

Determinação por HPLC de cafeína e teobromina em folhas jovens e velhas de *Ilex paraguariensis*

Maria Regina Soares Lopes¹, Sabrina Teixeira Martinez², Vitor Clasen Chaves³,
Andréa da Silva Ramos Rocha⁴ e Luciano do Amarante⁵

Introdução

Ilex Paraguariensis A.St. Hil pertencente a família Aquifoliaceae, conhecida popularmente como erva mate, é uma espécie largamente consumida no Brasil, Argentina, Paraguai e outros países da América do Sul, tendo grande importância econômica e cultural no Mercosul [1].

No Brasil é oriunda de quatro estados produtores: Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Suas folhas têm sido utilizadas para o preparo do chimarrão (infusão quente) e do tererê (infusão fria). Mais recentemente, está sendo utilizada para bebidas enlatadas, chás solúveis e medicamentos [2].

O extrato aquoso da *Ilex Paraguariensis* é uma bebida rica em compostos, como antioxidantes, aminoácidos, saponinas e metilxantinas. Suas principais propriedades são: estimulante, diurético, estomáquico e sudorífero [1,7,8].

A Erva mate contém cerca de 0,2 - 2% de cafeína, 0,3% de teobromina, traços de teofilina, cerca de 10 - 16% de ácido clorogênico (ácido cafeoilânico), pequena quantidade de óleo volátil, saponinas triterpênicas, aminoácidos e vitaminas [1,3].

A quantidade e composição de metilxantinas nas folhas pode ser influenciada por diferentes fatores, tal como variabilidade genética, condições ambientais, idade, período de colheita, tratamento e preparação da droga [4]. Esta composição química tem seus índices estabelecidos pela Portaria 234, de 25 de março de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, a qual prevê um teor de cafeína mínimo (0,5g/ 100g) de erva mate [5].

A cafeína é um pseudoalcalóide estimulante do sistema nervoso central (SNC) pertencente ao grupo das metilxantinas, o qual está contido em várias bebidas não alcoólicas consumidas em todo o mundo [1].

Este estudo teve como objetivo avaliar os teores de cafeína e teobromina em folhas jovens e velhas de *Ilex Paraguariensis* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

Material e métodos

Utilizou-se como material vegetal, folhas jovens e velhas de *Ilex Paraguariensis* provenientes de uma

planta de aproximadamente 40 anos de idade, conforme informação do proprietário, de um exemplar localizado na latitude de 28° 21' S, longitude de 51° 08' W e 945,3 metros de altitude, no município de Esmeralda/RS, colhidas no mês de junho de 2006, excicata depositada no HERBÁRIO PEL 24.505. Procedeu-se a secagem ao ar e a sombra. As folhas secas foram pulverizadas em moinho tipo Willye, modelo MA 048, com granulometria de 20 mesh. O material seco foi quantificado em um grama e submetido a 10ml de água e 10ml de ácido sulfúrico 1N, em sistema fechado por dez minutos a uma temperatura de 80°C. O extrato aquoso ácido foi filtrado a vácuo e alcalinizado com hidróxido de amônio 6N até atingir pH 11, o qual foi submetido a extrações por duas vezes com proporções de 10ml de clorofórmio. As frações clorofórmicas reunidas foram filtradas a vácuo e evaporadas. Os cristais obtidos foram ressolubilizados na fase móvel transferidos para um balão volumétrico de 50ml e diluídos ao volume.

A cafeína e teobromina foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência usando um sistema HPLC-SHIMADZU CLASS-VP. Utilizou-se sistema cromatográfico composto de coluna octadecilsilano de 25 cm e 4,6 mm, mantida a 40°C, fase móvel mistura água ultrapura MilliQ e metanol Merck grau HPLC (75:25 V/V), razão de fluxo 1ml/min. As substâncias eluídas foram detectadas no espectro do ultravioleta à 272nm. Os sinais obtidos foram integrados, obtendo-se a área de cada um, os resultados encontrados foram comparados com aqueles obtidos com solução padrão contendo cafeína e teobromina.

