

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA – EST
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ROMÁRIO CARDOSO DO NASCIMENTO

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO GUARA-
NÁ COM ADIÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

MANAUS

2021

ROMÁRIO CARDOSO DO NASCIMENTO

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO GUARANAÍ COM ADIÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia Química da Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lima Serudo

MANAUS

2021

ROMÁRIO CARDOSO DO NASCIMENTO

**ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO COM
ADIÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO**

**Monografia de Conclusão de Curso para obtenção do título de Engenheiro, Habilitação
em Engenharia Química – Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do
Amazonas**


Banca Examinadora:



.....
Prof. Dr. Ricardo Lima Serudo – Orientador



.....
Prof. Ms. Philipi Cavalcante Ricardo – UFAM



.....
Prof.^a Dr.^a Cláudia Cândida Silva – UEA

Conceito: Aprovado

Manaus, 17 de Dezembro de 2021.

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

N244e Nascimento, Romário Cardoso do
Estudo da extração de compostos bioativos do guaraná
com adição de ácido cítrico / Romário Cardoso do Nasci-
mento. Manaus : [s.n], 2021.
110 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Engenharia Química - Uni-
versidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021. In-
clui bibliografia
Orientador: Ricardo Serudo Lima

1. Guaraná. 2. extração. 3. cafeína. 4. compostos
fenólicos. 5. ácido cítrico. I. Ricardo Serudo Lima (Ori-
ent.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Estu-
do da extração de compostos bioativos do guaraná com
adição de ácido cítrico

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Francisco e Maria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas que estiveram ao meu lado desde o momento que iniciei esse caminho de aprendizado e resiliência: meus pais, Maria das Graças Cardoso dos Santos e Francisco Figueiredo do Nascimento. Sem o apoio deles, jamais teria prosseguido. Certamente eles abriram mão de muita coisa para me proporcionar um ambiente favorável ao meu desenvolvimento educacional e profissional. Todo esforço que dedico a este trabalho e ao curso é um gesto mínimo de gratidão pelo tanto que lutaram e comemoram quando ingressei na UEA.

Ao meu professor e orientador Dr. Ricardo Serudo Lima, por ter aberto as portas do ILUM para que eu pudesse dar os últimos passos que faltavam até a tão esperada graduação. Sem dúvida, a experiência de trabalhar ao seu lado e de sua equipe me proporcionou um olhar diferente para vários aspectos da minha trajetória acadêmica.

Aos meus amigos, Jorge Luiz Cauper e Peso Mraz, que me deram o suporte necessário para que eu não desistisse nos momentos mais difíceis.

Aos membros da equipe do laboratório ILUM: Guilherme, Léya, Matheus e Syra. São pessoas que estiveram sempre dispostas a me ajudar e o fizeram quando precisei. São cientistas altamente capacitados e brilhantes, foi uma experiência enriquecedora trabalhar ao lado deles.

À Universidade do Estado do Amazonas, especificamente ao laboratório ILUM, que me proporcionou toda a estrutura necessária para o desenvolvimento da minha pesquisa.

RESUMO

O guaraná é o fruto amazônico com a maior concentração de cafeína já reportada na região. A amêndoa também é rica em polifenóis, substâncias associadas à atividade antioxidante e a efeitos terapêuticos no corpo humano. Existe um grande interesse no desenvolvimento de produtos à base de extratos ricos em substâncias bioativas, tornando necessário o estudo de técnicas extrativas que não só maximizem a concentração desses compostos, como também sejam eficientes e ambientalmente corretas. Com base nisso, este trabalho propôs um novo estudo de extração hidroalcoólica dos compostos bioativos do guaraná, em um sistema de incubação *shaker*, com adição de ácido cítrico no meio extrator, um aditivo vastamente empregado na conservação de alimentos. Realizou-se um planejamento fracionado 2^{5-2} para investigar os efeitos das variáveis tempo (4 – 10 h), temperatura (30 – 60 °C), concentração de solvente hidroalcoólico (CSH, 30 – 80 %), agitação (56 – 168 rpm) e presença de ácido cítrico (0 – 0,1 g), aplicando como respostas os rendimentos de cafeína e compostos fenólicos totais (CFT). A análise estatística dos resultados foi feita no *Software Statistica versão 10.0* ($p = 0,05$). Na análise de cafeína, os rendimentos foram de 1,14 a 2,56 %, com melhor resultado para o ponto: CSH = 80%; T = 60 °C; t = 10 h; agitação = 168 rpm; ácido cítrico = 0,1 g. Os fatores com maior efeito estatístico foram, respectivamente, a agitação, CSH e tempo. O ácido cítrico, apesar de não ter sido isoladamente significativo, apresentou efeito positivo e significativo de interação com o tempo e a temperatura. Para a resposta CFT, os rendimentos foram de 9,97% a 14,73%, sendo o melhor resultado para o ponto: CSH = 55%; T = 30 °C; t = 7 h; agitação = 112 rpm; ácido cítrico = 0,1 g. Nem um efeito foi relevante estatisticamente, observando-se a existência de curvatura no modelo, o que indica que o processo seria mais bem descrito por um modelo quadrático. Ainda assim, o aditivo apresentou o efeito isolado com maior impacto na extração de polifenóis, além de ter apresentado efeito de interação com o tempo e temperatura. Através de uma função de desejabilidade, estimaram-se as condições ótimas de extração: CSH = 55%; T = 60 °C; t = 10 h; Agitação = 168 rpm; ácido cítrico = 0,1 g. Assim, foi possível desenvolver uma nova abordagem para extração de guaraná capaz de melhorar os rendimentos de cafeína e polifenóis com adição de acidulantes no meio extrator.

Palavras-chave: guaraná, extração, cafeína, compostos fenólicos, ácido cítrico, maceação.

ABSTRACT

Guarana contains more caffeine than any other plants in the Amazon region. The seeds of guarana contain in addition to alkaloid a mixture of polyphenol, which is associated with antioxidant activity and health benefits on human body. It has been shown interest in developing plant extract based products, making it necessary to study extraction techniques that are not only profitable, but it is also environmentally friendly and efficient. Based on this, the new method of hydroalcoholic extraction in shaker incubator with addition of citric acid was developed. A fractionated factorial design 2^{5-2} was performed in order to investigate following variables: temperature (30 – 60 °C), time (4 – 10 h), hydroalcoholic solution concentration (HSC, 30 – 80 %), agitation (56 -168 rpm) and citric acid presence (0 – 0,1 g). Caffeine yields and total phenolic compounds (TPC) were response variables. The statistical analysis was conducted using the Statistica software (version 10) ($p = 0,05$). For caffeine extraction response, it was obtained yields between 1,14 and 2,56 %. The variables with greater statistical significance were agitation, HSC and time. Citric acid presented positive interaction effect with temperature and time, although it was not significant alone. For TPC, it was reached yields between 9,97% and 14,73%. No significant effect was noticed. Curvature effect was the most important effect in this case, which suggests that a quadratic model would describe better this process. In addition, citric acid was the most important isolated effect, favoring TPC yields, in addition to interact with time and temperature. The study showed that the optimum conditions obtained through desirability function are: TPC = 55%; T = 60 °C; t = 10 h; Agitation = 168 rpm; citric acid= 1 g. Therefore, a new approach for guaraná extraction was able to improve yields of caffeine and polyphenols under presence of acid additive.

Key-words: guarana, extraction, caffeine, total phenolic compounds, citric acid, mace-
raction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cacho de guaraná in natura.....	18
Figura 2 – Estrutura morfológica do fruto do guaranazeiro.....	19
Figura 3 – Formas de comercialização do guaraná.....	19
Figura 4 – Complexo de cafeína e epicatequina. A) Pó liofilizado do complexo após precipitação em solução aquosa. B) Estrutura cristalina após recristalização.....	21
Figura 5 – Complexo de cafeína e epicatequina (EP) (A). Modelo de célula unitária (B). Estrutura em camadas e interações moleculares (C).....	22
Figura 6 – Estrutura molecular das principais metilxantinas.....	25
Figura 7 – Mapa percentual da ACP. PC1 e PC2 representam os componentes principais 1 e 2 respectivamente, cuja contribuição foi de 79 % no total de variância cumulativa.....	27
Figura 8 – Consumo e produção de café e chá pelo mundo.....	29
Figura 9 – Metabolismo da cafeína.....	30
Figura 10 – Estrutura química de um fenol.....	34
Figura 11 – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a estrutura química..	35
Figura 12 – Estrutura química geral de um flavonoide.....	35
Figura 13 – Estrutura química dos isômeros de flavanóis.....	36
Figura 14 – Estrutura molecular de algumas proantocianidinas.....	37
Figura 15 – Mecanismos de reação através dos quais os polifenóis expressam atividade antioxidante. R – Radical livre; M – Metal.....	38
Figura 16 – Beneficiamento do guaraná.....	42
Figura 17 – Fluxograma do processo industrial de produção de extrato de guaraná.....	43
Figura 18 – Mecanismo de transferência de massa no processo de extração sólido-líquido.....	45
Figura 19 – Modelo de difusão em um meio semi-infinito.....	48
Figura 20 – Parâmetro de Hansen de solubilidade para diversos solventes (verde: solventes verdes; azul: solventes clássicos; roxo: dióxido de carbono).....	54
Figura 21 – Parâmetro de Hansen para diversos metabólitos	55
Figura 22 – Efeito isolado da concentração de etanol no rendimento da extração de cafeína.....	56
Figura 23 – Efeito da temperatura de extração com água subcrítica no rendimento da	57

extração de cafeína de resíduo de chá.....	
Figura 24 – Curvas cinéticas de extração da cafeína em diferentes temperaturas.....	58
Figura 25 – Influência do tamanho de partícula na recuperação de fenólicos totais (CFT) com etanol 60 %, a 22 °C e RSL de 1:20 (m:v).....	59
Figura 26 – Efeito da velocidade de agitação na extração de polifenóis da casca de laranja.....	60
Figura 27 – Efeito da agitação na recuperação de taninos condensados do guaraná. Condições do processo: RSL – 1/3; solvente – etanol:água (50:50); tempo – 15 min.....	61
Figura 28 – Influência do pH no rendimento da extração líquido-líquido de extratos aquosos de café tratados com acetato de etila.....	63
Figura 29 – Rendimento de cafeína e catequina na extração de chá verde.....	64
Figura 30 – Guaraná em pó comercial.....	65
Figura 31 – Fluxograma do estudo da extração por maceração do guaraná.....	66
Figura 32 – Frascos onde se realizaram as extrações.....	69
Figura 33 – Sistema de incubação <i>shaker</i> usado na extração	70
Figura 34 – Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a resposta cafeína (%).....	76
Figura 35 – Médias marginais em pares para a resposta cafeína (%).....	78
Figura 36 – Médias marginais dos fatores tomados individuais.....	80
Figura 37 - Superfícies de resposta para a cafeína (%).....	81
Figura 38 – Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a resposta CFT (%).....	83
Figura 39 – Médias marginais em pares para a resposta CFT (%).....	84
Figura 40 – Médias marginais tomadas individualmente para a resposta CFT (%).....	85
Figura 41– Superfícies de resposta para CFT (%).....	86
Figura 42 – Perfil dos valores previstos e desejabilidade.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção, área de cultivo e produtividade do guaraná em 2019.....	20
Tabela 2 – Composição química das sementes de guaraná.....	21
Tabela 3 – Concentração de cafeína em diferentes partes do guaraná.....	26
Tabela 4 – Concentração de teofilina em diferentes partes do guaraná.....	26
Tabela 5 – Concentração de teofilina em diferentes partes do guaraná.....	26
Tabela 6 – Concentrações de metilxantinas (MX) e taninos totais (TT) de amostras de guaraná obtidas por análise espectrofotométrica. DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação.....	28
Tabela 7 – Solubilidade das metilxantinas em diferentes solventes.....	33
Tabela 8 – Concentração média de polifenóis no guaraná.....	37
Tabela 9 – Solubilidade da cafeína e catequina em diferentes solventes (g/100g).....	55
Tabela 10 – Variáveis dependentes e independentes do planejamento experimental.....	67
Tabela 11 – Matriz do delineamento experimental $2^{(5-2)}$ para análise da extração do guaraná em pó. C – ponto central.....	68
Tabela 12 – Soluções de diluição de cafeína para curva padrão.....	71
Tabela 13 – Soluções de tirosina com diferentes concentrações.....	72
Tabela 14 – Resultados dos ensaios de extração de compostos bioativos do guaraná.....	74
Tabela 15 – Análise de variância ANOVA para a resposta cafeína (%) do planejamento experimental fracionado 2^{5-2}	75
Tabela 16 – Estimativa dos coeficientes de regressão linear para a resposta cafeína (%)	75
Tabela 17 – Análise de variância ANOVA para a resposta CFT (%) do planejamento experimental fracionado 2^{5-2}	82
Tabela 18 – Resultado da função de desejabilidade para as resposta cafeína e CFT.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Δz	Distância infinitesimal percorrida, m
A	Agitação, rpm
AC	Ácido cítrico
ACP	Análise de componentes principais
AG	Ácido gálico
AG	Ácido gálico
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de prata
Bmin Tf2N	1-butil-3-metilimidazólio bis (trifluorometilsulfonil) imida
C	Ponto central
CAC	Concentração de ácido cítrico, mg/mL
CC	Concentração de cafeína, mg/mL
CFT	Compostos fenólicos totais, mg EqTi/mL
C_i	Concentração do soluto i no solvente
C_{i0}	Concentração na interface sólido-líquido
$C_{i\infty}$	Concentração no meio semi-infinito
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alt eficiência acoplada a espectrofotômetro de massas
CO ₂	Dióxido de carbono
CSH	Concentração da Solução Hidroalcoólica
D_i	Coefficiente de difusão binária do soluto i no solvente, m ² /s
DMF	Dimetoxietano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA -E	Extração com etanol 70%
EA-80	Extração aquosa a 80 °C
EA-A	Extração aquosa com ácido cítrico
EA-AT	Extração aquosa à alta temperatura
EA-D	Dupla extração aquosa
eq.	Equivalente
F	Estatística F
HFO-1234ze	1,3,3,3-Tetrafluoropropeno
M	Molar, mol/L
p	Probabilidade de significância
p	Peso, g

PA	Para análise
ρ_{ac}	Peso de ácido cítrico, g
pH	Potencial hidrogeniônico
ρ_{pg}	Peso de guaraná em pó, g
PS	Peso seco
RFC	Reagente Folin Ciocalteu
RSL	Razão sólido-líquido
S	Área de passagem de fluxo, m ²
t	Tempo, h
T	Temperatura, °C
TIR	Tirosina
UV-Vis	Luz ultravioleta e visível
v	Volume, mL
v_{ag}	Volume de água, mL
v_{rfc}	Volume do reagente Folin Ciocalteu, mL
y	Umidade em base seca, (p/p)
z	Distância na direção da transferência, m
δd	Força de interação molecular por dispersão
δh	Força de interação molecular por ligação de hidrogênio
δp	Força de interação molecular dipolo-dipolo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 GUARANÁ: ASPECTOS GERAIS.....	18
1.1.1 Composição Química do Guaraná.....	20
1.1.1 Aplicações Farmacológicas	39
1.1.2 Processamento e produção de extrato.....	41
2.2 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	44
2.2.1 Teoria e princípios.....	44
2.2.2 Técnicas de extração.....	48
2.2.3 Fatores que influenciam a extração	52
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.1 MATÉRIA-PRIMA	65
3.2 REAGENTES.....	65
3.3 MÉTODOS.....	66
3.3.1 Teor de umidade	66
3.3.2 Delineamento do planejamento experimental	67
3.3.3 Extração hidroalcoólica a quente.....	69
3.3.4 Quantificação de cafeína	70
3.3.5 Compostos Fenólicos Totais.....	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA.....	74
4.2 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	82
4.3 FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE PARA AS RESPOSTAS %CAFEÍNA E %CFT	87
5 CONCLUSÃO.....	90
6 PERSPECTIVAS	91

REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE A – Dados das curvas padrão das análises espectrofotométricas	104
APÊNDICE B – Dados das análises espectrofotométricas das amostras.....	107

1 INTRODUÇÃO

Compostos bioativos são substâncias capazes de gerar um efeito protetor na saúde humana. Estão presentes principalmente em fontes naturais na forma de fitoquímicos, vitaminas, fibras e sais minerais (ABBAS et al., 2017). Recente pesquisa indica que cerca de 70% das novas drogas produzidas nas últimas três décadas são derivadas ou completamente formadas por moléculas bioativas de procedência natural (NEWMAN; CRAGG, 2016). Existe um mercado biotecnológico em plena ascensão no desenvolvimento de alimentos funcionais inovadores, suplementos alimentares, nutracêuticos e novos medicamentos produzidos a partir de biocompostos naturais (QUINTIN et al., 2019).

Considera-se a Amazônia a região com maior densidade de recursos naturais do mundo, o que a torna um potencial mercado biotecnológico de fonte de bioativos (GOUVEA KASSICIEH; 2005). O guaraná, fruto típico da região, é a espécie vegetal com maior concentração já reportada de cafeína no bioma amazônico, além de ser rico em polifenóis (SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013). Por conta de sua composição, as amêndoas são conhecidas pelos efeitos estimulantes, sendo parte importante no comércio local na produção de extratos, guaraná em pó, bebidas energéticas e gaseificadas (SILVA et al., 2019).

Estudos recentes indicam o potencial terapêutico do uso de extratos de guaraná como matéria-prima para produção de suplementos alimentares, alimentos funcionais e medicamentos ricos em bioativos. O derivado da semente pode ser aplicado no tratamento de distúrbios gastrointestinais, como termogênico, agente antimicrobiano, como coadjuvante no tratamento do câncer, antiobesogênico, dentre outros (SANTANA e MACEDO, 2018b).

Para que os benefícios dos compostos fitoquímicos sejam aproveitados, é necessário o desenvolvimento de técnicas extrativas que consigam aumentar a concentração e pureza dessas moléculas quando aplicadas em alimentos e nutracêuticos. Logo, a extração dessas substâncias se torna uma etapa crítica no desenvolvimento de novos produtos provenientes de fontes naturais (IBARZ; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003).

As técnicas tradicionais de extração envolvem o contato de um solvente líquido com a matriz vegetal a fim de se solubilizar as moléculas de interesse. Métodos avançados englobam o uso de sistemas que permitem maior eficiência do processo, reduzindo tempo e impacto ambiental. Desses últimos, são exemplos a extração supercrítica, extração assistida por microondas e extração assistida por ultrassom. Apesar do caráter inovador, eles carecem de simplicidade no uso, custo inicial elevado e, em alguns casos, pouca escalabilidade e versatilidade

no tipo de moléculas extraíveis (AZWANIDA, 2015; LEFEBVRE; DESTANDAU; LESELLIER, 2020).

A maceração é uma técnica tradicional de extração que ainda é bastante empregada na obtenção de bioativos naturais devido a sua simplicidade, flexibilidade, escalabilidade e baixo custo operacional. A técnica consiste no contato do vegetal com o solvente em um sistema fechado e agitado, geralmente à temperatura ambiente, por períodos que podem chegar a dias de trabalho (GARCIA-VAQUERO; RAJAURIA; TIWARI, 2020). Industrialmente, faz parte da produção de extratos de guaraná (CARCIOCHI et al., 2021).

Apesar das vantagens, a metodologia apresenta alguns problemas, tais como: longos períodos de operação, grandes quantidades de solvente, degradação dos fitoquímicos e impacto ambiental (AZWANIDA, 2015). Por essa razão, estudos sobre formas de se melhorar o processo estão em constante evolução e se concentram no monitoramento de variáveis limitantes da operação, tais como temperatura, tempo de extração, mecanismos de agitação e tipo de solvente empregado (OREOPOULOU, A; TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, V., 2019).

Além da análise de variáveis críticas do processo, a implementação de aditivos químicos e biológicos no meio extrator também vem se tornando uma alternativa para aumentar a taxa de extração de biocompostos naturais (ZIMMERMANN e GLEICHENHAGEN, 2011). Essas substâncias seriam capazes de alterar a interação entre solvente e soluto, facilitar a liberação dos compostos das células vegetais e alterar quimicamente a estrutura dos bioativos. Exemplos incluem a extração em meio enzimático, extração em meio ácido ou básico e adição de acidulantes orgânicos naturais no meio extrator, como ácido cítrico ou ácido gálico (WANG et al., 2020).

O uso de ácido cítrico na extração tem como vantagem o fato de ser um conservante natural vastamente empregado na prevenção do escurecimento de alimentos frescos (ROCULLI et al., 2007). No meio extrator, ele seria capaz de prevenir a degradação de compostos fenólicos, modificar a seletividade do solvente e alterar quimicamente a estrutura das moléculas alvo, tornando-as mais estáveis e biologicamente mais ativas (COX et al, 2019).

Alguns estudos sobre o efeito do ácido cítrico na extração de polifenóis e metilxantinas de erva-mate e chá verde reportaram efeitos significativos na seletividade de solventes (ZIMMERMANN; GLEICHENHAGEN, 2011; DEMIR et al., 2015; SERDAR et al., 2016). Para o caso do guaraná, todavia, não há estudos relacionados ao uso de ácido cítrico como aditivo na extração de seus princípios ativos, o que seria uma nova alternativa para a extração da amêndoa.

Portanto, o problema científico deste trabalho refere-se a: qual o efeito do ácido cítrico e de algumas variáveis críticas do processo de extração por maceração (temperatura, agitação, tempo de extração e composição do solvente) no rendimento em termos de concentração de cafeína e compostos fenólicos do guaraná?

Como hipótese ao problema proposto, tem-se que: (i) a adição de ácido cítrico teria efeito significativo na extração de compostos fenólicos e cafeína do guaraná; (ii) a alteração das variáveis críticas do processo de extração poderia melhorar o rendimento na obtenção de bioativos do guaraná; (iii) a interação da adição de ácido cítrico com uma ou mais variáveis do processo extrativo por maceração geraria efeito significativo no rendimento da extração.

Assim, o objetivo geral desta pesquisa consiste em investigar a extração de compostos bioativos do guaraná em um sistema de agitação *shaker* com adição de ácido cítrico. Os objetivos específicos são:

- Determinar o efeito da mudança das variáveis independentes tempo, temperatura, concentração de solvente hidroalcoólico (CSH), presença de ácido cítrico, bem como seus efeitos de interação, no rendimento de biocompostos do guaraná, com base nas análises de cafeína e compostos fenólicos totais (CFT).
- Estabelecer as regiões ótimas de extração que maximizem o rendimento de cafeína e CFT com base na análise dos efeitos das variáveis independentes e suas interações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GUARANÁ: ASPECTOS GERAIS

O guaraná é um fruto proveniente do guaranazeiro (Figura 1), um arbusto da família sapindáceas (*Paulinia cupana* H. B. K var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) que ocorre naturalmente no norte região da Amazônia, especificamente na Guiana, Venezuela e nos estados do Amazonas e Pará, interior do Brasil (CARDOSO et al., 2017).

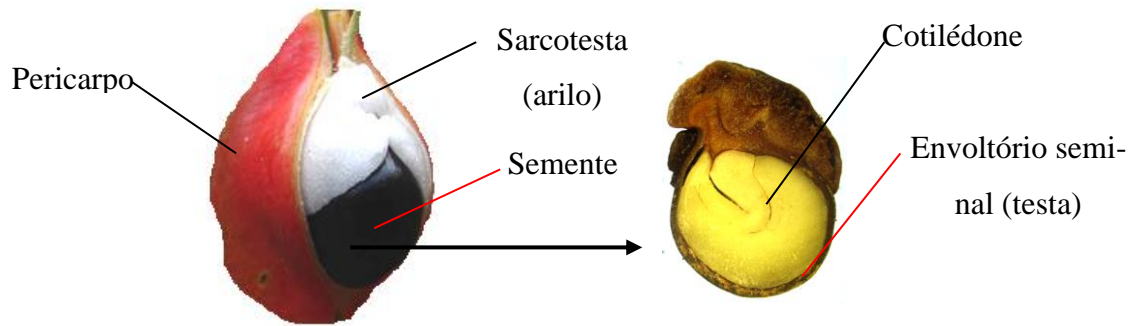
Anatomicamente, o fruto é uma cápsula recoberta por um pericarpo de cor avermelhada, cujo tamanho pode variar de 1,18 cm até 3,0 cm de comprimento e de 0,75 cm a 2,5 cm de largura (Figura 2). Após a maturação, as sementes surgem e contrastam com uma estrutura carnosa branca chamada de arilo (POLO, 2006; MEDEIROS; H; FORZZA, R.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, R.; 2016). Cada cápsula contém até três amêndoas, as quais representam o principal constituinte de interesse do guaraná (ATROCH; FILHO, 2018).

Figura 1 – Cacho de guaraná in natura



Fonte: Filho (2012)

Figura 2 – Estrutura morfológica do fruto do guaranazeiro



Fonte: adaptado de Apolo (2006)

O bastão foi a primeira forma de comércio do arbusto, cuja origem atribui-se aos índios da tribo Sateré-Maué, em Maués, Amazonas. Para obtê-lo, as sementes passam por um processo artesanal de fabricação em fornos de barro, culminando no “pão de waraná” (Figura 3), usado no preparo de bebidas. Os grãos torrados, também conhecidos como ramas, fomentam a produção de extratos e xaropes e representam a principal forma de comercialização do insumo, embora apresentem valor agregado inferior. Por fim, existe o formato em pó, comum no comércio varejista e de maior valor comercial, usado principalmente para o preparo de alimentos (TAVARES *et al.*, 2005).

Figura 3 – Formas de comercialização do guaraná. (A) sementes torradas ou ramas; (B) pó seco e torrado; (C) pasta de grão moldada na forma de bastão e desidratada por processo de defumação.



Fonte: compilação do autor¹

O Brasil é o maior produtor comercial global de guaraná. O fruto é naturalmente abundante nos municípios de Maués e Parintins, interior do estado do Amazonas (OZORIO; ATROCH; FILHO, 2019). Conforme Tricaud, Pinton e Pereira (2016), a crescente demanda

¹ Montagem a partir de imagens coletadas de Martins et al. (2014) (A), fonte própria (2021) (B) e de Beaufort (2018) (C).

industrial pelo produto no setor de bebidas e a modernização do sistema de cultivo incentivaram a integração de outros estados do país na cultura do arbusto, sendo Bahia, Amazonas e Mato Grosso, nessa ordem, os maiores produtores. De acordo com a CONAB (2020), a área de plantação brasileira chegou a 10.097 ha em 2019, cuja produção atingiu 2.761 t (Tabela 1).

