

ISOLAMENTO DO PIGMENTO VERMELHO NATURAL DO PÓ DE  
GUARANÁ E DOSEAMENTO DE CAFEÍNA NO  
EXTRATO CLOROFÓRMICO

Antônia Mattos Simão <sup>1</sup>

José Muradian <sup>2</sup>

João Pessoa de Paula Carvalho <sup>3</sup>

INTRODUÇÃO

O grande interesse pelo guaraná (*Paullinia cupana*) surgiu, justamente, quando se conseguiu isolar, a partir das sementes desse arbusto, um princípio ativo, a guaranina (cafeína).

Segundo LEBEAU & col. (1956), a cafeína age sobre o sistema nervoso e aparelho circulatório. Estudos mais recentes com relação à patologia animal e à ingestão de altas doses de cafeína foram realizados, principalmente, por WURZNER & col. (1977).

O pó de guaraná tem sido utilizado como substância miraculosa, segundo a crença popular. Sabe-se que o es-

---

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

<sup>2</sup> Instituto de Química, USP.

<sup>3</sup> Faculdade de Saúde Pública, USP.

tado de bem-estar e euforia ocasionado pela ingestão do pó de guaraná provém da cafeína, em virtude de sua atuação sobre o sistema nervoso. Enquanto a semente de café pode apresentar de 0,5 a 1,2% p/p de cafeína, a semente de guaraná pode apresentar de 3,3 a 6,5% p/p (LOPES, 1968).

A semente do guaraná, geralmente, é comercializada na forma de pó, comprimidos e bastão.

O uso indiscriminado de guaraná pode acarretar danos à Saúde Pública, tendo em vista as altas doses de cafeína que podem ser ingeridas por pessoa, diariamente. Por exemplo, tivemos oportunidade de analisar comprimidos de guaraná comercializados e verificamos que o peso médio dos comprimidos era de 0,573 g e que 100 g do pó apresentava 3,500 g de cafeína, correspondendo, portanto, a 20,0 mg de cafeína por comprimido. Todavia, segundo a rotulagem ou embalagem: "devem ser ingeridos dois comprimidos diários", portanto, 40,0 mg de cafeína.

"100 ml de refrigerante de guaraná devem conter, 6 mg (máximo) a 0,6 mg (mínimo) de cafeína"\*\*. Desta forma, nos produtos de guaraná comercializados estão sendo recomendadas quantidades de guaraná a serem ingeridas, que podem conter até, quase, 6 vezes mais cafeína do que o estabelecido pela legislação.

Pesquisas realizadas em diferentes órgãos oficiais nos levam a concluir que a produção de guaraná não atende à demanda, o que nos induz a supor a existência efetiva de fraude no preparo do pó de guaraná. Esta afirmativa é ainda apoiada no fato de que grande volume de análises oficiais tem condenado esses produtos.

---

\* Ministério da Agricultura. Decreto-Lei nº 73.267 de 06 de dezembro de 1973.

\*\* Ministério da Agricultura. Portaria 902, de 26 de de-

O teor de caféina no pó de guaraná, estipulado por lei, não é suficiente para testar seu grau de pureza, pois, ela pode ser perfeitamente adicionada. Pela análise microscópica, embora se determine a presença de elementos histológicos, constata-se também a presença de outras substâncias estranhas, o que não é suficiente para condenar o produto. Há, portanto, necessidade de se pesquisar, por métodos químicos, os componentes secundários do guaraná. Entre estes, o que figura no primeiro livro de técnica do INST. ADOLFO LUTZ (1951), é o pigmento vermelho natural, que dá coloração ao extrato de guaraná, matéria prima usada no fabrico do refrigerante.

Este pigmento vermelho, segundo CAGNO (1950), seria o mesmo da noz de cola (cola nítida ou Cola acuminata) estudada por GORIS (1949). FREUDENBERG e col. (1949) concluíram que o composto isolado por GORIS (1949) seria a d-catequina, juntamente com o epicatecol impuros, que sofreriam oxidações enzimáticas (diástase), dando o vermelho de cola.

HAUASHI (1962) afirma que as catequinas e outros flavonóis e flavonoides têm inúmeras aplicações técnicas.

Pelo exposto, verifica-se que o pó de guaraná não corresponde às características necessárias para ser comercializado como alimento e não atende às recomendações da Farmacopéia Brasileira para ser registrado como medicamento.

