

# IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM GUARANÁ EM PÓ UTILIZANDO OS MARCADORES QUÍMICOS CAFEÍNA E TEOBROMINA POR HPLC.

Daniele Santana de Jesus<sup>1</sup>, Leandro Soares Santos<sup>2</sup>, Laoan Brito Oliveira Rodrigues<sup>3</sup>, Wmekson Oliveira Santos<sup>4</sup>

## RESUMO

O guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) pertence à família Sapindaceae é popularmente conhecida como guaraná verdadeiro. Essa variedade é encontrada no Brasil, principalmente nas regiões centrais da floresta amazônica brasileira, e é cultivada em algumas regiões brasileiras com clima favorável. As metilxantinas e os taninos são os principais compostos ativos responsáveis pelas atividades biológicas e farmacológicas apresentadas pelo guaraná, têm efeito estimulante, broncodilatador, relaxante muscular e diurético. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver métodos de identificação e quantificação de adulterantes no guaraná em pó utilizando os marcadores químicos teobromina, catequina, cafeína e epicatequina por HPLC, associada a técnica de estatística multivariada, Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Discriminante (AD). Para isso, foram utilizadas 12 amostras de guaraná em pó, estas foram adulteradas com fubá de milho e casca de café, nas concentrações de 10%, 20%, 30%, 40% e 50% submetendo a análise cromatográfica. A ACP permitiu a separação da maioria das amostras puras das adulteradas. A AD classificou corretamente 100% das amostras adulteradas enquanto das amostras puras apenas 50% foram classificadas corretamente, assim pode-se considerar a AD como um método de triagem para identificação de adulteração das amostras de guaraná.

**PALAVRAS-CHAVES:** Adulterantes, Cromatografia e Guaraná em Pó.

## IDENTIFICATION OF ADULTERATION IN GUARANÁ POWDER USING THE CHEMICAL MARKERS CAFFEINE AND THEOBROMINE BY HPLC.

## ABSTRACT

Guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) belongs to the Sapindaceae family and is popularly known as true guaraná. This variety is found in Brazil, mainly in the central regions of the Brazilian Amazon forest, and is cultivated in some Brazilian regions with a favorable climate. Methylxanthines and tannins are the main active compounds responsible for the biological and pharmacological activities presented by guaraná, they have a stimulating, bronchodilating, muscle relaxing and diuretic effect. In view of the above, the present

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Aluna de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>1</sup>

Professor Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>2</sup>

Aluna de Pós-Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>3</sup>

Aluno de Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>4</sup>

work aimed to develop methods for identifying and quantifying adulterants in guaraná powder using the chemical markers theobromine, catechin, caffeine and epicatechin by HPLC, associated with the multivariate statistical technique, Principal Component Analysis (PCA) and Discriminant Analysis (DA). For this, 12 samples of powdered guaraná were used, these were adulterated with cornmeal and coffee husks, at concentrations of 10%, 20%, 30%, 40% and 50% and subjected to chromatographic analysis. ACP allowed the separation of most of the pure samples from the adulterated ones. AD correctly classified 100% of the adulterated samples while only 50% of the pure samples were correctly classified, so AD can be considered as a screening method for identifying adulteration of guaraná samples.

KEYWORDS: Adulterant, Chromatography and Guarana Powder

## 1. INTRODUÇÃO

O guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) pertence à família *Sapindaceae* e é popularmente conhecido como guaraná verdadeiro. Essa variedade é encontrada no Brasil, principalmente nas regiões centrais da floresta amazônica brasileira (schimpl et al., 2013), e é cultivada em algumas regiões brasileiras com clima favorável (Sousa et al., 2010; Silva et al., 2010; Silva et al., 2015).

As metilxantinas e os taninos são os principais compostos ativos responsáveis pelas atividades biológicas e farmacológicas apresentadas pelo guaraná. As metilxantinas (como teobromina, teofilina e cafeína) têm efeito estimulante, broncodilatador, relaxante muscular e diurético (Alves e Bragagnolo, 2002; Sousa et al., 2010; Oñatibia-Astibia et al., 2017). Outra característica interessante é que o teor de cafeína deste produto natural é cerca de 4 vezes superior ao encontrado no café (*Coffea sp.*) (Edwards et al., 2005).