Tabela 1 – Produção, área de cultivo e produtividade do guaraná em 2019

Estado	Produção (t)	Área (ha)	Produtividade (kg.ha⁻¹)
Bahia	1.624	5.603	290
Amazonas	858	3.954	218
Mato Grosso	145	326	449
Demais estados	134	214	626
Brasil	2.761	10.097	274

Fonte: adaptado de CONAB (2020)

O maior interesse por trás das sementes decorre de sua composição química. O fruto é rico em taninos e metilxantinas, principalmente a cafeína, uma substância estimulante que pode representar de 2,5% a 6% do peso seco do grão (SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013). Suas propriedades terapêuticas como estimulante, tônico e afrodisíaco tornaram-se mundialmente conhecidas após os primeiros relatos do uso por tribos indígenas da região de Maués e impulsionaram a aplicação em bebidas. A criação do Guaraná Antártica, em 1921, e dos projetos da EMBRAPA de melhoria genética expandiram a indústria do grão e consolidaram seu comércio (MENEGHETTI; SILVA, 2020).

Atualmente, os fitoquímicos do guaraná vêm sendo relacionados a benefícios para saúde, o que tem aumentado a inserção do produto em alimentos funcionais, remédios e suplementos alimentares. Alguns dos benefícios incluem melhora na função cognitiva, resistência na prática de atividade física, propriedades antimicrobianas e anticancerígenas (SANTANA; MACEDO, 2018b).

1.1.1 Composição Química do Guaraná

Em 1826, Theodor Martius iniciou os primeiros estudos acerca dos constituintes químicos presentes nas sementes do guaraná. Com auxílio do botânico Carl Martius, o pesquisador foi quem primeiro isolou o princípio estimulante da amêndoa, denominando-o guaranina (SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013). Descreveu-se a substância como um composto

crystalino, branco e amargo, cujas propriedades davam conta de que se tratava de um isômero da cafeína (BEAUFORT, 2018).

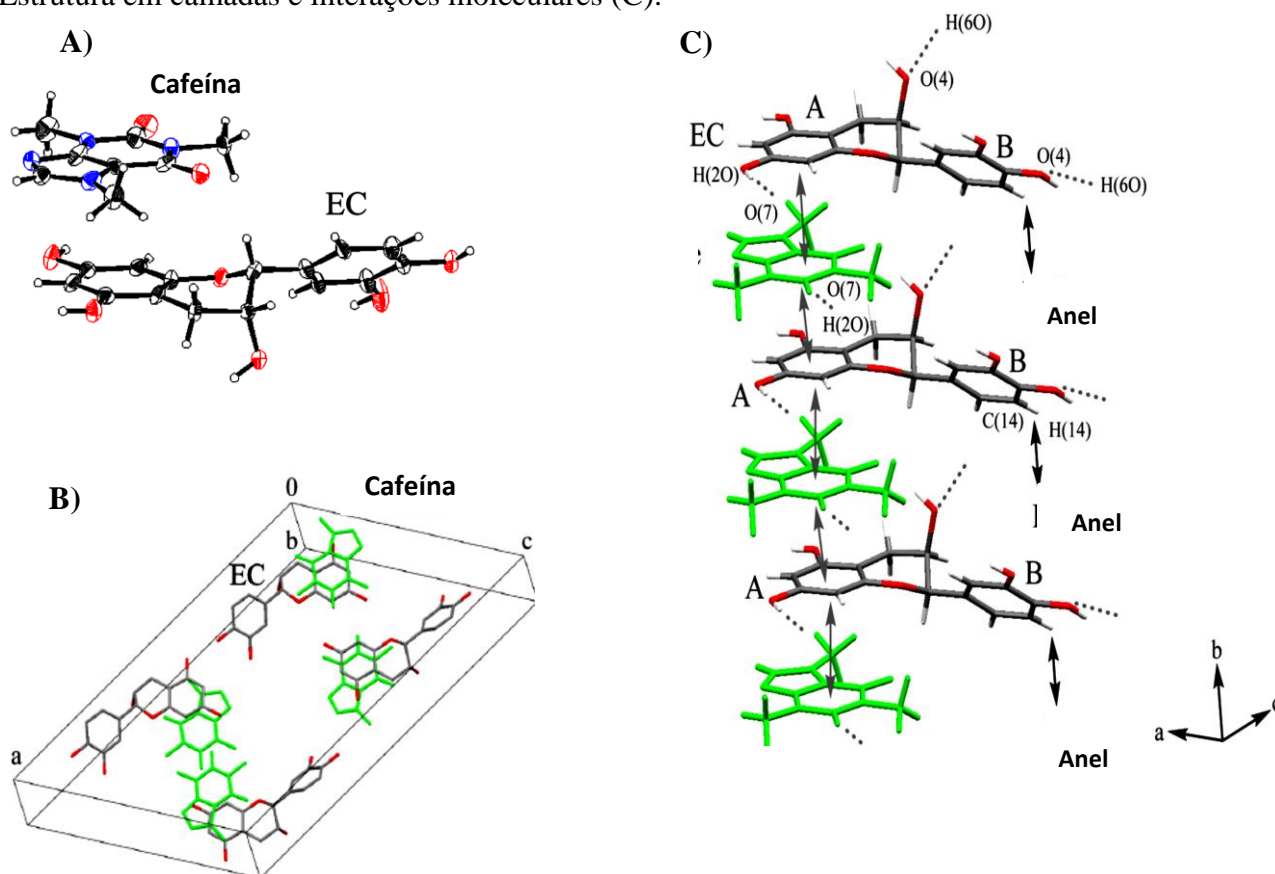
Apesar de considerada, na época, uma nova substância, anos mais tarde se descobriu que a guaranina, na realidade, era um composto idêntico à cafeína (FIGUEROA, 2016). Em 1840, Berthelot e Dechastelus demonstraram que o princípio ativo era um complexo formado por polifenóis, como as epicatequinas, e o alcaloide, conforme Figura 4 e 5, gerado a partir de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre os compostos, o que levou Martius acreditar que se tratava uma nova espécie química (SPENCER et al., 1988; EDWARDS et al., 2005; BEAUFORT, 2018).

Figura 4 – Complexo de cafeína e epicatequina. A) Pó liofilizado do complexo após precipitação em solução aquosa. B) Estrutura cristalina após recristalização



Fonte: Ishizu, Takashi e Sato (2016)

Figura 5 – Complexo de cafeína e epicatequina (EP) (A). Modelo de célula unitária (B). Estrutura em camadas e interações moleculares (C).



Fonte: Ishizu, Takashi e Sato (2016)

Além da cafeína, outras substâncias de interesse estão presentes no guaraná. É possível detectar, em menor quantidade, outras metilxantinas, como a teobromina e a teofilina, além de uma alta concentração de polifenóis, principalmente taninos. Também fazem parte dos constituintes químicos da amêndoa os ácidos graxos, polissacarídeos, saponinas, proteínas, além de traços dos elementos rubídio, magnésio, ferro, níquel e estrôncio, conforme se demonstra na Tabela 2 (MARQUES et al., 2017).

Tabela 2 – Composição química das sementes de guaraná

Substância	Conteúdo (%)	Referência	Farmacopeia
Cafeína	2,41 – 5,07	(HENMAN, 1982; SPOLADORE et al., 1987; BAUMANN et al., 1995; ANDRADE et al., 1999; ZEIDAN-CHULIA et al., 2013; BITTENCOURT et al., 2014; ROGGIA et al., 2020; CARCIOCHI et al., 2021)	> 5
Taninos totais	5,0 – 14,1	(MARX, 1990; USHIROBIRA et al., 2004; FUKUMASU et al., 2006a; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; ANTUNES, 2011; ROGGIA et al., 2020)	> 4
Proteínas	7 – 16,29	(ANGELUCCI et al., 1978; NAZARÉ, 1998; SANTANA e MACEDO, 2018a)	-
Polissacarídeos	30 – 65, 03	(ANGELUCCI et al., 1978; NAZARÉ, 1998; SANTANA e MACEDO, 2018a)	-
Açúcares	6,0 – 8,0	(ANGELUCCI et al., 1978)	-
Fibras	3,0 – 21,9	(ANGELUCCI et al., 1978; ANTUNES, 2011; SANTANA e MACEDO, 2018a)	-
Lipídeos	2,2 – 6,25	(ANGELUCCI et al., 1978; AVATO et al., 2003; ANTUNES, 2011; SANTANA e MACEDO, 2018a)	-
Cinzas totais	1, 0 – 2,88	(ANGELUCCI et al., 1978; MATTEI et al., 1998; NAZARÉ, 1998; ANTUNES, 2011; SANTANA e MACEDO, 2018a)	< 3
Umidade	4,3 – 10,82	(ANGELUCCI et al., 1978; MATTEI et al., 1998; NAZARÉ, 1998; ANTUNES, 2011; SANTANA e MACEDO, 2018a)	< 9,5
Níquel	0, 00005 – 0, 0004	(ADOLFO et al.; 2020)	-
Ferro	0, 002 – 0,05	(ADOLFO et al.; 2020)	-

Fonte: adaptado de Marques et al. (2017)

Dentre os diversos fitoquímicos que constituem o guaraná, as metilxantinas, do ponto de vista medicinal, são os componentes que recebem maior atenção (SALOMÃO-OLIVEIRA *et al.*; 2018). Conforme Carrageta *et al.* (2018), essas substâncias vêm sendo associadas a diversos efeitos fisiológicos no corpo humano, incluindo o sistema nervoso, cardíaco, respiratório e reprodutivo. Podem-se encontrar aplicações relacionadas a efeitos diuréticos, inibição de apetite, metabolismo de lipídeos, reações psicoativas e cardioprotetoras (MONTEIRO *et al.*, 2018).

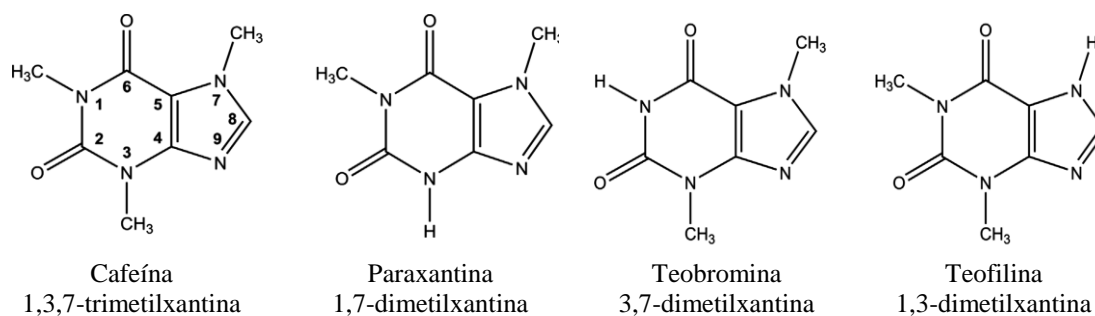
Além das metilxantinas, os polifenóis presentes na semente também possuem atividades biológicas com efeitos terapêuticos relevantes (SALOMÃO-OLIVEIRA *et al.*; 2018). Devido a sua capacidade antioxidante, esses compostos são aptos a reduzir o estresse oxidativo das células humanas, além de estabilizar a presença de radicais livres (YONEKURA, 2016). Em virtude de sua habilidade como modulador de marcadores relacionados ao câncer, os polifenóis, ainda, podem atuar como inibidores do crescimento de células cancerígenas (FANTINI, 2015).

1.1.1.1 Metilxantinas

As metilxantinas são compostos orgânicos naturais formados a partir de derivados metilados de xantinas (NEHLIG, 2015; CARREGATA *et al.*, 2018). São complexos heterocíclicos de bases purinas concebidos a partir do atrelamento dos anéis imidazol e pirimidinadiona (MONTEIRO; ALVES; SILVA, 2018). Cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina) e a teobromina (3, 7-dimetilxantina) são as principais fontes naturais de metilxantinas (Figura 6). Além delas, existe a paraxantina (1,7 - dimetilxantina), que se diferencia das outras por ser proveniente do metabolismo da cafeína no corpo de animais, principalmente em humanos (MONTEIRO *et al.*, 2016).

A estrutura química desses compostos é responsável por conferir-lhes propriedades distintas. A presença do nitrogênio na posição 9 os transforma em bases fracas de Bronsted com propriedades eletrolíticas (SALIHović *et al.*, 2014). A teofilina, no entanto, é considerada uma doadora de próton devido à ausência de um grupo metil na posição 7, agindo, assim, como um ácido de Bronsted em grande parte das aplicações farmacológicas (MONTEIRO *et al.*, 2016). De fato, o grupo metil vem sendo relacionado a propriedades fisiológicas da cafeína, por exemplo, cujo caráter lipofílico acaba aumentando sua permeabilidade através de células e outras barreiras biológicas (NEHLIG; 2018; SAMI *et al.*, 2018).

Figura 6 – estrutura molecular das principais metilxantinas



Fonte: adaptado de Carregata et al (2018)

No guaraná, as metilxantinas estão distribuídas em diferentes quantidades pelo arbusto, sendo a cafeína a representante em maior concentração. A maior parte está na semente e no cotilédone (primeiro par de folhas embrionárias da amêndoa), enquanto o pericarpo e o arilo possuem apenas traços ou ausência total das bases purinas, conforme descrito na Tabela 3, 4 e 5 (SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013). Esse espalhamento é reflexo de um mecanismo evolutivo para proteger planta do ataque de pragas, além de facilitar a dispersão da semente por pássaros, tendo em vista que as metilxantinas possuem propriedades tóxicas para alguns animais (BAUMANN et al., 1995; MITHÖFER; BOLAND, 2012; WECKERLE et al., 2003).

Tabela 3 – Concentração de cafeína em diferentes partes do guaraná

Produto	Rendimento (%)	Referência
Arilo	0	(BAUMANN et al.,1995)
Testa	1,64	(BAUMANN et al.,1995)
Pericarpo	0,02 – 0,5	(BAUMANN et al.,1995; OLIVEIRA, 2010)
Semente	1,6 – 7,8	PIRES, 1949; MARAVALHAS, 1965; SPOLADORE et al., 1987; BAUMANN et al., 1995; MEURER-GRIMES et al., 1998; OLIVEIRA, 2010)
Folhas	0 – 0,3	(SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013)
Caule	0 – 0,02	(SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013)
Cotilédone	3,3 – 5,3	(OLIVEIRA, 2010)figur

Fonte: adaptado de Schimpl, Silva e Gonçalves (2013) e Macedo e Santana (2018b)

Tabela 4 – Concentração de teofilina em diferentes partes do guaraná

Produto	Rendimento (%)	Referência
Arilo	0	(BAUMANN et al.,1995)
Pericarpo	0,203	(WECKERLE et al., 2003)
Semente	0,0039 – 0,017	(YONEKURA et al., 2016; MACHADO et al., 2018)
Folhas	2,0 – 5,0	(SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013)
Caule	0,1 – 0,75	(SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013)
Extrato	0,04 – 0,4	

Fonte: adaptado de Schimpl, Silva e Gonçalves (2013) e Macedo e Santana (2018b)

Tabela 5 – Concentração de teobromina em diferentes partes do guaraná

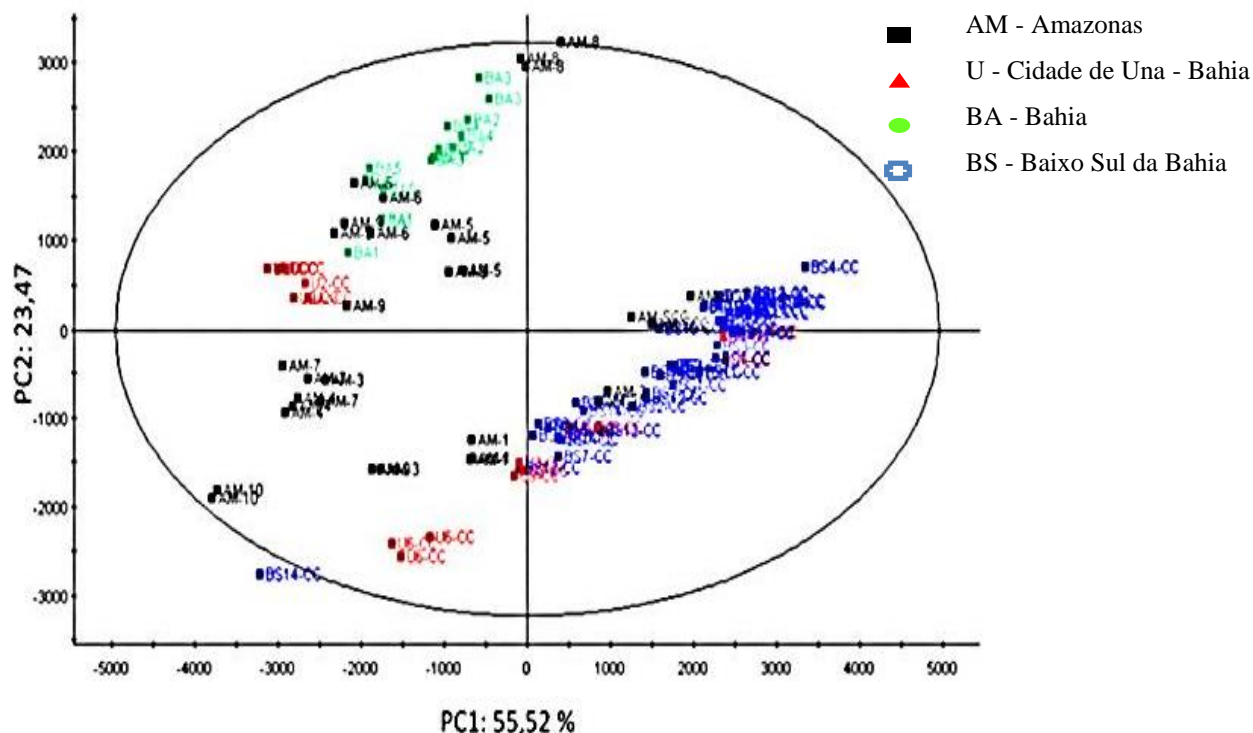
Produto	Rendimento (%)	Referência
Arilo	0	(BAUMANN et al.,1995)
Pericarpo	0,001	(WECKERLE et al., 2003)
Semente	0,0028 – 0,013	(YONEKURA et al., 2016; MACHADO et al., 2018)
Folhas	0,2 – 0,65	(SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013)
Caule	0,02 – 0, 09	(SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013)
Extrato	0,63 – 1,77	(SANTANA e MACEDO, 2018a)

Fonte: adaptado de Schimpl, Silva e Gonçalves (2013) e Macedo e Santana (2018b)

Conforme se observa na Tabela 3, 4 e 5, os valores de fitoquímicos apresentam faixas de variabilidade. Consoante com Bertin et al. (2014), fatores geográficos, origem botânica, natureza do cultivo e condições de extração atuam diretamente no perfil de compostos da semente.

Em um estudo sobre perfil químico do guaraná, Silva, G. S. et al. (2017) confirmaram uma diferença significativa entre amostras provenientes do Amazonas e Bahia, conforme Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 7). O estudo se baseou no perfil metabólico das amostras de quatro regiões distintas, com base no tempo de retenção e razão carga-massa obtidos por CLAE -EM.

Figura 7 – Mapa percentual da ACP. PC1 e PC2 representam os componentes principais 1 e 2 respectivamente, cuja contribuição foi de 79 % no total de variância cumulativa



Fonte: adaptado de Silva, G. S. et al. (2017)

Já Ushirobira et al. (2004) verificou níveis diferentes de metilxantinas e taninos relacionados à forma de secagem do grão, conforme dados da Tabela 6.

Tabela 6 – Concentrações de metilxantinas (MX) e taninos totais (TT) de amostras de guaraná obtidas por análise espectrofotométrica. DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação

Secagem	MX ± DP $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CV)	TT ± DP % (CV)
Tacho de barro, 2 h	8,69 ± 0,34 (3,98)	254,14 ± 0, (6,13)
Torrado ao Sol	5,80 ± 0,27 (4,65)	3,00 ± 0,21 (6,93)
Tacho de barro, 4 h	7,17 ± 0,21 (3,01)	4,74 ± 0,04 (0,08)
Tacho metálico com água, 2,5 h	6,78 ± 0,18 (2,70)	4,88 ± 0,19 (3,95)
Tacho metálico com água, 4h	8,39 ± 0,18 (2,20)	5,05 ± 0,30 (5,91)
Tacho metálico sem água, 4h	7,06 ± 0,15 (2,13)	5,30 ± 0,14 (2,62)

Fonte: adaptado de Ushirobira et al. (2004)

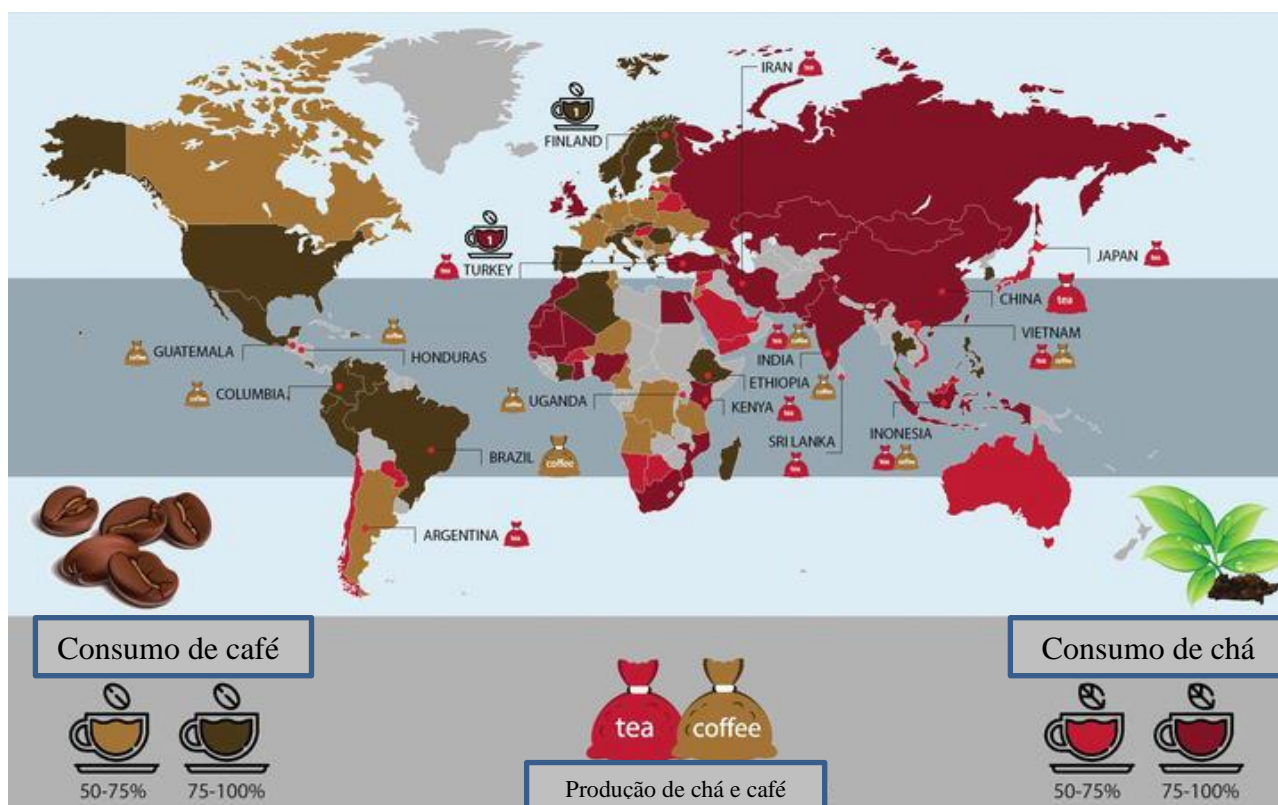
Em relação a outras fontes naturais de bases purinas, a *Paullinia sp.* possui relativamente concentrações maiores de cafeína (SPOLADORE, 1987; HECKMAN et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013). Os frutos do arbusto podem

ter um teor do alcaloide até 4 vezes maior que o café, 30 vezes quando comparado às sementes de cacau e 10 vezes em relação à erva-mate (EDWARD et al., 2005).

A cafeína é o principal alvo de estudos científicos sobre o guaraná, já que apresenta a maior concentração dentre os fitoquímicos do fruto, além de estar associada aos principais efeitos decorrentes do seu consumo (MARQUES et al., 2017). Desde que ela foi isolada em 1820 por Friedlieb Ferdinand Runge em sementes de café (*C. arábica*) e folhas de chá-da-índia (*C. sinensis*), a substância passou a ser alvo de estudos demonstrando seus efeitos farmacológicos, especialmente como um poderoso estimulante do sistema nervoso central (MARTINI et al., 2016; NEHLIG, 2018).

Considerada a droga psicoativa mais consumida no mundo, a 1,3,7 –trimetilxantina está presente em diversos alimentos, principalmente no café, refrigerantes, chocolate, bebidas energéticas, chás, suplementos alimentares e medicamentos (ALSABRI et al., 2018; QUADRA et al., 2019). Além do guaraná, ela pode ser encontrada em mais 60 espécies diferentes de plantas, sendo o café a principal delas (BARONE e RONERTS, 1996). Em 2018, segundo a *Acute Market Report* (2020), o mercado dessa metilxantina foi avaliado em torno de US\$ 231,1 milhões, despontando Estados Unidos e União Europeia como principais consumidores, enquanto América Latina e Ásia são as maiores regiões produtoras (Figura 8).