Tendo em vista que o pigmento é um componente natural do pó e do extrato de guaraná, a determinação de sua presença, confirma a existência de extrato de guaraná nos refrigerantes comercializados e produtos afins, bem como a pureza do pó de guaraná.

Este trabalho tem como objetivo o isolamento do pigmento vermelho natural a partir do pó de guaraná e a tentativa de sua elucidação estrutural através de aplicação de métodos para a determinação de estrutura de subs-

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Ensaio preliminares**

Tentamos isolar os constituintes do pô de guaraná, utilizando os solventes antes testados por CAGNO (1950) e os métodos da figura 1, de GOTTLIEB, para pesquisa de substâncias naturais, que foram os seguintes:

- cromatografia em coluna
- percolação fracionada
- extração contínua.

OPERAÇÃO	MÉTODOS	
	CLÁSSICOS	MODERNOS
1) Isolamento da Substância	Extração contínua Percolação Fracionada	Físico Cromatografia
2) Verificação da Pureza	Determinação do Ponto de Fusão	Físico Cromatografia
3) Determinação da Fórmula Molecular	Composição Elementar por Análise de Combustão	
4) Determinação dos Grupos Funcionais		Espectrometria - no ultravioleta - no infravermelho - de massa
5) Determinação do Esqueleto		- de ressonância magnética nuclear
6) Determinação da Fórmula Estrutural		
7) Determinação da Fórmula Espacial		Espectrometria - de ressonância magnética nuclear.

FIGURA 1. Métodos de determinação de Estrutura de Subs -

## Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna, mesmo empregando-se materiais diferentes em seu empacotamento, não nos forneceu resultados satisfatórios. Partimos para os métodos clássicos indicados pela FARM. BRAS. I (1929), percolação fracionada e extração contínua.

## Percolação fracionada

Especialmente recomendada para drogas que contêm princípios voláteis ou constituintes facilmente alteráveis pela ação do calor.

Foram utilizados respectivamente 5 g, 3 g e 2 g de pó de guaraná em três percoladores. Os solventes empregados foram éter etílico, clorofórmio e álcool etílico - contendo 3% de HCl concentrado.

## Líquido extrator-éter etílico

No primeiro percolador contendo 5 g de pó de guaraná foram colocados 80 ml de éter etílico. O material permaneceu em contato com o solvente 24 horas, após as quais foram retirados 60 ml para o segundo percolador, o volume do primeiro percolador foi completado para 80 ml, o tempo de permanência do solvente com 3 g de guaraná, também de 24 horas, findas as quais retirou-se o volume de 40 ml que se introduziu no terceiro percolador contendo 2 g do material, completando-se novamente o volume do segundo percolador com 60 ml do líquido extrator do primeiro. A operação continuava em reciclagem até que o líquido colhido no terceiro percolador (30 ml) se tornava incolor, pois, as primeiras porções eram verdes.

## Líquido extrator clorofórmio

(Procedimento semelhante ao do primeiro líquido extrator)

O extrato clorofórmico, retirado do terceiro percolador contendo cafeína, era controlado por cromatografia em camada delgada, após ser reduzido a um volume de 10 ml.

Empregava-se o seguinte sistema:

**Adsorvente:** sílica gel G segundo STAHL (tipo 60) para cromatografia em camada delgada.

**Fase móvel:** n-butanol saturado de água e HCl conc. na proporção de 9:1 de acordo com LEDERER (1953).

**Revelador:** Reagente de Draggendorff, FARM. BRAS. II (1959).

Os volumes dos extratores colocados nas placas cromatográficas, por seringas micrométricas variavam de 50  $\mu$ l (inicialmente) até 250  $\mu$ l de acordo com os extratos recolhidos, para se verificar o esgotamento do alcalóide no líquido extrator. Como padrão utilizavam-se 50  $\mu$ l de uma solução clorofórmica de cafeína de concentração de 1 mg/100 ml.

As manchas de cafeína apresentavam coloração vermelha intensa.

### **Líquido extrator-álcool etílico contendo 3% de HCl concentrado**

(Processo também semelhante ao com éter etílico).

