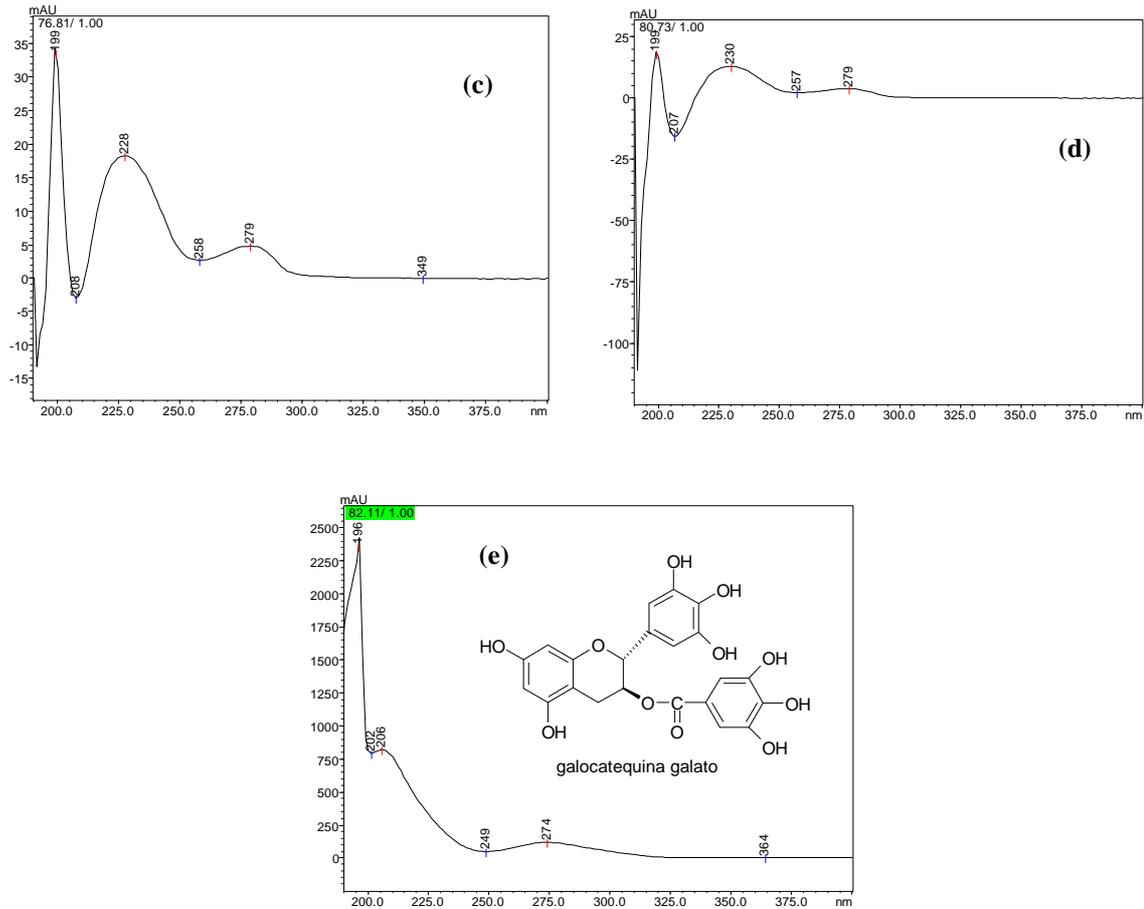
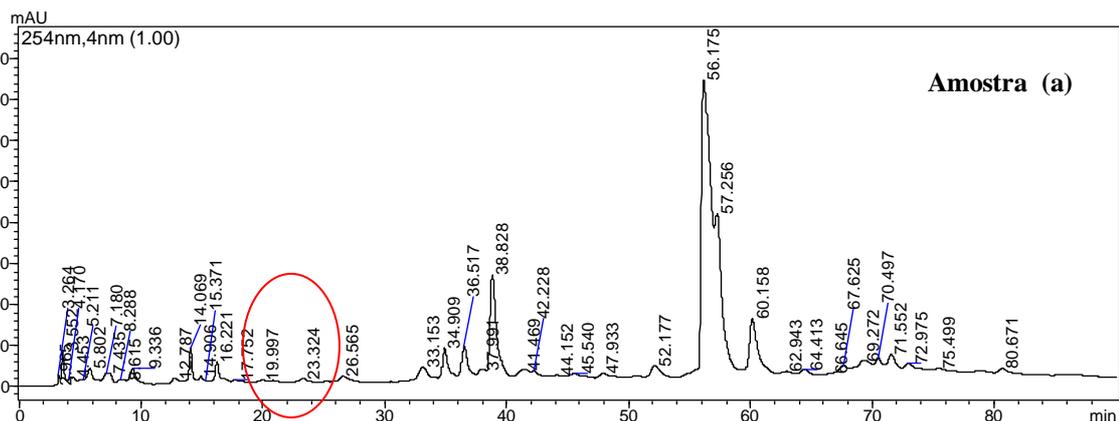


Fig. 33 – Cromatograma da amostra (a), amostra + mistura de padrões (b), espectro UV extraído do pico em 76.77 (c) em 80.69 min (d) da amostra e espectro UV do padrão - λ máx 206, 274 nm (e).

Para a teobromina, não foi possível a identificação na amostra analisada, pois os prováveis picos na amostra (19.99 e 23.32 min), mostrados na figura 34, se apresentaram em concentrações muito baixas ou impuros, porém, a identificação foi positiva em outras amostras analisadas (fração metanólica da amostra 34-2 – pico em 23.40 min).



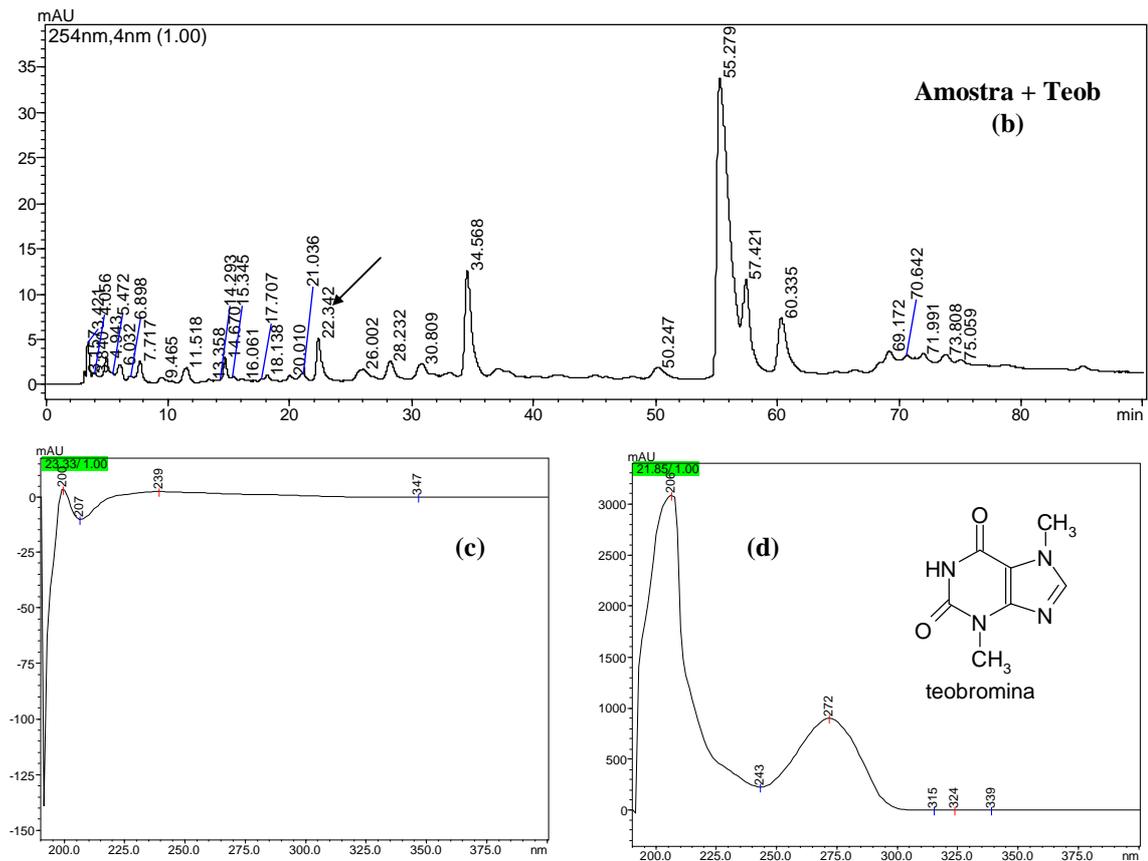
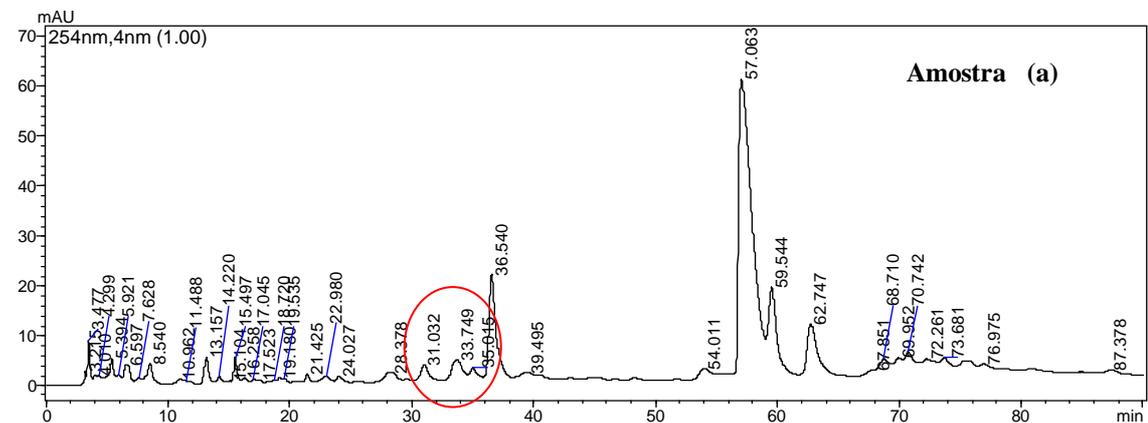


Fig. 34 – Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão de Teob (b), espectro UV extraído do pico em 23.32 min na amostra (IP – 0.74) (c) e espectro UV do padrão - λ máx 206, 272 nm (d).

A coincidência com a teofilina resultou em aumento do pico em 34.30 min (Fig. 35). Na amostra, os picos avaliados foram em 31.03, 33.74 e 35.01 min. Nenhum dos prováveis picos na amostra apresentou espectro UV compatível com o do padrão, porém também para a teofilina foi possível a confirmação em outras amostras (fração metanólica da amostra 11-1 – pico em 32.49 min).



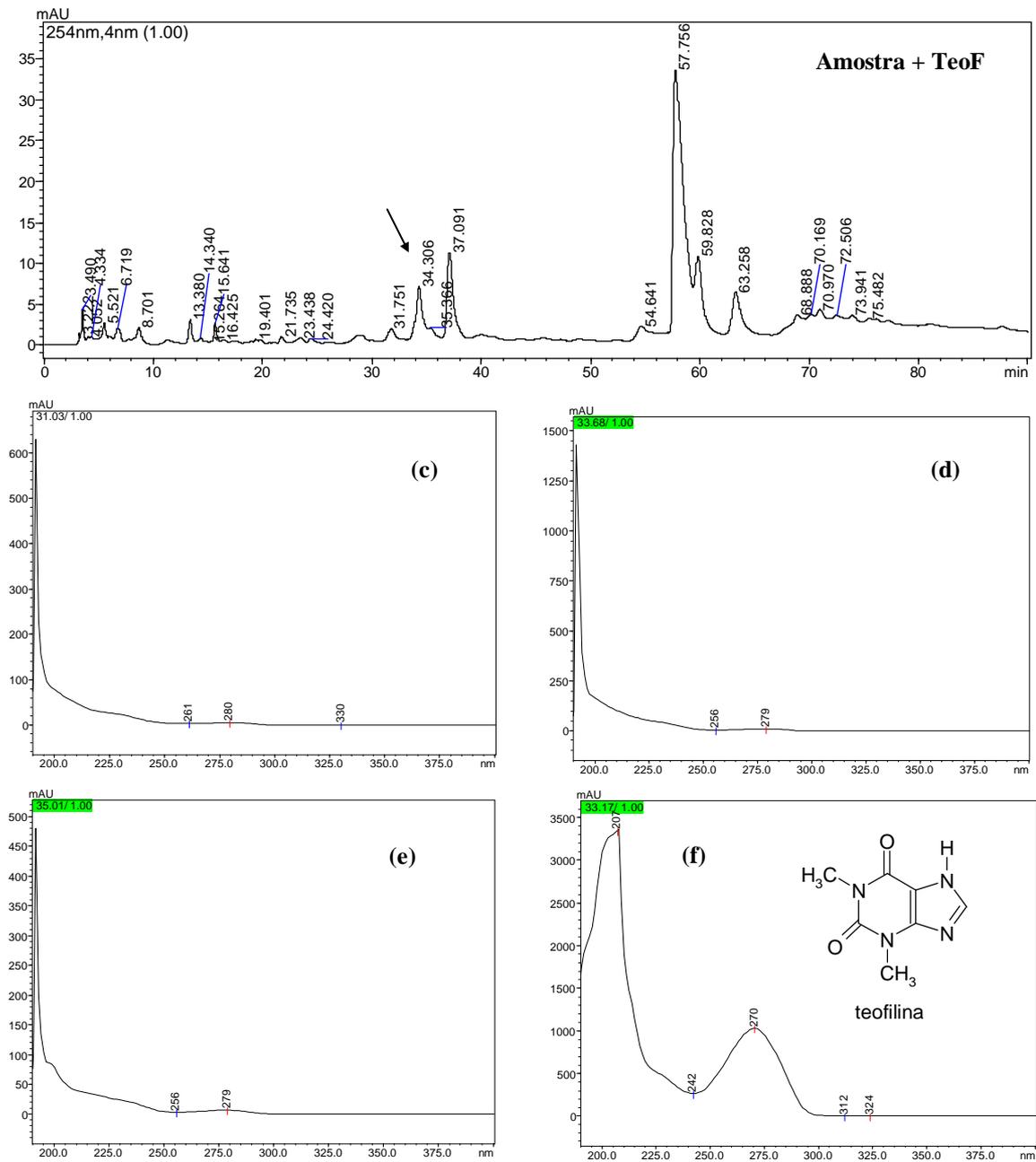


Fig. 35 – Cromatograma da amostra (a), amostra + padrão de TeoF (b), espectro UV extraído do pico em 31.03 min (IP – 1.00) (c), em 33.74 min (IP – 0.99) (d), em 35.01 min (IP – 0.40) (e) na amostra e espectro UV do padrão - λ máx 207, 270 nm (f).