Figura 8 – Consumo e produção de café e chá pelo mundo



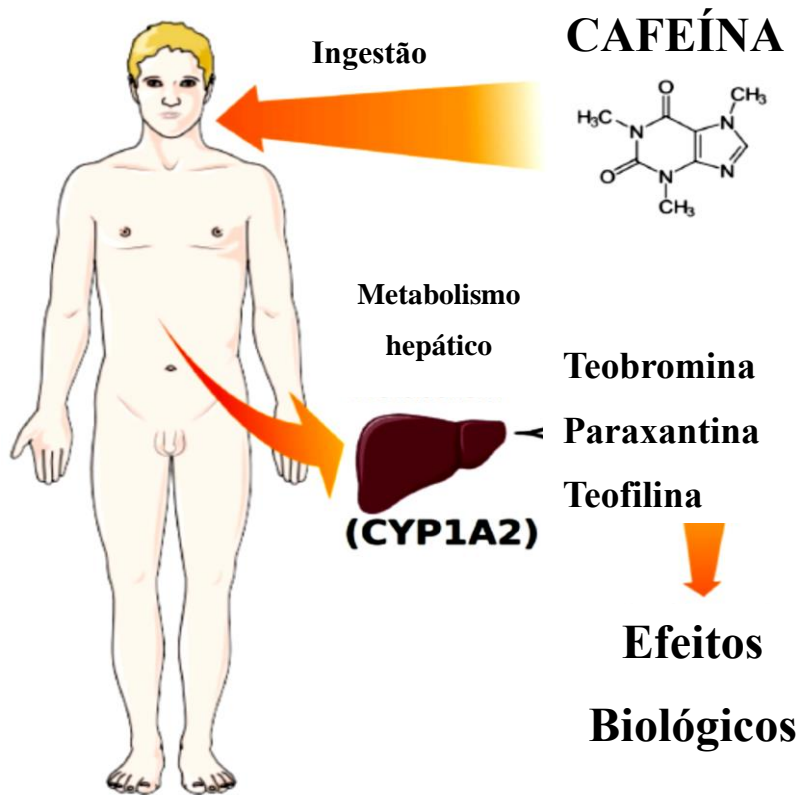
Fonte: adaptado de Latosinska, J e Latozinska, M. (2017)

O consumo médio anual chega a 120 mil toneladas por ano, dos quais 79% são provenientes do café, 15 % do chá e 6% vêm do cacau, mate e outras fontes. Conforme se observa na Figura 8 a principal fonte de cafeína no Ocidente é o café, enquanto no Oriente há uma predileção pelo chá. Dentre os 60 países exportadores de café, o Brasil se destaca como um dos maiores consumidores, chegando a 5 kg per capita anualmente. Já os europeus apresentam uma faixa de consumo per capita que varia de 3 a 10 kg a cada ano (LATOSINSKA, J e LATOZINSKA, M., 2017).

Em virtude do grande número de usuários espalhados pelo mundo, a cafeína tornou-se objeto de diversos estudos demonstrando seu metabolismo e efeito no corpo humano (TEMPLE et al., 2017). A substância tem a capacidade de estimular o sistema nervoso central, além de promover a secreção de hormônios e alterar parâmetros fisiológicos do organismo (BARCELOS et al., 2020). A principal forma de ingestão acontece por via oral e, devido a sua característica lipofílica, é rapidamente absorvida pelo organismo (GONZALES et al., 2014).

Uma vez ingerida, a cafeína é inicialmente metabolizada no fígado (Figura 9). Nos hepatócitos, o metabolismo primário do alcaloide é desencadeado pela família de enzimas citocromo P450, especificamente a isoenzima hepática CYP1A2, responsável por cerca de 95 % do processo de metabólico. Através de uma reação de desmetilação, a cafeína é transformada em seus respectivos metabólitos: teofilina (4%), paraxantina (84%) e a tobromina (12%) (SILVA, L. D. et al., 2017; NEHLIG, 2018; BARCELOS et al., 2020) . Cada uma dessas substâncias exerce papel biológico nos diferentes tecidos do corpo, cuja intensidade e efeito dependerão da idade, sexo, dose consumida, genética e interação com outras drogas (NEHLIG, 2018).

Figura 9 – Metabolismo da cafeína no organismo humano



Fonte: Barcelos et al (2020)

No organismo, o estimulante possui meia-vida de 4 a 5 horas em adultos, podendo ser menor para fumantes e maior em mulheres grávidas, recém-nascido, crianças e quando associado ao uso de contraceptivos (ALSABRI et al., 2018). Já a liberação apresenta uma taxa variável para cada indivíduo, ficando entre 1 e $3 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, enquanto o pico plásmico ocorre cerca de 1 hora após a ingestão (RYBAK et al., 2015). Estudos indicam que quanto maior a dose consumida, menor é a taxa de liberação da cafeína, como consequência da saturação de paraxantinas na circulação sanguínea e consequente interferência no metabolismo do composto (NEHLIG, 2018).

O efeito que a cafeína e seus metabólitos exercem no corpo se deve a vários mecanismos de ação, e o principal deles está relacionado ao antagonismo nos receptores de adenosina A1 e A2A (SAWYNOK, 2011). Devido a sua estrutura química similar às adenosinas, a cafeína tem efeito modulatório nos receptores dessas moléculas, inibindo sua ação e provocando diversos efeitos no sistema nervoso central, tais como: insônia, aumento da frequência cardíaca e respiratória, efeito analgésico (associado a outros medicamentos), estímulo de funções

psicomotoras e comportamentais e regulação do metabolismo sistêmico (NAYAK e TEJ, 2018). Os principais efeitos da cafeína estão sumarizados no Quadro 1.

Quadro 1 – Efeitos da cafeína investigados e seu impacto

Resultado	Impacto da cafeína ²	Comentários
Efeito cognitivo	↑	Mais significativo em indivíduos retraídos e cansados
Desordem neurológica	↑	Benefícios mas pronunciados em mulheres
Alívio de dor	↑	Funciona junto a outros analgésicos
Funções cardiovasculares	↑↑	Efeito dose-dependente nos batimentos cardíacos e na pressão sanguínea
Sistema vascular	↑	A cafeína causa vasoconstrição. Pode aumentar o risco de isquemia cardíaca
Efeitos reprodutivos	↓	Altas doses de cafeína aumentam o risco de aborto espontâneo
Anomalias congênitas	↔	Sem associação clara
Peso ao nascer	↓	Correlação negativa entre a ingestão de cafeína e peso ao nascer
Lactação	↓	Pode aumentar a agitação e prejudicar o sono em bebês
Desordens comportamentais em crianças	↑	O consumo de bebidas energéticas é positivamente associado a resultados comportamentais negativos
Distúrbios de sono	↑↑↑	A cafeína causa distúrbios de sono em todas as populações estudadas
Morte	↑	Raro
Hidratação e diurese	↔	Sem associação clara
Câncer	↔	Sem associação clara, porém há poucos estudos
Bexiga hiperativa	↑	Primariamente em mulheres com sintomas de bexiga hiperativa pré-existentes
Interação com drogas	↑	Potencial interação negativa com muitos medicamentos

Fonte: adaptado de Temple et al (2017)

² As setas indicam impacto positivo, negativo e ausência de impacto nos resultados. Quanto maior o número de setas, maior será o impacto.

Embora apresente benefícios para o corpo, o uso excessivo desse psicoativo pode causar efeitos adversos quando consumido em excesso. Doses acima de 500 mg.dia^{-1} podem causar o que se chama de cafeinismo, efeito tóxico da cafeína caracterizado pelos sintomas de ansiedade, insônia, perda de apetite, inquietude e sintomas somáticos no sistema cardiovascular e gastrointestinal. Apesar de ser rara, a morte causada por *overdose* de cafeína pode acontecer quando o consumo for acima de 5 g.kg^{-1} para adolescentes e $8 - 10 \text{ g.kg}^{-1}$ para adultos (MINISTERRÅDET, 2008).

Do ponto de vista das propriedades físico-químicas, a cafeína é um pó incolor, inodoro e levemente amargo, apresentando ponto de sublimação de $180 \text{ }^\circ\text{C}$ e ponto de fusão de $236,5 \text{ }^\circ\text{C}$ à pressão atmosférica. À temperatura ambiente, ela é mais solúvel em solventes orgânicos, como clorofórmio, que em água; já em relação às outras metilxantinas, apresenta maior facilidade em formar solução em solventes polares, conforme a Tabela 7. Estudos indicam que a presença do grupo metil nos dois anéis heterocíclicos desses compostos é responsável pelas diferenças nas suas propriedades (SPILLER, 1998).

Tabela 7 – Solubilidade das metilxantinas em diferentes solventes

Solvente	Cafeína (%)	Theobromina (%)	Theofilina (%)
Água, 150 °C	1,3	-	-
Água	2,2	0,005	0,83
Água, 400 °C	4,6		-
Água, quente	-	Solúvel	-
Água, 800 °C	18,2	-	-
Água, fervendo	66,7	0,67	-
Éter	0,3	Quase insolúvel	Moderadamente solúvel
Álcool, 600 °C	4,5	-	-
Álcool	1,2	1,25	-
Álcool, 600 °C	4,5	-	-
Álcool 95%	0,045	-	-
Acetato de etil	2,5	-	-
Clorofórmio	13,0	Praticamente insolúvel	0,91
Acetona	2,0	-	-
Benzeno	1,0	Praticamente insolúvel	-
Benzeno, fervendo	4,5	-	-
Pirrol	Livremente solúvel	-	-
Tetrahidrofurano e 4% de água	Livremente solúvel	-	-
Éter de petróleo	Moderadamente solúvel	-	-
Tetracloroeto de carbono	Praticamente insolúvel	Praticamente insolúvel	-

Fonte: Spiller (1998)

A determinação e quantificação desses compostos são de suma importância para o estudo das suas diversas fontes e controle das dosagens em produtos consumíveis. Dessa forma, os principais métodos analíticos envolvidos no estudo da cafeína são os cromatográficos acoplados a sistemas de detecção espectrofotométricos. Devido ao alto custo envolvido na análise com esses equipamentos, novos métodos vêm sendo desenvolvidos, prometendo padrões de precisão similares, porém a um custo mais acessível. Como exemplo, podem-se citar os méto-

dos eletroquímicos, como o sistema de voltametria cíclica, que será usado neste trabalho (LATOSINSKA, J e LATOZINSKA, M., 2017).

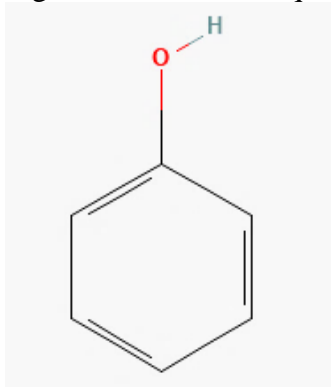
1.1.1.2 Polifenóis

O polifenóis são compostos naturais formados por um ou mais anéis aromáticos acoplados a um grupo hidroxil. Existem mais de 8000 espécies dessas substâncias, as quais estão presentes, sobretudo, em vegetais, frutas, café, cereais, chá e vinho (SHAH et al., 2018). São responsáveis por conferir características organolépticas a plantas, especialmente o gosto amargo, além de proporcionar a diferença de cor entre muitas frutas e vegetais (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021).

Como metabólitos secundários sintetizados nos vegetais, agem na defesa contra microorganismos invasores, em decorrência da ação tóxica que o grupo hidroxil proporciona. Atuam, ainda, na proteção dos tecidos vegetais contra ação de raios ultravioletas (UV) (SHIR-MOHAMMAD; EFHAMISISIA; PIZZI, 2018). Além disso, constituem parte importante da dieta humana, em virtude de suas propriedades bioativas no organismo (TSAO, 2010; ABBAS et al., 2017).

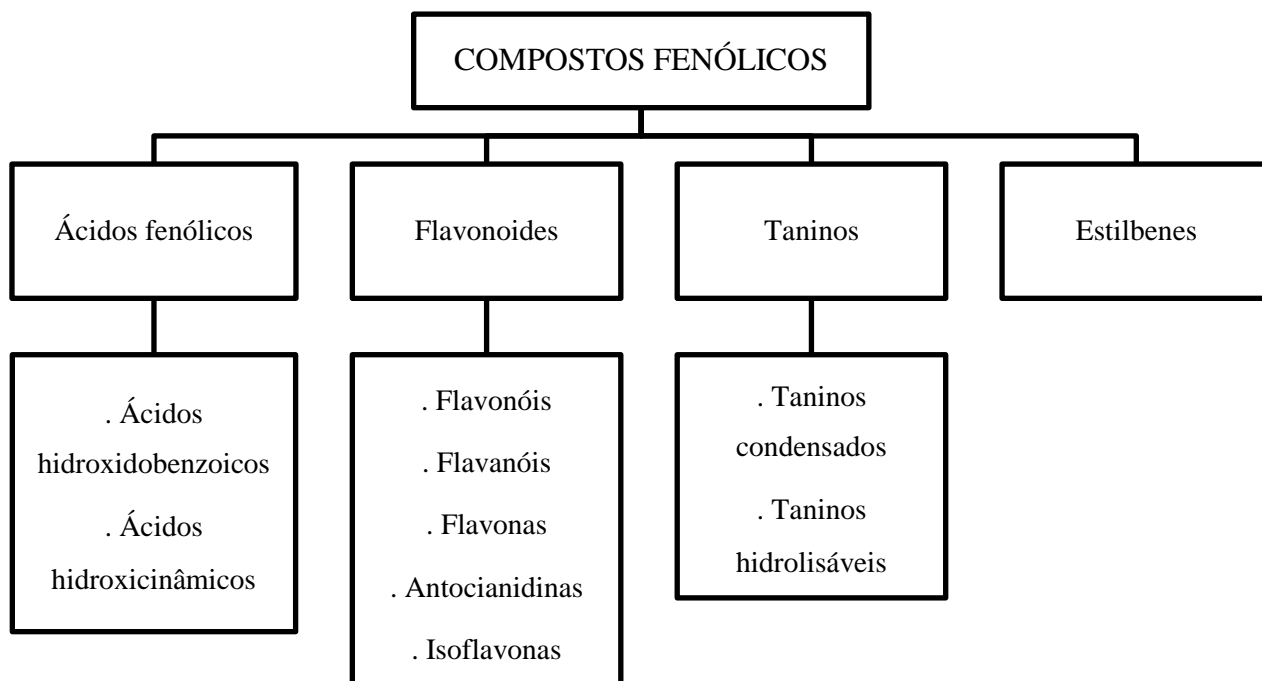
Os polifenóis apresentam uma grande diversidade e distribuição, logo, sua classificação adota diferentes critérios, tais como estrutura química, função biológica e origem (TSAO, 2010). O fenol (Figura 10) é o monômero que forma a base de um polifenol e, conforme sua estrutura e acoplamento com outras funções orgânicas, permita a classificação dessas substâncias tal como se demonstra na Figura 11 (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

Figura 10 – Estrutura química de um fenol



Fonte: National Center for Biotechnology Information (2021)

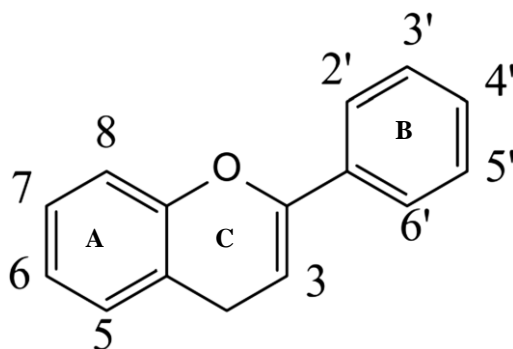
Figura 11 – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a estrutura química



Fonte: adaptado de Alara, Abdurahman e Ukaegbu (2021)

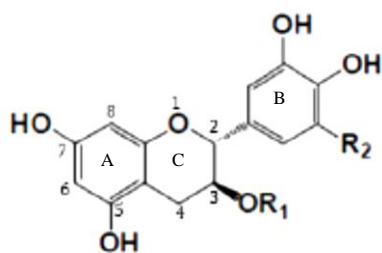
No guaraná, os flavanóis são o principal grupo presente de fenólicos. Também chamados de flavan-3-ol, os flavanóis são uma subclasse de flavonoides (Figura 12) ocorrentes em bebidas como vinho tinto, suco de frutas, chocolate e chá verde. São caracterizados pela hidroxilação nas posições 5° e 7° do anel A e 3°, 4° e 5° no anel B (Figura 13). Já no anel C, existe a possibilidade de esterificação por ácido gálico ou hidroxilação, ambas na posição 3 (TSAO, 2010; SILVA, G. S. et al., 2017).

Figura 12 – Estrutura química geral de um flavonoide

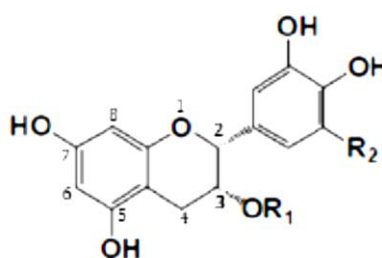


Fonte: Fraga et al. (2019)

Figura 13 – Estrutura química dos isômeros de flavanóis



Catequinas	R1	R2
(+)-Catequina	H	H
(+)-Galato de catequina	Galoil	H
(+)-Galocatequina	H	OH
(+)-Galato de galocatequina	Galoil	OH



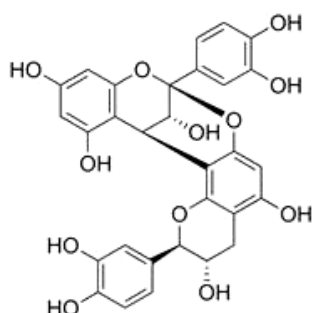
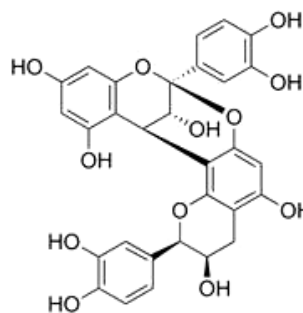
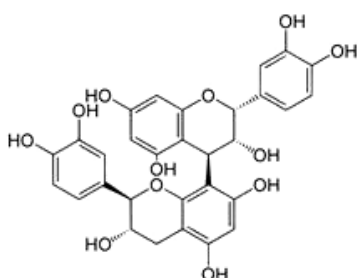
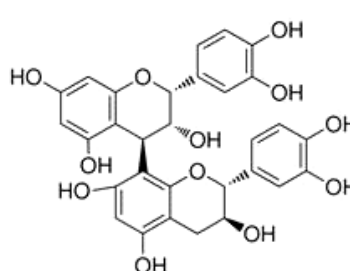
Epicatequina	R1	R2
(-)-Epicatequina	H	H
(-)-Galato de epicatequina	Galoil	H
(-)-Epigalocatequina	H	OH
(-)-Galato de epigalocatequina	Galoil	OH

Fonte: adaptado de Colomer et al. (2017)

Os flavanóis possuem 2 centros quirais na posição C2 e C3 do anel C. Consequentemente, são capazes de formar quatro diastereoisômeros: as catequinas, isômeros de configuração *trans*, e as epicatequinas, isômeros de configuração *cis*, cada uma possuindo 2 estereoisômeros diferentes, conforme descrito na Figura 13 (TSAO et al., 2003).

Além dessas estruturas, os flavan-3-ols também são capazes de gerar compostos poliméricos a partir dos monômeros epicatequina e catequina, as chamadas proantocianidinas. Também conhecidos como taninos condensados, esses compostos são altamente antioxidantes e podem apresentar duas subclasses, as procianidinas do tipo A ou B, a depender da ligação que ocorre entre as unidades monoméricas. No tipo B, a ligação acontece na forma C4-C6 ou C4-C8. Enquanto o tipo A é caracterizado por apresentar uma ligação adicional no C2-O-C7 ou C2-O-C5 (TSAO et al., 2003; COLOMER et al., 2014; SILVA, G. S. et al., 2017). Na figura 14, estão alguns representantes desse grupo.

Figura 14 – Estrutura molecular de algumas proantocianidinas

Procianidina A1**Procianidina A2****Procianidina B1****Procianidina B2**

Fonte: adaptado de Bansode et al. (2014)

Em sementes de guaraná, a manifestação dos flavanóis está associada à coloração escura e sabor amargo dos extratos. Machado et al. (2018), em um estudo sobre o perfil de compostos bioativos do guaraná, identificou 8 diferentes tipos de polifenóis, englobando as catequinas, epicatequinas e oligopolímeros de proantocianidinas. Na Tabela 8, estão resumidas as concentrações médias dos principais compostos fenólicos presentes no guaraná, segundo estudos diferentes.

Tabela 8 – Concentração média de polifenóis no guaraná

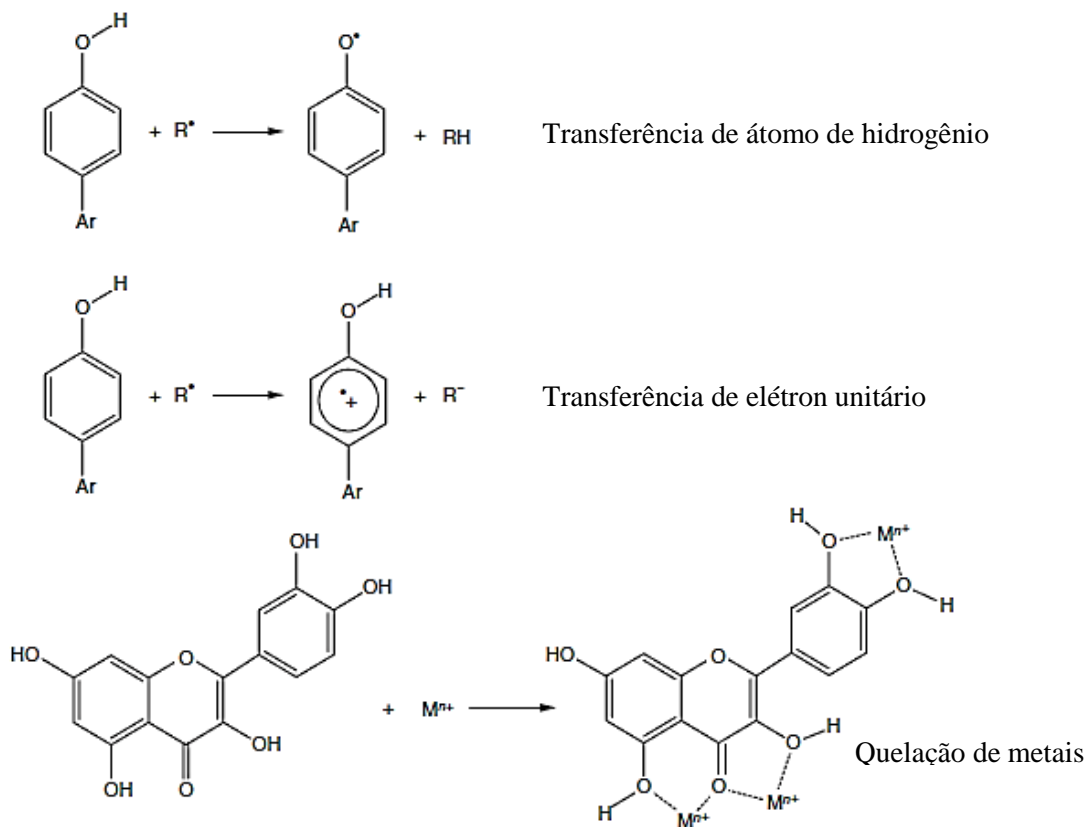
Composto	Produto	Rendimento (%)	Referência
Catequina	Semente	30	'
Epicatequina	Semente	2,02	(YONEKURA et al., 2016)
Galato de epicatequina	Extrato	0,1- 0,4	(MAJHENIČ; ŠKERGET; KNEZ, 2007)
Proantocianidina B1	Semente	0,372	(YONEKURA et al., 2016)
Proantocianidina B2	Semente	0,372	(YONEKURA et al., 2016)
Proantocianidina A2	Extrato	0,025 – 0,06	(MACHADO et al. 2018)

Fonte: adaptado de Santana e Macedo (2018b)

Em relação às aplicações, os compostos fenólicos são parte importante da dieta humana e vêm sendo relacionados à redução no risco de algumas doenças crônicas, tais como câncer, doenças cardiovasculares, inflamações e uma série de patologias degenerativas, além do caráter antimicrobiano (DZAH et al., 2020; FORNI et al., 2019; TOMÉ-CARNEIRO e VISIOLI, 2016). Uma vez que boa parte delas está associada ao estresse oxidativo resultante da atuação de radicais livres, como oxigênio reativo e espécies nitrogenadas, os polifenóis, exímios agentes antioxidantes, teriam um papel significativo no combate a essas enfermidades (ABBAS et al., 2017; ALARA et al., 2018).

A atividade antioxidante dos polifenóis se deve, sobretudo, à estrutura altamente conjugada de suas moléculas e aos seus padrões de hidroxilação. Eles seriam capazes de doar um par de elétrons, um átomo de hidrogênio ou atuar como agentes quelantes de metais, neutralizando a ação de radicais livres, além de impedir ou desativar a atividade de espécies precursoras dessas moléculas. (DZAH et al., 2020; VILLAÑO et al., 2007). Os principais mecanismos reacionais envolvidos nessa atividade estão presentes na Figura 15:

Figura 15 – Mecanismos de reação através dos quais os polifenóis expressam atividade antioxidante. R – Radical livre; M – Metal



Adicionalmente, os polifenóis podem atuar na modulação de enzimas e executar atividade regenerativa de algumas vitaminas essenciais, atuando como um co-antioxidante (OUYANG et al., 2019; TSAO, 2010).

Entretanto, estudos recentes vêm demonstrando que a concentração que esses compostos alcançam nos tecidos, em alguns casos, não é alta suficiente para justificar um efeito antioxidante significativo *in vivo* diretamente (CHIRIAC et al., 2021; LI et al., 2014). Em vez disso, outros mecanismos poderiam estar envolvidos na ação biológica dos polifenóis, tais como sua interação com receptores celulares e vias de transdução de sinal, gerando respostas adaptativas no organismo que estariam associadas aos diversos efeitos terapêuticos dessas moléculas (FRAGA et al., 2019).

No que se refere à quantificação e identificação dos polifenóis, não existe um protocolo padrão definido, uma vez que há uma grande variedade dessas espécies químicas em fontes naturais diversas (CHIRIAC et al., 2021). Entretanto, os métodos espectrofotométricos ainda são a principal forma de determinação dessas substâncias. Eles são rápidos e de fácil aplicação, ainda que sejam pouco específicos. Para quantificação mais acurada dos polifenóis, técnicas de separação, como Cromatografia Líquida de Alta Performance e Cromatografia Gasosa, são constantemente aplicadas juntamente à espectrofotometria (GLEICHENHAGEN e SCHIEBE, 2016).

1.1.1 Aplicações Farmacológicas

O guaraná está presente em diferentes produtos do mercado e pode facilmente ser encontrado em lojas de suplementos, tanto físicas quanto virtuais (MARQUES; KLEIN; MELL; 2019). O formato em pó, em geral, está disponível na forma bruta, dentro de cápsulas ou misturado a suplementos alimentares e combinados de ervas medicinais. Já o extrato pode estar contido em cosméticos, bebidas gasosas, energéticos, fármacos e xaropes (SANTANA e MACEDO, 2018b).




O uso disseminado do guaraná em produtos alimentícios, especialmente nos chamados alimentos funcionais, é atribuído principalmente aos efeitos terapêuticos associados aos compostos bioativos do fruto. Por esta razão, ele aparece na Farmacopeia Brasileira como uma droga vegetal, assim como em códigos farmacêuticos do México, Estados Unidos e de vários países da União Europeia (SALOMÃO-OLIVEIRA et al.; 2018).

Em decorrência do interesse sobre os efeitos que o consumo do guaraná geraria na saúde humana, vários estudos vêm sendo feitos para comprovar suas aplicações farmacológicas.