Inicialmente obtinha-se um líquido vermelho (coloração bordeaux) e esgotava-se o material do 3º percolador até se obter uma solução ligeiramente colorida. As soluções eram reunidas, evaporadas a vácuo até um volume bastante reduzido, no qual se juntava água destilada a mais ou menos 10°C e obtinha-se um precipitado de coloração marrom, filtrado a vácuo, lavado com água destilada

álcool etílico - P.A., seguido por evaporação do solvente em Erlenmeyer fechado com dois tubos, um dos quais se adaptava ao ar comprimido, até se obter um determinado volume. O restante do solvente era eliminado em dessecador a vácuo.

### Extração contínua

Partimos de 10 g do pó adaptadas em cartuchos no aparelho de soxhlet e aplicamos os mesmos solventes do processo anterior, assim como os mesmos critérios anteriores de controle dos extratos obtidos. Mas, a precipitação do corante era realizada em B.M. (banho-maria a 100°C), assim como a concentração das soluções obtidas por esgotamento do aparelho de soxhlet.

Os espectros na região do infravermelho do corante obtido tanto por percolação fracionada como por extração contínua (método aplicado no caso de substâncias termoes-táveis) foram idênticos (figura 5, espectro 3 e figura 6, espectro 4 em nujol). Concluimos, portanto, que o método por extração contínua seria de melhor aplicação, pois, fornecia uma maior quantidade de pigmento vermelho e nos dava ensejo de obter a cafeína em alto grau de pureza, de acordo com o espectro obtido na região do ultravioleta.

Finalmente temos a figura 7 espectro 5 em KBr do pigmento vermelho, apenas lavado com água destilada, já que não foi possível recristalizá-lo, por dissolução em álcool e reprecipitação em água destilada, o que naturalmente deveria ocorrer.

Com relação ao pigmento vermelho, os espectros no ultravioleta, antes e depois da cromatografia (as manchas eram reapadas e eluídas em álcool etílico contendo 3% de HCl concentrado), foram semelhantes (espectros 1 e 2, figura 2).

Concluimos, portanto, que a substância se apresen-

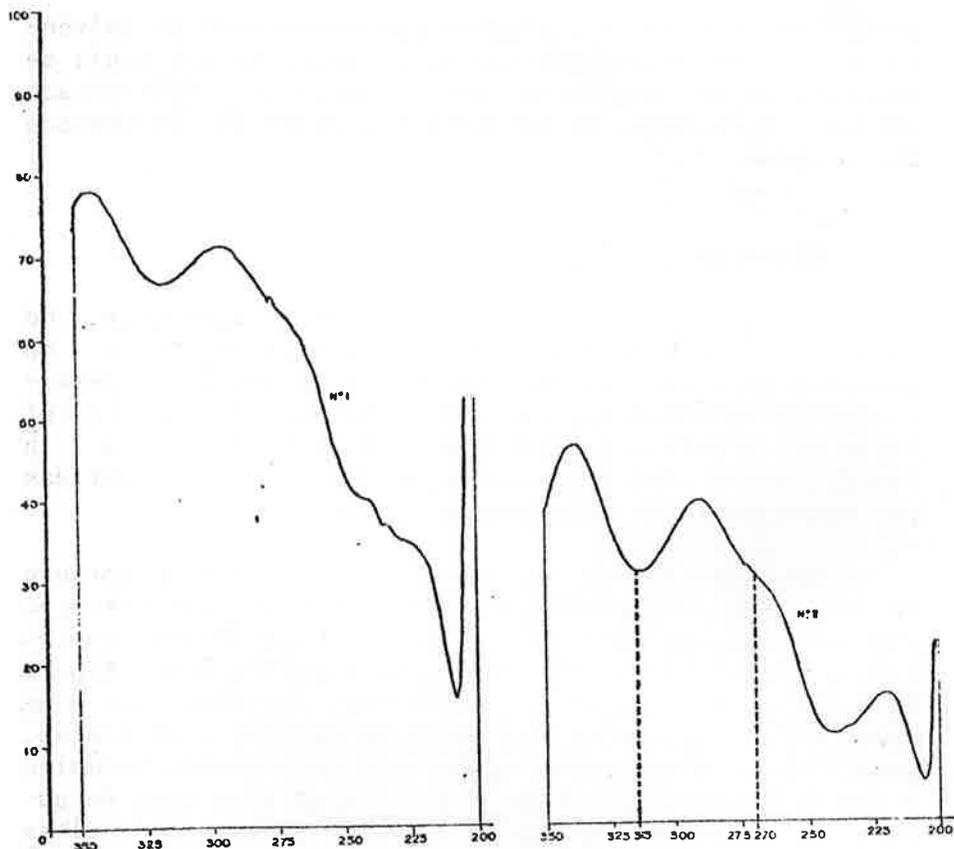


FIGURA 2 - Espectro na região do ultravioleta do corante vermelho natural.