4.5 Obtenção dos cromatogramas das amostras

4.5.1 Fração metanólica

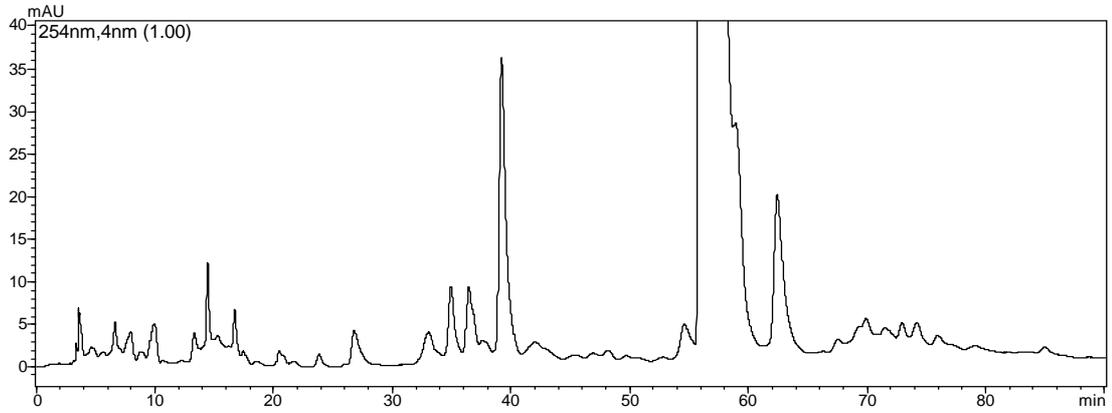
As frações metanólicas, MeOH/TFA (1:1), de todas as amostras são apresentadas a seguir (Figuras 36, 37 e 38). Observou-se uma boa reprodutibilidade nas análises realizadas, confirmando a confiabilidade do método desenvolvido.

Diferentemente de Yang *et al* (2005) que, em seus estudos com o *Hypericum japonicum*, conseguiu determinar diferenças no metabolismo de amostras coletadas em regiões distintas, os perfis cromatográficos de guaraná coletados nos estados do Amazonas, Bahia e Mato Grosso, não apresentaram diferenças significativas que pudessem agrupá-las por origem geográfica. Apenas no caso da amostra 11 oriunda de Maués, pode-se identificar a presença maior de teobromina e teofilina, além de catequina, cafeína e epicatequina.

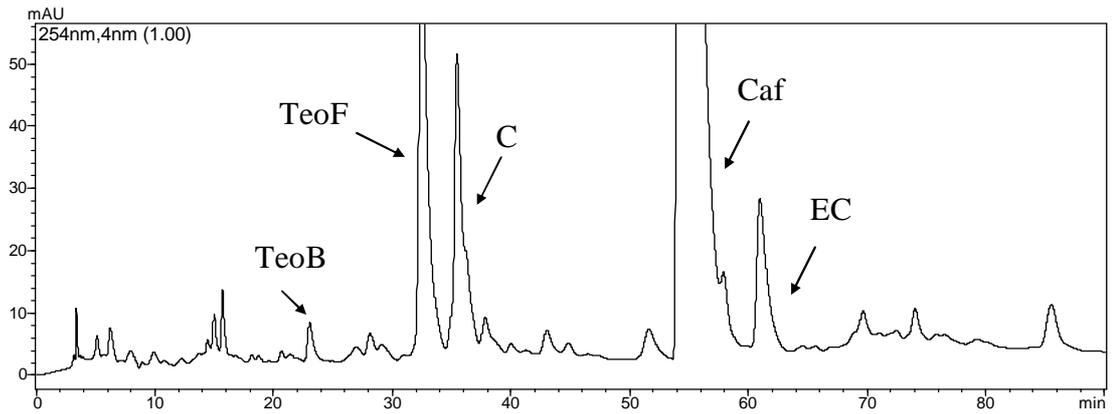
Pela análise das áreas dos picos identificados, verificou-se uma variação significativa nos teores de algumas dessas substâncias, porém as variações ocorreram de uma forma não relacionada com sua origem geográfica.