As metodologias usam principalmente o extrato de guaraná, além de comparar o efeito combinado com outras ervas e compostos isoladamente, tal como a cafeína e os polifenóis. Assim, abordagens realizadas em humanos, animais e células vêm demonstrando efeitos terapêuticos, conforme descrito no Quadro 2 (MARQUES et al., 2017).

O guaraná está presente em vários suplementos alimentares, muitos deles combinados com ervas medicinais, prometendo auxiliar na perda de peso. De fato, alguns estudos nos quais se administraram doses suplementares contendo extrato de guaraná em humanos demonstraram resultados positivos na redução de índices lipídicos e peso (KALMAN *et al.* 2002; LIMA *et al.*, 2005; PALMA *et al.*, 2016; YONEKURA *et al.*, 2016). O mecanismo de ação estaria relacionado a potencial ação modulatória nos minRNAs e ao aumento do metabolismo energético e estímulo da biogênese mitocondrial, mesmo em dietas ricas em gordura (LIMA, CARIA; GAMBERO; RIBEIRO, 2018).

Quadro 2 – Relação de efeitos terapêuticos do guaraná já estudados

Efeitos terapêuticos		
Estudo em humanos	Estudo em animais	Estudo em células
		
Anticâncer Anti-inflamatório Anti-obesogênico Antitumoral Neuroprotetivo	Anti-inflamatório Antitumoral Ansiolítico Panicolítico Anti-obesogênico Neuriprotetivo	Anti-adipogênico Antiproliferativo Citoproteção

Fonte: adaptado de Santana e Macedo (2018a)

Alguns estudos correlacionam o uso do guaraná com a melhora da capacidade cognitiva e saúde mental. O benefício estaria associado principalmente à alta concentração de cafeína da amêndoa associada a suplementos minerais, haja em vista que a metilxantina é conhecida por sua capacidade de aumentar os níveis de excitação e estado de alerta. Entretanto, exis-

tem estudos controversos quanto ao efeito (KENNEDY et al., 2004; HASKELL et al., 2007; POMPORTES et al., 2017).

O efeito ansiolítico do extrato de guaraná pode ser uma alternativa para a criação de drogas de menor custo no tratamento de doenças mentais. Estudos com extrato de guaraná administrados em roedores demonstraram uma contribuição positiva no sistema neurotransmissor glutamérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, os quais estão associados ao estado de euforia e tensão (RANGEL e AUDI, 2013).

Adicionalmente, é possível encontrar pesquisas ressaltando o efeito protetor que o guaraná exerce em diversos tecidos e órgãos do corpo humano. Por exemplo, demonstrou-se que o extrato seco da semente tem propriedades gastroprotetivas superiores à cafeína (CAMPOS et al., 2003). Em roedores, o pó do guaraná apresentou benefícios hepatoprotetivos (KOBBER et al., 2016). Outros estudos ressaltaram a capacidade neuroprotetora e de inibição da acetilcolinesterase, o que abriria caminho para o uso do guaraná como uma terapia adjuvante no tratamento de doenças cognitivas, como o Alzheimer (TREVISAN e MACEDO, 2003; BITTENCOURT et al., 2014).

Outra emergente aplicação do guaraná é a utilização como agente antimicrobiano. O uso do extrato aquoso em forma de enxaguante bucal demonstrou efeito estatisticamente eficaz no tratamento de placa bacteriana na superfície dental (YAMAGUTI-SASAKI *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* constataram a ação de extrato etanólico de guaraná contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, principalmente a *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* e *E. coli* (BASILE *et al.*, 2005).

Por fim, destaca-se também o uso tópico do guaraná no desenvolvimento de cosméticos. Um estudo aplicando extrato aquoso em *C. elegans* mostrou-se eficaz no aumento da vida útil e atenuação de marcadores do envelhecimento, demonstrando a ação antienvelhecimento da amêndoa (PEIXOTO et al., 2017). A presença de saponinas no guaraná, como substâncias detergentes, tem justificado sua aplicação como xampu, melhorando a ação de limpeza do produto. Além disso, o efeito antioxidante dos compostos fenólicos atuaria na proteção da fibra capilar contra agressões externas (CAMPOS; LEITE, 2020).

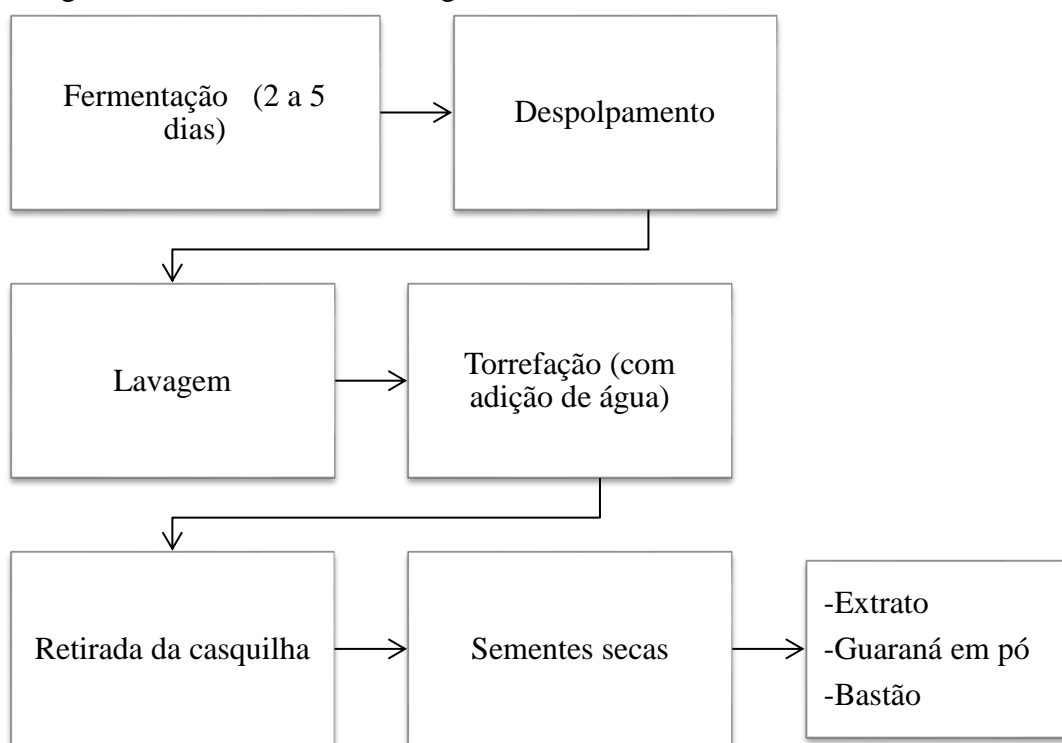
1.1.2 Processamento e produção de extrato

Após a colheita, o guaraná passa por uma série de processos de beneficiamento, conforme Figura 16, visando à obtenção de produtos com alto teor de cafeína. A principal forma

de concentração consiste na obtenção de extratos da semente na forma de soluções hidroalcoólicas (SANTANA e MACEDO, 2018b). Elas podem conter até o dobro da concentração de cafeína encontrada na semente, pelo que justifica o uso no preparo de bebidas energéticas (SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013).

A primeira etapa do processo é o despulpamento. Essa fase consiste na fermentação da massa do fruto para separá-la do grão, levando cerca de 2 a 5 dias até que se desprenda totalmente. Em seguida, realiza-se a separação final em despulpadoras (TAVARES *et al.*, 2005). Devido ao gargalo gerado pelo grande tempo de fermentação, novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para eliminá-la do beneficiamento, como o uso de desracemadores (SANTOS, 2018).

Figura 16 – Beneficiamento do guaraná



Fonte: adaptado de Tavares et al. (2005)

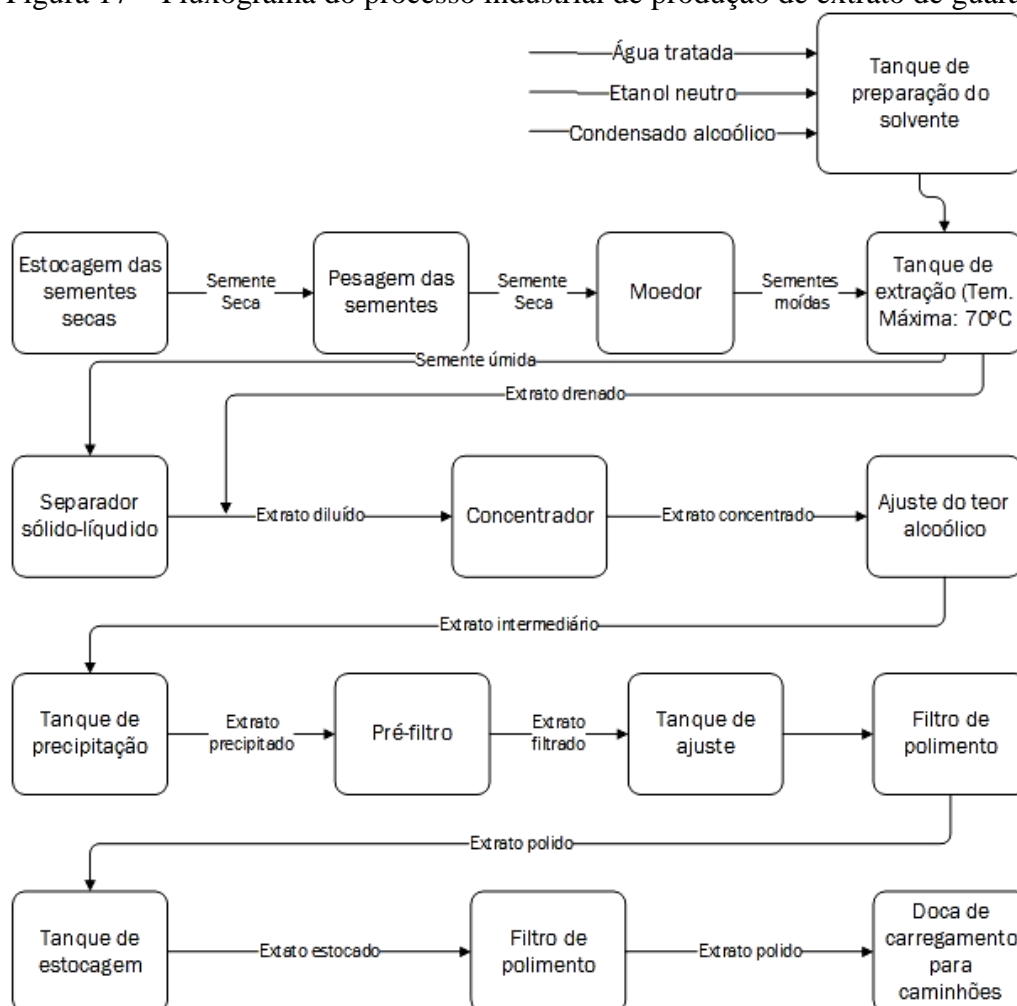
No passo consecutivo, as sementes secas e lavadas são separadas, através de peneiras, de acordo com seu tamanho, uniformizando as suas dimensões para a operação seguinte. Durante a torrefação, despejam-se as amêndoas em fornos de barro ou metálicos, em fogo baixo, permanecendo até atingirem o ponto de estalo, o qual acontece quando o teor de umidade das sementes chega entre 5% e 7%, ideal para o uso como bastão. No caso da aplicação na indús-

tria de refrigerantes, o valor deve estar entre 8% e 12% (TAVARES et al., 2005; SOUZA, 2016).

As sementes secas são a principal forma de comercialização do grão. É, sobretudo, através delas que se obtêm os extratos de guaraná, embora eles possam ser produzidos a partir do pó também. A produção de extrato está ligada principalmente à indústria de bebidas e tônicos, correspondendo, por exemplo, a cerca de 70 % de todo destino das sementes na região de Maués, uma das maiores localidades produtoras do país (MARQUES et al., 2017).

O método tradicional de produção de extrato é feito por meio de extração sólido-líquido a quente, usando uma mistura de etanol e água como solvente (CARCIOCHI et al., 2021). Os extratos hidroalcoólicos, assim que gerados, passam por uma etapa de concentração, que consiste na evaporação do álcool, podendo, então, ser destinado aos produtos finais. Na Figura 13, está descrito o processo de obtenção industrial do extrato, conforme patente da empresa Coca-Cola (TURANO, 2006).

Figura 17 – Fluxograma do processo industrial de produção de extrato de guaraná



Fonte: adaptado de Turano (2006)

Novas tecnologias e métodos de extração vêm sendo desenvolvidos no campo de compostos naturais. Essas inovações visam aumentar a concentração, bioatividade e biodisponibilidade das substâncias fitoquímicas, além de evitar degradação durante os processos extrativos e mitigar impactos ambientais (CHIRIAC et al., 2021). Alguns parâmetros, como temperatura, pH, agitação mecânica e natureza do solvente são fatores cruciais do processo, sendo decisivos no rendimento e recuperação dos bioativos (OREOPOULOU, A; TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, V., 2019). Nos próximos tópicos, serão discutidos esses e outros aspectos envolvendo a operação de extração.

2.2 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

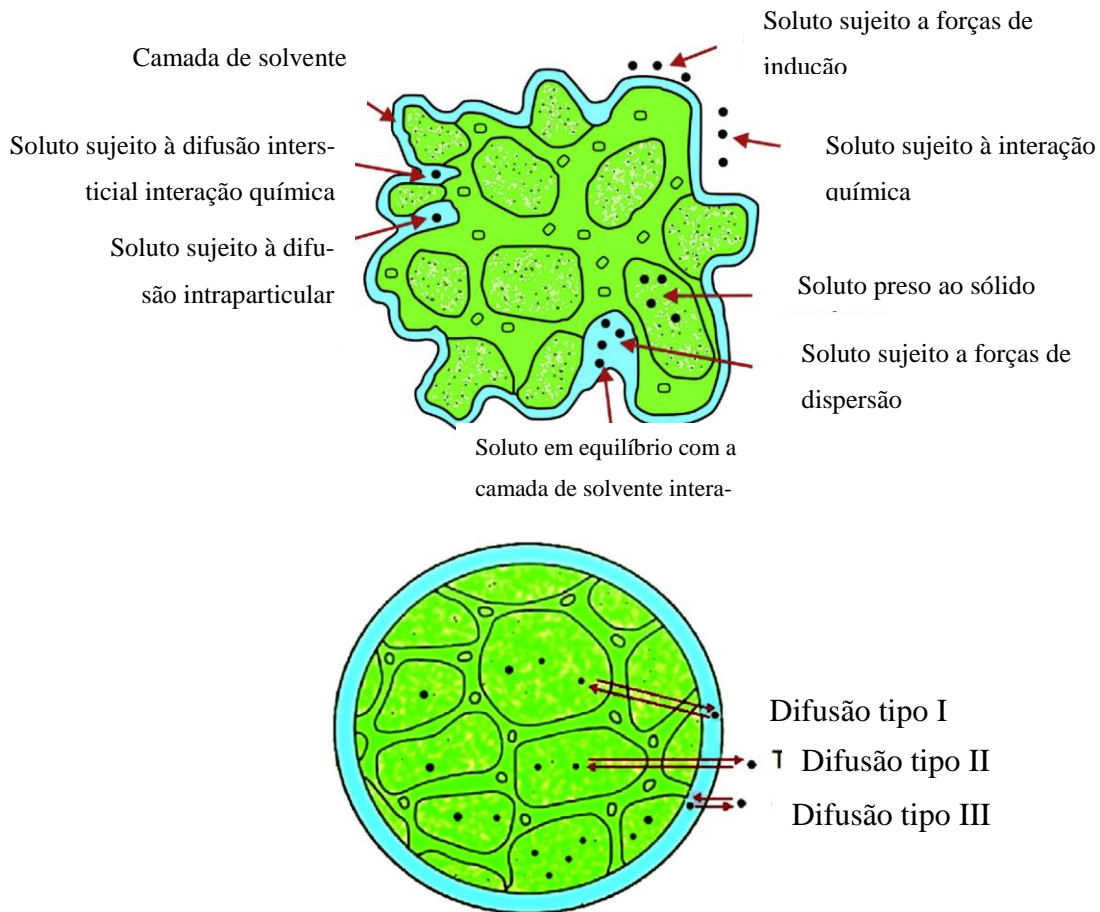
2.2.1 Teoria e princípios

A extração sólido-líquido é uma operação de transferência de massa que tem como princípio a separação de um ou mais componentes de uma fase sólida, o soluto, através de uma fase líquida ou gasosa, o solvente (WELTY *et al.*, 2007). No contexto dos compostos bioativos, seu principal objetivo é isolar fitoquímicos em extratos com baixo teor de substâncias indesejáveis (IBARZ; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003). Pode receber diversas denominações, como lixiviação, percolação, lavagem, etc. No entanto, quando o produto de interesse está na fase sólida, caso deste trabalho, lixiviação é um termo frequentemente empregado (TREYBAL, 1981).

Em geral, a extração de compostos bioativos de fontes naturais é feita usando a matriz vegetal seca como material de partida, pois a umidade aumenta a atividade enzimática e conseqüente degradação dos compostos naturais (DENG et al., 2018). Celulose, hemicelulose e lignina são os componentes responsáveis por formar toda a malha de tecidos vegetais em que os fitoquímicos estão inseridos (CHEN et al., 2018). A lixiviação, assim, envolve o acesso do solvente a essas estruturas para solubilização dos componentes de interesse.

O mecanismo de transferência de massa envolvido na extração é, em grande parte, explicado pela teoria da difusão molecular, também conhecida como a segunda lei de Fick. (GUERKE et al., 2018). A seguir, destacam-se os três estágios que envolvem o modelo difusional dessa operação, conforme Ibarz e Barbosa-Cánovas (2003) e Vinatoru, Mason e Calinescu (2017), também ilustrado na Figura 18:

Figura 18 – Mecanismo de transferência de massa no processo de extração sólido-líquido



Fonte: adaptado de Vinatoru, Mason e Calinescu (2017)

- Inicialmente, o solvente cria uma camada em torno da partícula sólida e começa a adentrar seus poros. Nesse instante, a matriz vegetal sofre um processo de dilatação, chegando a dobrar de tamanho. Cria-se uma interface sólido-líquida através da qual o soluto migra do sólido para a fase líquida. Esse fenômeno, chamado de difusão do tipo I, ocorre de maneira instantânea e tem pouco efeito sobre a taxa global de extração.

- No segundo estágio, a difusão ocorre no interior dos poros do sólido na direção da interface sólido-líquido até a superfície da partícula para além do filme que se forma ao seu redor. Nesse estágio, o mecanismo que governa o movimento do soluto é o gradiente de concentração, no qual as partículas se movimentam de uma região de menor para de maior concentração. Denominada difusão do tipo 2, a transferência de massa envolvida se dá apenas por difusão molecular, haja vista que o solvente encontra-se estagnado no interior do vegetal.

- Na terceira fase, o soluto alcança a superfície da partícula e inicia o processo de difusão do tipo III. Nele, o transporte de massa ocorre simultaneamente por difusão turbulenta e molecular, no sentido da camada estagnada para o volume de solvente.

Cada uma dessas etapas contribui para o movimento do soluto para solvente, no entanto, a segunda é a que, geralmente, governa a taxa de transferência. O efeito da primeira fase é negligenciado, visto que é instantâneo, enquanto o segundo estágio ocorre de maneira mais lenta em relação aos demais e, por essa razão, é o que normalmente controla o processo extrativo (IBARZ; BARBOSA-CÁNOVAS; GUERKE et al., 2018).

Para se fazer um balanço material desse processo, toma-se um volume de controle $S.\Delta z$ através do qual uma solução contendo o soluto de interesse atravessa. Supondo que o sistema não tenha reação química e que o transporte de massa é governado somente por difusão molecular, escreve-se, pois, a equação da continuidade (WELTY, et al., 2008; CLUSSLER, 2009):

$$\left(\text{Acúmulo de soluto} \right)_{\text{no volume } S.\Delta z} = \left(\text{taxa de difusão através} \right)_{\text{da camada em } z} - \left(\text{taxa de difusão através} \right)_{\text{da camada em } z + \Delta z} \quad (01)$$

Em que S representa a área de passagem de fluxo, Δz é a distância infinitesimal percorrida e z um ponto ao longo do eixo z de deslocamento.

Em termos matemáticos:

$$\frac{\partial}{\partial t} = (S\Delta z c_i) = S(J_i|_z - J_i|_{z+\Delta z}) \quad (02)$$

Em que J_i representa a taxa de difusão e t , o tempo. Dividindo-se os dois termos por $S.\Delta z$, obtém-se:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = - \left(\frac{J_i|_{z+\Delta z} - J_i|_z}{(z+\Delta z) - z} \right) \quad (03)$$

Aplicando-se o limite de Δz tendendo a zero e o conceito de derivada, resulta-se:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = - \frac{\partial J_i}{\partial z} \quad (04)$$

Combinando-se esse resultado com primeira lei de Fick (equação 5), chega-se a equação 6:

$$J_i = -D \frac{\partial C_i}{\partial z} \quad (05)$$

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (06)$$

Em que:

- C_i : Concentração do soluto i no solvente (mg.mL^{-1}).
- D_i : Coeficiente de difusão binária do soluto i no solvente ($\text{mm}^2.\text{min}^{-1}$).
- z : distância na direção da transferência (mm).

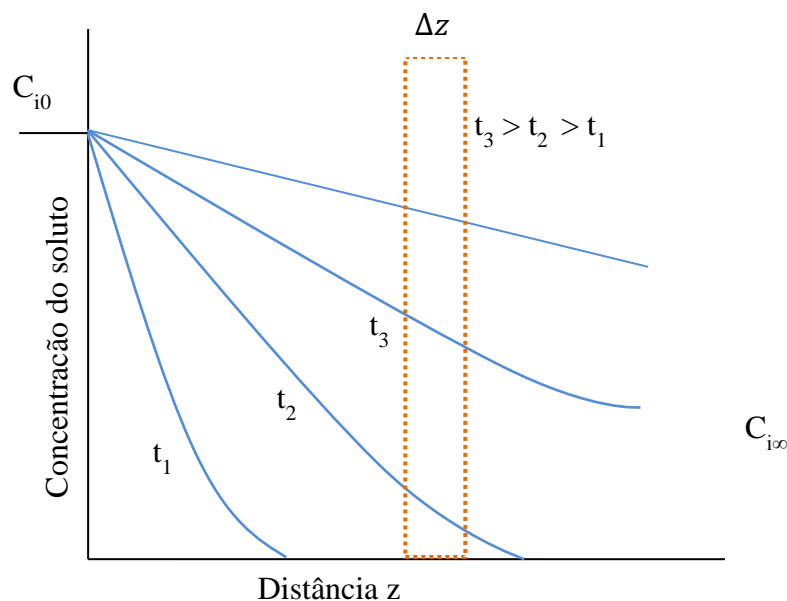
A equação 6 é conhecida como segunda lei de Fick e representa situações em que ocorre variação do fluxo difusional e do gradiente de concentração com o tempo, ou seja, em regime não estacionário ou transiente (ZIAEDINI, JAFARI e ZAKERI, 2010). O coeficiente de difusão, no geral, é constante, caso não varie com a composição do soluto, por isso, fica fora do termo diferencial (CLUSSLER, 2009).

A solução para a lei de Fick pode envolver integrais especiais, funções de erro ou funções trigonométricas, a depender do quanto longo é o valor de tempo empregado. Analiticamente, é comum o uso de transformadas de Laplace ou separação de variáveis (WELTY et al., 2008; HELDMAN; LUND, 2007). Para esse fim, frequentemente emprega-se o modelo transiente de difusão através de um meio semi-infinito, estabelecendo-se as seguintes condições de aplicação (ZIAEDINI, JAFARI e ZAKERI, 2010):

- Assume-se que as partículas sólidas são placas finas.
- O soluto está uniformemente distribuído pelo sólido em um primeiro momento.
- A concentração do soluto varia com o tempo e direção (regime não estacionário).
- Existe um equilíbrio termodinâmico na interface sólido-líquido.
- Os poros são canais pseudo-homogêneos.

Na Figura 19, esquematiza-se o referido modelo de difusão. Ele se aplica à maioria dos casos de difusão envolvendo extração sólido-líquido. Cada uma das curvas indica o perfil de concentração do soluto ao longo do que seria o meio semi-infinito: o solvente. Como se vê, esse perfil varia para cada tempo considerado, caracterizando o regime não estacionário. A difusão acontece, pois, do lado direito da interface (WELTY et al., 2008; CLUSSLER, 2009).

Figura 19 – Modelo de difusão em um meio semi-infinito



Fonte: adaptado de Clussler (2009)

Durante o processo, C_{i0} representa a concentração na interface assim que o processo difusivo se inicia, mantendo-se constante ao longo de toda extração, pois, a todo o momento, há adição de material nessa região. Já o $C_{i\infty}$ denota a concentração do componente em difusão no meio semi-infinito a uma distância tal que seu valor também é constante (CLUSSLER, 2009).

É sabido que a operação extrativa ocorre até que se alcance espontaneamente o estado de equilíbrio de concentração. Ele pode ser atingido de duas formas: 1 – quando o soluto está totalmente dissolvido no solvente, formando uma solução de concentração uniforme; 2 – quando o solvente em contato com sólido forma uma solução saturada na sua superfície e é incapaz de extrair mais soluto da partícula. Vários fatores interferem nesse processo, como a técnica empregada e variáveis do processos, os quais serão discutidos a seguir (IBARZ; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003; TIWARI; BRUNTON e BRENNAN, 2013).

2.2.2 Técnicas de extração

De modo geral, as técnicas de extração podem ser divididas em dois grupos: métodos convencionais e métodos avançados. Os métodos convencionais englobam técnicas bastante usadas devido a sua simplicidade e alto rendimento (AZWANIDA, 2015). Maceração, decocção, infusão e extração com soxhlet são seus principais representantes. As técnicas avançadas

abrangem inovações que visam, principalmente, ganhos em termos de eficiência do processo. São parte dessa classe a extração assistida por ultrassom, micro-ondas, extração por líquido pressurizado e supercrítica (LEFEBVRE; DESTANDAU; LESELLIER, 2020).

Nos Quadros 3 e 4, estão descritas brevemente as principais vantagens e desvantagens de algumas das metodologias mencionadas anteriormente, bem como o mecanismo de funcionamento, de acordo com Azwanida (2015) e Alara, Abdurahman e Ukaegbu (2021).