A solução padrão foi preparada diluindo 30mg de de cafeína (Merck®) e 15mg de teobromina (Merck®) em 100 ml de fase móvel, 10 ml desta solução foi diluída para 100ml utilizando o eluente, obtendo-se assim uma concentração final de 30µg/ml e 15µg/ml de cafeína e teobromina respectivamente. Antes de proceder a cromatografia a fase móvel, solução e a amostras foram filtradas á vácuo utilizando membrana de 0,45µm e desaerados por dez minutos em banho de ultra-som. As amostras foram preparadas em triplicata e cada uma foi cromatografada em quadruplicata.

De posse dos resultados de área obtidos foi calculado a quantidade de metilxantina presente na amostra.

1. Acadêmica do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas e Professora da disciplina de Farmacognosia, Escola de Farmácia, Universidade Católica de Pelotas, Felix da Cunha, 412, Pelotas, RS. E-mail: mariareginalopes@hotmail.com

2. Acadêmica do Curso de Farmácia, Universidade Católica de Pelotas, Felix da Cunha, 412, Pelotas, RS.

3. Acadêmico do Curso de Farmácia, Universidade Católica de Pelotas, Felix da Cunha, 412, Pelotas, RS.

4. Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas e Professora da disciplina de Controle de Qualidade, Escola de Farmácia, Universidade Católica de Pelotas, Felix da Cunha, 412, Pelotas, RS.

5. Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n°, Caixa Postal 354, CEP: 96010-900, Pelotas, RS.

Resultados e Discussão

A análise cromatográfica da solução padrão de teobromina e cafeína evidenciou um cromatograma típico que é demonstrados na figura 1A. O tempo de retenção para teobromina foi de 3,112 e para cafeína 6,599. Obteve-se picos simétricos com boa resolução da linha de base e o que facilita a determinação acurada da área dos picos obtidos. O coeficiente de variação obtido para a solução padrão foi de 0,37% para teobromina e de 0,17% para cafeína.

A análise quantitativa de metilxantinas nas amostras foi determinada comparando a área dos picos obtidos com a solução padrão.

Os níveis de cafeína e teobromina encontrados nas folhas velhas foi de 0,75% e 0,05% respectivamente. Nas folhas jovens obteve-se valores de 0,90% para cafeína e de 0,08% de teobromina. As amostras apresentaram tempo de retenção médio de 3,126 para teobromina e de 6,583 para cafeína, conforme apresentado na figura 1B. O coeficiente de variação (CV) para cafeína foi de 3,79% para folhas velhas e de 2,91% para jovens, na análise de teobromina o CV foi de 3,61% para velhas e de 1,16% para jovens. Estes dados são compatíveis com os relatados na literatura e exigidos pela legislação brasileira [4,5,6]. A metodologia empregada possibilitou

detectar simultaneamente cafeína e teobromina em amostras de *Ilex paraguariensis*, podendo ser utilizada para estudos de controle de qualidade e de adulterações.

Referências

- [1] SIMÕES, M.C.O., et al., 1999. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre / Florianópolis, Editora da Universidade/UFRGS / Editora da UFSC. p.723-734.
- [2] SILVA, R.P. 2000. *Desenvolvimento de extratos aquosos descafeinados de erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil)*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, UFPR, Paraná.
- [3] EVANS, W.C., 1996. *Trease and Evans' Pharmacognosy*. London, WB Saunders. 403p.
- [4] REGINATO, et al., 1999. Methylxanthines Accumulation in *Ilex Species*. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 10, No. 6, p. 443-446.
- [5] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria no. 234, 25 de março de 1998. Diário Oficial, 29 de junho de 1998. Brasília, DF, 1998.
- [6] MAZZAFERA, P. 1994. Caffeine, Theobromine and Theophylline distribution in *Ilex paraguayensis*. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, vol. 6, No 2, p. 149-151.
- [7] MOSIMANN, A. L. P., 2002. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Ilex paraguayensis* na lipoperoxidação sérica e na aterosclerose experimental em coelhos. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Farmácia, UFSC, Santa Catarina.
- [8] REITZ, P. R., 1967. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí – SC, Impresso na Topografia e Livraria Blumenauense S. A. p.34.