Amostras provenientes do Estado do Amazonas

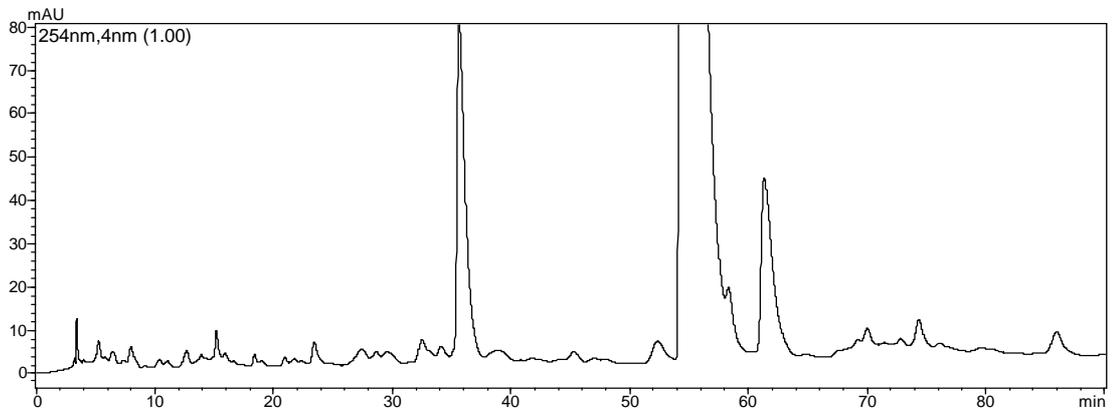
Amostra 10 – Manaus



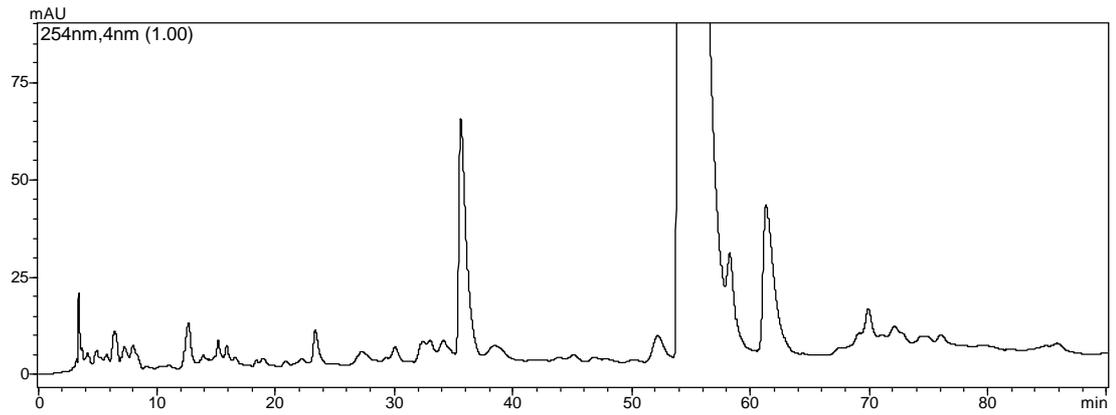
Amostra 11 – Maués



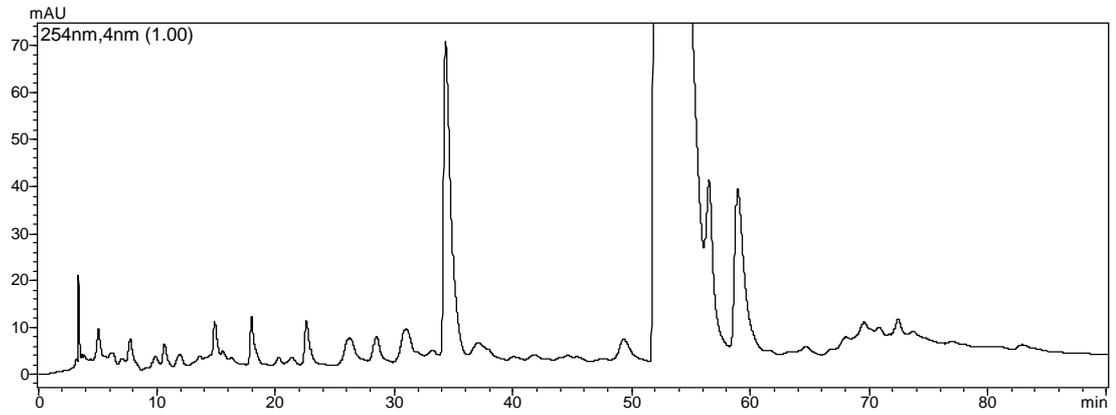
Amostra 12 – Urucará



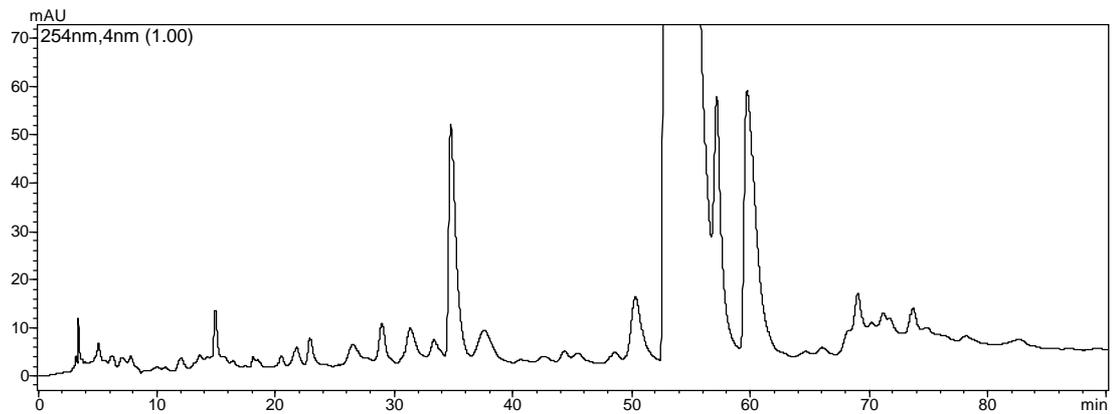
Amostra 13 – Manaus



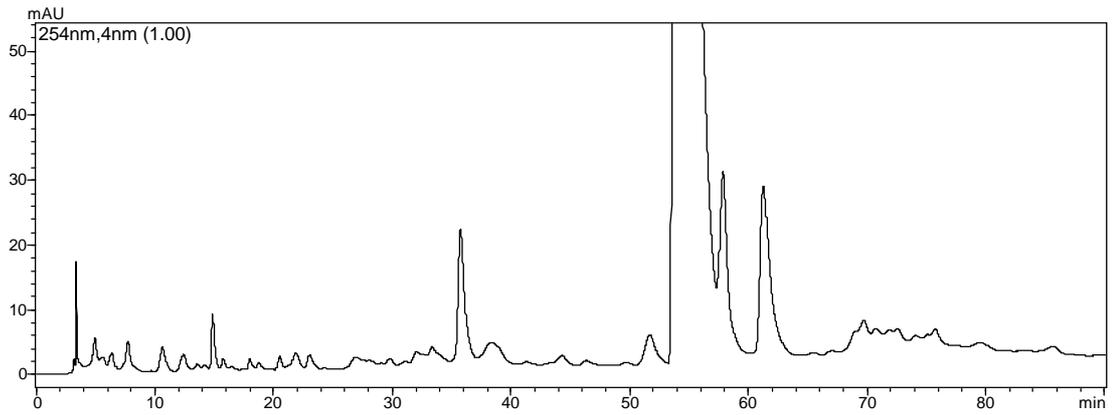
Amostra 14 - Manaus



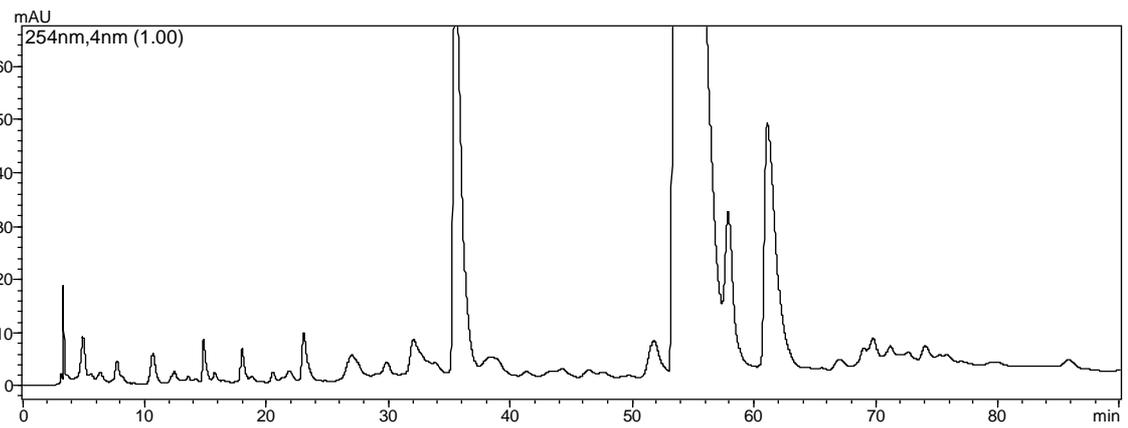
Amostra 15 - Manaus



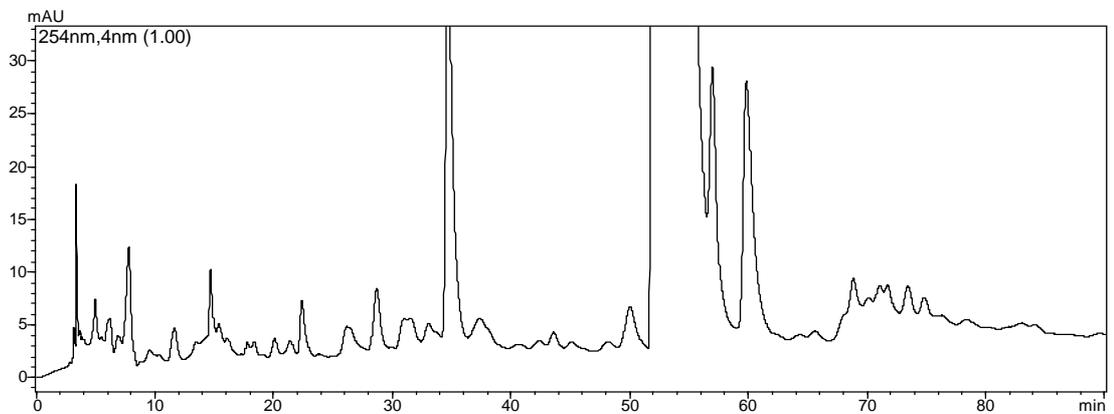
Amostra 16 - Manaus



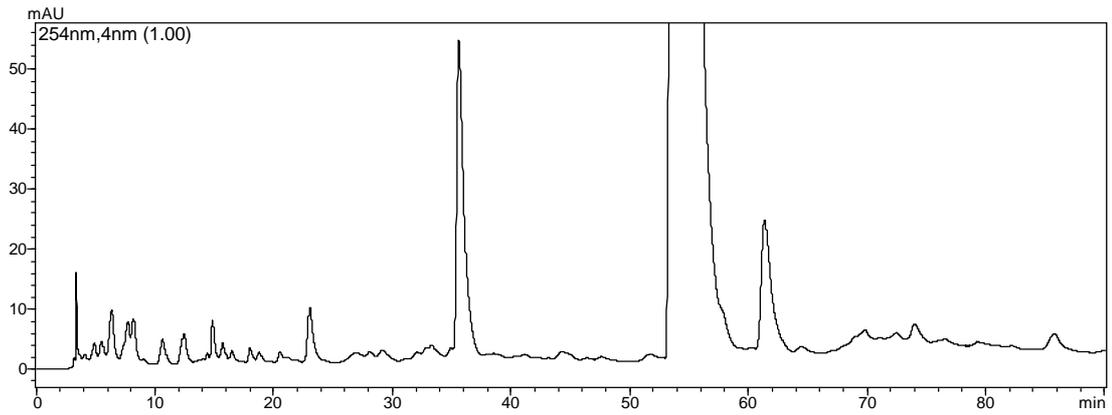
Amostra 17 - Manaus



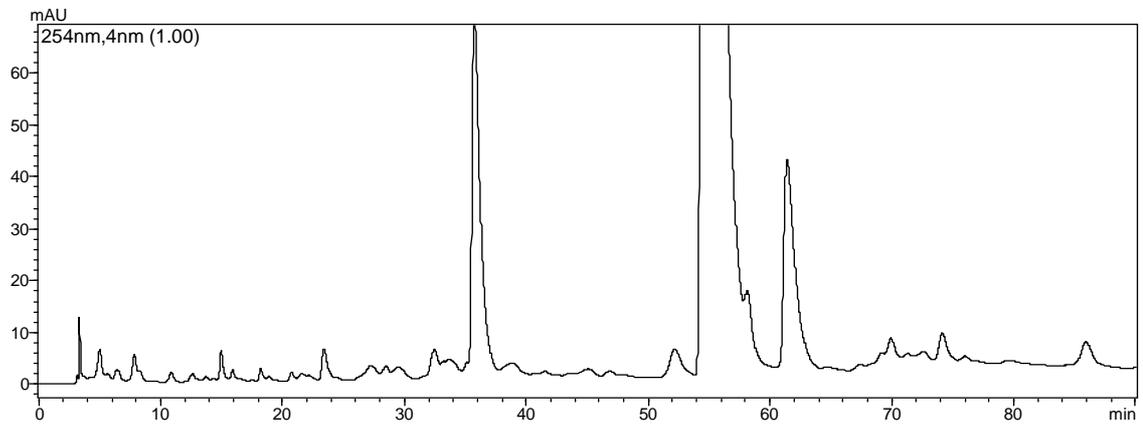
Amostra 18 - Manaus



Amostra 19 - Itacoatiara



Amostra 28 - Maués



Amostra 35 - Tabatinga

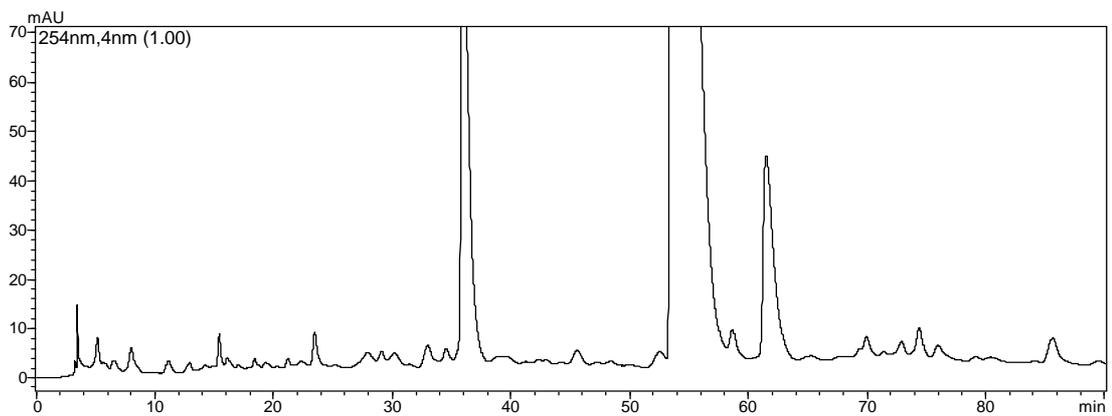
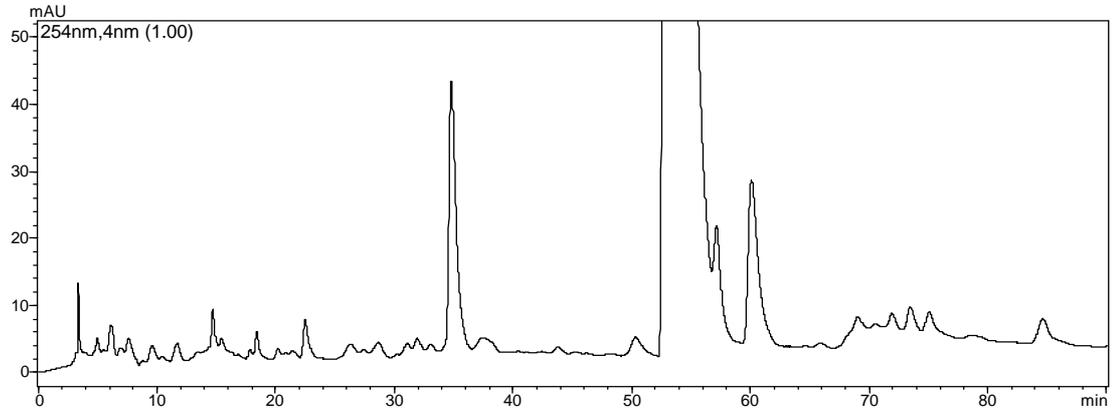


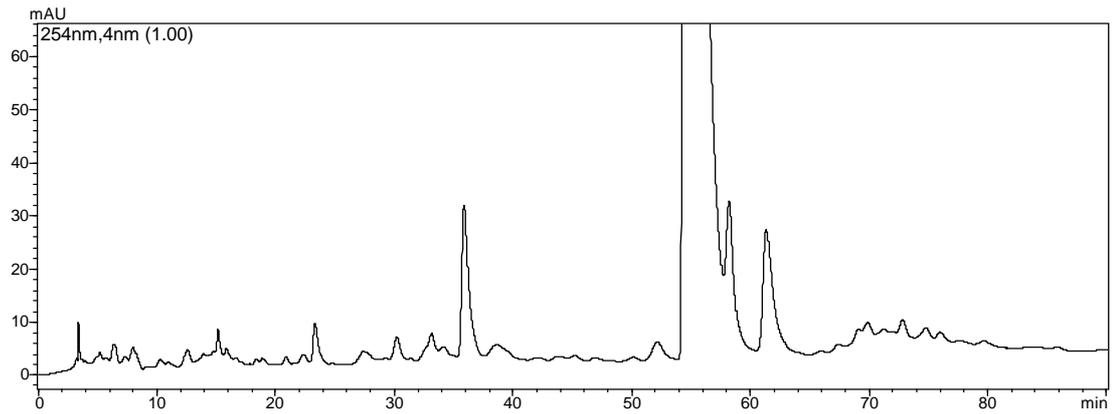
Fig. 36 - PC das frações MeOH/TFA (1:1) das amostras provenientes do Estado do Amazonas.

Amostras provenientes da Bahia

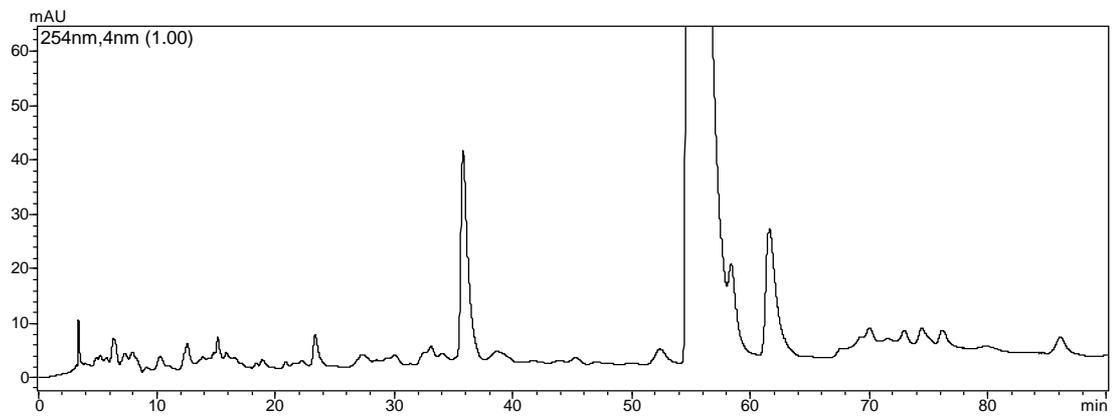
Amostra 20 - Valença



Amostra 21 - Valença



Amostra 29 - Ituberá



Amostra 32 – Ituberá

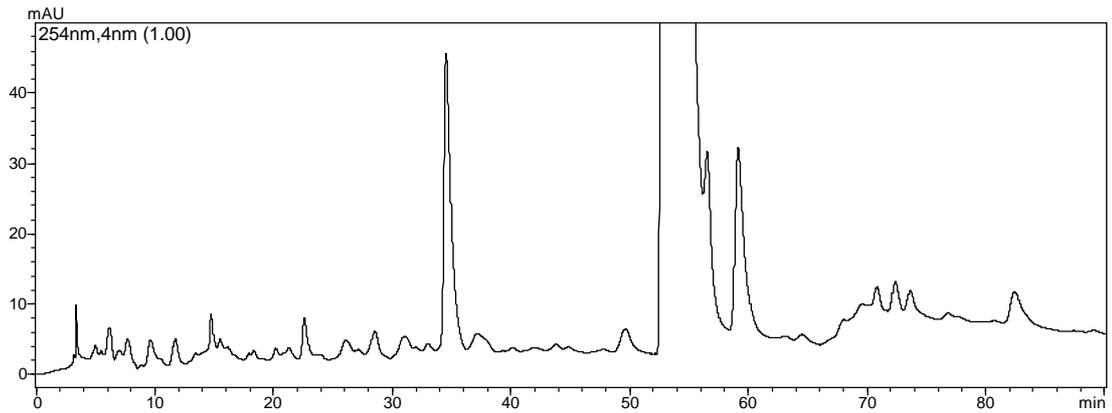
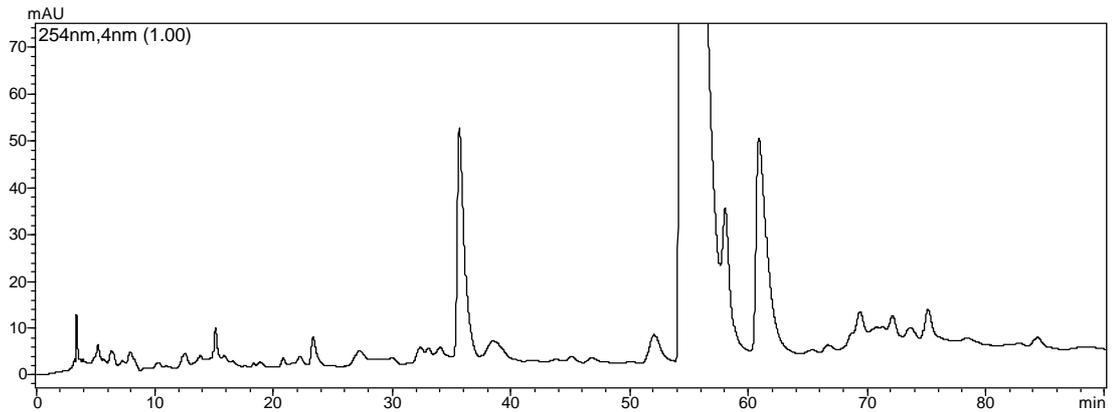


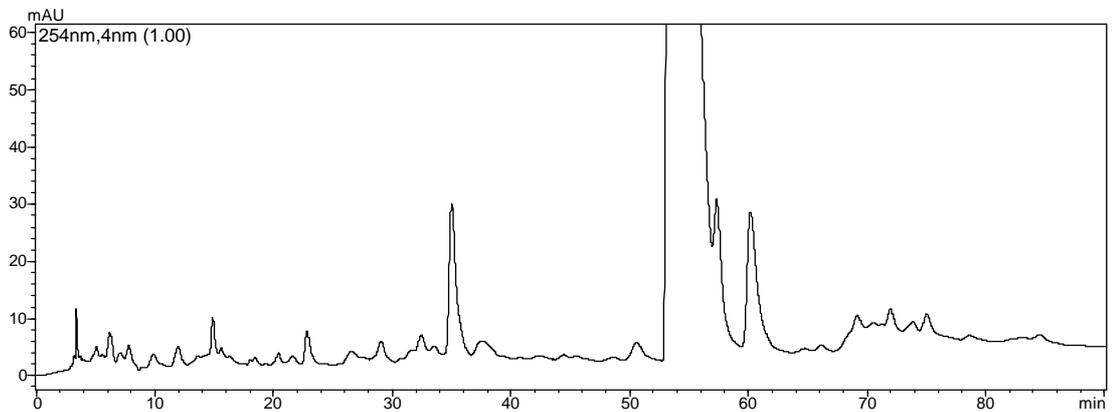
Fig. 37 – PC das frações MeOH/TFA (1:1) das amostras provenientes da Bahia.

Amostras provenientes do Mato Grosso

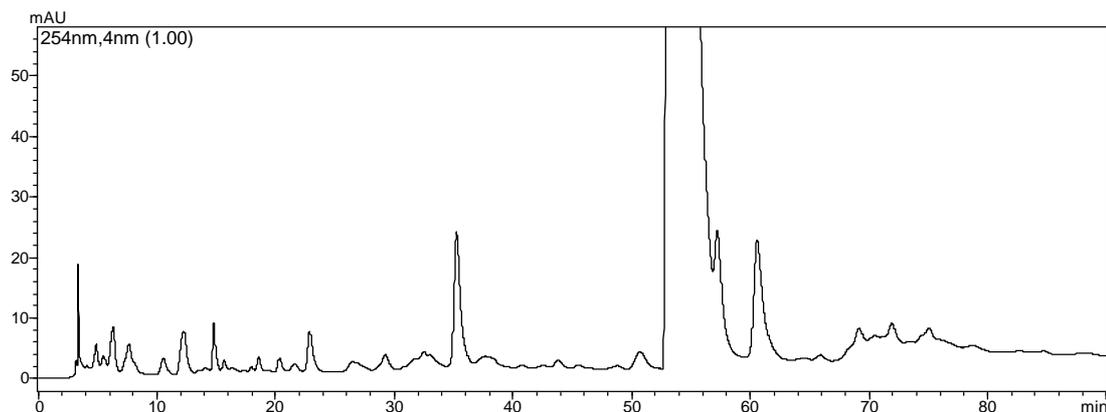
Amostra 30 - Cuiabá



Amostra 31 – Cuiabá



Amostra 33 – Alta Floresta



Amostra 34 – Terra Nova do Norte

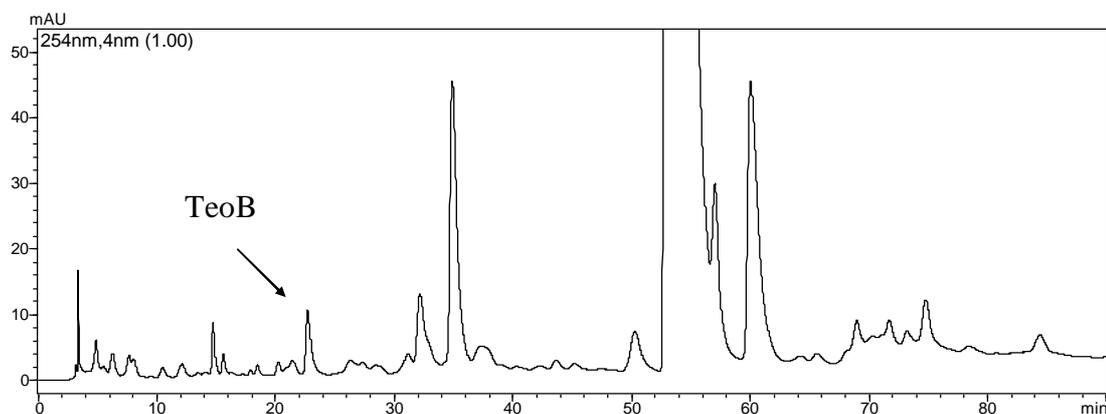


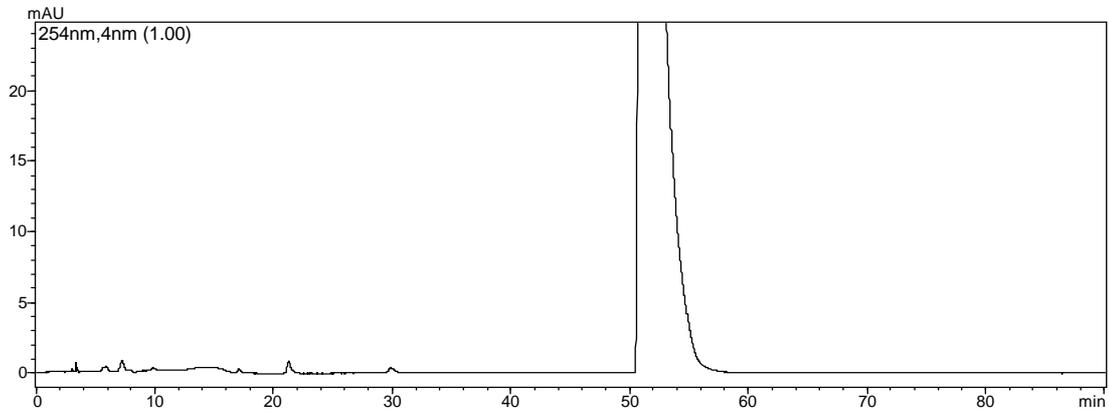
Fig. 38 – PC das frações MeOH/TFA (1:1) das amostras provenientes do Mato Grosso.