Quadro 3 – Técnicas convencionais de extração e suas vantagens e desvantagens

Técnica	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Maceração, decocção e infusão	Na maceração, a matéria prima vegetal é encharcada com o solvente em um sistema fechado, à temperatura ambiente e agitação esporádica. A decocção e infusão possuem o mesmo princípio, diferenciando-se pelo fato de ambas ocorrerem à temperatura de ebulição e em tempos prolongados na decocção e curtos na infusão.	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade na aplicação; • equipamentos de baixo custo; • adaptabilidade para extrair uma vasta variedade de moléculas através do uso de múltiplos solventes; • permite combinar diversos fatores como temperatura, agitação, pH e solvente para melhorar a seletividade e eficiência do processo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo prolongado de operação; • grande volume de solvente empregado; • necessidade do emprego de filtração e centrifugação para separar a matéria vegetal gasta. • potencial liberação de agentes tóxicos quando em alta temperatura, especialmente o soxhlet.
Percolação	Passagem gradual do solvente pelo soluto através de percoladores equipados com filtros, onde o extrato é coletado na parte inferior do equipamento a taxas moderadas (6 gotas/min)		
Soxhlet	Sistema que permite o refluxo do solvente através de um aparato de aquecimento e condensação constantes. O solvente é aquecido em um balão volumétrico, cujo vapor, após condensação, preenche o compartimento de amostras até um nível onde retorna ao balão.		

Fonte: própria (2021)

Quadro 4 – Técnicas avançadas de extração e suas vantagens e desvantagens

Técnica	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Extração Assistida por Micro-ondas	Permite o uso de energia radiativa de micro-ondas para aquecer mistura extrativa. O calor facilitaria a liberação dos marcadores no solvente por meio da destruição das ligações de hidrogênio que prendem o soluto à amostra.	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de operação mais curto; • redução no uso de solventes ou emprego de dissolventes mais limpos, como o CO₂ e água. • algumas técnicas permitem modificações na pressão, o que melhoraria o contato do dissolvente com o vegetal; • reutilização do solvente, no caso da extração supercrítica 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo de equipamento elevado; • limitação para algumas técnicas no tipo de moléculas extraíveis devido a pouca versatilidade no uso de solventes; • consumo elevado de energia.
Extração assistida por Ultrassom	Técnica que emprega frequências de 20 a 2000 kHz capazes de gerar um efeito acústico de cavitação em torno da matriz vegetal, gerando um distúrbio que facilitaria o contato da amostra com o solvente e um aumento na permeabilidade das células vegetais.		
Extração supercrítica	Aplica gases, principalmente o CO ₂ , em estado supercrítico para extrair componentes da amostra. Permite a configuração de diferentes condições de temperatura e pressão, além da adição de co-solventes, como etanol, para extração de marcadores polares.		
Extração com líquido pressurizado	Usa valores altos de temperatura e pressão, 40 a 200 °C e 3,3 a 20,2 MPa respectivamente, em tempos curtos de operação. permitindo a extração dos compostos ativos. Normalmente, emprega-se água como solvente.		

Fonte: própria (2021)

Embora seja uma técnica que vem sendo substituída por metodologias mais eficientes, a maceração ainda é bastante empregada na extração de marcadores naturais devido à facilidade e versatilidade operacional. Além disso, pode-se usá-la conjuntamente a técnicas mais

avançadas, combinando os benefícios de ambas as metodologias (GARCIA-VAQUERO; RAJAURIA; TIWARI, 2020).

No que concerne à extração do guaraná, a maceração é comumente empregada como técnica de extração e, tradicionalmente, faz parte do processo industrial de obtenção de extratos (SCHIMPL; SILVA; GONÇALVES, 2013). No Quadro 4, estão presentes alguns estudos recentes com o uso da técnica.

Quadro 5 – Processo de extração por maceração do guaraná em diferentes estudos. CFT – Compostos Fenólicos Totais; RSL – Razão sólido-líquido

Sistema	Temperatura	RSL	Solvente	Tempo	Resultados	Referência
Frasco com agitador magnético e sistema de condensação	Ebulição	1/15 (10 g de pó de guaraná em 150 mL)	Solução hidroalcolica 60 % (v/v)	2h	CFT: 172 mg AG/ g extrato Cafeína: 140 mg/ g extrato	(MAJHENIC; ŠKERGET; KNEZ, 2007)
Frascos plásticos de PET	Ambiente	3/10 (30g de guaraná em pó e 100 mL de solvente)	Etanol 92,8 % (v/v)	7 dias	Índice de taninos: 95,23 (absorbância, 400 nm)	(GARCIA et al, 2015)
Frasco de fundo redondo com agitação magnética	40 °C a 70°C	1/80 (1g de guaraná em pó em 80 mL de solvente)	Água	12 min	Cafeína: 0,4 - 0,6 g cafeína / L extrato aquoso	(ADNADJEVIC; KOTUREVICB; JOVANOVIC, 2017)
Erlemeyer fechado em	40°C	1:3 (p/p) diferentes granula-	Solução hidroalcolica 50	6 h	Cafeína: 14,95- 53,01 gm/ mL extra-	(SANTANA e MACEDO,

sistema <i>Shaker</i> de agitação		ções	% (p/p)		to Catequinas: 19,09 – 71,37 g / mL extrato	2018a)
Banho de aqueci- mento com agi- tação rotatória	60 °C	1:3 (p/p), diferentes granula- ções	Solução hidroal- coólica 50 % (p/p)	30 min	Cafeína: 10,94 – 33,91 g / mL extrato; Cate- quinas: 14,42 – 28,77 g /mL	(SANTA- NA; ZAN- INI; MA- CEDO 2020)

Fonte: própria (2021)

2.2.3 Fatores que influenciam a extração

Visando-se aumentar a taxa de transferência da extração, estudam-se e modificam-se diferentes fatores na operação. Temperatura, agitação mecânica, pH da solução, tipo de solvente e tempo de extração são variáveis frequentemente relacionadas ao aumento global da velocidade de transferência na lixiviação (HU et al., 2016; OREOPAULOU et al., 2020). Estudos sobre o efeito isolado e conjugado desses fatores são importantes, pois podem elucidar a cinética dos processos extrativos e promover melhorias no rendimento de extratos (CHOUNG et al., 2014).

2.2.3.1 Solvente

A escolha do solvente é uma das etapas mais importantes do processo extrativo. Estudos demonstram que seu efeito, em muitos casos, é superior a todos os outros parâmetros da operação. Para a seleção, devem-se levar em conta, no geral, os seguintes critérios (TIWARI; BRUNTON; BRENNAN, 2013):

- Segurança na aplicação;
- solubilidade do componente de interesse no solvente;
- potencial de extrair componentes indesejáveis.

A segurança está relacionada à viabilidade de operação e efeitos indesejáveis do solvente em organismos vivos. Alguns solventes orgânicos, como metanol e acetona, são conhecidos por conta de sua alta seletividade na extração de alguns marcadores fitoquímicos (MU-

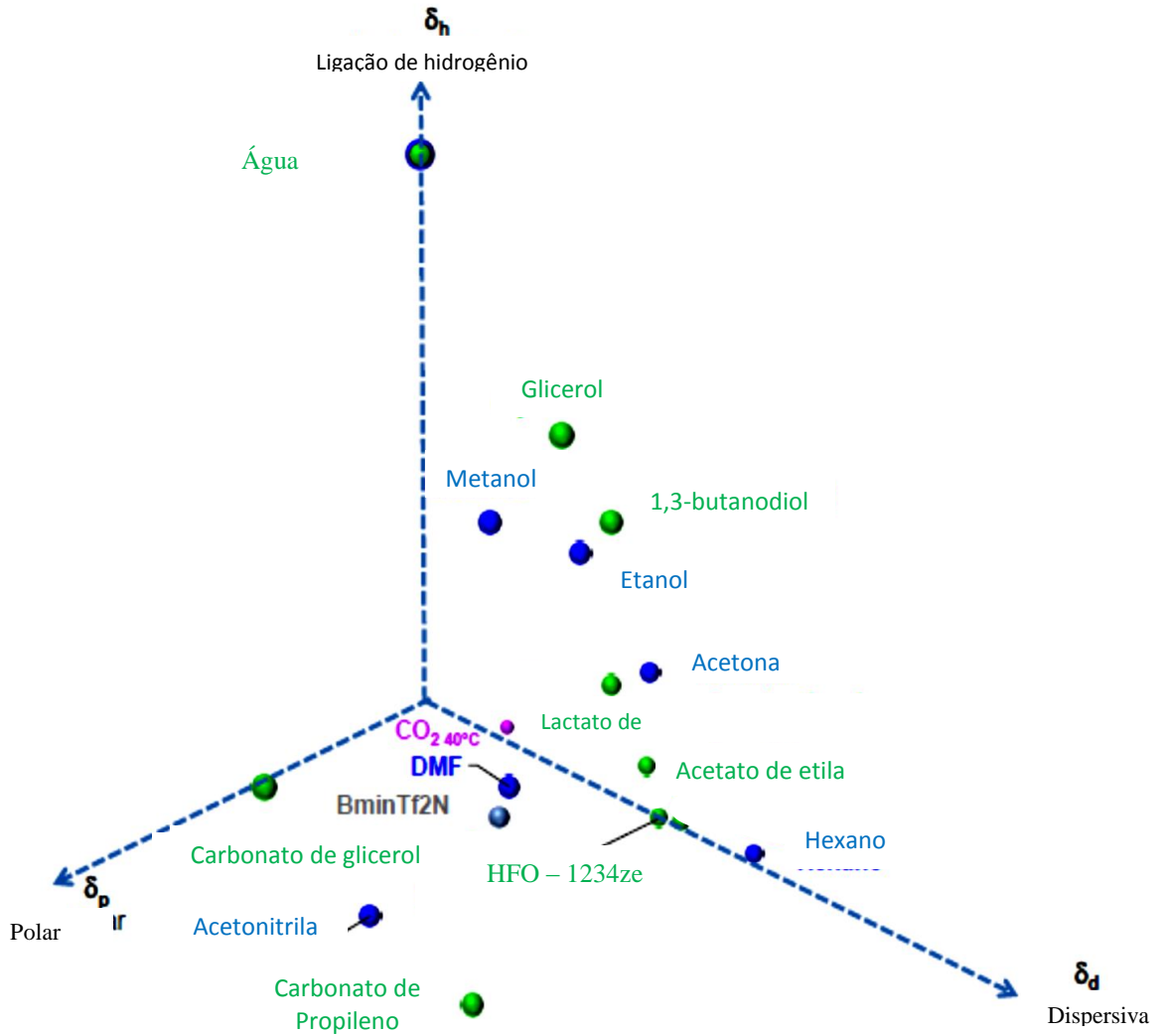
SA et al., 2010). No entanto, devido ao caráter tóxico e aos impactos ambientais decorrentes do seu uso, não podem ser incorporados em aplicações envolvendo seres vivos (JOSHI; ADHIKARI, 2019).

A água e o etanol, por outro lado, são solventes que ganham destaque nesse sentido. Devido à baixa toxicidade, pode-se incorporá-los no preparo de bebidas, medicamentos e alimentos, mesmo com algumas restrições legais ao álcool etílico que deve ter seu conteúdo reduzido por uma etapa de concentração (TIWARI; BRUNTON; BRENNAN, 2013).

A solubilidade corresponde ao potencial seletivo do solvente em relação ao substrato de interesse. Geralmente, quanto mais solúvel o marcador fitoquímico é no solvente de extração, maior será sua seletividade, impactando diretamente no rendimento da extração. (ORE-OPAULOU et al., 2020). Para correta seleção do solvente, lança-se mão de algumas escalas de propriedades, como as escalas de polaridade e o parâmetro de solubilidade de Hansen (LEFEBVRE, DESTANDAU; LESELLIER, 2020).

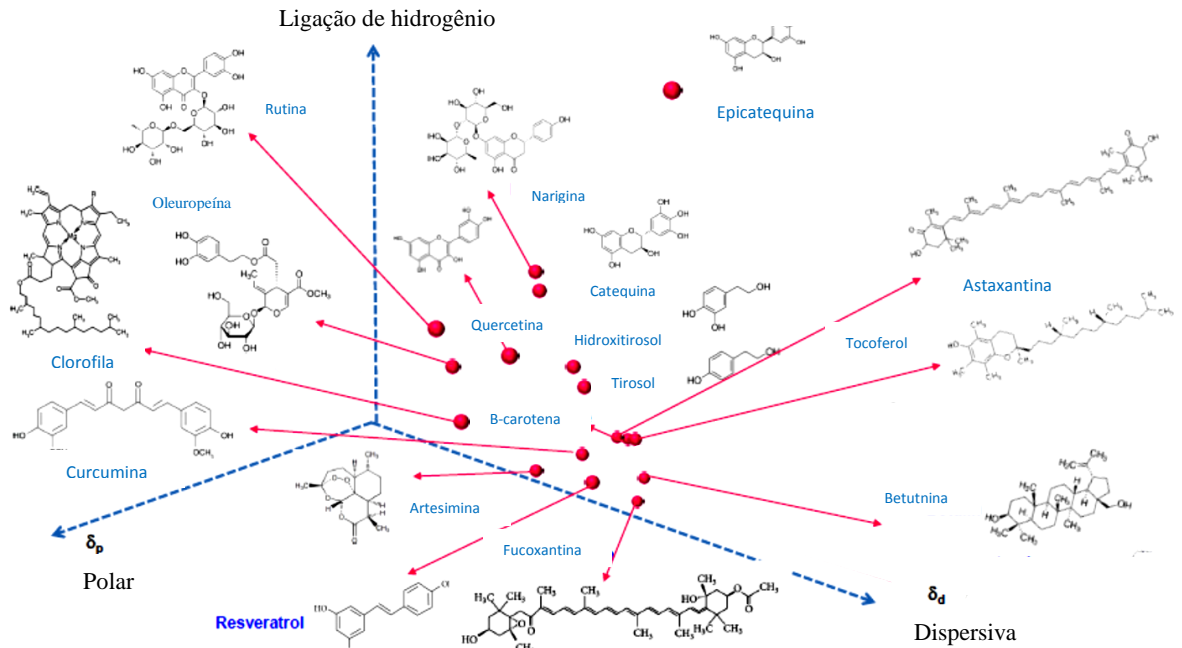
A escala de Hansen é comumente empregada devido à facilidade na aplicação. Ela baseia-se em três parâmetros de interação intermolecular: dispersão (δd), dipolo-dipolo (δp) e ligações de hidrogênio (δh). As Figuras 20 e 21 representam a escala para alguns solventes e biocompostos naturais, respectivamente. O tamanho das esferas é maior quanto maior é a força de interação calculada pelo parâmetro para a molécula em questão. Quanto mais próxima a esfera de uma molécula estiver da outra, maior é a probabilidade de serem solúveis entre si (LEFEBVRE, DESTANDAU; LESELLIER, 2021).

Figura 20 – Parâmetro de Hansen de solubilidade para diversos solventes (verde: solventes verdes; azul: solventes clássicos; roxo: dióxido de carbono)



Fonte: adaptado de Lefebvre, Destandau e Lesellier (2021)

Figura 21 – Parâmetro de Hansen para diversos metabólitos



Fonte: adaptado de Lefebvre , Destandau e Lesellier (2021)

Além da ação isolada, alguns estudos vêm demonstrando o efeito da mistura de solventes na seletividade da extração (SULAIMAN et al., 2011; ARYA; THAKUR; KASHYAP, 2012). Hu et al. (2016) comprovaram que soluções hidroalcoólicas, especialmente a 50% (v/v), tem maior poder de extrair catequinas e cafeína do chá verde que a água e o etanol sozinhos. Conforme a Tabela 9 do mesmo estudo, este resultado relaciona-se à solubilidade dos compostos que é maior na mistura dos solventes que neles isoladamente.

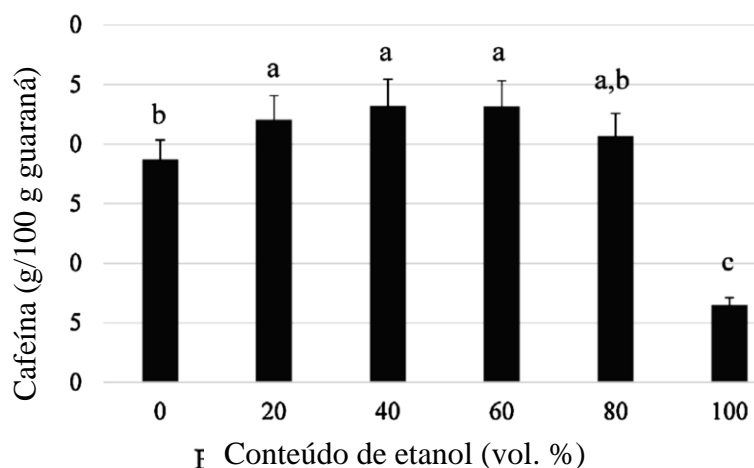
Tabela 9 – Solubilidade da cafeína e catequina em diferentes solventes (g/100g)

	Água	25% EtOH	50%	75%	EtOH Absoluto
Cafeína	6,10±0,6	51,37±0,85	54,55±1,29	59,8±0,82	76,80±1,73
Catequina	2,11±0,05	3,87±0,03	7,95±0,71	6,00±0,04	0,62±0,01

Fonte: adaptado de Hu et al. (2016)

Em outra investigação, dessa vez com extração de cafeína do guaraná, Carciochi et al. (2021) confirmou o mesmo efeito da mistura de solvente. Observou-se um aumento no rendimento da metilxantina quando a extração usou até 60% de solução hidroalcoólica, o que se atribuiu também à solubilidade da cafeína, conforme a Figura 22.

Figura 22 – Efeito isolado da concentração de etanol no rendimento da extração de cafeína



Fonte: Carciochi et al. (2021)

Além da solubilidade, a alta capacidade extrativa de soluções aquosas de solventes orgânicos pode estar relacionada à habilidade da água de dilatar a matéria vegetal e, logo, permitir que o solvente orgânico penetre os poros do vegetal. Assim, componentes menos polares de interesse, como alguns polifenóis, poderiam ser mais facilmente extraídos pela fase orgânica, enquanto outras substâncias hidrofílicas seriam solubilizadas pela água (PSARROU et al., 2020).

2.2.3.2 Temperatura

De maneira geral, o aumento da temperatura é responsável por elevar a concentração de biocompostos no extrato. Alguns fatores podem estar relacionados a esse efeito, tais como (TIWARI; BRUNTON; BRENNAN, 2013):

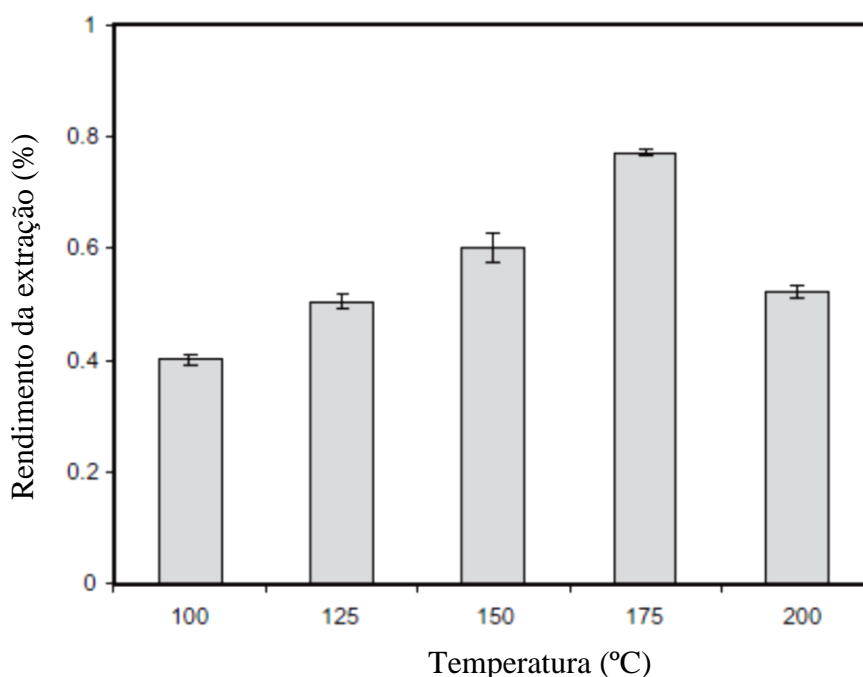
- Aumento da solubilidade do soluto no solvente;
- Dilatação da matriz vegetal;
- aumento do coeficiente de difusão;
- redução da atividade enzimática e consequente preservação dos fitoquímicos;
- ruptura da parede celular em que os compostos estão confinados, permitindo a liberação dos compostos ativos.

Há uma série de pesquisas demonstrando o efeito positivo da temperatura na extração de polifenóis e metilxantinas (PINELA et al., 2016; GUERKE et al., 2018; OREOPAULOU et al., 2020; CARCIOCHI et al., 2021). No caso do guaraná, Santana e Macedo (2018a) en-

contraram maiores rendimentos de metilxantinas e catequinas para extração hidroalcoólica a quente (40°C), quando comparado a outras técnicas a frio.

Em contrapartida, deve-se ter em conta fatores como eficiência energética, tipo de solvente empregado e termodegradação das espécies extraíveis durante a escolha da temperatura (AZWANIDA, 2015). Valores muito altos podem resultar em gastos excessivos de energia e degradação de espécies sensíveis ao calor. Estudos apontam que polifenóis sofrem degradação de até 21% quando expostos a temperaturas superiores a 70 °C (DENG et al.,2018). Já a cafeína é termicamente mais estável, podendo apresentar estabilidade até 170° C, dependendo do tempo de exposição, conforme Figura 23.

Figura 23 – Efeito da temperatura de extração com água subcrítica no rendimento da extração de cafeína de resíduo de chá. Tempo: 120 min; pressão: 20 bar; fluxo: 4g.min⁻¹



Fonte: Shalmashi et al. (2009)

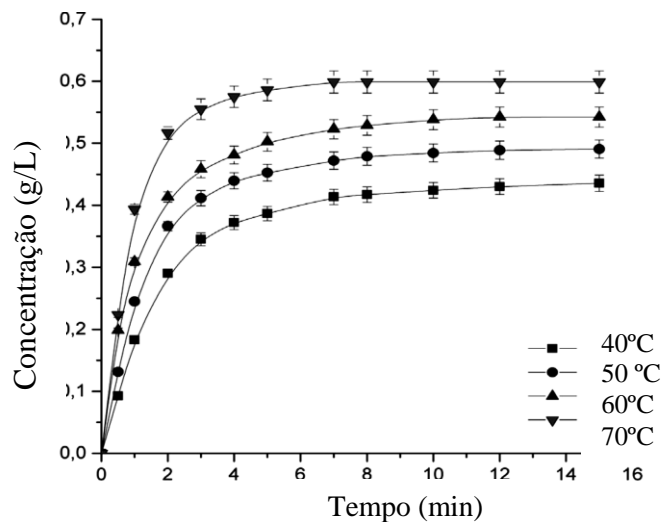
2.2.3.3 Tempo

O tempo de extração é um fator diretamente ligado à cinética do processo. É necessário estipular um menor tempo possível que permita a obtenção de todos os componentes extraíveis. Para tanto, deve-se levar em conta que o tamanho da partícula e formato do material vegetal interferem diretamente nesse fator operacional. No geral, sementes, galhos e pedaços

de madeira requerem maior tempo de extração que folhas e pó. Além disso, a razão entre solvente e soluto também influencia (TIWARI; BRUNTON; BRENNAN, 2013).

Conhecer a cinética de extração dos compostos extraíveis também é importante para determinação da duração do processo. Através do estudo do comportamento difusional das espécies químicas, é possível estipular condições ótimas da extração, escalonamento e desenho de equipamentos (SANTANA e MACEDO, 2018a). Adnadjevic, Koturevicb e Jovanovic (2017), em um estudo comparativo sobre métodos de extração, determinaram o perfil cinético de extração da cafeína do guaraná usando água como solvente, a diferentes temperaturas, consoante com a Figura 24.

Figura 24 – Curvas cinéticas de extração da cafeína em diferentes temperaturas. Condições do processo: massa de guaraná – 1g; volume solvente (água) – 80 mL; agitação – 410 rpm



Fonte: adaptado de Adnadjevic, Koturevicb e Jovanovic (2017)

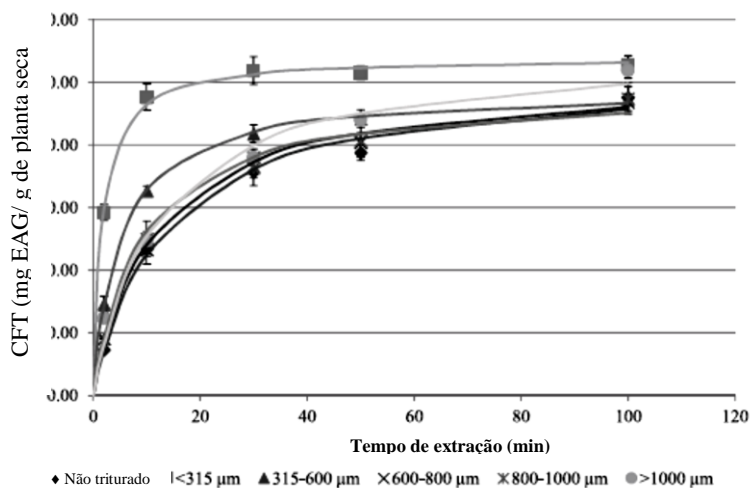
Observa-se que o formato das isotermas é similar, independente da temperatura. Pode-se concluir que apresenta 3 estágios: um crescimento linear nos primeiros minutos; formação intermediária de uma curva convexa e, finalmente, alcance do platô depois de 8 min de extração. Esse valor, embora pequeno, está vinculado à razão sólido-líquido (RSL) de 1:80, m/v, conforme discutiram os autores.

2.2.3.3 Tamanho da partícula

Antes da extração, é comum o tratamento físico do material vegetal para reduzir seu tamanho em partículas menores. A razão é que quanto menor seu tamanho, maior a área superficial da matriz vegetal, o que aumenta a região de contato do solvente com o soluto. Além disso, é possível que, com a redução do tamanho, haja uma ruptura das células vegetais e encurtamento do caminho do solvente para o interior do sólido, contribuindo, pois, para a liberação do soluto no meio (TIWARI; BRUNTON; BRENNAN, 2013).

Algumas pesquisas indicam essa tendência de aumento de componentes extraíveis com a diminuição do sólido inerte (SHALMASHI et al. 2009; HU et al. 2016). Sulaiman et al. (2011) determina valores inferiores a 0,5 mm como condição ideal para extração de matéria-prima vegetal. Oreopoulou et al. (2020), em um estudo sobre extração de fenólicos do órgão, verificou melhores resultados em tamanhos de partícula inferiores a 0,345 mm, conforme Figura 25.