Embora tenha havido um grande interesse em estudar a cafeína do guaraná, incluindo seus benefícios e malefícios, as mais diversas substâncias farmacológicas do guaraná estão associadas aos taninos presentes nas sementes de planta, que representam cerca de 16% da composição da semente (Yamaguti-Sasaki et al., 2007, pelozo et al., 2008, sousa et al., 2010, Dalonso e Petkowicz, 2012).

O guaraná em pó é um produto muito difundido, sendo utilizado nas mais diversas culturas, o que o torna um produto susceptível a ocorrências de adulterações, que apesar difícil percepção, compromete sua autenticidade (Pacholczyk-Sienicka et al., 2021).

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Aluna de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>1</sup>

Professor Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>2</sup>

Aluna de Pós-Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>3</sup>

Aluno de Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>4</sup>

De forma geral, as principais alterações relacionadas a essa espécie são aquelas em que ocorrem a adição de materiais com características semelhantes. No caso do guaraná em pó os principais adulterantes utilizados são cascas de café e fubá de milho.

Nesse sentido, faz-se necessário o emprego de metodologias que permitam a identificação da presença das fraudes alimentares em produtos em pó, aliado a técnicas que possam ser rápidas e precisas e que ainda atuam como alternativa em substituição às análises tradicionalmente utilizadas (Modupalli et al., 2021).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho de Iniciação Científica foi desenvolvido no Laboratório de Identificação e Autenticidade de Alimentos (LIAA) na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* Itapetinga.

### **2.1 Coleta e Preparo das Amostras**

Para realização do estudo foram coletadas 12 amostras de guaraná em pó *in natura* em diversas localidades do Brasil e foram utilizados fubá de milho e casca de café como adulterantes.

### **2.2 Preparo das Amostras Adulteradas**

Inicialmente pesou-se 0,64 g de guaraná em pó para cada concentração de adulterante a ser utilizada (0, 10, 20, 30, 40 e 50%), e com base nessas concentrações foram calculadas as quantidades de adulterante a serem adicionados em cada tratamento. Os extratos secos foram diluídos em etanol 60%, em seguida coletou-se 0,5 ml do mesmo e adicionou nos respectivos tubos de falcon passando pelo vórtex fazendo leve agitação e posteriormente encaminhado para o banho ultrassônico por 15 minutos, logo após foram direcionado para o banho maria por aproximadamente 10 minutos na temperatura de 60°C, após esse processo passou pela centrifuga que permaneceu por 15 minutos e posteriormente armazenado sob refrigeração, logo sendo filtrados em filtro de seringa

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Aluna de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>1</sup>

Professor Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>2</sup>

Aluna de Pós-Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>3</sup>

Aluno de Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>4</sup>

com membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  (Syringe filter, PVDF030N022I, Taiwan) e injetados diretamente no sistema.

### **2.3 Análise Cromatográfica**

A análise por CLAE foi realizada de acordo com o método utilizado por Jolic et al. (2011). Os extratos filtrados foram separados em coluna RP-LC (Zorbax SB-C18, 4,6 mm ID x 250 mm, 5 $\mu\text{m}$  e coluna de guarda Zorbax SB-C 18, 4,6 mm ID x 12,5 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) usando um sistema HP Agilent 1260 Infinity II. A fase móvel consistia em 2,5% de ácido acético (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro) (solvente A) e acetonitrila (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, São Paulo) (solvente B) a uma taxa de fluxo de 1mL/min. O gradiente de eluição foi a seguinte: 0–13 min 3% do solvente B, 13–18 min 9% de B, 18–25 min 11% de B, 25–45 min 18% de B, 45–50 min 30% de B e em 50 min 3 % de B. A identificação dos compostos foi obtida comparando seus espectros de UV e tempos de retenção dos picos separados com os tempos de retenção dos padrões. Os compostos fenólicos identificados foram quantificados pelo método do padrão externo, sendo a quantificação baseada na área do pico. As curvas de calibração dos padrões foram preparadas diluindo os padrões (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) de estoque com a solução extratora (85% H<sub>2</sub>O, acidificado com 0,3% de ácido acético, e 15% Metanol) (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro), sendo composta por oito pontos (1 a 128 $\mu\text{g/ml}$ ) de (-)-epicatequina, (+)-catequina, cafeína e teobromina

### **2.4 Análise de Componentes Principais (ACP)**

A ACP foi realizada para transformar o conjunto original de variáveis em eixos ortogonais, seus principais componentes e identificar as medidas responsáveis pela maior variação nos resultados. A ACP é uma técnica exploratória que permite a verificação da dispersão e a formação de grupos de acordo com o grau de similaridade entre as amostras. Foi utilizada a matriz de covariância (S) e o número de componentes principais (CPs) foi determinado considerando o critério dos fatores interpretáveis, o diagrama de autovalores (screenplot) e a variância dos dados originais com representação >70,00% (Silva et al. 2020).