4.5.2 Fração diclorometano

Para confirmar que o método desenvolvido podia restringir-se a análise da fração hidroalcolica, analisaram-se também todas as frações diclorometano obtidas. Analisando-se os PC obtidos das frações diclorometano das amostras, verifica-se que, na maior parte dos casos, extraiu-se somente cafeína (área do pico entre 97-99 %) não havendo perda significativa de informação para análise do perfil da fração metanólica. Em alguns casos (amostra 11 e 29) houve extração significativa das outras metilxantinas. Os cromatogramas são apresentados nas Figuras 39, 40 e 41.

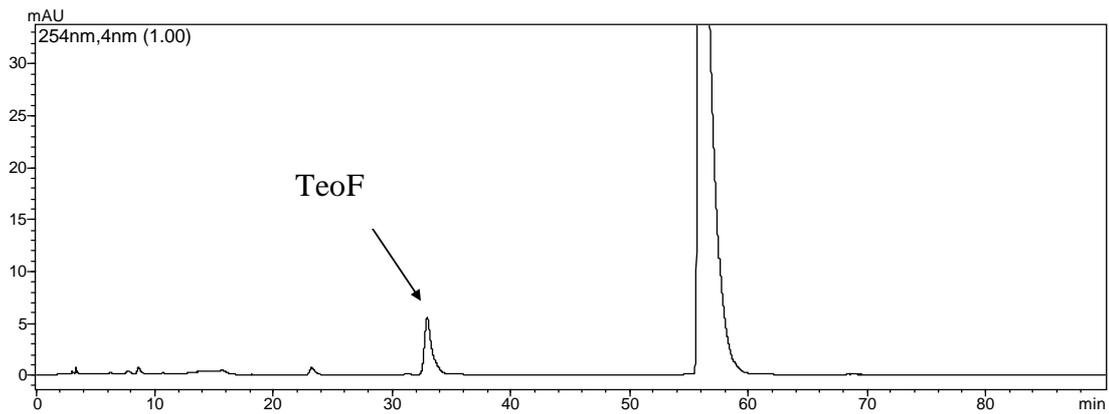
Amostras provenientes do Estado do Amazonas

Amostra 10 - Manaus



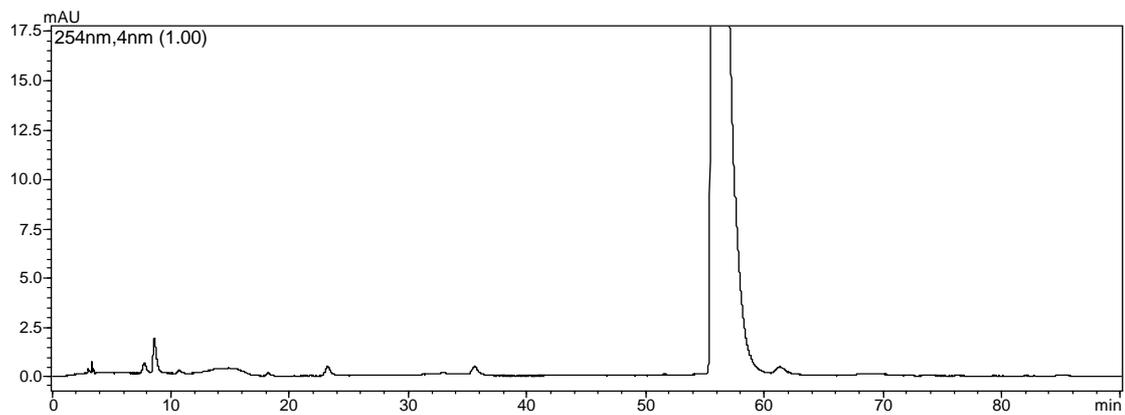
Obs.: Área do pico da cafeína corresponde a 99,27 % da área total

Amostra 11 - Maués



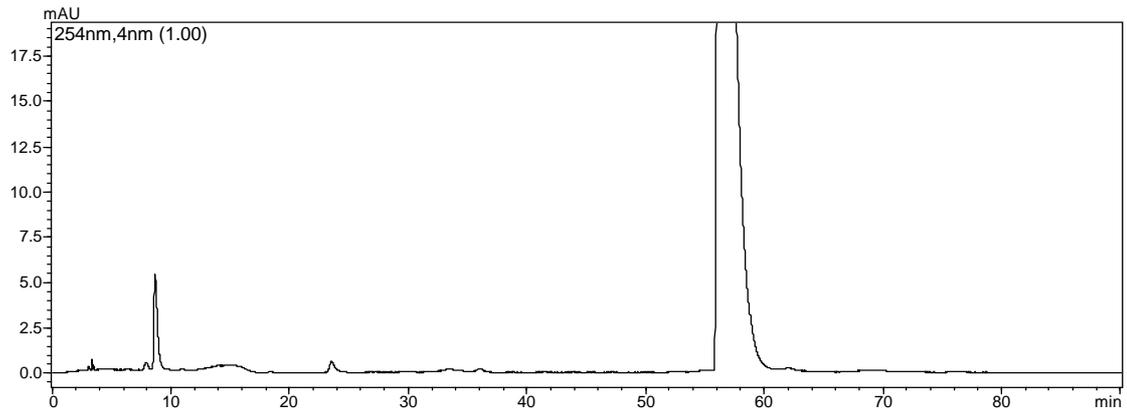
Obs.: Área do pico da cafeína – 94,11 % e pico em 32,93 min – 4,98 %