Figura 25 – Influência do tamanho de partícula na recuperação de fenólicos totais (FT) com etanol 60 %, a 22°C e RSL de 1:20 (m:v)



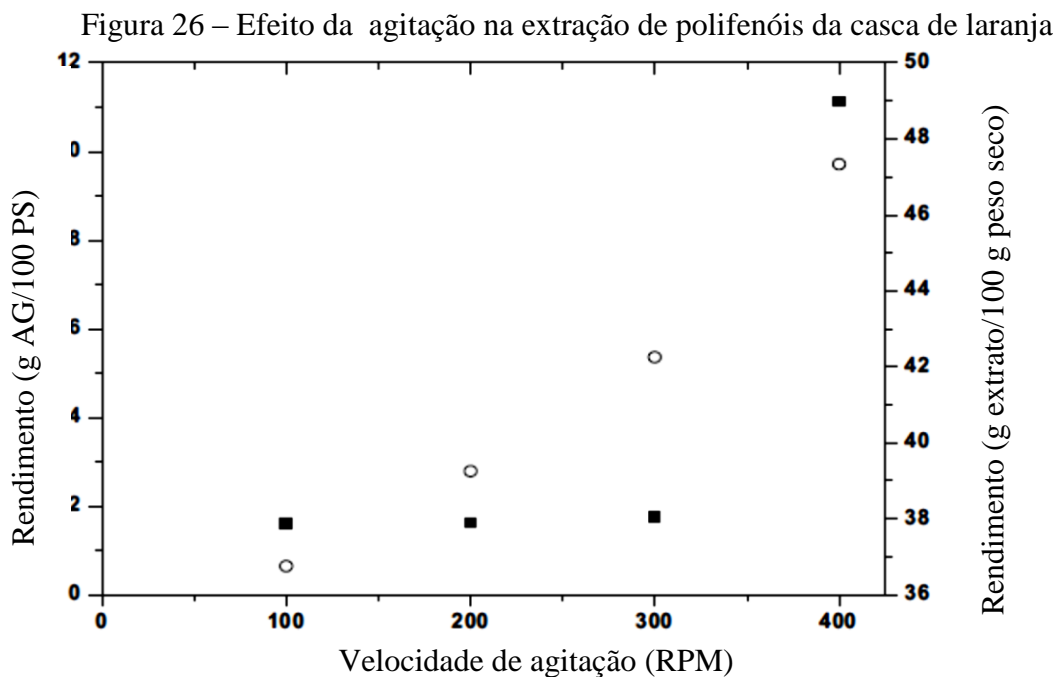
Fonte: Oreopoulou et al. (2020)

No entanto, existem situações em que partículas menores podem reduzir a eficiência extrativa. Esse efeito pode estar relacionado à maior suscetibilidade à degradação, uma vez que os bioativos permanecem mais tempo expostos às condições ambientais durante a operação (GADKARI e BALARAMAN, 2015). Além disso, partículas menores podem bloquear sistemas de filtragem mais rapidamente que sólidos maiores, o que resultaria no aumento do tempo de extração e perda de extrato (TIWARI; BRUNTON; BRENNAN, 2013).

2.2.3.4 Agitação

Frequentemente se emprega agitação durante a lixiviação buscando-se aumentar a capacidade extrativa da operação (TIWARI; BRUNTON; BRENNAN, 2013). As técnicas mais comuns englobam o uso de *shaker*, agitação magnética, agitador de pás, além de técnicas mais avançadas, como ultrassom e sonificação (LÓPEZ-CERVANTES et al., 2014; AHMED et al., 2019; SHAHEEN et al., 2020). Justifica-se o uso porque a movimentação no meio seria capaz aumentar o coeficiente de transferência de massa, reduzindo a camada limitante entre a amostra e o solvente, além de aumentar a superfície de contato do sólido e mitigar zonas de estagnação (CÁRDENAS; LUCENA, 2017; HAYA, BENTAHAR; TRARI, 2018).

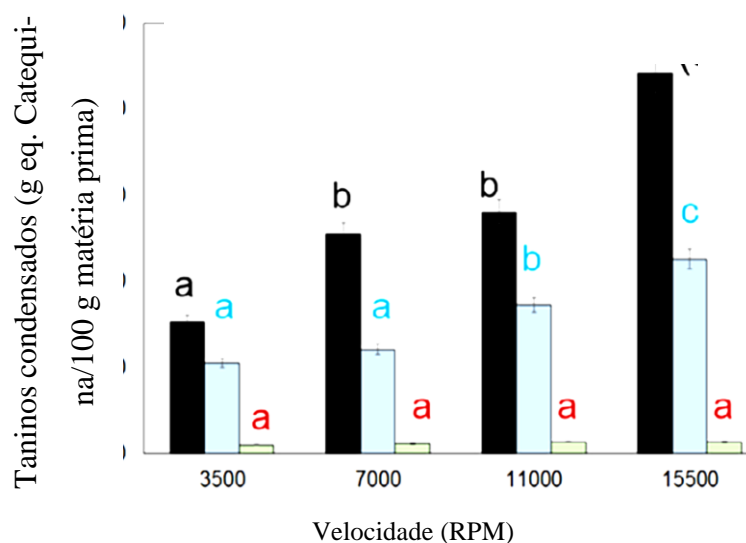
Na literatura, encontram-se diversos estudos relacionando o aumento da velocidade de agitação com o rendimento na extração de marcadores (ELHAG et al., 2018; MURUGESH e SUBRAMANIAN, 2018; PHAM et al., 2020). Haya, Bentahar e Trari (2018), em um trabalho sobre o efeito de diversos fatores na extração de polifenóis de cascas de laranja, demonstraram que um aumento na velocidade gera um efeito significativo positivo na quantidade de polifenóis totais (Figura 26). Além da velocidade, a técnica de agitação, tipo de agitador e combinação de mecanismos diferentes de agitação também podem alterar os padrões de extração e devem ser levados em conta. (AHMED et al., 2019; ELHAG et al., 2018; SHAHEEN et al., 2020).



Fonte: adaptado de Haya, Bentahar e Trari (2018)

Santana, Zanini e Macedo (2020), em um estudo comparativo de técnicas de extração do guaraná, relataram que o uso de homogeneizadores de alto poder de cisalhamento geram rendimentos na extração de taninos condensados maiores quando comparados a técnicas tradicionais como cocção e infusão. Ainda, demonstraram um efeito positivo na recuperação desses compostos quando sujeitos a diferentes velocidades de agitação, conforme Figura 27.

Figura 27 – Efeito da agitação na recuperação de taninos condensados do guaraná. Condições do processo: RSL – 1/3; solvente – etanol:água (50:50); tempo – 15 min



Fonte: adaptado Santana, Zanini e Macedo (2020)

2.2.3.4 Aditivos

O uso de aditivos teria a capacidade de mudar a dinâmica do processo extrativo, permitindo melhores resultados em termos de rendimento, conservação e biodisponibilidade dos biocompostos. Essas substâncias suscitarão os seguintes efeitos no sistema (ZIMMERMANN e GLEICHENHAGEN, 2011):

- Ajuste do pH (D'ARCHIVIO; MAGGI; RUGGIERI, 2015);
- conservação dos fitoquímicos ante a condições extremas de temperatura (HUMAN et al., 2021);
- aumento da seletividade do solvente e afinidade dos bioativos com o solução extratora (SERDAR et al., 2016);
- melhoria na atividade biológica dos extratos (COX et al, 2019);

A alteração do pH do meio é o efeito mais relacionado à utilização de aditivos na extração. Esse fator é um importante parâmetro que pode influenciar tanto a seletividade quanto o rendimento da extração (VANDEPONSEELE; DRAYE; CHATEL, 2021). Mudanças no pH poderiam alterar quimicamente a estrutura dos fitoquímicos e partes da estrutura do vegetal, afetando a afinidade dos marcadores com o solvente e a cinética da difusão (LIANG; XU, 2001).

De maneira geral, os polifenóis são mais estáveis em pH ácido (DENG et al., 2018). Estudos sobre a estabilidade de catequinas do chá verde, por exemplo, indicam que elas são mais estáveis em pH abaixo de 4 e sofrem degradação em pH acima de 6 (ANANINGSIH et al., 2013). Human et al (2021) demonstraram que os polifenóis da *Cyclopia subternata* são mais estáveis termicamente quando conservados em misturas de soluções contendo conservantes químicos ácidos.

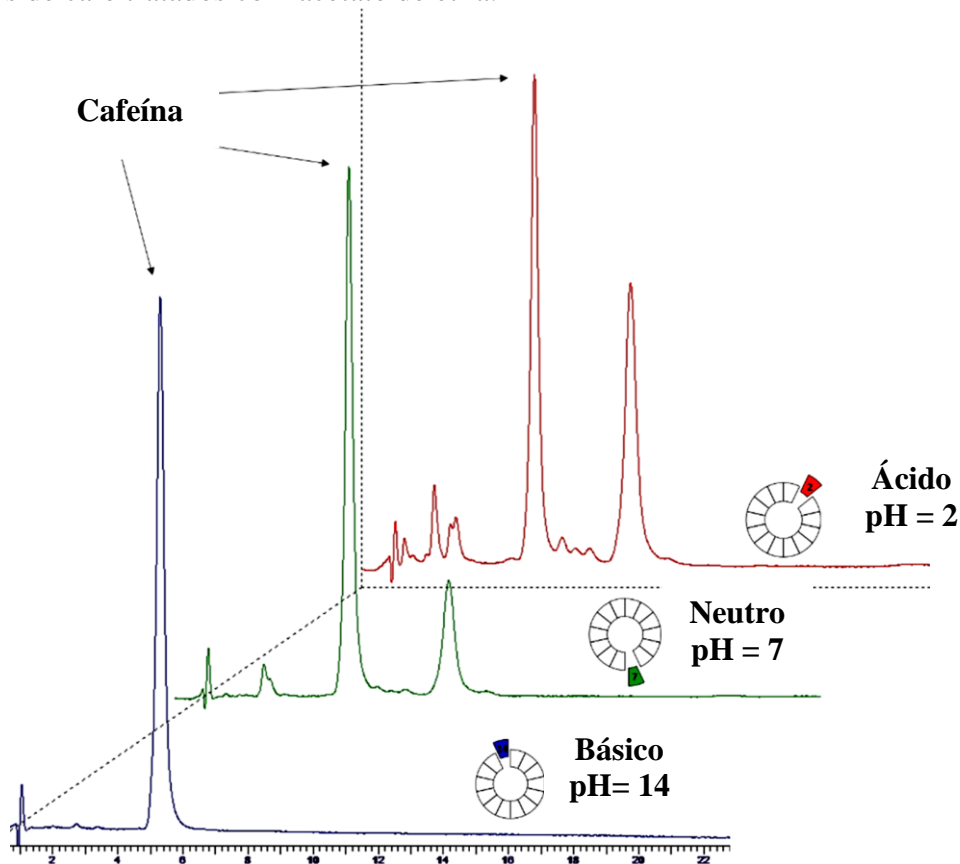
Além da estabilidade, alguns trabalhos apontam mudanças no padrão extrativo com a alteração do pH (ZIMMERMANN e GLEICHENHAGEN, 2011; D'ARCHIVIO; MAGGI; RUGGIERI, 2015). Vandeponsele, Draye e Chatel, em uma pesquisa sobre a recuperação da cafeína da borra de café, relacionaram altos valores de pH a um aumento na seletividade da extração da cafeína de soluções aquosas, enquanto valores baixos corresponderiam a um aumento na composição de polifenóis, conforme indicado nos cromatogramas da Figura 24.

Alterações nos valores de pH estariam relacionados a mudanças estruturais decorrentes da protonação ou desprotonação das espécies químicas. Nos polifenóis, a presença de hidroxilas estaria relacionada à reatividade desses compostos frente a mudanças de pH (RUSAK et al. 2008). Sugere-se que valores de pH ácidos gerariam polifenóis protonados com maior afinidade com solventes orgânicos que em água (VANDEPONSEELE; DRAYE; CHATEL, 2021). Além disso, a acidificação do meio seria capaz de alterar a interação entre nutrientes e polissacarídeos ou proteínas do vegetal, favorecendo a liberação dos fitoquímicos no dissolvente (LIANG; XU, 2001).

O uso de substâncias para reduzir o pH do meio tem sido uma das alternativas escolhidas para melhorar a seletividade do solvente (ZIMMERMANN e GLEICHENHAGEN, 2011; COX et al, 2019; HUMAN et al., 2021). Além de soluções tamponantes, a escolha por acidulantes orgânicos, como ácido ascórbico e ácido cítrico, tornou-se uma alternativa, uma vez que são substâncias bem aceitas na aplicação em alimentos e reconhecidas como conservantes naturais efetivos, presentes em diversos frutos cítricos e no preparo tradicional de bebidas, especialmente chás (LIU et al., 2013).

O ácido cítrico (AC) é o agente acidulante mais usado na indústria de alimentos para prevenir o escurecimento de frutas. O composto orgânico, bem como seus sais, seria capaz de inibir a ação de enzimas que causam a degradação de polifenóis presentes em frutos, tais como a polifenoloxidase e peroxidase (ROCULLI et al., 2007). Liu et al. (2013) indicou que o aumento da concentração de ácido cítrico gera uma redução na atividade da polifenoloxidase através de alterações em parâmetros termodinâmicos e conformação da enzima.

Figura 28 – Influência do pH no rendimento da extração líquido-líquido de extratos aquosos de café tratados com acetato de etila.

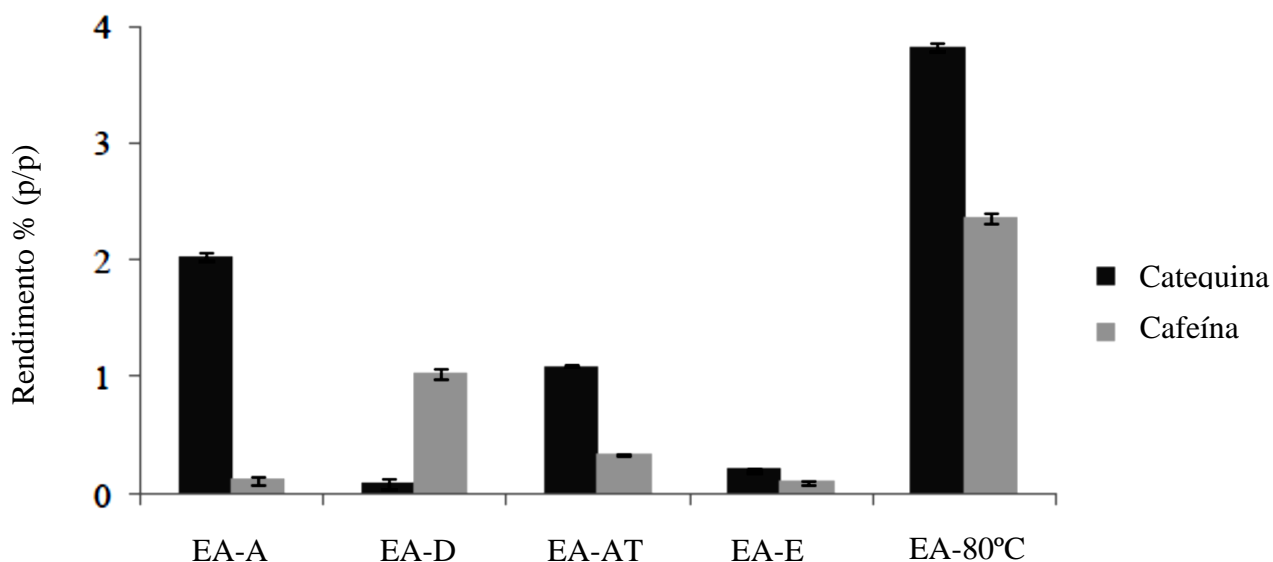


Fonte: adaptado de Vandepoosele, Draye e Gregory Chatel (2021)

Na operação de extração, alguns estudos indicam efeito seletivo na extração de compostos bioativos com a adição de ácido cítrico (ZIMMERMAN e GLEICHENHAGEN, 2011; DEMIR et al., 2015; SERDAR et al., 2016). Quando presente no solvente extrator, o principal efeito observado é a redução do pH do meio e consequente alteração da estrutura química dos solutos. Serda et al. (2016) observaram que uso de solução aquosa de AC a 0,1M promoveu o maior rendimento de catequinas e epicatequinas, comparado à água e ao solvente hidroalcoólico na extração assistida por micro-ondas de chá verde.

Demir et al. 2015, em um estudo comparativo de extração a quente com soluções aquosas como solvente, observaram que o dissolvente contendo ácido cítrico apresentou um melhor isolamento de catequinas em relação aos demais sistemas extrativos, conforme demonstrado na Figura 25. Já Zimmermman e Gleichenhagen (2011) observaram que soluções de ácido cítrico a 0,18% (p/p) causam diferença significativa na concentração de galato de epicatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina durante a infusão de chá verde, podendo ser até 20% maior que infusões com água.

Figura 29 – Rendimento de cafeína e catequina na extração de chá verde. EA-A: extração aquosa com ácido cítrico; EA-D: dupla extração aquosa; EA-T: extração aquosa à alta temperatura; EA-E: extração com etanol a 70% (v/v); EA: extração aquosa a 80 °C



Fonte: adaptado de Demir et al. (2015)

Além de mudanças na seletividade do solvente, o AC poderia melhorar o potencial de ação biológica dos extratos. Cox et al. (2019) demonstrou que o uso de solvente hidroalcolico a 70% (v/v) acidificado com ácido cítrico a 5% (p/v) gera extratos de sorgo com maior potencial antiproliferativo contra células cancerígenas quando comparado a composições sem o aditivo orgânico. A solução, segundo o autor, seria capaz de extrair moléculas específicas do vegetal, alterar quimicamente os compostos bioativos e promover uma extração mais limpa, fatores que beneficiariam sua ação biológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Realizaram-se todos os experimentos no laboratório ILUM do centro de pesquisa HUB – Tecnologia e Inovação, localizado nas dependências da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

3.1 MATÉRIA-PRIMA

Para obtenção dos extratos hidroalcoólicos, utilizaram-se dois potes de 150 g de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) em pó da empresa Guaraná Marau de Maués (Maués, Amazonas, Brasil), presente na Figura 30.

Figura 30 – Guaraná em pó comercial



Fonte: própria (2021)

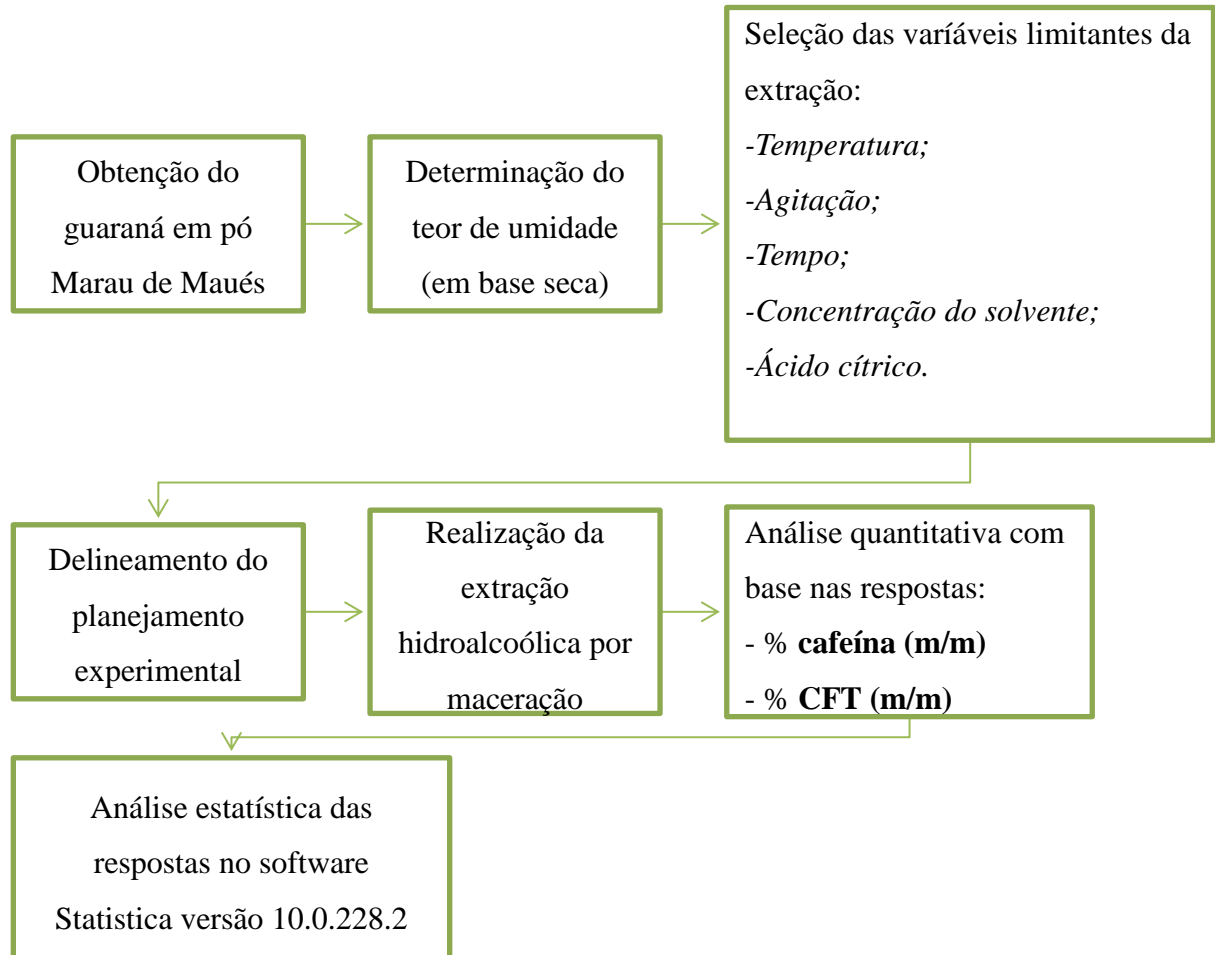
3.2 REAGENTES

Em todas as análises e corridas experimentais, utilizou-se água ultrapura produzida pelo ultrapurificador da marca Gehaka. Os reagentes tirosina PA (Dinâmica, dosagem de 99%), reativo de fenol Folin & Ciocalteu (Sigma-Aldrich, concentração 2 N), carbonato de sódio PA (Biotec, dosagem de 99%), hidróxido de sódio PA (Dinâmica, dosagem mín. 98%) e hexano PA (Êxodo Científica, 95%) foram empregados na análise de compostos fenólicos totais. Já na extração, utilizou-se etanol 96% para o preparo das soluções hidroalcoólicas e ácido cítrico PA (Êxodo Científica, dosagem mín. 99,5%) como aditivo químico. Durante a quantificação de cafeína, empregou-se cafeína anidra (Cspc Inovation Pharmaceutical Co.) e diclorometano (Pancrea ITW Companies, 99,9%).

3.3 MÉTODOS

A realização das corridas e análises experimentais seguiu a sequência prevista no fluxograma apresentado na Figura 31.

Figura 31- Fluxograma do estudo da extração por maceração do guaraná



Fonte: própria (2021)

3.3.1 Teor de umidade

Determinou-se a umidade com o intuito de se expressarem os resultados das análises em base seca de massa de guaraná. Para tanto, utilizou-se uma balança de umidade da marca Marte Científica, modelo V1.8. Assim, espalhou-se uniformemente 10 g do guaraná em pó no prato do equipamento, de modo a evitar retenção de umidade pela camada seca. Adiante, fechou-se a câmpula do sistema e ajustou-se o equipamento para o modo automático de operação. Ao final do processo, o equipamento expressou a umidade em base seca, conforme a equação 7. Realizou-se o procedimento em triplicata.

$$Umidade (\%) = \frac{\text{peso inicial guaraná} - \text{peso corrente guaraná}}{\text{peso corrente guaraná}} \times 100 \quad (7)$$

3.3.2 Delineamento do planejamento experimental

Com o propósito de se efetivar uma varredura dos efeitos principais e de interação das variáveis escolhidas sobre a extração dos compostos bioativos do guaraná, realizou-se um planejamento experimental multivariado fracionado em dois níveis $2^{(5-2)}$, utilizando-se o software *Statistica* versão 10.0.228.2. As variáveis independentes escolhidas foram tempo de extração, temperatura, agitação, concentração da solução hidroalcoólica (CSH) e concentração de ácido cítrico (CAC), de acordo com a Tabela 10. Já as o termos dependentes da análise foram a concentração de cafeína (CC) e o teor de compostos fenólicos totais (CFT).

A construção da matriz do planejamento fracionado $2^{(5-2)}$ foi obtida da seguinte forma: as variáveis de 1 a 3 permaneceram com a codificação idêntica àquela de um planejamento 2^5 . Diferentemente, a variável 4 resultou da multiplicação da codificação das colunas 1 e 2 do planejamento completo, enquanto a variável 5 formou-se pelo produto das colunas 1 e 3. Assim, obteve-se a matriz do planejamento presente na Tabela 11.

Realizaram-se todas as corridas experimentais uma única vez. Para checagem de curvatura, possível perda de linearidade e estimativa da variância experimental, aplicou-se um ponto central em triplicata no planejamento.

Tabela 10 – Variáveis dependentes e independentes do planejamento experimental. p_{ac} – peso de ácido cítrico e p_{pg} – peso de guaraná; v_{et} – volume de etanol e v_{ag} – volume de água.

Variáveis independentes	Símbolo	-1	0	+1
Tempo (h)	X_1	4	7	10
Temperatura (°C)	X_2	30	45	60
Agitação (rpm)	X_3	56	112	168
Ácido cítrico (g)	X_4	0	0,05	0,1
CSH (% , v_{et}/v_{ag})	X_5	30	55	80

Fonte: própria (2021)

Tabela 11 – Matriz do delineamento experimental $2^{(5-2)}$ para análise da extração do guaraná em pó. C – ponto central.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
1	-1	-1	-1	+1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1
4	+1	+1	-1	+1	-1
5	-1	-1	+1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	+1	+1
9 (C)	0	0	0	0	0
10 (C)	0	0	0	0	0
11 (C)	0	0	0	0	0

Fonte: própria (2021)

Inicialmente, determinou-se o guaraná no formato em pó como matéria-prima, visto que tamanhos menores de partículas permitem maior contato do solvente com as partes mais internas do soluto, o que aumentaria o rendimento de bioativos. Problemas como decantação e compactação do soluto seriam minimizados pela presença da agitação, como salientou Garcia et al. (2015). Fixou-se, também, a razão sólido-líquido em 1:5, com base nos trabalhos de Hulbet (1998) e na patente de Turano (2008), cujos valores foram de 1:6 e 1:4, respectivamente.