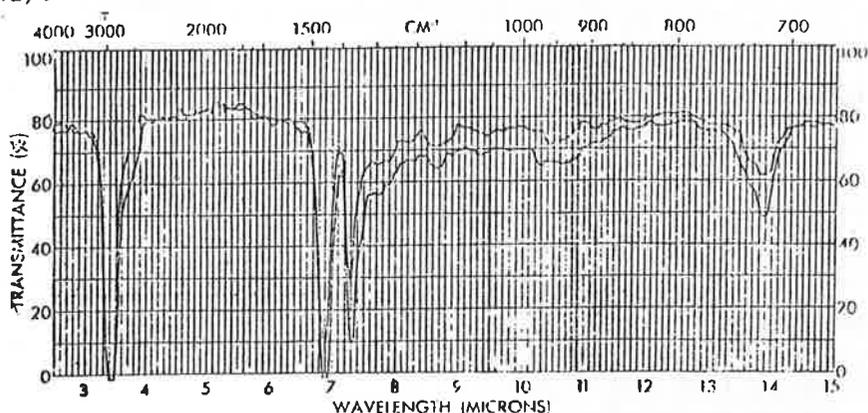
- Espectro nº 1 solução alcoólica (álcool etílico com 3% HCl) do corante puro.
- Espectro nº 2 eluato do corante após ser cromatografado. Concentração da solução 4,0 mg/100 ml - 8 pontos/20µl.

Espectrofotômetro Varian 634, Slit 1,0 nm.  
Varredura 50 nm/min.

tão, os métodos indicados para determinação de estrutura de substâncias orgânicas: ponto de fusão, análise elementar, espectro de massa e de ressonância nuclear magnética.

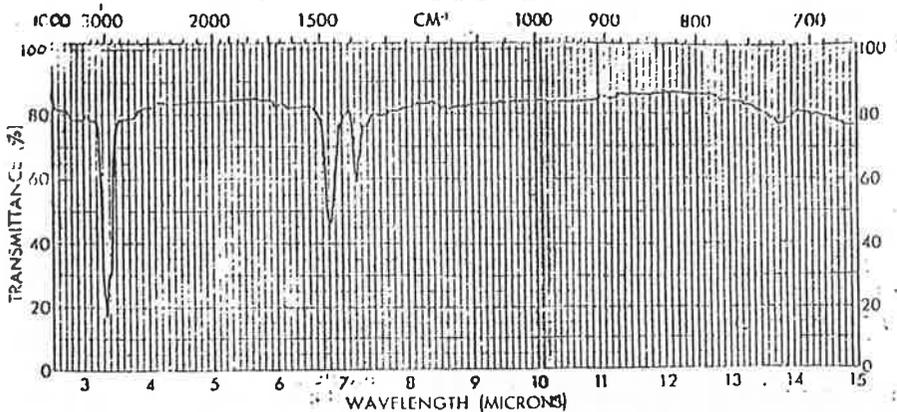
**Dosagem de cafeína**

Montamos um sistema em série de soxhlet, que permitia realizar um maior número de análises. Com éter etílico extraímos o pigmento verde, esgotamos o aparelho de soxhlet e evaporamos o extrato obtido até a secura. Repetimos a operação até obter um resíduo incolor - figura 3, espectro 1 (as primeiras porções da solução etérea podem ser reservadas para reaproveitamento do solvente por destilação). Em seguida a cafeína foi extraída com clorofórmio, reduzido até um determinado volume no próprio balão do aparelho de soxhlet, passando quantitativamente para um balão volumétrico. Efetuamos as devidas diluições, a fim de se determinar o teor de cafeína pelo processo convencional em refrigerantes. Isto é, leitura espectrofotométrica da solução clorofórmica no comprimento de onda de 274 nm, de acordo com a curva padrão. (Tempo de extração da cafeína com clorofórmio - 6 (seis) horas). (Tomada de ensaio - de 2 a 2,5 g de pó de guaraná).