Amostra 12 - Urucará



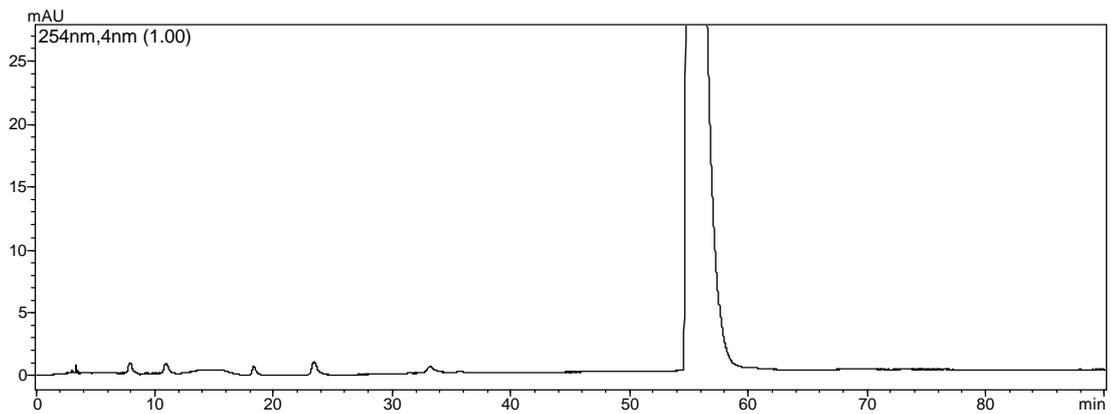
Área do pico da cafeína – 98,53 %

Amostra 13 - Manaus



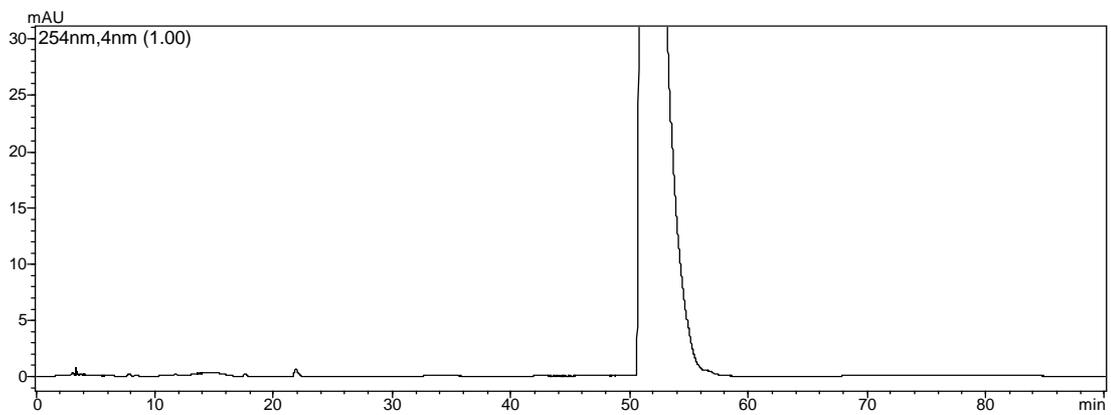
Área do pico da cafeína – 97,48 %

Amostra 14 - Manaus



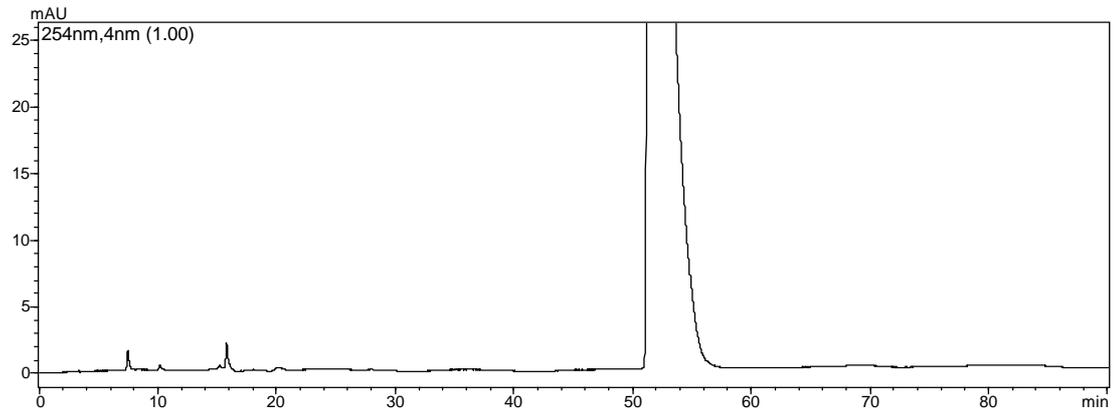
Área do pico da cafeína – 98,75 %

Amostra 15 - Manaus



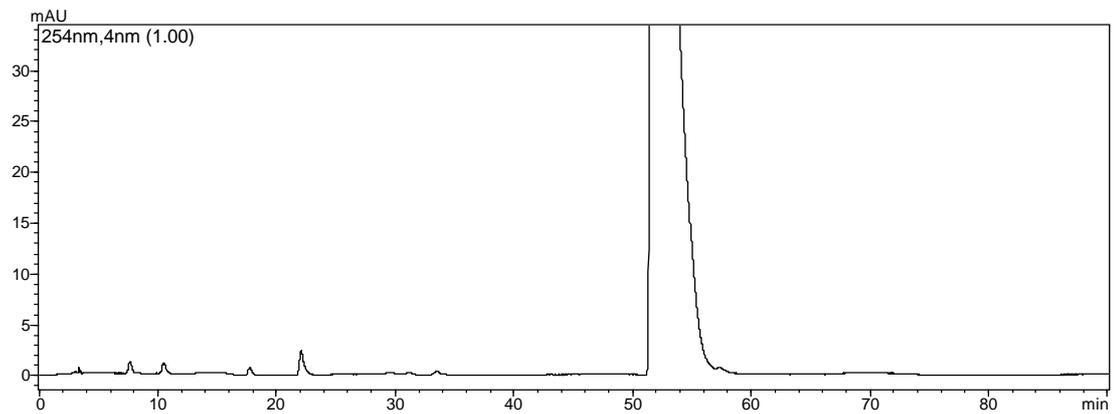
Área do pico da cafeína – 99,72 %

Amostra 16 - Manaus



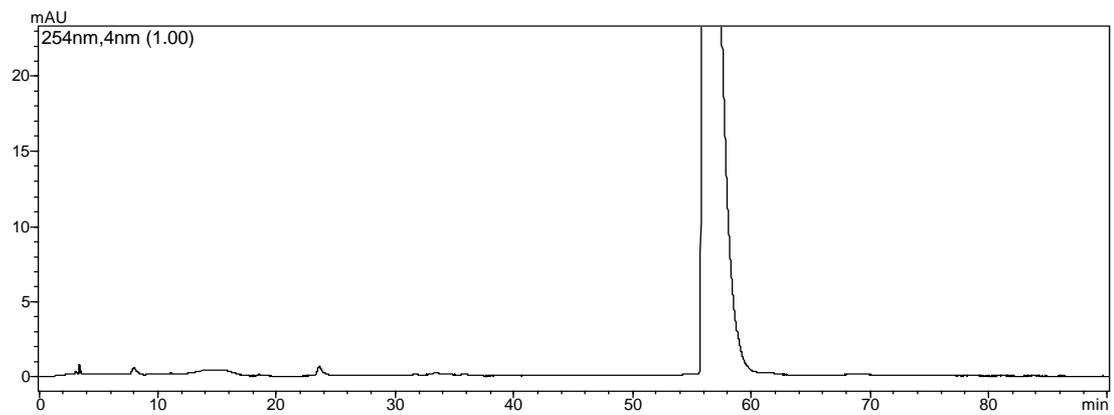
Área do pico da cafeína – 99,50 %

Amostra 17 - Manaus



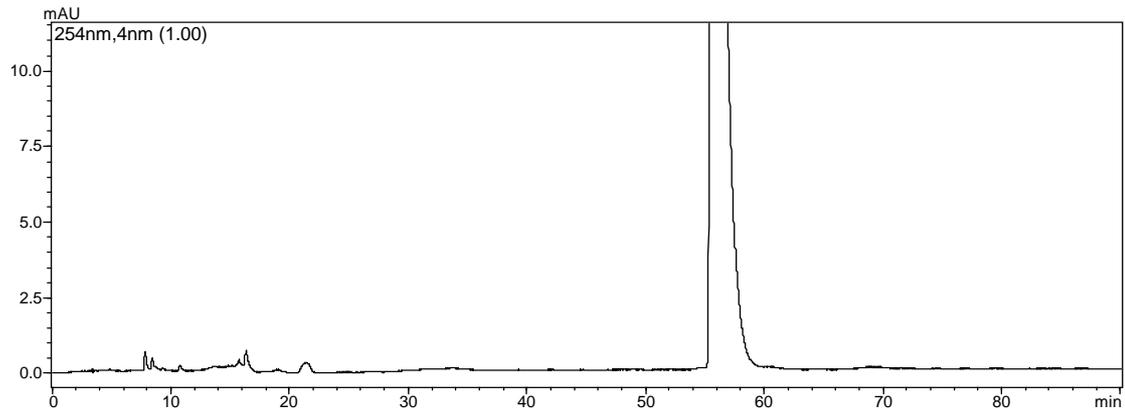
Área do pico da cafeína – 99,00 %

Amostra 18 – Manaus



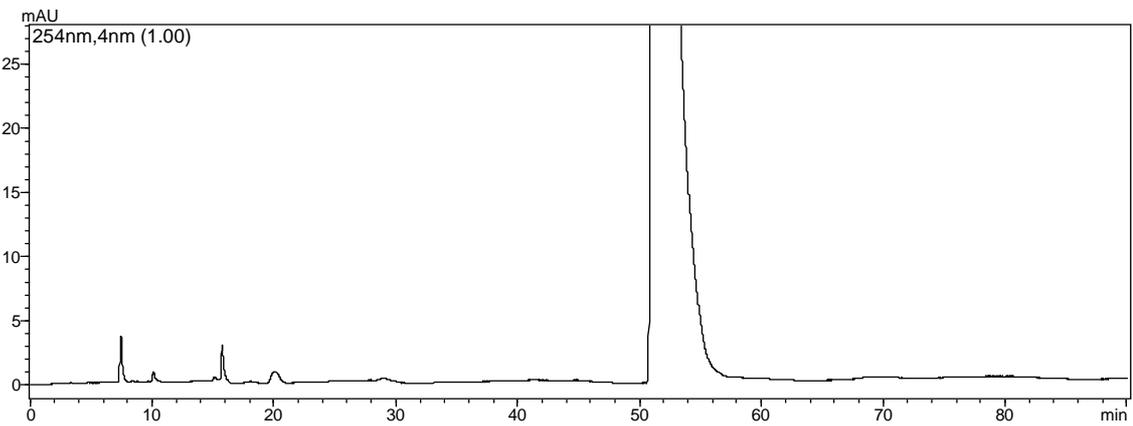
Área do pico da cafeína – 99,59 %

Amostra 19 - Itacoatiara



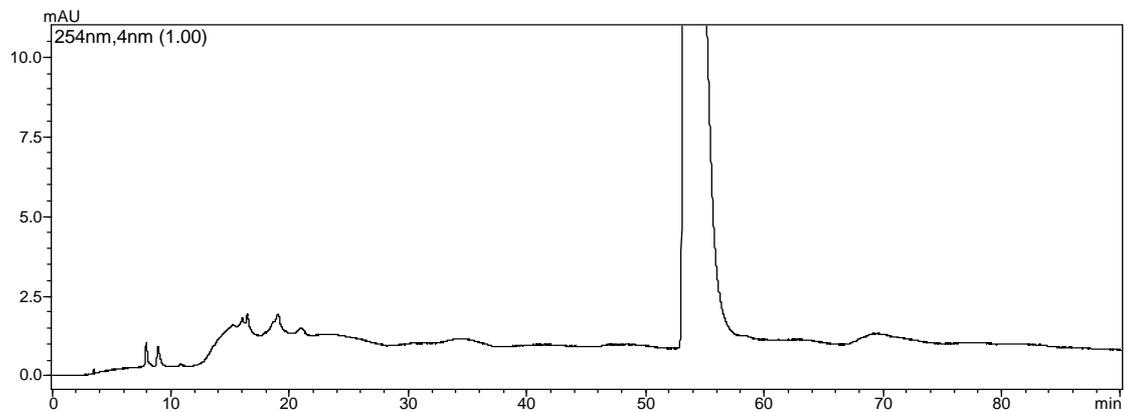
Área do pico da cafeína – 99,24 %

Amostra 28 - Maués



Área do pico da cafeína – 98,75 %

Amostra 35 - Tabatinga

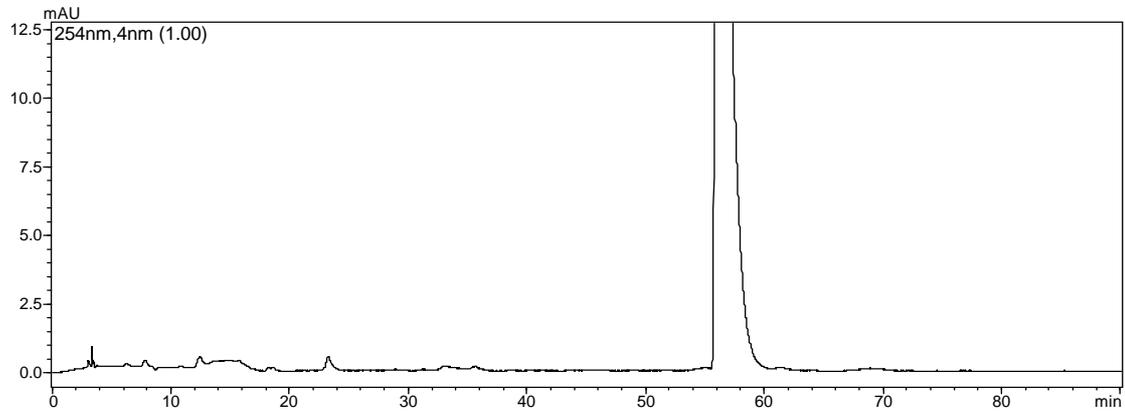


Área do pico da cafeína – 98,60 %

Fig. 39 – PC das frações diclorometano das amostras provenientes do Estado do Amazonas.

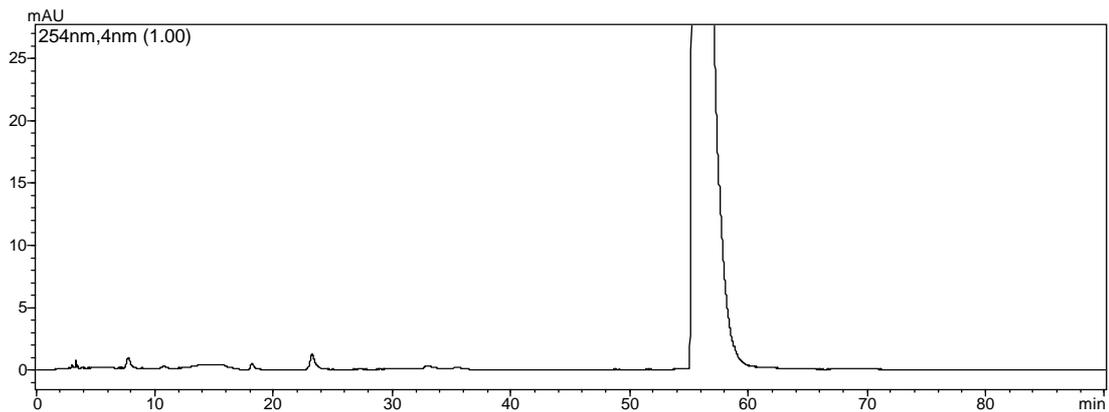
Amostras provenientes da Bahia

Amostra 20 - Valença



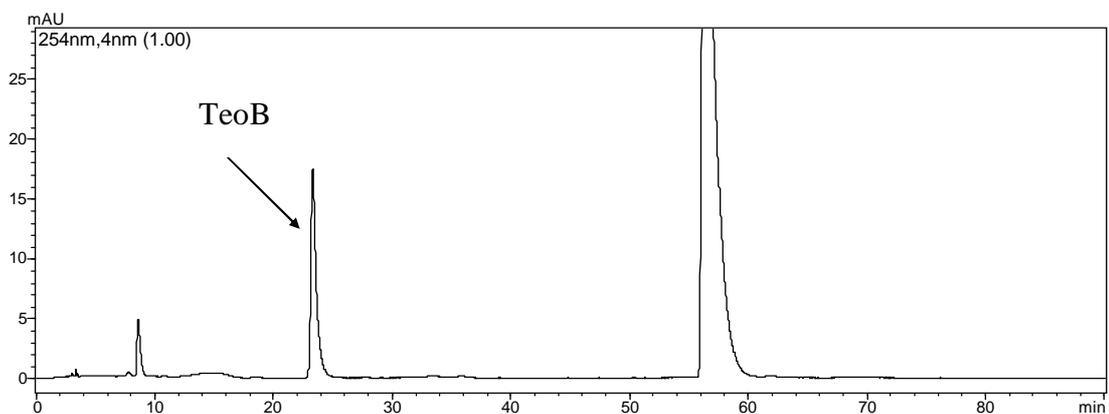
Área do pico da cafeína – 99,04 %

Amostra 21 - Valença



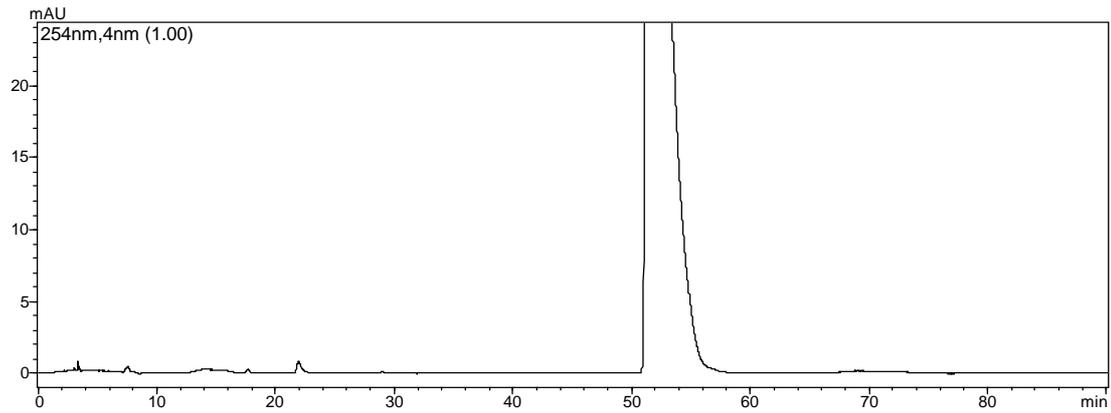
Área do pico da cafeína – 99,27 %

Amostra 29 - Ituberá



Área do pico da cafeína – 85,05 % e do pico em 23,29 min – 12,47 %

Amostra 32 - Ituberá

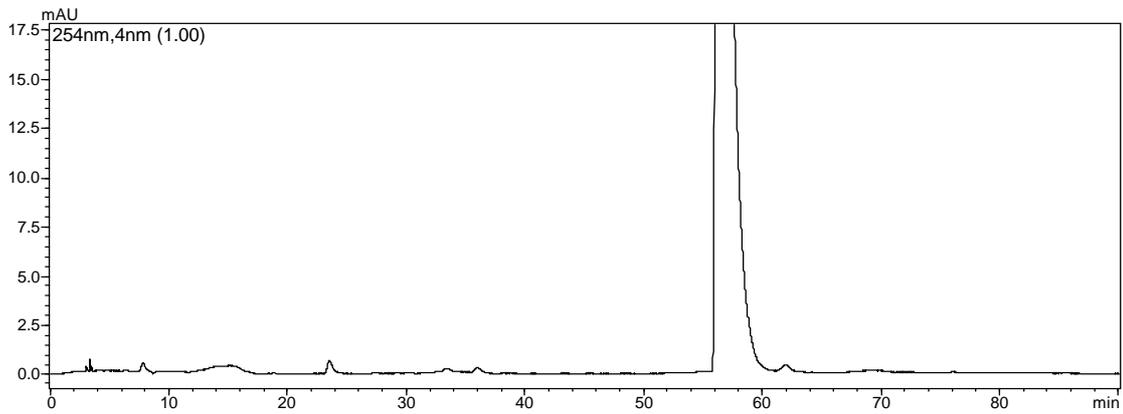


Área do pico da cafeína – 99,60 %

Fig. 40 – PC da fração diclorometano das amostras provenientes da Bahia.

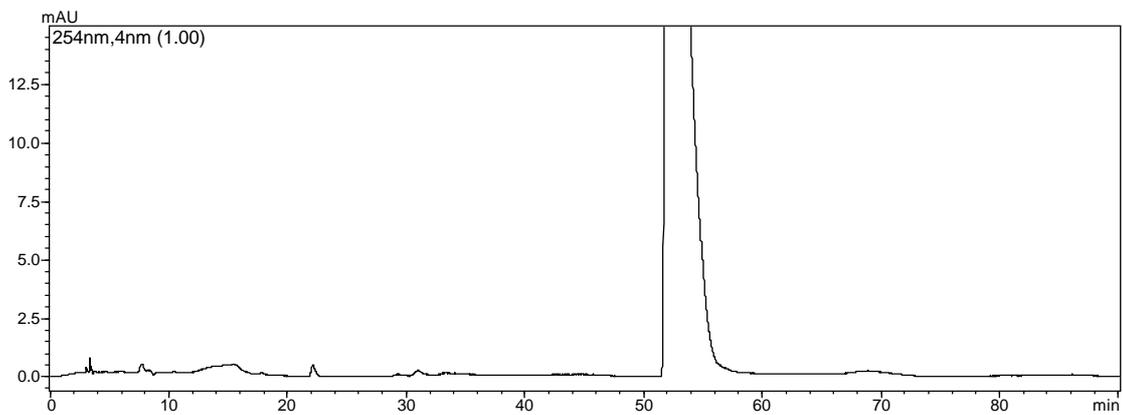
Amostras provenientes do Mato Grosso

Amostra 30 - Cuiabá



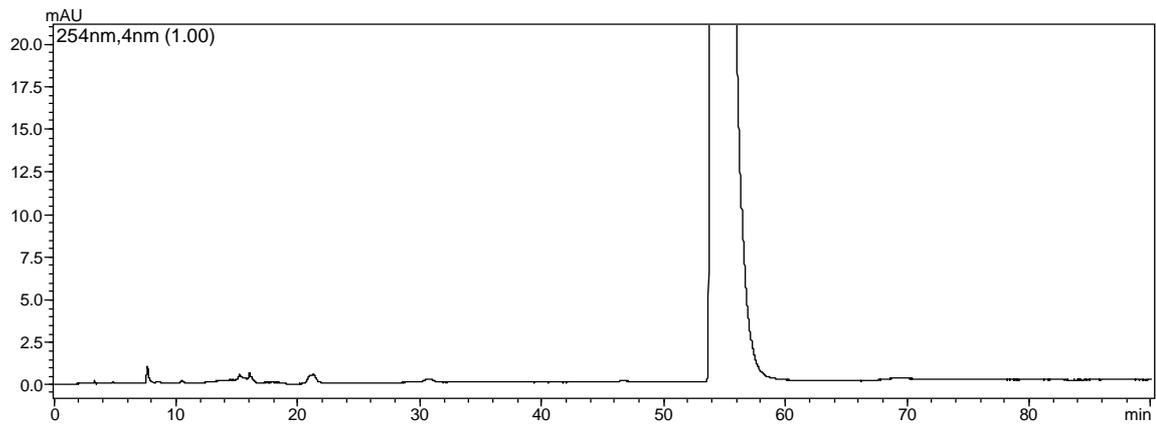
Área do pico da cafeína – 99,26 %

Amostra 31 - Cuiabá



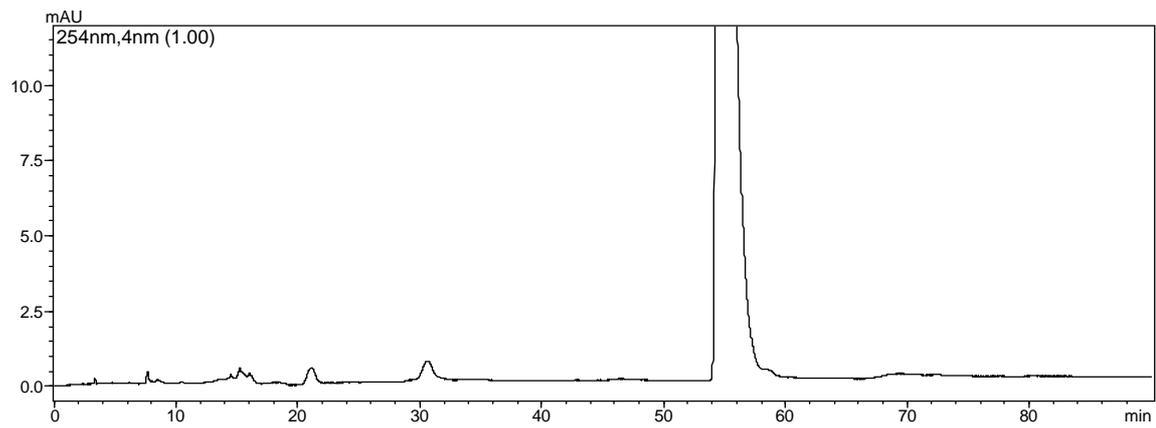
Área do pico da cafeína – 99,53 %

Amostra 33 – Alta Floresta



Área do pico da cafeína – 99,78 %

Amostra 34 – Terra Nova do Norte



Área do pico da cafeína – 99,00 %

Fig. 41 – PC da fração diclorometano das amostras 30, 31, 33 e 34 provenientes do Mato Grosso.