Delimitou-se a variável tempo entre 4 e 10 h, com base nos estudos de Santana e Macedo (2018a), Duvoisin (2016) e Turano (2008) que, para valores de RSL próximos aos deste trabalho, encontraram tempos ótimos de 6 h, 9,5 h e 1-8 h, respectivamente. Já a temperatura foi fixada entre 30 °C e 60 °C, visto que os compostos fenólicos sofrem degradação em temperaturas superiores a 70 °C e temperaturas inferiores a 30° C apresentam maiores oscilações no equipamento.

Para o estudo do efeito da agitação, aplicou-se 168 rpm como limite superior, com base em valores ótimos de extração de polifenóis comprovados por Fourate et al. (2019) e Bimkr et al. (2017) em 135 e 150 rpm, respectivamente, e 56 rpm, como limite inferior.

No caso do ácido cítrico, determinou-se uma concentração de 0,001 g.mL⁻¹ ou 0,1 g do aditivo na solução extratora para o limite superior, conforme Zimmermann e Gleichenhagen (2011), cuja concentração foi de 0,0018 g.mL⁻¹ para extração de compostos fenólicos e

cafeína da erva-mate, e de zero para inferior, tendo em vista o objetivo da pesquisa de verificar o efeito da presença do aditivo na extração.

Por fim, estabeleceu-se a concentração da solução hidroalcoólica entre 30 e 80%, tendo em vista que a cafeína e catequina apresentam maior solubilidade no solvente em 50% (etanol/água), além de apresentar maiores rendimentos na extração de bioativos, de acordo com Hu et al. (2016) e Carciochi et al. (2021).

3.3.3 Extração hidroalcoólica a quente

Prepararam-se os extratos empregando-se o pó de guaraná do Grupo Guaraná Marau de Maués (Maués, Amazonas). Inicialmente, pesaram-se 10 g do pó e 0,1 ou 0,05 g de ácido cítrico, conforme planejamento experimental. Transferiu-se a massa de guaraná e ácido cítrico (quando requerido no planejamento) para um erlemeyer de 125 ml, adicionando-se, posteriormente, 50 mL de solução hidroalcoólica (30%, 55% ou 80%, v/v), conforme a corrida experimental. Vedou-se o frasco com auxílio de uma tampa de encaixe e papel filme (Figura 32).

O processo extrativo ocorreu em uma incubadora *shaker* TSI 16B da marca Telga, ao abrigo de luz, ajustando-se a temperatura (30, 45 e 60 °C), agitação (56, 112 e 168 rpm) e tempo de extração (4h, 7h e 10 h), consoante com a Figura 33. Ao final da operação, mediu-se o volume do extrato e transferiu-se a amostra para um frasco âmbar. O material permaneceu armazenado em um *freezer*, a 5 °C, para posterior análise.

Figura 32 – Frascos onde se realizaram as extrações



Fonte: própria (2021)

Figura 33 – Sistema de incubação *shaker* usado na extração



Fonte: própria (2021)

3.3.4 Quantificação de cafeína

3.3.4.1 Construção da curva analítica de cafeína

Esta etapa foi concebida conforme Atomssa e Gholap (2006). Assim, para o preparo da solução estoque de cafeína ($0,024 \text{ mg.mL}^{-1}$), pesou-se 0,6 mg de cafeína e diluiu-se o analito em um balão de 25 mL com água ultrapura. Posteriormente, estabeleceram-se os pontos da curva através de diluições sucessivas, conforme a Tabela 12. Em seguida, realizou-se a varredura do espectro de cafeína e determinou-se o pico de absorção para a amostra mais concentrada. Ao final, realizou-se a leitura dos padrões diluídos e do branco em um espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu e construiu-se a curva de absorbância versus concentração.

Tabela 12 – Soluções de diluição de cafeína para curva padrão

Solução	Alíquota (mL)	Vf (mL)	Cf (mg/mL)
CAF1	0,2	10	0,0005
CAF2	1,00	10	0,0024
CAF3	1,25	10	0,0030
CAF4	1,5	10	0,0036
CAF5	1,75	10	0,0042
CAF6	2	10	0,0048
CAF7	2,5	10	0,0060
CAF8	3	10	0,0072

Fonte: própria (2021)

3.3.4.2 Preparo e análise das amostras

Para as análises de cafeína, diluíram-se as amostras de extrato na proporção de 1:1000 usando-se uma alíquota de 10 μ L de extrato que foi avolumado em um balão volumétrico de 10 mL com água ultrapura. Em seguida, filtraram-se as amostras com um filtro de seringa de 0,45 μ m.

A fim de se isolar a cafeína do extrato, adaptou-se uma micro-extração líquido-líquido proposta por Amini e Hashemi (2018). Dessa forma, transferiu-se 1 mL de extrato diluído para um tubo *ependorf* de 2 mL. Posteriormente, adicionaram-se 600 μ L de diclorometano no meio. Agitou-se a mistura vigorosamente aplicando-se um vortex *mixer* K45-2820, da Kasbi basic, por 20 s. Por fim, centrifugou-se a mistura por 4 min a uma velocidade de 5000 rpm e temperatura de 20 °C. Ao final, formaram-se duas fases: a orgânica, contendo a cafeína, e uma fase aquosa. Com auxílio de uma pipeta automática de 1000 μ L, retirou-se a fase superior aquosa e reservou-se a partição de diclorometano. Repetiu-se a extração líquido-líquido com a fase aquosa adicionando-se mais 600 μ L de diclorometano. Por fim, uniram-se as duas fases orgânicas e ajustou-se o volume para 2 mL com diclorometano. Empregou-se uma alíquota de 600 μ L dessa solução para análise em um espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu e determinou-se a absorbância a um comprimento de onda de 275 nm.

Após a determinação da concentração de cafeína, expressaram-se os rendimentos de cafeína em percentual mássico, conforme a equação 8:

$$\%cafeína = \frac{\text{massa total cafeína extraída (g)}}{\text{massa total de guaraná (g)} \times (1 - \text{umidade}_{base\ seca})} \times 100 \quad (8)$$

3.3.5 Compostos Fenólicos Totais

Aplicou-se a metodologia de CFT com base em Furlong et al (2003) adaptando-se algumas etapas.

3.3.5.1 Preparo da solução padrão

Preparou-se 100 mL de uma solução padrão de tirosina pesando-se 0,002 g do analito que foi avolumado com água ultrapura em um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, geraram-se, a partir de diluições, cinco soluções com concentrações de 3 a 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de modo a formar os pontos da curva analítica de CFT, conforme a Tabela 13. Finalmente, determinou-se a absorbância de cada amostra a 660 nm usando-se em um espectrofotômetro UV-Vis da Shimadzu.

Tabela 13 – Soluções de tirosina com diferentes concentrações

Solução TR*	Vi (mL)	Vf (mL)	Concentração TR ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
TR1	1,5	10	3
TR2	3	10	6
TR3	4,5	10	9
TR4	6	10	12
TR5	7,5	10	15

Fonte: própria (2021)

3.3.5.2 Preparo das amostras

Inicialmente, dilui-se as amostras na proporção de 1:1000 tomando-se 5 μL de extrato e 4995 μL de água ultrapura em um béquer de 10 mL. Em seguida, filtrou-se a amostra através de um filtro de seringa de 0,45 μm . Posteriormente, lavou-se a solução com hexano em um tubo Falcon de 15 mL. Separou-se a fase orgânica com auxílio de uma pipeta automática e reservou-se a fase aquosa para póstuma análise.

3.3.5.3 Reação Folin Ciocalteu

Em um tubo de ensaio, acrescentou-se 400 μL do extrato pré-tratado e 400 μL de água; adicionaram-se 1 mL da solução de carbonato de sódio a 2% em solução de hidróxido de sódio a 0,1 M. Em seguida, transferiu-se 500 μL do RFC (50%, $v_{\text{RFC}}/v_{\text{ag}}$) para a mistura reacional, permanecendo em um banho-maria a 37 °C por 10 min, ao abrigo de luz. Ao final, coletaram-se as amostras para análise de absorvância em um espectrofotômetro de luz ultravioleta e visível UV-Vis da marca Shimadzu, aplicando-se um comprimento de onda de 660 nm. Determinou-se o teor de CFT correlacionando-se os valores de absorvância a uma curva analítica de tirosina, obtida no mesmo equipamento, pela relação entre concentração de tirosina e absorvância (FOURLONG et al., 2003).

Os rendimentos de CFT foram expressos em percentual mássico, conforme equação 9:

$$\%CFT = \frac{\text{massa total CFT (eq. tirosina) extraída (g)}}{\text{massa total de guaraná (g)} \times (1 - \text{umidade}_{\text{base seca}})} \times 100 \quad (9)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adoção de uma abordagem de planejamento experimental multivariada e fracionada teve como propósito fazer uma triagem inicial das variáveis que exercem maior efeito estatístico na extração de compostos bioativos do guaraná, bem como analisar o efeito de suas interações e determinar regiões de otimização. Além disso, esse tipo de delineamento experimental permite uma análise com menor número de experimentos, economizando recursos e tempo para o estudo, especialmente por se tratar de um planejamento com multirespostas.

Na Tabela 14, estão presentes os resultados das análises quantitativas de cafeína e compostos fenólicos totais (CFT) para o planejamento experimental fracionado 2^{5-2} . Os valores foram determinados em base seca de guaraná, cuja umidade foi de 8,91% ($\pm 0,06$).

Tabela 14 – Resultados dos ensaios de extração de compostos bioativos do guaraná

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Ácido cítrico (g)	Agitação (rpm)	CSH (%)	Respostas	
						Cafeína (%)	CFT (%)
1	4	30	0	168	80	1,95%	9,21%
2	10	30	0	56	30	1,76%	12,57%
3	4	60	0	56	80	1,36%	9,53%
4	10	60	0	168	30	1,61%	11,61%
5	4	30	0,1	168	30	1,57%	8,97%
6	10	30	0,1	56	80	1,51%	11,61%
7	4	60	0,1	56	30	1,14%	11,61%
8	10	60	0,1	168	80	2,56%	14,41%
9	7	45	0,05	112	55	1,59%	13,37%
10	7	45	0,05	112	55	1,80%	14,73%
11	7	45	0,05	112	55	1,76%	12,09%

Fonte: própria (2021)

A análise e otimização de multirespostas pode apresentar diversos tipos de abordagens, tais como funções matemáticas de combinação, funções de desejabilidade e análise individualizada. Neste caso, optou-se por fazer análise em duas etapas: 1° - diagnóstico separado das duas variáveis dependentes em estudo; 2° - análise conjunta através da função de desejabilidade para determinação das condições ótimas de extração. Assim, espera-se entender melhor os mecanismos envolvidos na extração de cada tipo de bioativo separadamente e conjuntamente.

4.1 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA

Conforme se observa na Tabela 14, o teor de cafeína nas amostras de guaraná esteve entre 1,14 % e 2,56 %. Esses resultados estão dentro da faixa esperada, conforme dados do fabricante do guaraná comercial, cujo percentual de cafeína informado no rótulo é de 3 %.

Na Tabela 15, estão presentes os resultados da análise de variância ANOVA, com checagem de curvatura, para o modelo de regressão linear obtido a partir da análise dos resultados da resposta %cafeína. Já na Tabela 16, estão os coeficientes de regressão. Os dados em

vermelho indicam os fatores com relevância estatística, considerando uma probabilidade de significância de 95 % ($p = 0,05$). Além dos efeitos principais, a tabela também apresenta os efeitos de interação de segunda ordem. O coeficiente de determinação linear foi de $R^2 = 0,99756$ e o ajuste foi de 0,98778.

Tabela 15 – Análise de variância ANOVA para a resposta cafeína (%)

Fator	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	0,000001	1	0,000001	8,3249	0,102061
(1)CSH (%)	0,000025	1	0,000025	157,4001	0,006293
(2)Ácido cítrico	0,000000	1	0,000000	1,1241	0,400160
(3)Temperatura	0,000000	1	0,000000	0,7806	0,470160
(4)Agitação	0,000046	1	0,000046	287,7602	0,003457
(5)Tempo (h)	0,000021	1	0,000021	131,9213	0,007495
2*3	0,000023	1	0,000023	144,3797	0,006855
2*5	0,000014	1	0,000014	84,4296	0,011638
Erro	0,000000	2	0,000000		
Total SQ	0,000131	10			

Fonte: própria (2021)

Tabela 16 – Estimativa dos coeficientes de regressão linear para a resposta cafeína (%)

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	Intervalo de confiança -95, %	Intervalo de confiança +95
Intercepto	0,012237	0,000892	13,7219	0,005269	0,008400	0,016074
Curvatura	0,000647	0,000299	2,1603	0,163338	-0,000641	0,001935
(A)CSH	0,000071	0,000006	12,5459	0,006293	0,000047	0,000095
(B) Ácido cítrico	-0,016567	0,001112	-14,8978	0,004475	-0,021351	-0,011782
(C) Temperatura	-0,000105	0,000013	-7,8717	0,015758	-0,000162	-0,000048
(D) Agitação	0,000043	0,000003	16,9635	0,003457	0,000032	0,000054
(E) Tempo	0,000108	0,000067	1,6243	0,245799	-0,000179	0,000395
B*C	0,000227	0,000019	12,0158	0,006855	0,000146	0,000308
B*E	0,000867	0,000094	9,1886	0,011638	0,000461	0,001272

Fonte: própria (2021)

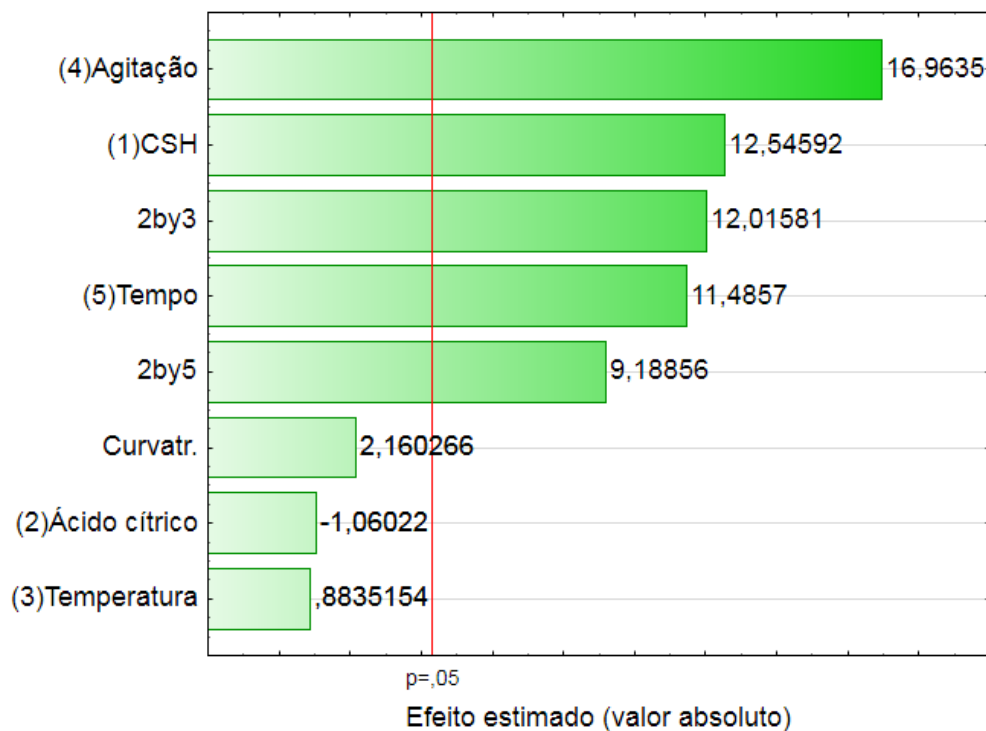
A partir da Tabela 16, pode-se escrever a equação que descreve o rendimento de cafeína (%Cafeína) para o sistema extrativo em estudo, conforme a equação 10:

$$\%Cafeína = 0,012237 + 0,000071(A) - 0,016567(B) - 0,000105(C) + 0,000043(D) + 0,000108(E) + 0,000227(B)(C) + 0,000867(B)(E) \quad (10)$$

Nota-se que, dos fatores em estudo, agitação, tempo e CSH foram os que apresentaram efeito estatístico significativo. Apesar de o ácido cítrico e a temperatura não exibirem relevância para o nível de confiança estipulado, a interação de segunda ordem entre ambos e entre o ácido cítrico e o tempo foram significativas, conforme indicado pelas linhas vermelhas dos fatores B*C e B*E.

Na Figura 34, está presente o diagrama de paretos dos efeitos principais e de interação. Cada retângulo representa um fator, todos dispostos verticalmente do mais significativo ao menos significativo, conforme os valores de estatística t presentes ao lado. Os efeitos cujos retângulos ultrapassam a linha vermelha p são estatisticamente significativos. Valores positivos e negativos indicam efeitos favoráveis e desfavoráveis à extração da cafeína, respectivamente.

Figura 34 – Gráfico de paretos dos efeitos padronizados para a resposta cafeína (%)



Fonte: própria (2021)

Observa-se que todos os fatores que influenciaram significativamente o processo extrativo da cafeína tiveram efeito positivo, inclusive os de interação. A agitação foi o efeito principal com maior impacto, seguida da CSH e do tempo, enquanto a temperatura e o ácido cítrico não foram importantes individualmente. A interação do ácido cítrico com a temperatura e o tempo favoreceram a extração, sendo mais importantes que esses fatores tomados individualmente.

O incremento da agitação, como se constatou, foi capaz de aumentar a quantidade de cafeína extraída, além de ter sido o fator mais importante entre os estudados. Este resultado está de acordo com a literatura, tendo em vista que o aumento da agitação é responsável por ampliar o coeficiente de transferência de massa, favorecendo o contato entre a matriz sólida e o solvente, além de proporcionar uma maior superfície de contato entre soluto e solvente (CÁRDENAS; LUCENA, 2017; HAYA, BENTAHAR; TRARI, 2018).

Durante a extração, o solvente e o guaraná não estiveram perfeitamente misturados, observando-se uma parte da matéria prima sedimentada no fundo do reator. Assim, o sistema extrativo *Shaker* pode ser mais suscetível a zonas de estagnação que outros equipamentos. Além disso, consoante com Tiwari, Brunton e Brennan (2013), a matéria-prima em pó favorece o surgimento de zonas de compactação, limitando a passagem de solvente quando em processos estagnados. Portanto, é razoável esperar que o aumento da agitação exerça, nesse caso, impacto importante entre os fatores, pois ela seria capaz de mitigar esses problemas.

Mesmo em sistemas altamente misturados, ainda é possível observar o efeito da agitação na extração. Santana, Zanini e Macedo (2020) observaram um aumento na recuperação de cafeína do guaraná quando submetido a velocidades de rotação de 3500 rpm a 15500 rpm em homogeneizadores de alto poder de cisalhamento, o que demonstra a significância da agitação como fator no processo de extração.

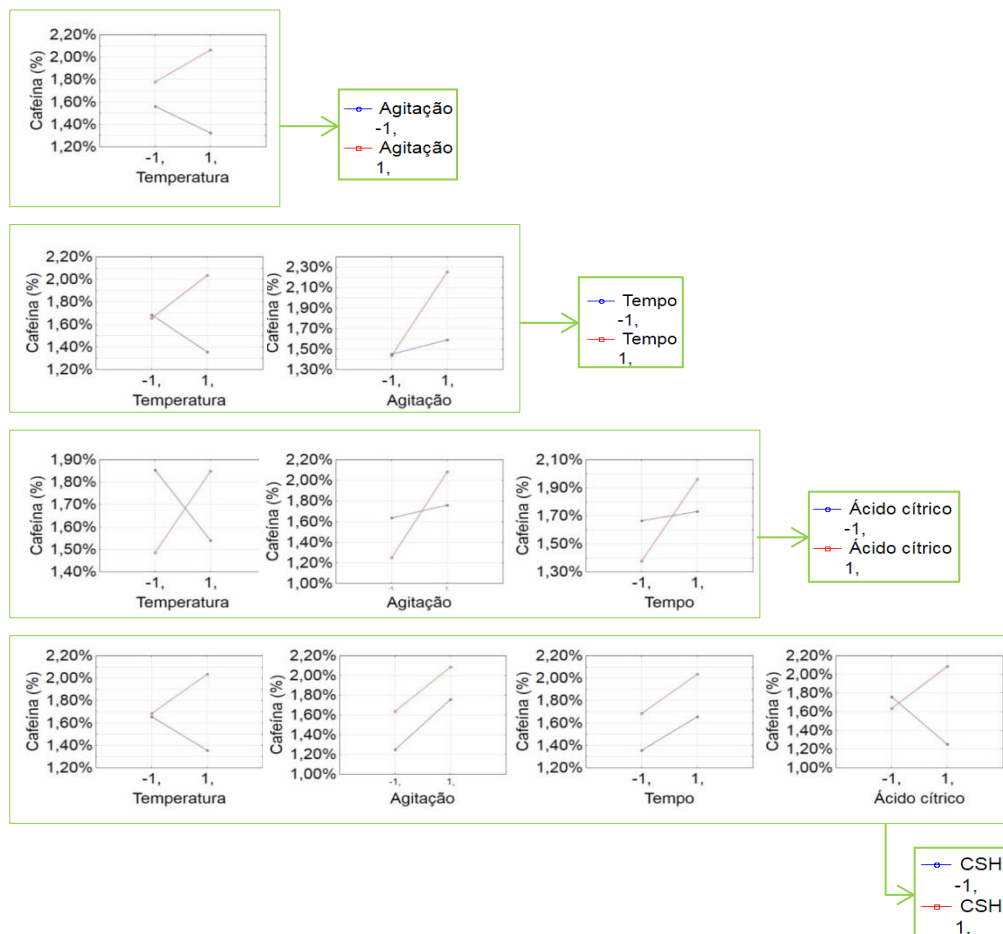
O aumento da concentração de álcool na solução hidroalcoólica também proporcionou maiores ganhos de cafeína. Um acréscimo na proporção de etanol relacionado a melhores rendimentos de cafeína também foi observado por outros autores (JUN, 2009; HU et al., 2016; CARCIOCHI et al., 2021). A mudança proporcionada por variações na CSH geraria alterações de polaridade e, conseqüentemente, solubilidade da cafeína (CARCIOCHI et al., 2021). De acordo Hu et al., 2016, a cafeína é mais solúvel em misturas hidroalcoólicas que no álcool ou na água pura, encontrando melhores faixas de solubilidade em solventes de 50 a 75 % de concentração.

Outro efeito principal importante constatado foi do tempo. Esse fator relaciona-se à cinética do processo e, uma vez que apresente efeito estatístico significativo positivo, infere-

se que, para o intervalo de tempo escolhido, o processo extrativo ainda não chegou no ponto de equilíbrio. Nesse caso, um tempo mínimo de 10 h seria necessário para que toda cafeína fosse extraída. A influência favorável do tempo também foi observada por Adnadjevic, Koturevicb e Jovanovic (2017) e Carciochi et al. (2021). Santana e Macedo (2018a) encontraram resultados significativos de rendimento de bioativos em intervalos de 1 a 6 h de extração para extração de guaraná.

Através dos gráficos das Figuras 35 e 36, serão analisados os efeitos de interação entre os fatores. A Figura 35 representa as médias marginais dos efeitos tomados em pares. Quanto mais paralelas as linhas referentes aos níveis de tratamento forem entre si, menor é a interação entre os fatores escolhidos. Do contrário, caso elas se cruzem, significa que há efeito de interação. Uma vez que não existe significância para a maioria dos efeitos de interação, conforme o gráfico de paretos da Figura 34, esta será apenas uma análise preliminar dos efeitos sinérgicos e antagonísticos das variáveis.

Figura 35 – Médias marginais em pares para a resposta cafeína (%)



Fonte: própria (2021)

Analisando-se o efeito de interação mais significativo B*C, observa-se que, pelas linhas cruzadas, há um efeito antagonístico entre os fatores temperatura e ácido cítrico: para um nível inferior de ácido cítrico, um aumento na temperatura reduz o rendimento da extração, enquanto em níveis maiores de ácido cítrico, esse efeito é invertido, observando-se um ganho de rendimento com o aumento da temperatura.

Uma vez que esses dois fatores interagiram, é possível inferir que o incremento da temperatura proporcionou um maior contato do solvente com as moléculas extraíveis ao facilitar o rompimento da parede celular e dilatar a matriz vegetal. Como consequência, houve uma maior difusão do solvente e contato com o ácido cítrico, permitindo que o aditivo agisse positivamente na solubilização da cafeína (VANDEPONSEELE; DRAYE; CHATEL, 2021).

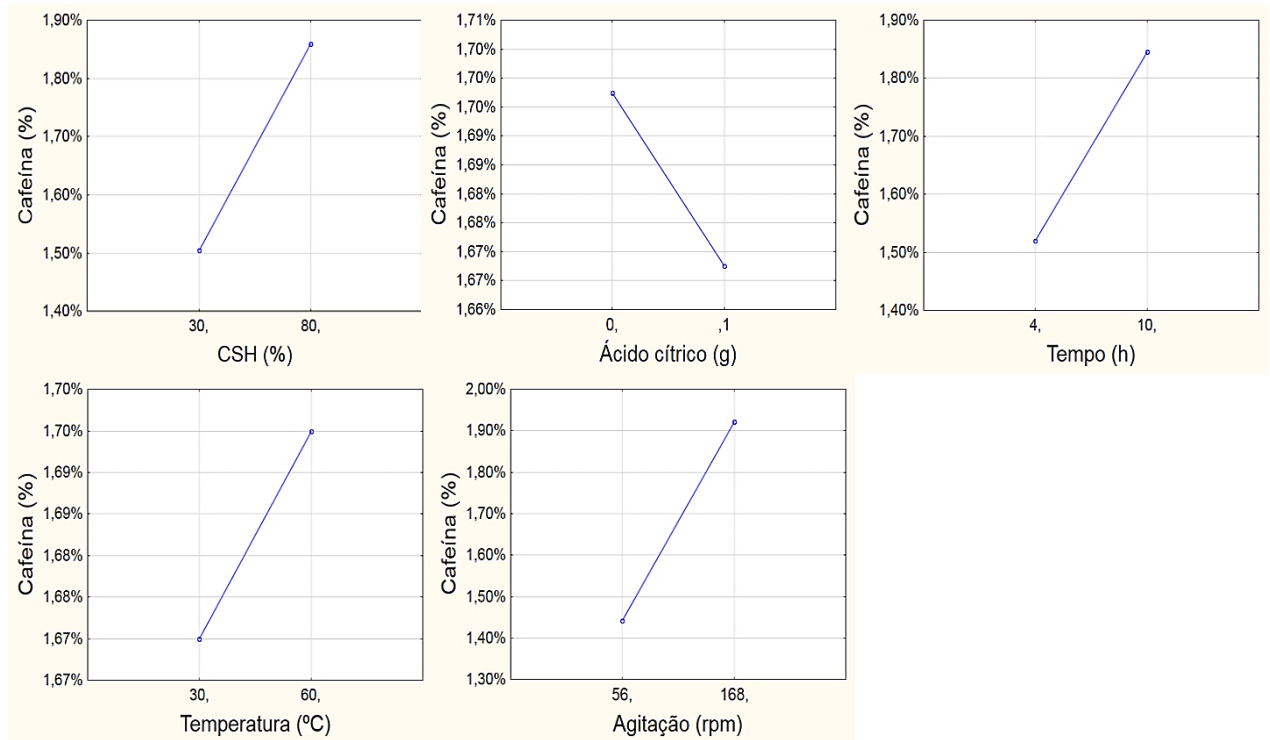
De acordo com a literatura, a adição de ácido cítrico no meio extrator tem como efeito a redução do pH da solução (ZIMMERMANN e GLEICHENHAGEN, 2011). Como consequência, vários mecanismos podem ser desencadeados, tais como: protonação de espécies químicas (VANDEPONSEELE; DRAYE; CHATEL, 2021), seletividade do solvente frente a espécies intermediárias formadas (DEMIR et al. 2015), facilitar a liberação de bioativos no solvente ao alterar sua interação com a matriz vegetal (LIANG; XU, 2001) e prevenir a degradação (LIU et al., 2013). Para cafeína, alguns autores também encontraram melhores rendimentos de cafeína em condições ácidas a temperaturas de 50 °C e 95°C (PARVEZ; WANI; MASOODI, 2021; MANDAL et al., 2014).