SPECTRUM NO. 1	ORIGIN espectro	LEGEND	REMARKS resíduo do
SAMPLE	nujol + resíduo de substância	1.	extrato etereo
resíduo de	PURITY	2.	ausência de outra
extrato etereo	PHASE Nujol	DATE 17/04/74	substância
	THICKNESS	OPERATOR	além do nujol

FIGURA 3 - ESPECTRO Nº 1 - Espectro na região do infravermelho



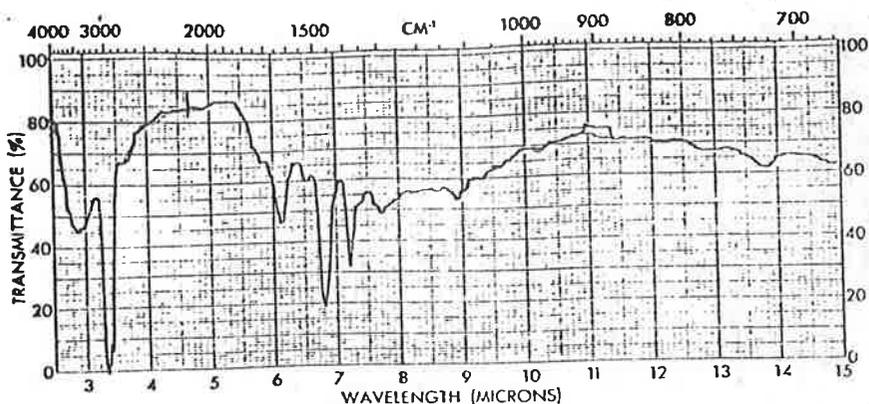
SPECTRUM NO. 2	ORIGIN	LEGEND	REMARKS
SAMPLE Nujol		1.	
	PURITY	2.	
	PHASE	DATE	
	THICKNESS	OPERATOR	

THE PERKIN-ELMER CORPORATION, NORWALK, CONN.

FIGURA 4 - ESPECTRO Nº 2 - Espectro na região do infravermelho do Nujol - fase utilizada nos espectros Nºs 1, 3 e 4.

**Curva padrão de cafeína:** foram tomadas soluções contendo respectivamente 0,3 mg/100 ml, 0,50 mg/100 ml, 0,70 mg/100 ml, 0,90 mg/100 ml, 1,00 mg/100 ml, 1,10 mg/100 ml e 1,15 mg/100 ml. Estas concentrações se referem a mg de cafeína por 100 ml de clorofórmio. Trabalhamos, porém, com absorvidade média a 0,485 e o desvio padrão 0,014.

**Valor real:** o fator determinante para adaptação do método foi o valor nominal, isto é, ensaios realizados com cafeína pura, que submetida a extrações, primeiro com éter e depois com clorofórmio, deram uma reprodução de 97,0 até 98,6% (valor médio - 97,7%). Os ensaios foram



SPECTRUM NO. 3	ORIGIN	LEGEND	REMARKS
SAMPLE 1		1.	
corante obtido	PURITY	2.	
por percolação	PHASE: Nulo!	DATE	
27/01/75	THICKNESS	OPERATOR	

SAMPLE NO. 3

PART NO 137-1281

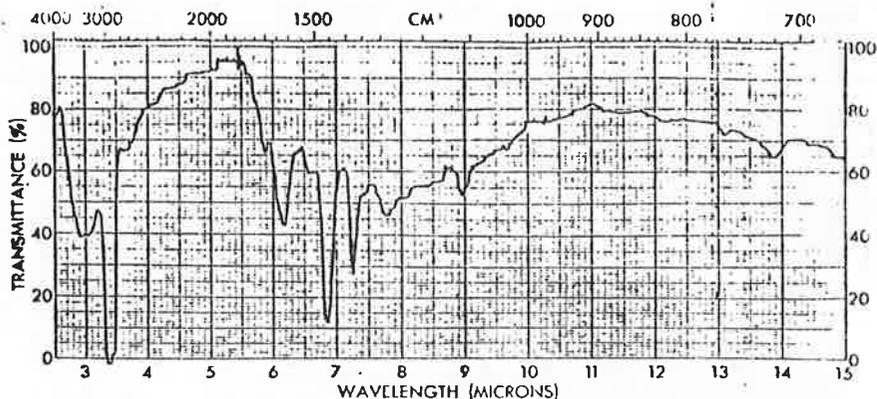
THE PERKIN-ELMER CORPORATION, NORWALK, CONN.