4.6 Determinação do teor de cafeína por CLAE nas amostras

Embora o método para obtenção do fingerprint desenvolvido neste trabalho não tenha visado à quantificação de cafeína e sim a extração e visualização do maior número de constituintes químicos, os cromatogramas obtidos tiveram seu teor de cafeína quantificado pela determinação das áreas dos picos de cafeína (em 272 nm) nas duas frações (DCM e MeOH/TFA). A figura 42 mostra a curva de calibração usada para esta quantificação.

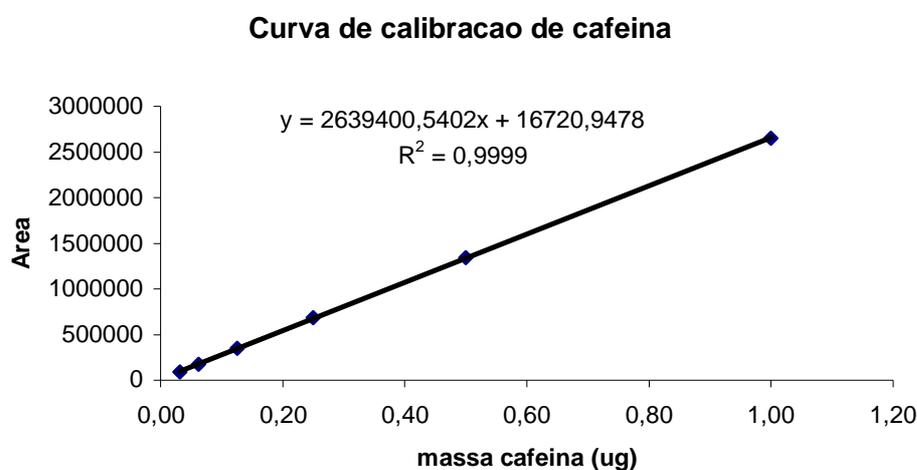


Fig. 42 – Curva de calibração da cafeína.

A média dos resultados obtidos para cada amostra de guaraná analisada é mostrada na Tabela 11. Observando-se os resultados obtidos nos diferentes Estados (AM, MT e BA) pode-se concluir que as amostras produzidas no Amazonas apresentam maior teor de cafeína. Belliaro, Martelli e Valle (1985), estudaram o conteúdo de cafeína por CLAE usando cinco procedimentos diferentes de extração e obtiveram resultados de 1,3 à 2,9 % de cafeína em amostra de guaraná em pó analisada, sendo o procedimento com maior rendimento obtido por refluxo (15 min) da solução aquosa acidificada. Os mesmos autores em seguida analisaram 5 amostras de guaraná em pó e obtiveram resultados de 2,95 à 3,75 % de cafeína. Segundo Ashihara e Crozier (apud TFOUNI *et al*, 2007), a quantidade de cafeína no guaraná em pó pode variar de acordo com a procedência da matéria-prima, método de cultivo, presença de contaminantes químicos e métodos de secagem. Tfouni *et al* (2007) analisaram treze marcas

de guaraná em pó, adquiridas no comércio de Campinas e Ribeirão Preto, SP e obtiveram resultados entre 1,41 e 2,87 % de cafeína.

Os resultados encontrados no estudo desenvolvido nesse trabalho variaram de 3,05 à 5,69 % sendo os maiores valores encontrados em amostras provenientes do Estado do Amazonas (Gráfico 2). Em 2002, Saldaña *et al* relataram conteúdo de 4,82 % de cafeína em amostra de sementes de guaraná fornecidas pela EMBRAPA - AM descafeinadas por extração supercrítica e analisadas por CLAE.

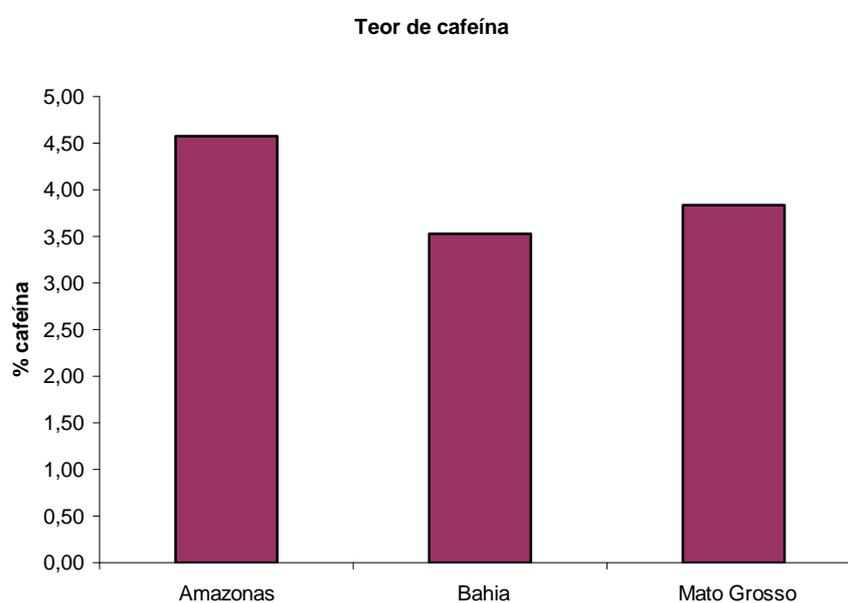


Gráfico 2 – Teor médio de cafeína nas amostras provenientes do Estado do Amazonas, Bahia e Mato Grosso.

Tabela 11 – Resultado da quantificação de cafeína das diferentes amostras de guaraná analisadas.

Amazonas																
Fração DCM								Fração MeOH/TFA						Resultados		
Am	PA (mg)	Área 1 (/4)	massa cafeína 1 (ug)	% cafeína 1	Área 2 (/4)	massa cafeína 2 (ug)	% cafeína 2	Área 1 (/4)	massa cafeína 1 (ug)	% cafeína 1	Área 2 (/4)	massa cafeína 2 (ug)	% cafeína 2	% cafeína 1	% cafeína 2	Média
10	50,0	5.220.086	1,97	1,18	5.708.775	2,16	1,29	15.610.454	5,91	3,54	14.726.524	5,57	3,34	4,73	4,64	4,68
11	50,0	2.351.440	0,88	0,53	2.722.091	1,02	0,62	11.950.092	4,52	2,71	10.364.067	3,92	2,35	3,24	2,97	3,11
12	50,0	2.521.231	0,95	0,57	2.280.653	0,86	0,51	17.257.601	6,53	3,92	16.093.648	6,09	3,65	4,49	4,17	4,33
13	50,0	1.321.845	0,49	0,30	3.261.361	1,23	0,74	21.485.562	8,13	4,88	18.153.173	6,87	4,12	5,18	4,86	5,02
14	50,0	4.349.571	1,64	0,99	3.326.425	1,25	0,75	19.462.081	7,37	4,42	19.700.526	7,46	4,47	5,41	5,23	5,32
15	50,0	6.451.016	2,44	1,46	2.893.432	1,09	0,65	19.869.196	7,52	4,51	20.901.803	7,91	4,75	5,98	5,40	5,69
16	50,0				5.418.903	2,05	1,23				12.221.973	4,62	2,77		4,00	4,00
17	50,0	7.535.187	2,85	1,71	4.961.434	1,87	1,12	14.652.523	5,55	3,33	16.704.805	6,32	3,79	5,04	4,92	4,98
18	50,0	3.412.254	1,29	0,77	3.716.450	1,40	0,84	17.646.177	6,68	4,01	17.215.981	6,52	3,91	4,78	4,75	4,77
19	50,0	1.546.001	0,58	0,35	2.611.058	0,98	0,59	16.240.128	6,15	3,69	14.985.363	5,67	3,40	4,04	3,99	4,01
28	50,0	6.815.108	2,58	1,55	5.895.144	2,23	1,34	15.486.085	5,86	3,52	14.245.165	5,39	3,23	5,06	4,57	4,82
35	50,0	1.744.134	0,65	0,39	1.616.700	0,61	0,36	17.162.632	6,50	3,90	16.204.739	6,13	3,68	4,29	4,04	4,17
Bahia																
Fração DCM								Fração MeOH/TFA						Resultados		
Am	PA (mg)	Área 1	massa cafeína 1 (ug)	% cafeína 1	Área 2	massa cafeína 2 (ug)	% cafeína 2	Área 1	massa cafeína 1 (ug)	% cafeína 1	Área 2	massa cafeína 2 (ug)	% cafeína 2	% cafeína 1	% cafeína 2	Média
20	50,0	1.670.782	0,63	0,38	1.890.144	0,71	0,43	13.889.125	5,26	3,15	13.189.127	4,99	2,99	3,53	3,42	3,48
21	50,0	4.940.178	1,87	1,12	5.968.267	2,25	1,35	13.010.049	4,92	2,95	10.136.615	3,83	2,30	4,07	3,65	3,86
29	50,0	2.007.503	0,75	0,45	2.499.749	0,94	0,56	12.560.132	4,75	2,85	9.842.683	3,72	2,23	3,30	2,80	3,05
32	50,0	4.924.791	1,86	1,12	5.665.294	2,14	1,28	12.087.766	4,57	2,74	10.082.409	3,81	2,29	3,86	3,57	3,72
Mato Grosso																
Fração DCM								Fração MeOH/TFA						Resultados		
Am	PA (mg)	Área 1	massa cafeína 1 (ug)	% cafeína 1	Área 2	massa cafeína 2 (ug)	% cafeína 2	Área 1	massa cafeína 1 (ug)	% cafeína 1	Área 2	massa cafeína 2 (ug)	% cafeína 2	% cafeína 1	% cafeína 2	Média
30	50,0	2.511.469	0,95	0,57	2.702.873	1,02	0,61	15.251.595	5,77	3,46	14.810.417	5,60	3,36	4,03	3,97	4,00
31	50,0	2.782.514	1,05	0,63	2.931.030	1,10	0,66	15.903.771	6,02	3,61	12.334.000	4,67	2,80	4,24	3,46	3,85
33	50,0	4.791.958	1,81	1,09	4.097.244	1,55	0,93	15.031.257	5,69	3,41	10.049.246	3,80	2,28	4,50	3,21	3,85
34	50,0	1.652.964	0,62	0,37	1.868.295	0,70	0,42	13.523.453	5,12	3,07	15.207.037	5,76	3,45	3,44	3,87	3,66

4.7 Avaliação da atividade antioxidante

Para comparar o poder antioxidante prepararam-se amostras de diferentes espécies, normalmente consumidas como bebidas: chá verde, chá preto, cevada, café, erva-mate e guaraná. Para o guaraná foram analisadas duas amostras, uma proveniente de Manaus cujas sementes foram secas ao sol, e a outra proveniente de Maués cujas sementes foram beneficiadas de modo tradicional, ou seja, torradas em fornos de barro (Figura 8).

Essa avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelos ensaios da medida da capacidade redutora de ferro (FRAP); sequestro de radicais de DPPH e determinação de fenólicos totais.

4.7.1 Quantificação de fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais foi determinada pela obtenção de uma curva de calibração do ácido gálico como pode ser vista na Figura 42. As amostras preparadas por infusão no dia do ensaio apresentaram resultados apresentados na Tabela 12, calculados em mg de ácido gálico/g de amostra.

Conc (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Média	DP	CV (%)
0,4	2,132	2,100	2,116	0,023	1,07
0,3	1,552	1,548	1,550	0,003	0,18
0,2	0,981	0,980	0,981	0,001	0,07
0,1	0,432	0,440	0,436	0,006	1,30
0,05	0,195	0,195	0,195	0,000	0,00

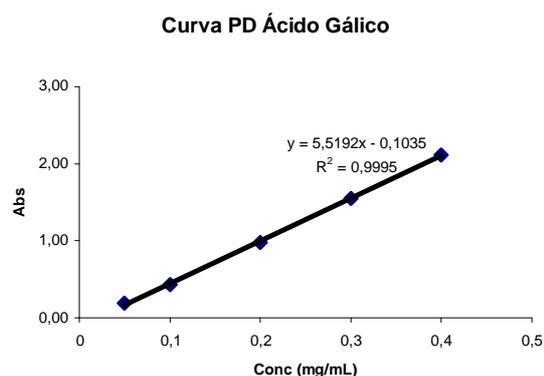


Gráfico 3 – Curva de calibração de ácido gálico no ensaio de fenólicos totais.

O teor de fenólicos totais para a amostra de guaraná proveniente de Manaus está de acordo com o resultado obtido por Majhenic, Skerget e Knez (2007), que obteve valores de 43 mg/g de amostra para um extrato aquoso obtido por extração com refluxo por 2h. Apesar das condições de extração bem mais brandas (infusão por 10 min) usadas neste experimento, os valores obtidos foram ligeiramente maiores, no caso da amostra de guaraná proveniente de

Manaus (47,3 mg/g), e bem maiores para a amostra proveniente de Maués (80,7 mg/g). Esta diferença entre os dois guaranás (claro e escuro) deve-se provavelmente à oxidação natural dos taninos (catequinas) à o-quinonas conforme descrito por Barreto e Ribeiro (2005) em seus estudos com o guaraná, o que explica o teor mais baixo de fenólicos totais no guaraná proveniente de Manaus.

Os resultados obtidos para o chá preto e chá verde estão um pouco abaixo dos relatados por outros autores (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN 2006), cujos menores valores encontrados foram de 62 e 61 mg/g matéria seca para o chá preto e chá verde respectivamente. A comparação dos teores de fenólicos totais de todas as amostras analisadas pode ser observada no Gráfico 4.

Tabela 12 – Teor de fenólicos totais em mg de ácido gálico/g de amostra.

Amostra	Conc (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Média	DP	CV (%)	Eq AG mg/g amostra
Guaraná Maués	1,25	0,444	0,462	0,453	0,013	2,810	80,7
Chá preto	1,25	0,287	0,282	0,285	0,004	1,243	56,2
Chá verde	1,25	0,307	0,306	0,307	0,001	0,231	59,4
Erva Mate	1,25	0,462	0,475	0,469	0,009	1,962	82,9
Café	2,5	0,462	0,449	0,456	0,009	2,018	40,5
Guaraná Manaus	2,5	0,538	0,560	0,549	0,016	2,834	47,3
Cevada	2,5	0,107	0,104	0,106	0,002	2,011	15,1

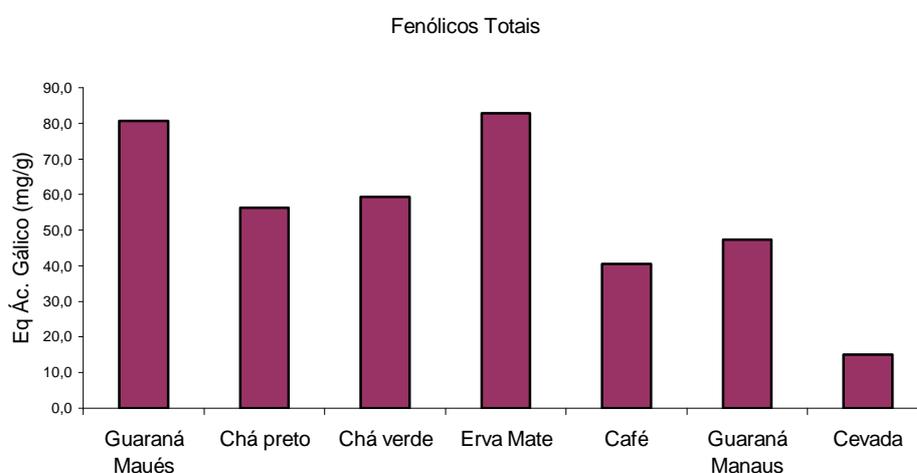


Gráfico 4 – Comparação do teor de fenólicos totais nas diferentes amostras analisadas.