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Aluna de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>1</sup>

Professor Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>2</sup>

Aluna de Pós-Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>3</sup>

Aluno de Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>4</sup>

## 2.5 Análise de Discriminante (AD)

A AD foi utilizada para discriminar e classificar as amostras com base nas matrizes de dados descritas. Os dados das matrizes foram randomizados aleatoriamente com o algoritmo Kennard-Stone pelo software Matlab 8.1 (Math Works Inc. Natick, EUA). A precisão preditiva do modelo foi calculada utilizando as estimativas dos erros de validação, buscando produzir desempenho de generalização satisfatório e confiável. Para verificar a eficiência da AD foi utilizado o percentual de acerto da classificação, que correspondeu aos dados classificados corretamente para cada classe (Santos *et al.* 2017).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Análise de Componentes Principais (Figura 1) permitiu a dispersão espacial das amostras de guaraná pura e adulterada, com base na presença de cafeína, catequina e epicatequina, sendo necessárias apenas duas Componentes Principais (CPs) que explicaram 98,07% da variabilidade dos dados. Através da ACP é possível verificar que as amostras puras em sua maioria, se separam das amostras adulteradas, o que pode ser explicado devido a composição do adulterante influenciar reduzindo a concentração de alguns componentes uma vez que apresente ausência ou baixa concentração dos mesmos ou aumentando a concentração de alguns componentes quando os mesmos forem presentes em sua composição.

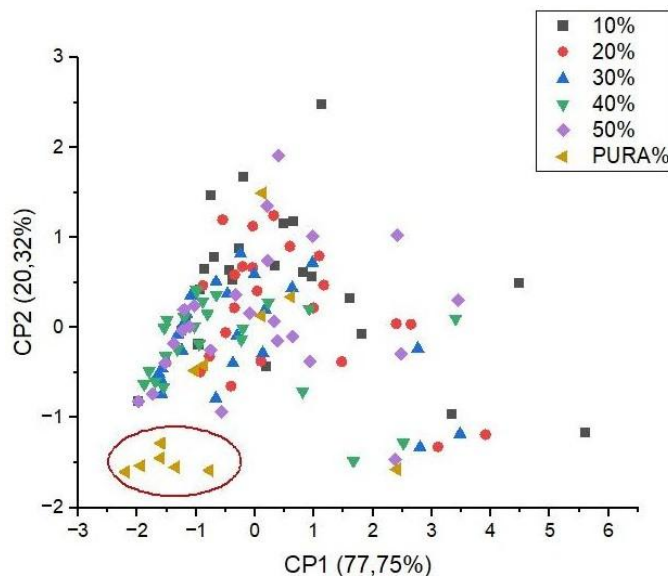
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Aluna de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>1</sup>

Professor Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>2</sup>

Aluna de Pós-Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>3</sup>

Aluno de Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>4</sup>



Fonte: Autoral,2023

**Figura 1.** Análise de Componentes Principais das amostras de guaraná pura e fraudadas.

Para discriminar as amostras de guaraná, o conjunto de dados foi dividido em duas classes, sendo uma correspondente as amostras de guaraná adulterada e a outra as amostras de guaraná pura. A Tabela 1 apresenta o percentual de classificações das amostras. A eficiência dos modelos de treinamento e validação gerados foram verificadas de acordo com as taxas de classificação. No modelo de treinamento pôde-se verificar que as amostras adulteradas apresentaram taxa de classificação de 87,06%, enquanto as amostras puras apresentaram taxa de 100%, ou seja 100% das amostras puras foram classificadas como sendo realmente puras. Já a taxa de classificação do modelo de validação foi de 100% para as amostras adulteradas e 50% para as amostras puras, ou seja, a identificação das amostras adulteradas ocorreu de forma eficiente.

Assim, a Análise de Discriminante mostrou-se uma boa alternativa para discriminar as amostras de guaraná adulteradas de acordo com a sua composição em catequina, cafeína e epicatequina.