FIGURA 5 - ESPECTRO Nº 3 - Espectro na região do infravermelho do corante vermelho obtido por percolação fracionada.

O método dá uma aproximação admitida para processos de rotina nos laboratórios de controle de drogas e medicamentos.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos empregados para a determinação da estrutura do pigmento vermelho natural (presente no pó e no extrato de guaraná) levaram-nos à hipótese de que se



SPECTRUM NO. 4	ORIGIN	LEGEND	REMARKS
SAMPLE 2		1.	
corante obtido	PURITY	2.	
por ext. soxhlet	PHASE Nujol	DATE	
pp B.M.	THICKNESS	OPERATOR	

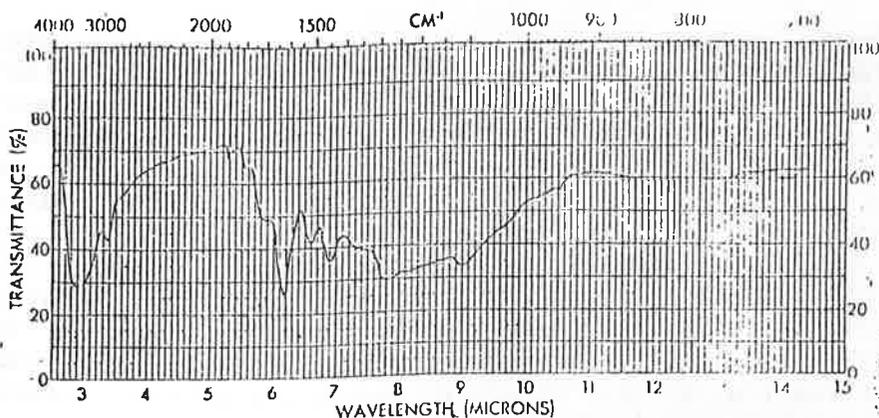
PART NO 127-1781 P. 4

THE PERKIN-ELMER CORPORATION, NORWALK, CONN.

FIGURA 6 - ESPECTRO Nº 4 - Espectro na região do infravermelho do corante vermelho obtido por extração contínua.

durante o processo de extração o pigmento inicialmente vermelho escarlata, se tornava bordeaux e após evaporação parcial do solvente em banho termoeletrico (temperatura 100°C), ao juntarmos água destilada obtínhamos um precipitado marrom. Estas mudanças de coloração inferem um provável processo oxidativo. Portanto, deveríamos ter trabalhado em atmosfera de gás inerte (nitrogênio - N<sub>2</sub>).

Na determinação de cafeína tomamos 12 amostras, cujo teor encontrado situou-se entre 3,07 a 4,60% p/p. Observamos que o extrato etéreo apresentava nas primeiras porções coloração verde, característica, em algumas



SPECTRUM NO. 5	ORIGIN	LEGEND	REMARKS
SAMPLE		1. Pastilha KBr	
corante lavado	PURITY	2.	
com H <sub>2</sub> O. destilada	PHASE	DATE 04/09/75	
	THICKNESS	OPERATOR	

SPECTRUM NO. 5

THE PERKINELMER CORPORATION NORWALK CONN

FIGURA 7 - ESPECTRO Nº 5 - Espectro do corante vermelho em pastilhas de KBr na região do infravermelho.

te de mistura. Nas amostras manipuladas o extrato etéreo era incolor, embora apresentando a quantidade de cafeína exigida pela legislação. A análise microscópica apresentava alguns elementos histológicos de guaraná. Como preenchiam os requisitos previstos pela legislação foram aprovadas para consumo.

### CONCLUSÕES

Com relação ao pigmento vermelho, não nos foi possível determinar sua fórmula estrutural, enquanto que a

fórmula mínima  $(CH_2O)_n$  sugere a hipótese de um polímero. Não poderíamos, entretanto, deixar de transcrever os métodos e os critérios adotados para a obtenção do pigmento vermelho, que serviu de padrão para o trabalho anterior e, ainda, em virtude da importância que tem o pó de guaraná, de oferecer sugestões para trabalhos futuros (SIMÃO & ALMEIDA, 1984).