4.7.2 Teste da capacidade redutora de ferro – FRAP

A medida da capacidade antioxidante pelo ensaio FRAP é baseado na capacidade de uma amostra reduzir íons de Fe^{3+} em Fe^{2+} . A atividade antioxidante de uma amostra é proporcional a sua capacidade em se oxidar, conseqüentemente promovendo a redução de outra semi-reação. A quantificação é realizada baseada na construção de uma curva de calibração de sulfato ferroso (Tabela 13) que pode ser observada no Gráfico 5.

Tabela 13 – Dados da curva de calibração com sulfato ferroso no ensaio FRAP.

Conc (uM)	Abs 1	Abs 2	Média	DP	CV (%)
2000	1,257	1,241	1,249	0,011	0,906
1000	0,656	0,647	0,652	0,006	0,977
500	0,341	0,338	0,340	0,002	0,625
250	0,194	0,183	0,189	0,008	4,126
125	0,12	0,118	0,119	0,001	1,188

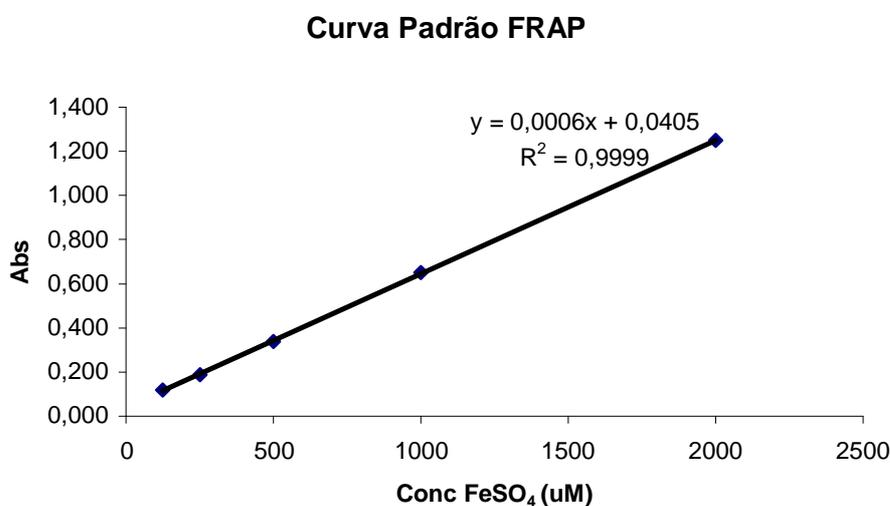


Gráfico 5 – Curva de calibração de sulfato ferroso no ensaio FRAP.

O resultado das avaliações das diferentes amostras pode ser visto na Tabela 14.

Tabela 14 – Atividade antioxidante de diferentes amostras pelo ensaio FRAP.

Amostra	Conc (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Média	DP	CV (%)	umol Fe(II)/g de amostra
Guaraná Maués	2,5	1,230	1,207	1,219	0,016	1,335	785,33
Chá preto	2,5	1,194	1,208	1,201	0,010	0,824	773,67
Chá verde	2,5	1,447	1,403	1,425	0,031	2,183	923,00
Erva Mate	2,5	1,035	1,001	1,018	0,024	2,362	651,67
Café	5	1,182	1,169	1,176	0,009	0,782	378,33
Guaraná Manaus	5	1,522	1,522	1,522	0,000	0,000	493,83
Cevada	10	0,384	0,381	0,383	0,002	0,555	57,00

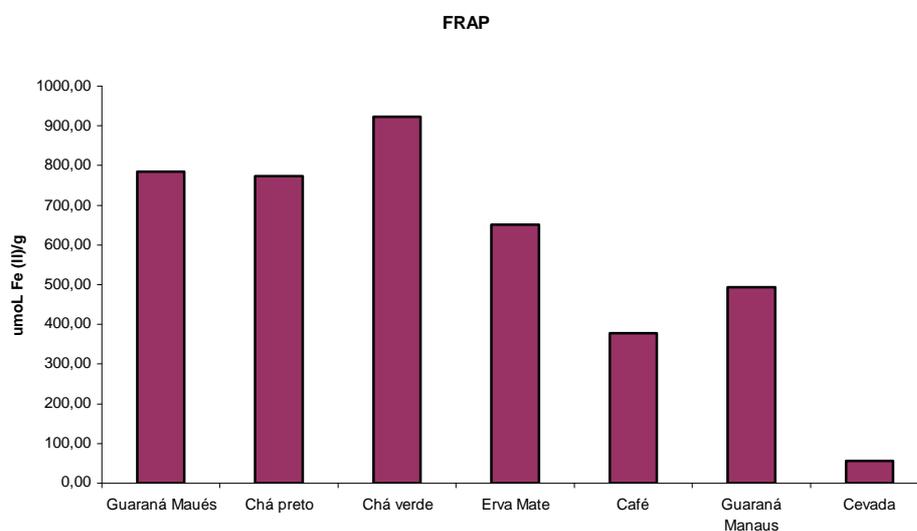


Gráfico 6 – Comparação da atividade antioxidante pelo ensaio FRAP das amostras.

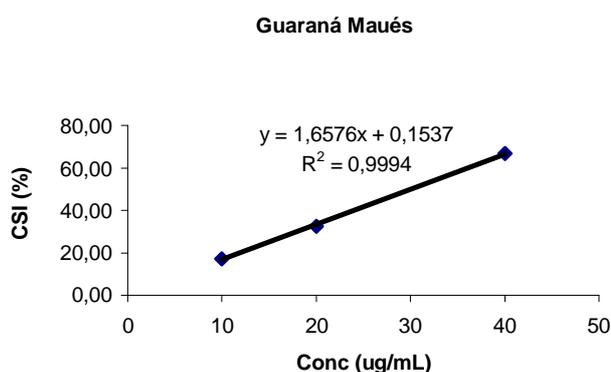
Dentre as amostras analisadas, o guaraná de Maués foi um dos mais ativos, resultado coerente com os resultados obtidos no ensaio de fenólicos totais. O chá verde, um reconhecido antioxidante natural, apresentou a maior atividade antioxidante entre todas as amostras. Novamente a amostra de guaraná de Manaus, seca ao sol, apresentou atividade antioxidante bem inferior (Gráfico 6).

4.7.3 Determinação da atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres DPPH

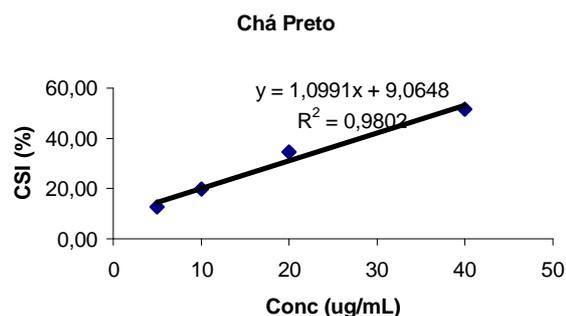
Os radicais livres são um dos principais responsáveis pelas reações de oxidação indesejadas que levam à processos degenerativos em sistemas biológicos. Antioxidantes capazes de seqüestrar radicais livres vêm sendo estudados pelo ensaio com o radical DPPH pela facilidade de realização.

O ensaio foi realizado a partir de diferentes concentrações da solução mãe de cada amostra, preparadas por diluições, medidas as absorbâncias e calculadas a porcentagem de inibição de radicais livres de DPPH. Os resultados estão expressos nos gráficos e tabelas abaixo (Gráfico 7).

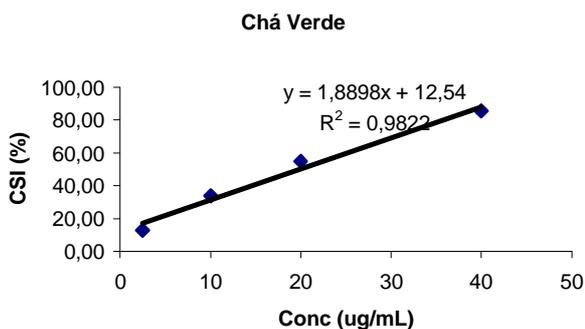
Guaraná Maués				
Conc (ug/mL)	Abs	Branco	Controle	CSI %
40	0,655	0,005	1,952	66,70
20	1,321	0,005	1,952	32,58
10	1,621	0,005	1,952	17,21



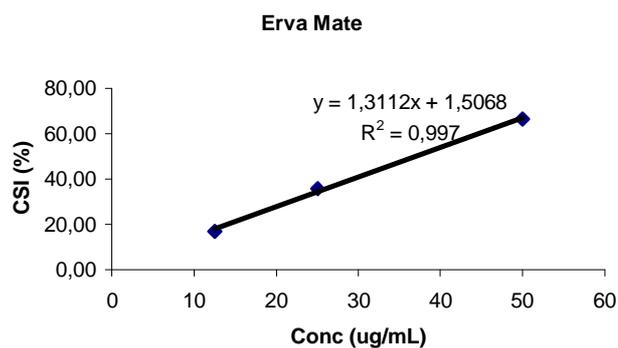
Chá Preto				
Conc (ug/mL)	Abs	Branco	Controle	CSI %
40	0,859	0,009	1,755	51,57
20	1,158	0,009	1,755	34,53
10	1,416	0,009	1,755	19,83
5	1,540	0,009	1,755	12,76



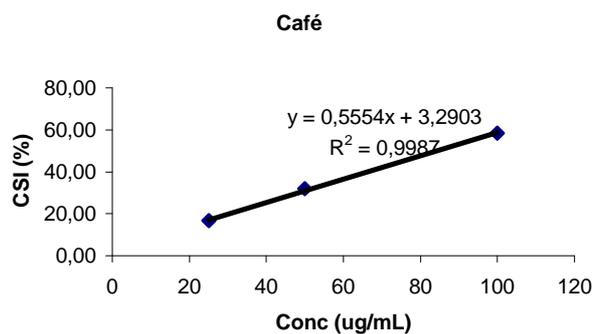
Chá Verde				
Conc (ug/mL)	Abs	Branco	Controle	CSI %
40	0,252	0,006	1,699	85,52
20	0,771	0,006	1,699	54,97
10	1,133	0,006	1,699	33,67
2,5	1,484	0,006	1,699	13,01



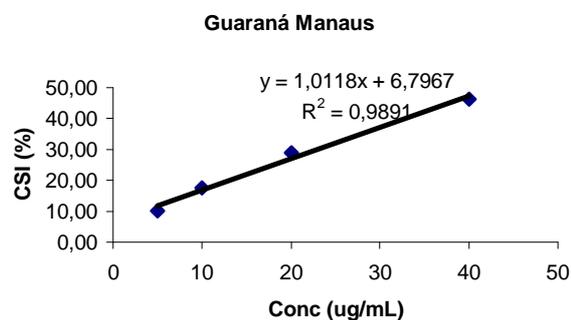
Erva Mate				
Conc (ug/mL)	Abs	Branco	Controle	CSI %
50	0,555	0,011	1,626	66,54
25	1,054	0,011	1,626	35,85
12,5	1,363	0,011	1,626	16,85



Café				
Conc (ug/mL)	Abs	Branco	Controle	CSI %
100	0,705	0,031	1,626	58,55
50	1,138	0,031	1,626	31,92
25	1,387	0,031	1,626	16,61



Guaraná Manaus				
Conc (ug/mL)	Abs	Branco	Controle	CSI %
40	1,040	0,009	1,921	46,33
20	1,373	0,009	1,921	29,00
10	1,592	0,009	1,921	17,60
5	1,735	0,009	1,921	10,15



Cevada				
Conc (ug/mL)	Abs	Branco	Controle	CSI %
100	1,717	0,016	1,969	13,61
10	1,911	0,016	1,969	3,76
1	1,939	0,016	1,969	2,34

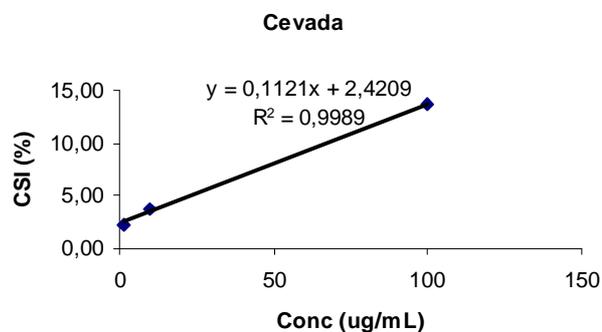


Gráfico 7 – Gráficos dos resultados da atividade antioxidante pelo ensaio DPPH das diferentes amostras.

Através da equação da reta de cada amostra foram calculados os valores de CS₅₀ em µg de amostra (quantidade de amostra necessária para seqüestrar 50 % dos radicais livres de DPPH). Os resultados estão expressos na tabela 15.

Tabela 15 – Resultados da atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH

Amostra	CS50 (µg/mL)	R (%)	CS50 (µg am/mL)
Guaraná Maués	30,07	28,87	104,16
Chá preto	37,24	20,07	185,55
Chá verde	19,82	21,57	91,89
Erva Mate	36,98	29,73	124,39
Café	84,10	28,91	290,90
Guaraná Manaus	42,69	26,81	159,23
Cevada	424,43	55,75	761,31

Os resultados encontrados para as amostras de guaraná estão de acordo com os achados por Majhenic, Skerget e Knez, (2007) em seus extratos aquosos obtidos a temperatura ambiente e ebulição. Entre as amostras de guaraná analisadas neste trabalho, pode-se confirmar uma maior atividade seqüestrante de radicais livres para a amostra proveniente Maués, processada pelo modo tradicional e de coloração mais clara. Estes resultados também estão de acordo com os obtidos para fenólicos totais e FRAP. Dentre as amostras analisadas o chá verde se confirmou como o de maior poder antioxidante pelo sequestro de radicais seguido do guaraná de Maués, erva-mate, guaraná de Manaus, chá preto, café e cevada (Gráfico 8).

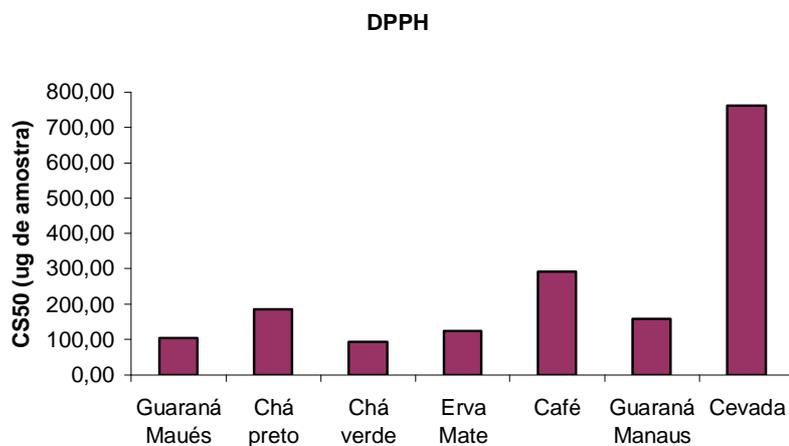


Gráfico 8 – Comparação dos resultados do ensaio DPPH.