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Aluna de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>1</sup>

Professor Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>2</sup>

Aluna de Pós-Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>3</sup>

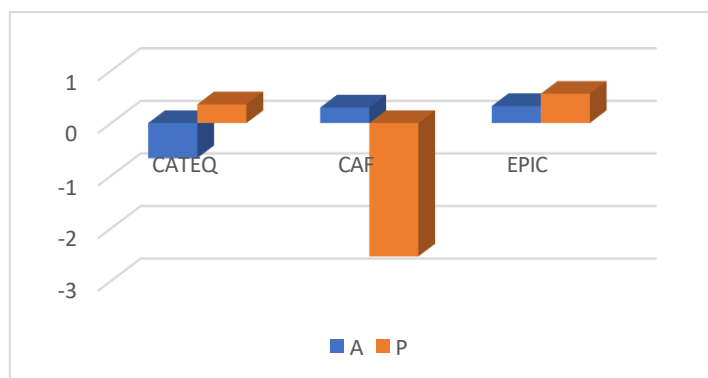
Aluno de Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>4</sup>

**Tabela 1.** Classificação do Guaraná em pó puro e fraudado, quanto a sua composição química, através da aplicação da Análise de Discriminante Linear (LDA).

MODELO DE TREINAMENTO				MODELO DE VALIDAÇÃO			
Número de observações e porcentagem classificada na classe 2				Número de observações e porcentagem classificada na classe 2			
Classe 2	A	P	Total	Classe 2	A	P	Total
A	74 87,06	11 12,94	85 100,00	A	36 100,00	0 0,00	36 100,00
P	0 0,00	8 100,00	8 100,00	P	2 50,00	2 50,00	4 100,00
Total	74 79,57	19 20,43	93 100,00	Total	38 95,00	2 5,00	40 100,00
Priors	0,5	0,5		Priors	0,5	0,5	

Fonte: Autoral, 2023

A Figura 2 obtida a partir da Análise de Discriminante Linear (LDA), permitiu verificar que nas amostras puras o composto que se destaca é a cafeína, enquanto nas amostras adulteradas o composto majoritário é a catequina. Esse comportamento pode ser explicado devido ao fato de o adulterante apresentar baixas concentrações de cafeína que é o principal composto presente no guaraná, dessa forma o adulterante promove a diluição da cafeína nas amostras.



Fonte: Autoral, 2023

**Figura 2.** Importância relativa das variáveis para discriminar as amostras de guaraná pura (P) das adulteradas (A).

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Aluna de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>1</sup>

Professor Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>2</sup>

Aluna de Pós-Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>3</sup>

Aluno de Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>4</sup>

#### 4. CONCLUSÃO

A ACP mostrou-se eficiente para diferenciar as amostras de guaraná pura das adulteradas, enquanto a AD apesar de identificar corretamente 100% das amostras adulteradas, confundiu as amostras puras com amostras adulteradas. Assim, pode-se considerar o modelo da AD como sendo um modelo de triagem para identificação das amostras adulteradas.

#### 5. REFERÊNCIAS

Alves A.B.; Bragagnolo N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência  
Rev. Bras. Ciências Farm., V.38, pp. 237-243, 2002

Edwards H.G.M.; Farwell D.W.; De Oliveira L.F.C.; Alia J.-M.; Hyaric M.L.; Almeida M.V.D. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts  
Anal. Chim. Acta, V. 532 n.2, pp. 177-186, 2005.

Schimpl F.C.; Da Silva J.F.; Gonçalves J.F.C.; Mazzafera P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon  
J. Ethnopharmacol., V.150, p. 14-31, 2013.

Sousa, S.A.; Alves, S.F.; De Paula, J.A.M.; Fiuza, T.S.; Paula, J.R.; Bara, M.T.F. Determinação de taninos e metilxantinas no pó de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, *Sapindaceae*) por cromatografia líquida de alta eficiência  
Rev. Bras. Farmacogn., V. 20, n.6, p. 866-870, 2010.

Oñatibia-Astibia A.; Franco R.; Martínez-Pinilla E. Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases  
Mol. Nutr. Food Res., V.61 n.6, p. 1600670, 2017.

#### 6. AGRADECIMENTOS

Agradecer a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela concessão de bolsa.



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Aluna de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>1</sup>

Professor Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>2</sup>

Aluna de Pós-Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>3</sup>

Aluno de Doutorado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia<sup>4</sup>