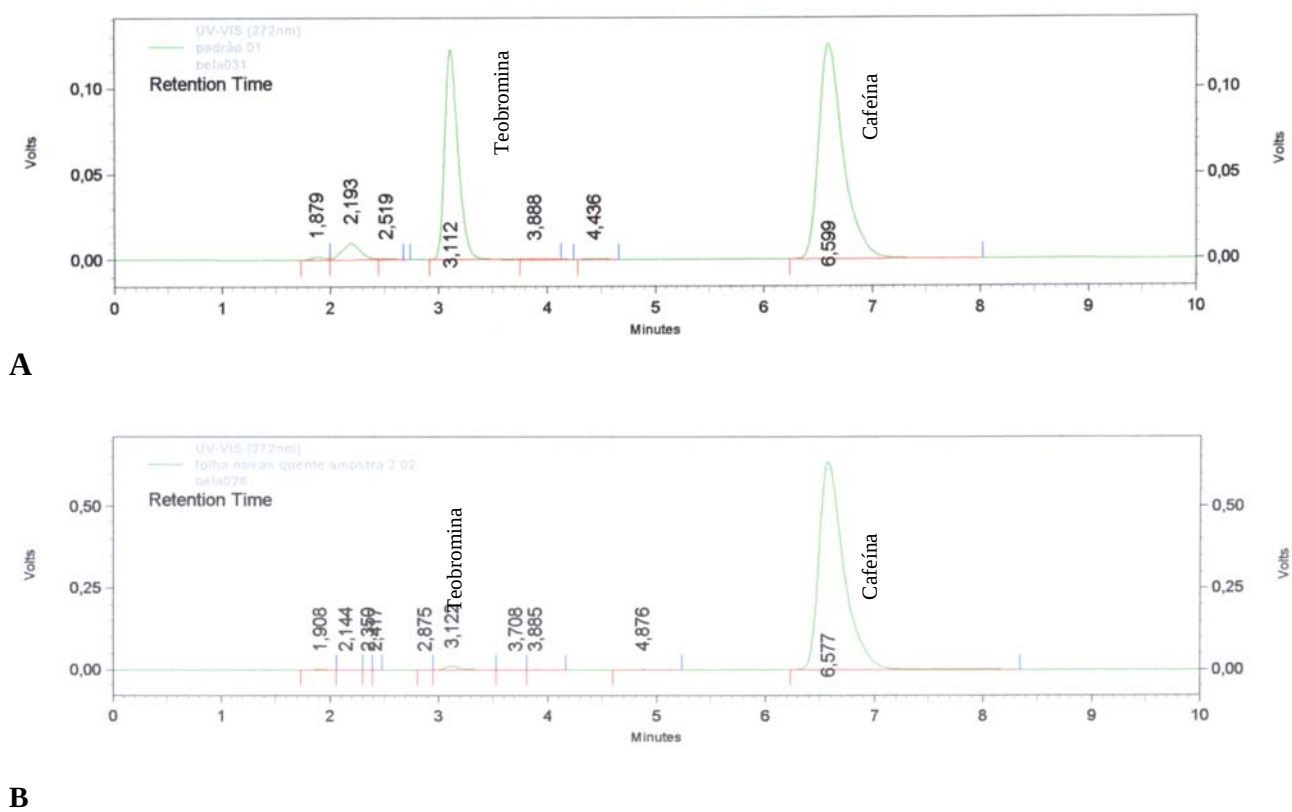


Figura 1. A – Cromatograma obtido com a Solução Padrão de Teobromina e Cafeína, evidenciando os tempos de retenção de 3,112 para Teobromina e 6,599 para cafeína. B – Cromatograma obtido com a Solução Amostra, evidenciando os tempos de retenção de 3,122 para Teobromina e 6,577 para cafeína.