Com o intuito de verificar uma possível correlação entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante das amostras, foram construídos gráficos relacionando esses dois resultados para as análises de DPPH e FRAP. O Gráfico 9 apresenta a correlação entre o teor de fenólicos totais e o FRAP onde se podem diferenciar dois grupos, o do chá verde e chá preto, com dados acima da reta, e outro grupo com o guaraná de Maués e erva mate, com resultados abaixo da reta.

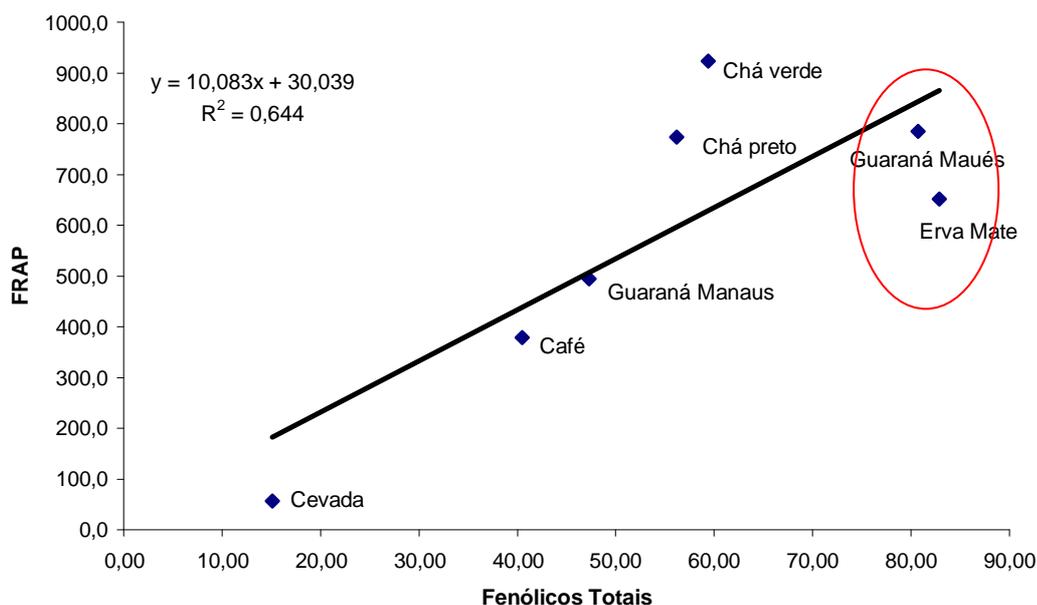


Gráfico 9 – Relação entre teor de fenólicos totais e FRAP das amostras analisadas.

Observou-se que as amostras de guaraná de Maués e de erva mate possuem um teor de fenólicos totais superior ao seu poder antioxidante. Normalmente observa-se uma maior linearidade entre os resultados dessas duas análises, pois a atividade antioxidante normalmente deve-se a presença de compostos fenólicos.

No caso da análise da correlação entre a quantificação de fenólicos totais das amostras analisadas e a capacidade de seqüestro de radicais de DPPH também se observou um fenômeno semelhante, com as amostras de guaraná de Maués e erva mate com um teor superior a sua capacidade antioxidante.

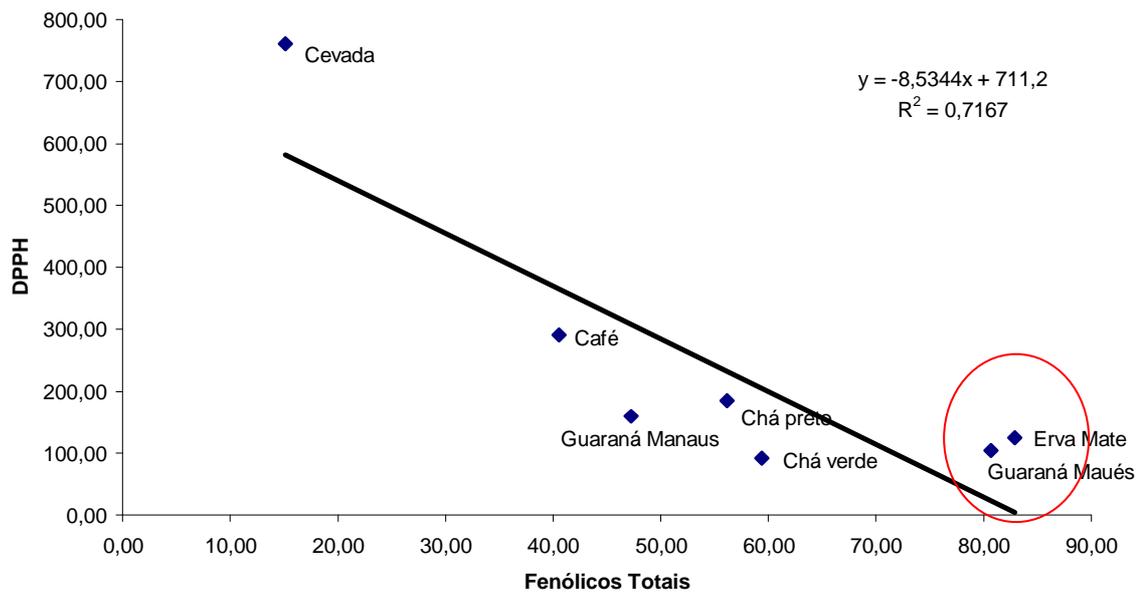


Gráfico 10 – Relação entre teor de fenólicos totais e DPPH.

Resultados publicados em literatura mostraram que para o chá verde e preto existe uma correlação entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais (SEERAM, *et al.* 2006). Novamente os valores encontrados para o guaraná de Maués e erva mate sugerem que a atividade antioxidante não está totalmente relacionada ao teor de fenólicos totais e é inferior a esperada.

CONCLUSÃO

O método de análise do guaraná, pela obtenção do perfil cromatográfico desenvolvido nesse trabalho, se mostrou bastante reprodutível e eficiente como método de controle de qualidade por permitir a identificação dos principais constituintes químicos (5 marcadores químicos) e não somente da cafeína. Além disso, o método se torna extremamente útil na detecção de possíveis adulterações visto que das 20 amostras analisadas todas apresentaram praticamente o mesmo PC, sendo possível o estabelecimento do “fingerprint” característico do guaraná.

Adicionalmente o método se mostrou eficaz para a determinação do teor de cafeína nas amostras, através da quantificação nas duas frações (DCM e MeOH/TFA) e demonstrou que a extração e análise apenas da fração DCM não é suficiente para determinação do teor de cafeína nas amostras. Embora não tenha sido possível estabelecer diferenças qualitativas nos PCs das amostras analisadas, ficou claro que existem diferenças quantitativas de cafeína por região, sendo as amostras provenientes do estado do Amazonas as que apresentaram maiores teores de cafeína.

Com relação à atividade antioxidante, dentre as espécies analisadas, a amostra de guaraná proveniente de Maués apresentou capacidade antioxidante, pelos dois métodos empregados, bastante elevada e inferior somente ao chá verde sendo, a comparação feita nesse trabalho, inédita. A análise das duas amostras de guaraná para conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante, demonstrou resultados bem superiores para guaraná proveniente de Maués, beneficiado tradicionalmente e de coloração bem mais clara que o guaraná proveniente de Manaus, seco ao sol, o que sugere que o processo de secagem ao sol e/ou a torrefação excessiva favorecem a oxidação dos compostos fenólicos, originando um produto mais escuro (presença de o-quinonas) e com significativa perda da atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Edith Ewerton. **Guaraná**. Ministério da Agricultura: IBGE, 1953.

ANGELUCCI, Eidiomar; *et al.* Caracterização química da semente de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Ducke). **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 56, p. 183-192, 1978.

ARNT, R. Tesouro Verde. **Revista Exame**, São Paulo, n. 28, p. 53-65, maio de 2001.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, 99, p. 191-203, 2006.

BARATA, L.E.S. **Produtos da Biodiversidade Amazônica**. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/amazonia/amaz22.htm>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2006.

BARRETO, D. W.; RIBEIRO, B. D. Evaluation of Oxidation Processes of Guarana Tannins. In: 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 2005, Angra dos Reis. Proceedings of the 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 2005.

BASILE, Adriana; *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.

BELLIARDO, F.; MARTELLI, A.; VALLE, M.G. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (Guarana) and *Cola spp.* samples. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, 180, p. 398-401, 1985.

BENONI, Heiz; DALLAKIAN, Paul; TARAZ, Kambiz. Studies on the essential oil from guarana. **Z Lebensm Unters Forsch.** v. 203, p. 95-98, 1996.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p.70-76, 1996.

BRACA, A. *et al.* Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 379-381, 2002.

CABRITA, Maria João; SILVA, Jorge Ricardo; LAUREANO, Olga. Os compostos fenólicos das uvas e dos vinhos. In: Seminário Internacional de Vitivinicultura, I., 2003, Ensenada, México. Rede Iberoamericana de Vitivinicultura. Disponível em: <www.isa.utl.pt/riav/Memoria>. Acesso em: 05 de novembro de 2007.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

CHOI, Hyung-Kyoon. *et al.* Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by ¹H NMR and multivariate analysis technique. **Phytochemistry**, v. 65, p. 857-864, 2004.

CIOLA, Remolo. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho – HPLC**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 1998.

CORRÊA, Manuel Pio. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. III, 1984.

DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2001.

DIMITRIOS, Boskou. Sources of natural phenolic antioxidants. **Food Science & Technology**, v. 17, p. 505-512, 2006.

EDWARDS, Howell G.M. *et al.* FT-Raman spectroscopic studies of guaraná and some extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 532, p.177-186, 2005.

EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL. **Agricultura Familiar na Amazônia Brasileira: Clones de guaraná – Tecnologia Sustentável para a Amazônia**. Manaus. 2002.

ERICKSON, H.T.; CORRÊA, Maria Pinheiro F.; ESCOBAR, José Ricardo. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a Commercial Crop in Brazilian Amazônia. **Economic Botany**, v. 38, p. 273-286, 1984.

ESPINOLA, E.B. *et al.* Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 223-239, 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3. ed. São Paulo: Andrei Editora S.A., 1997.

FGV/ISAE. Projeto Potencialidades Regionais – Estudo de Viabilidade Econômica: Guaraná. Manaus. Julho de 2003.

FUKUMASU, H. *et al.* Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 862-867, 2006.

GABRIELSSON, J.; LINDBERG, N.O.; LUNDSTEDT, T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. **Journal of Chemometrics**, v. 16, p. 141-160, 2002.

GONG, Fan. *et al.* Correction of retention time shifts for chromatographic fingerprints of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1029, p. 173-183, 2004.

GONZÁLEZ-ARJONA, D.; GONZÁLEZ, A.G. Adaptation of linear discriminant analysis to second level-pattern recognition classification. **Analytica Chimica Acta**, v. 363, p. 89-95, 1998.

HOSTETTMAN, Kurt; QUEIROZ, Emerson F.; VIEIRA, Paulo C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

LEITE, Flávio. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Editora Átomo, 2002.

LIMA, Waldecir L. *et al.* Lipid metabolism in trained rats: Effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 1019-1028, 2005.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAGNA, Adriana. *et al.* Comparative Study of Two Spectrophotometric Reagents for Catechol Analysis in Guaraná Seeds Powder. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 01, p. 129-132, 2003.

MAJHENIC, Lucija; SKERGET, Mojca; KNEZ, Zeljko. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seeds extracts. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1258-1268, 2007.

MARAVALHAS, Nelson. **Estudos sobre o guaraná e outras plantas produtoras de cafeína**. Manaus: Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1965.

MARIA, Carlos A.B. de; MOREIRA, Ricardo F.A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, p. 99-105, 2007.

MARX, Friedhelm. Analysis of guarana seeds: II. Studies on the composition of the tannin fraction. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Springer Verlag, 1990.

MARX, F.; FABRICIUS, H. Zur Analytik von Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, 93 (6), 1997.

MARX, Friedhelm; PFEILSTICKER, Konrad; MAIA, José Guilherme Soares. Zur Analytik von Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Deutsche Lebensmittel Rundschau**. v. 81 (12), p. 390-392, 1985.

MATTEI, R. *et al.* Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-116, 1998.

MDIC/SUFRAMA. **Projeto Potencialidades Regionais - Estudo de Viabilidade Econômica: Guaraná**, Manaus, v.6, 2003.

MAPA. Decreto n. 2.314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. In: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 5 de novembro de 2007.

MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA. **Produtos Potenciais da Amazônia**. v. 6, Brasília, 1998.

MONTEIRO, Mário Ypiranga. **Antropogeografia do guaraná** - Cadernos da Amazônia, 6. Manaus: Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1965.

MORS, Walter B.; RIZZINI, Carlos Toledo; PEREIRA, Nuno Alvares. **Medicinal Plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, Inc., 2000.

NEDERKASSEL, A.M, van. *et al.* Development of a *Ginkgo biloba* fingerprint chromatogram with UV and evaporative light scattering detection and optimization of the evaporative light scattering detector operating conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, p. 230-239, 2005.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. 17. ed. USA: Ed. AOAC International.

OSAKABE, N. *et al.* Antioxidative Polyphenolic Substances in Cacao Liquor. In: Caffeinated Beverages. ACS Symposium Series, v. 754, 2000.

PINTO, Marco Antônio Rodrigues. Guaraná: Alguns aspectos da Produção e da Comercialização. **Revista de Política Agrícola**, n. 01, ano VII, 2003.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

RIBEIRO, José Eduardo L. da S. *et al.* **Flora da Reserva Ducke**: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999.

SALDAÑA, M.D.A.; *et al.* Decaffeination of guaraná seeds in microextraction column using water-saturated CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, 22, p. 119-127, 2002.

SCHANEBERG, Brian T. *et al.* The role of chemical fingerprinting: application to *Ephedra*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 911-918, 2003.

SEERAN, Navindra P.; *et al.* Catechin and Caffeine Content of Green Tea Dietary Supplements and Correlation with Antioxidant Capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1599-1603, 2006.

SILVA, W. Gomes da; CORTESI, N.; ROVELLINI, P. Satere Mawe guarana of the Brazilian Amazon. Note 1. Chemical and physical characterization. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 77 (1), p. 31-36, 2000.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; GLAJCH, Joseph L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1997.

SUFRAMA HOJE. **Produtos regionais conquistam mercado internacional**. Manaus: Editora da Suframa, Agosto 2005. Disponível em: <http://www.suframa.gov.br/suf_suframa hoje.cfm>. Acesso em: 18 fev. 2006.

TFOUNI, S.A.V.; *et al.* Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Revista de Nutrição**, 20(1), p. 63-68, 2007.

TSAI, Pi-Jen *et al.* Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, v. 35, p. 351-356, 2002.

USHIROBIRA, Tânia Maria Antonelli. **Estudo químico, avaliação microbiológica e toxicológica pré-clínica de extratos de sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke Guaraná.** Maringá: UEM, 2003. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Ciências Farmacêuticas, 2003.

USHIROBIRA, T.M.A.; *et al.* Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23 (3), p. 383-386, 2004.

VELIOGLU, Y.S.; *et al.* Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

WONG, Shih Peng; LEONG, Lai Peng; KOH, Jen Hoe William. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, p. 775-783, 2006.

WANG, Huafu; HELLIWELL, Keith; YOU, Xiaoqing. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v. 68, p. 115-121, 2000.

WECKERLE, Caroline; STUTZ, Michael A.; BAUMANN, Thomas W. Purine Alkaloids in *Paullinia*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 735-742, 2003.

WECKERLE, Bernhard; RICHLING, Elke; SCHREIER, Peter. Authenticity Assessment of Guarana Products (*Paullinia cupana*) by Caffeine Isotope Analysis. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 98 (4), p. 122-124, 2002.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

YANG, Li-Wei; *et al.* Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1070, p. 35-42, 2005.