Quanto ao método de doseamento de cafeína podemos afirmar ser menos trabalhoso que o da FARM. BRAS. II (1959), exigindo menor esforço do analista, possibilitando realizar análise em série, dado o seu grande número e com bons resultados.

## RESUMO

O pó de guaraná submetido à ação de 3 solventes, éter etílico, clorofórmio e álcool etílico contendo 3% de ácido clorídrico concentrado, forneceu três extratos que foram analisados por espectrometria. O extrato clorofórmico, um dos objetivos de nosso trabalho, contendo cafeína, mediante adaptação de análise por espectrometria no ultravioleta no comprimento de onda de 274 nm, nos proporcionou resultados quantitativos bastante satisfatórios, permitindo a possibilidade de um método mais simples e menos trabalhoso para o doseamento do referido alcalóide no pó de guaraná. Os ensaios em branco nos permitiram uma reprodução de 97,7% média de aproximação suficiente para os trabalhos de rotina. No extrato alcoólico obtivemos um pigmento vermelho que, após sofrer os processos rotineiros de extração e purificação, foi objeto de estudo por meio dos métodos indicados para a determinação de estrutura de substâncias orgânicas.

## SUMMARY

vents - ethyl ether, chloroform and ethyl alcohol containing 3% concentrated hydrochloric acid - yielded three extracts which were analysed by spectrometer. The chloroform extract containing caffeine (determined by ultraviolet spectroscopic analysis at the 274 nm wavelength), gave good quantitative results, allowing a simpler and easier method for the treatment of the said alkaloid in guarana powder. Control experiments showed an average accuracy of 97.7, sufficient for routine work. From the alcohol extract we obtained a red pigment, which after routine extraction and purification procedures, was studied by the accepted methods for determining the structure of organic substances, and we arrived at the conclusion that it seems to be a polymer.

#### BIBLIOGRAFIA

- BRASIL, 1976. Leis e Decretos. Decreto-Lei 73.267 de 06.12.73 (Ministério da Agricultura). Portaria 902 de 26.12.73. D.O.U. 13.12.76.
- CAGNO, N., 1950. Estudo paralelo dos corantes de *Theobroma cacao*, *Paullinia cupana* e *Kola acuminata*. **Anais da Primeira Jornada Brasileira de Bromatologia** 4(1): 496.
- CORREIA, M.P., 1926. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v.3.
- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil, 1929. São Paulo, Companhia Editora Nacional.
- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil, 1959. 2a. ed., São Paulo, Indústria Gráfica Siqueira.
- FREUDENBERG, O., 1949. **Pharmacie Galenique**. In: GORIS, A. et al., tome II ed., Paris, Masson.
- GORIS, A., et al., 1949. **Pharmacie Galenique**, Tome II ed., Paris, Masson.

- GOTTLIER, O.A., s.d. **Introdução a espectrometria de massa das substâncias orgânicas**, Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- HAYASHI, K., 1962. The anthocyanins. In: GEISSMAN, T.A. ed., **The chemistry of flavonoid compounds**, New York, The Macmillan Company, cap. 9, p.248-285.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1951. **Métodos de análise bromatológica do Instituto Adolfo Lutz. Análise Química**, São Paulo, Imprensa Gráfica da Revista dos Tribunais.
- LEBEAU, P. et al., 1956. **Traite de Pharmacie Chimique**, Paris, Masson.
- LEDERER, E. & M. LEDERER, 1953. **Chromatography**, London, Elsevier.
- LOPES, R.C., 1968. **Tratado de Bromatologia**, 4a. ed, Madrid, Editora Casares.
- PEARSON, D., 1970. **The chemical analysis of food**, ed., J & A. Churchill, London.
- SIMÃO, A.M. & M.E.W. ALMEIDA, 1984. Identificação do extrato de guaraná em refrigerantes por meio do pigmento vermelho natural. Apresentado no III Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Santa Catarina, Florianópolis, 1979.
- WURZNER, H.P. et al., 1977. A 2-year feeding study of instant coffees in rats. 1. Body weight, food consumption, haematological parameters and plasmachemistry. **Fd. Cosmet Toxicol.** 15: 7-16.