Já a temperatura atua diretamente na cinética do processo químico. Valores maiores dessa grandeza estão relacionados a maiores coeficientes de difusão e maior solubilidade das espécies químicas no solvente (TIWARI; BRUNTON; BRENNAN, 2013). Alguns autores indicam a dependência da extração da cafeína com a temperatura, observando maiores rendimentos para sistemas mais aquecidos (GHASEMZADEH-MOHAMMADI et al, 2017; PARVEZ; WANI; MASOODI, 2021). Adnadjevic, Koturevicb e Jovanovic (2017), em um estudo sobre a cinética de extração da cafeína do guaraná, observaram que a concentração máxima de cafeína ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) é obtida quando se aumenta a temperatura (40 a 70 °C), indicando que o processo é ativado termicamente.

A interação entre o tempo e o ácido cítrico também apresentou relevância estatística. Pela análise das médias marginais, constata-se que quando o tempo esteve em nível inferior, a influência do ácido cítrico foi negativa. Ao contrário, para o nível superior de tempo, a presença de ácido cítrico teve efeito positivo na extração da cafeína. Pode-se inferir que o comportamento cinético da extração foi alterado com a presença do ácido cítrico, ativando os mesmos mecanismos salientados para meios extrativos em baixo pH.

Na Figura 36, estão presentes as médias marginais para os efeitos principais. É possível observar que, pela inclinação positiva, todos os fatores, à exceção do ácido cítrico, tiveram efeito positivo na extração, corroborando o gráfico de paretos da Figura 34:

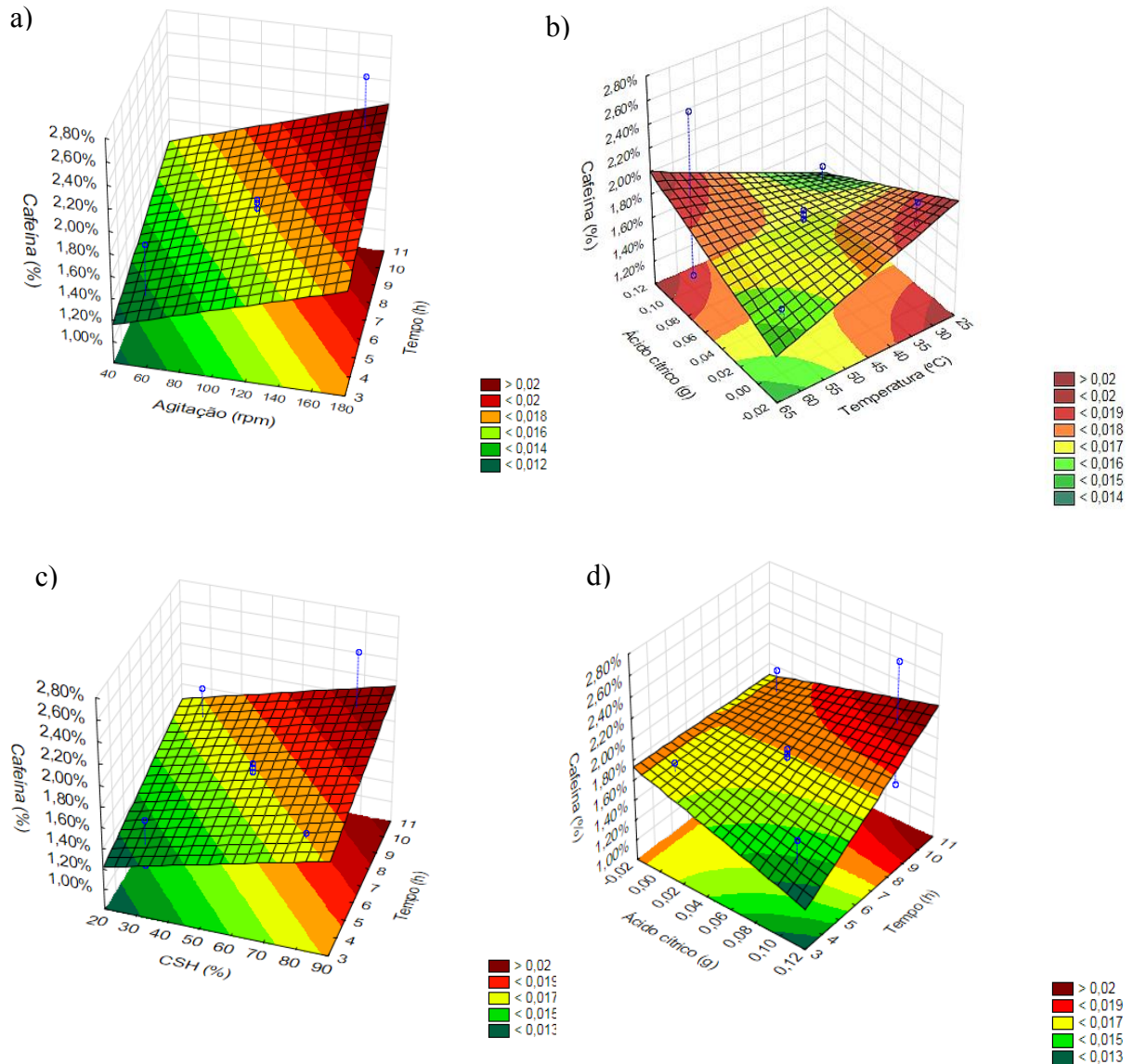
Figura 36 – Médias marginais dos fatores tomados individuais



Fonte: própria (2021)

Na Figura 37, estão presentes as superfícies de respostas para o rendimento de cafeína. Através dessa imagem, é possível fazer uma análise da tendência de resposta das variáveis dependentes plotadas, fornecendo uma ideia de valores ótimos para o planejamento. O formato da superfície é plano, pois se trata de um modelo de regressão linear. Cada linha colorida representa uma faixa de valor para a resposta cafeína.

Figura 37 – Superfícies de resposta para a cafeína (%)



Fonte: própria (2021)

Analisando-se as curvas de contorno da Figura 37a, verifica-se uma tendência de maior rendimento de cafeína para valores de agitação e tempo em torno dos níveis superiores (10h e 168 rpm). Além disso, percebe-se que as curvas de contorno são todas paralelas, indicando a ausência de interação entre as variáveis. O mesmo comportamento é constatado na Figura 37c, em que se consideram as variáveis tempo e CSH. Assim, entende-se que 10 h, 168 rpm e 80% de CSH seriam condições ótimas para a extração de cafeína.

Já na Figura 37b, observa-se a existência de duas regiões de otimização para as variáveis temperatura e ácido cítrico: temperatura em 60 °C e 0,1 g de ácido cítrico; temperatura 30 °C e ausência de ácido cítrico. Além disso, as curvas de nível apresentam formato ondulado,

indicando a presença de interação, como se constatou também pelas análises anteriores. Já a figura 37b apresenta um ponto de otimização para os níveis superiores de ácido cítrico (0,1 g) e tempo (10 h).

4.2 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Consoante com os dados presentes na Tabela 14, constata-se que o rendimento de CFT esteve entre 8,97 % e 14,7 %. Esse resultado é similar ao encontrado por outros autores, como Marques et al. (2016) e Schimpl et al. (2013), cujos teores de CFT apresentam valores de 10,57 e 9,6 %, respectivamente.

Na Tabela 17, estão presentes os resultados da análise de variância ANOVA, com checagem de curvatura, para o modelo de regressão linear obtido a partir da análise dos resultados da resposta %CFT. Os dados em vermelho indicam os fatores com relevância estatística, considerando uma probabilidade de significância de 95 % ($p = 0,05$).

Tabela 17 – Análise de variância ANOVA para a resposta CFT (%) do planejamento experimental fracionado 2^{5-2}

Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Curvatura	17,99490	1	17,99490	3,136583	0,218568
(A)CSH (%)	14,78178	1	14,78178	2,576523	0,249675
(B)Ácido cítrico	2,87708	1	2,87708	0,501486	0,552255
(C)Temperatura	1,69108	1	1,69108	0,294762	0,641601
(D)Agitação	0,15664	1	0,15664	0,027303	0,883950
(E)Tempo (h)	0,00000	1	0,00000	0,000000	1,000000
B*C	4,61611	1	4,61611	0,804606	0,464381
B*E	0,25894	1	0,25894	0,045134	0,851444
Erro	11,47421	2	5,73710		
Total SQ	53,85073	10			

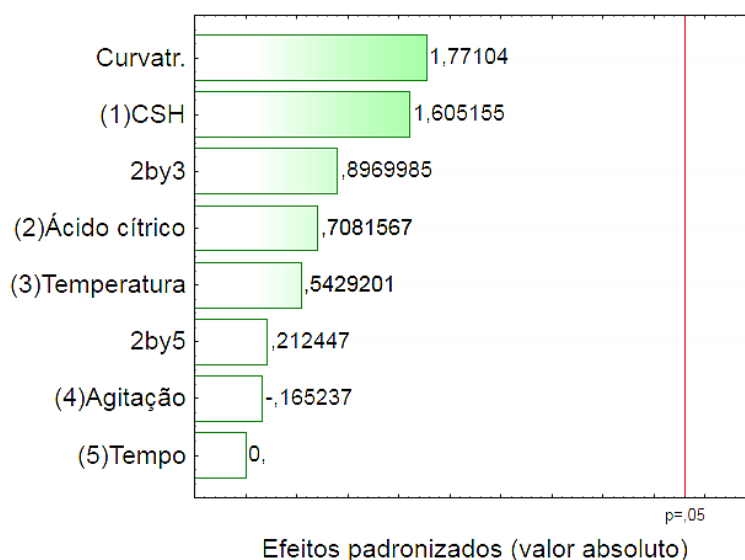
Fonte: própria (2021)

Para o nível de significância de 5%, constata-se que nem uma variável ou suas interações apresentaram relevância significativa nesse estudo. O coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,78693$, e o ajuste foi de 0. Uma vez que a pretensão desta etapa do planejamento é de-

terminar a importância relativa dos efeitos para se eliminar variáveis do estudo, pode-se prosseguir com análise estatística. Não será levado em conta o modelo matemático nesta etapa.

Com o intuito de se elucidar os fatores com maior e menor impacto na extração de compostos fenólicos, dispõe-se, na Figura 38, o diagrama de paretos dos efeitos principais e secundários para a variável resposta %CFT:

Figura 38 – Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para a resposta CFT (%)



Fonte: própria (2021)

Verifica-se, pois, que os efeitos principais com maior impacto foram CSH, ácido cítrico e a temperatura. Já os que tiveram menor impacto foram a agitação e o tempo, esse último expressando efeito nulo. Ainda, constata-se dois efeitos de interação: ácido cítrico com a temperatura e tempo, os mesmos observados para a cafeína. Por fim, a curvatura foi o efeito mais importante, indicando a existência de termos quadráticos no modelo do planejamento, fato este que explica a falta de ajuste do modelo de regressão linear.

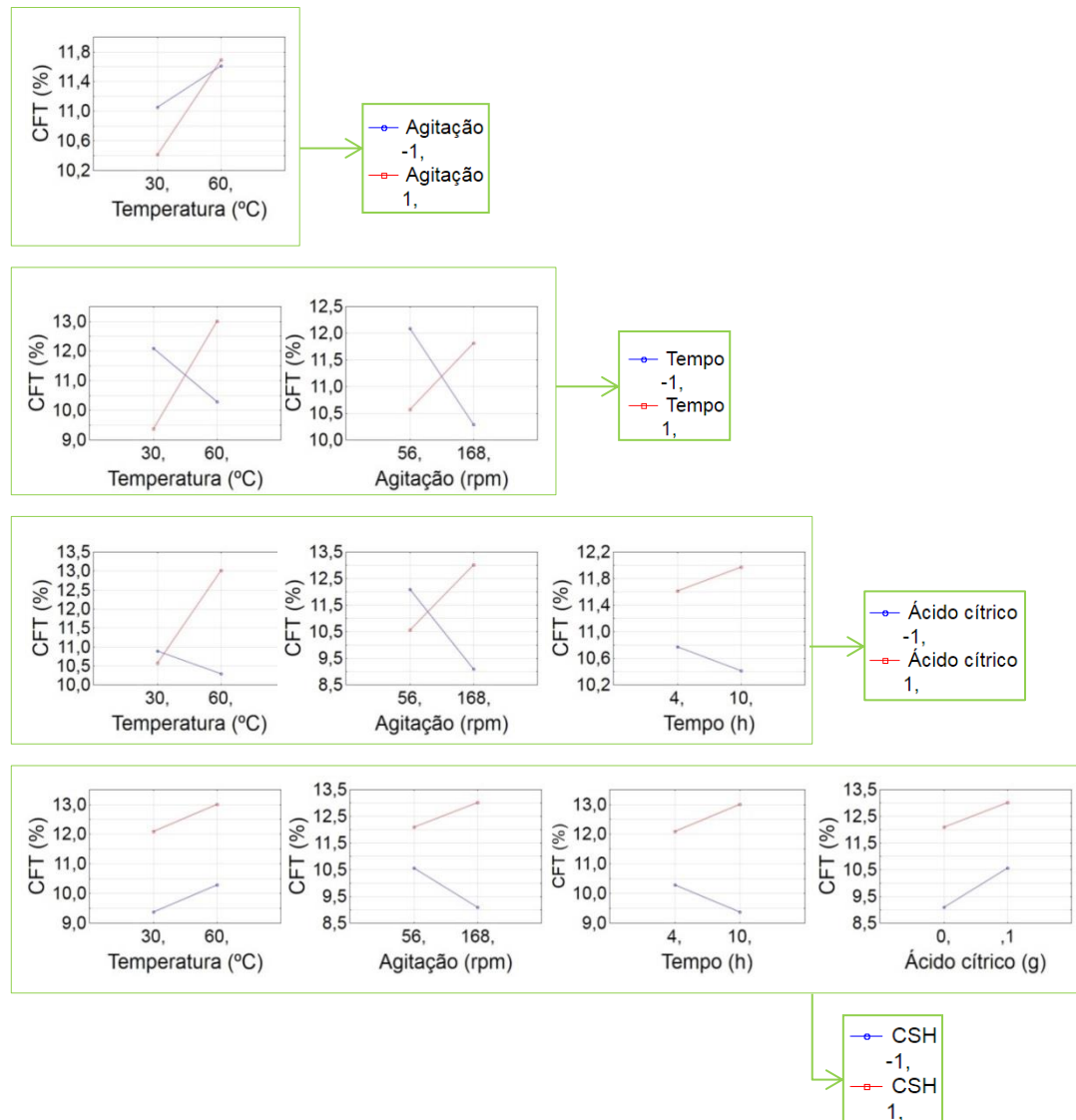
O aumento da concentração de álcool proporcionou um maior rendimento de compostos fenólicos. De maneira geral, os compostos fenólicos tem maior afinidade em solventes orgânicos que em água (MAJHENIČ; ŠKERGET; KNEZ, 2007). Além disso, a presença de água favorece a atividade enzimática e consequente degradação dos compostos naturais, o que pode ter tido impacto durante a conservação das amostras (DENG et al.,2018).

A presença do ácido cítrico foi responsável por aumentar o rendimento de polifenóis. Em trabalhos utilizando ácido cítrico para extração de polifenóis de chá verde, o aditivo quí-

mico foi capaz de melhorar o isolamento e rendimento de catequinas e epicatequinas, quando comparado a métodos de maceração sem o aditivo (ZIMMERMANN e GLEICHENHAGEN, 2011; DEMIR et al., 2015; SERDAR et al., 2016). Além disso, os polifenóis são altamente estáveis em condições ácidas, pois pH inferiores a 5 inibem a oxidação desses compostos (ZHU et al., 1997). Por fim, uma vez que parte dos compostos fenólicos se apresenta de forma conjugada, a hidrólise proporcionada por acidulantes poderia romper ligações glicosídicas e permitir a liberação dessas substâncias no solvente (WATI; SAMPANVEJSOBHA; PUNBUSAYAKUL, 2009).

Para análise da interação dos efeitos, apresenta-se a Figura 39 com as médias marginais considerando a resposta %CFT:

Figura 39 – Médias marginais em pares para a resposta CFT (%)

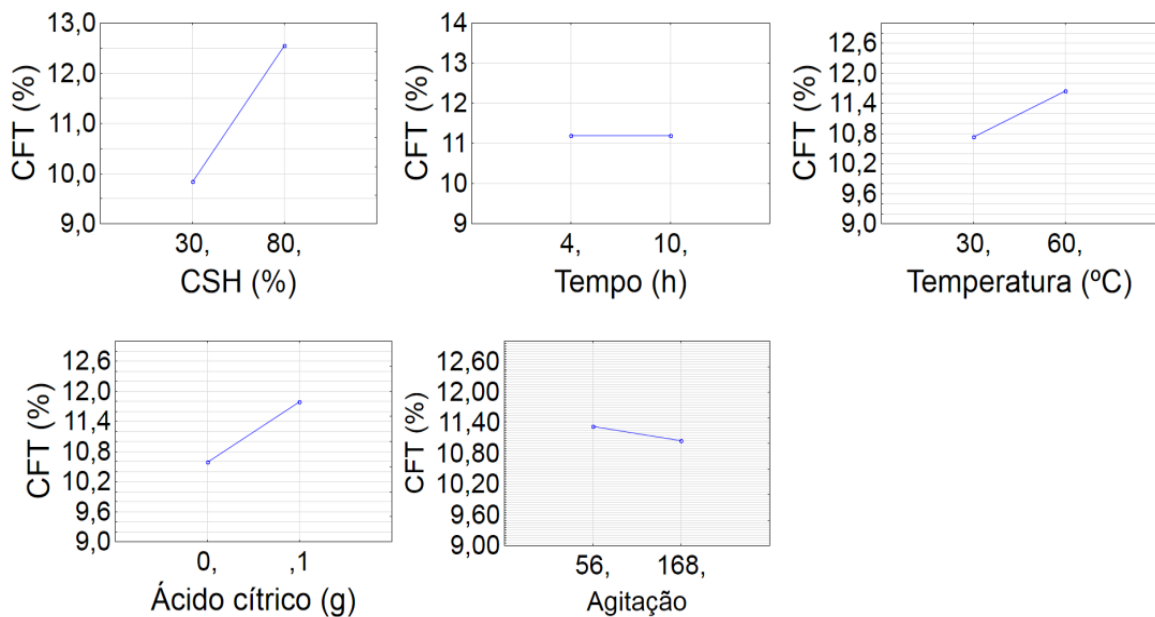


Fonte: própria (2021)

Nota-se que o efeito do ácido cítrico teve interação de segunda ordem com todos os outros fatores, o que pode ser constatado pelas linhas cruzadas. No entanto, apenas aquelas referentes ao tempo e temperatura foram relevantes, conforme demonstrado no diagrama de paretos. Para temperaturas baixas, a presença do aditivo químico foi irrelevante para a extração de CFT. No entanto, em níveis superiores de temperatura, a presença do ácido aumentou em quase 3% os ganhos em fenólicos totais. A temperatura, portanto, pode ativar o processo cinético de extração desencadeado pelo ácido cítrico.

Na Figura 40, estão as médias marginais dos efeitos principais. Percebe-se que as três variáveis com maior efeitos estatístico (tempo, temperatura e CSH) apresentaram inclinação positiva, indicando ganhos de rendimento de %CFT com aumento dos seus níveis.

Figura 40 – Médias marginais tomadas individualmente para a resposta CFT (%)

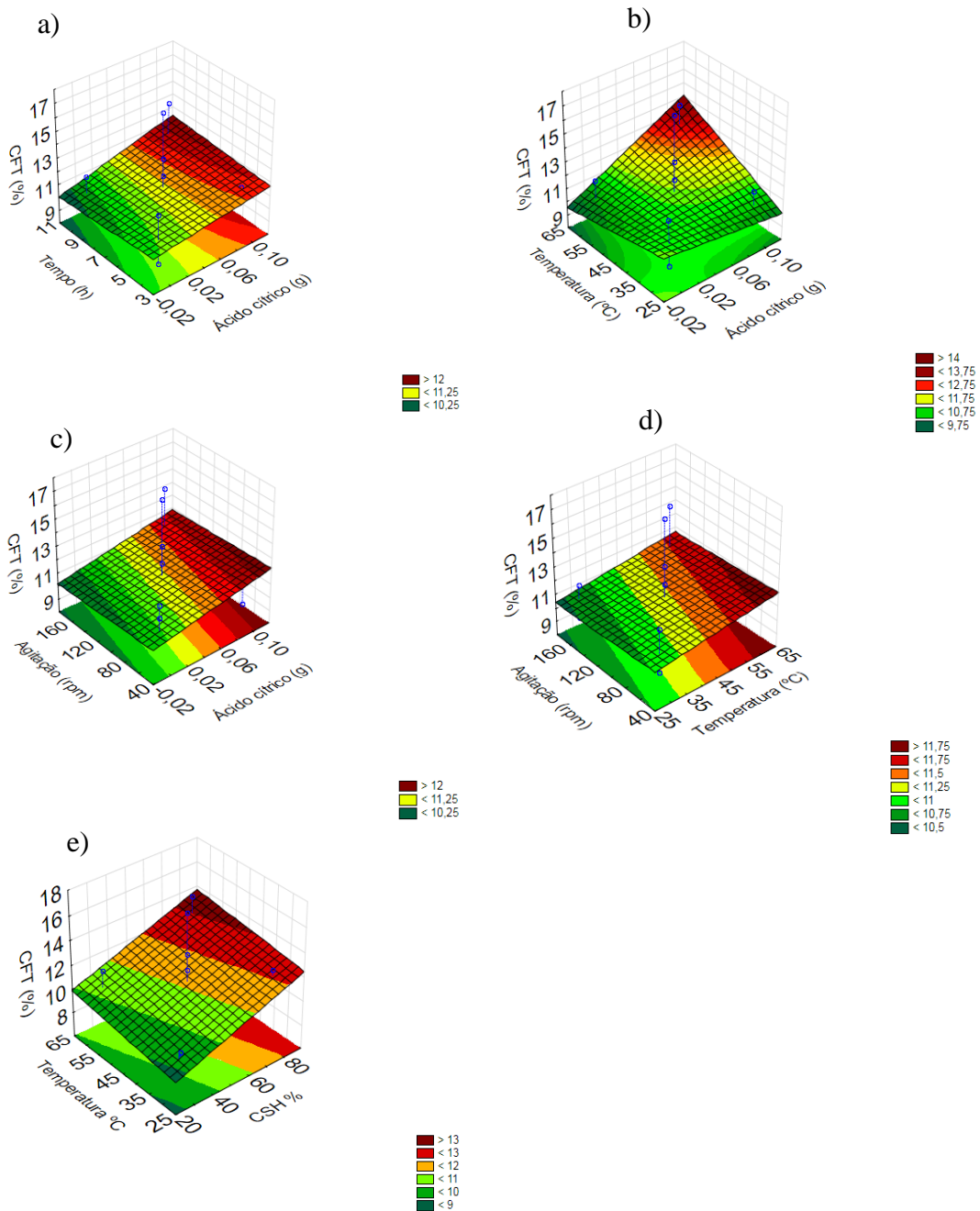


Fonte: própria (2021)

Chama a atenção o fato de a linha da variável tempo estar totalmente na horizontal, indicando efeito praticamente nulo desse fator. Santana et al. (2018a) constatou um tempo ótimo de 6 h para a extração hidroalcoólica de guaraná à quente de CFT do guaraná. Assim, é possível que, para a faixa de tempo escolhida de 4 a 10 h, a extração tenha chegado a um estado de esgotamento de moléculas extraíveis.

Para previsão de uma região de otimização, lançou-se mão da Figura 41. Nela, apresentaram-se algumas superfícies de resposta do planejamento em estudo:

Figura 41– Superfícies de resposta para CFT (%)



Fonte: própria (2021)

Da Figura 41a, depreende-se que há um ponto ótimo para a o valor de ácido cítrico em 0,1 g e tempo de 10h. Na Figura 41b, o ponto máximo também é visto para os níveis superiores de ácido cítrico e temperatura (60°C). Nas Figuras 41c e 41d, tanto o nível superior quanto inferior de agitação tem ponto ótimo. Nesse caso, por uma questão de eficiência energética, poderia optar-se pelo nível inferior de agitação (56 rpm), uma vez que essa variável teve o segundo menor efeitos estatístico no estudo. Pela Figura 41e, nota-se um ponto ótimo para os valores máximos de CSH e temperatura (80% e 60 °C, respectivamente).

4.3 FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE PARA AS RESPOSTAS %CAFEÍNA E %CFT

Para determinação das condições ótimas que maximizassem tanto a extração de cafeína quanto de CFT, usou-se a técnica de programação não linear “função de desejabilidade $f(d)$ ”, disponível no *Statistica versão 10.0*. Os resultados estão presentes na Figura 42. Os valores de desejabilidade (d) variam de 0 a 1 e referem-se aos pesos dados a cada valor alvo escolhido da resposta. Quando se atribui 1 ao valor alvo, assume-se que esse valor é o desejado da resposta. Ao contrário, quando se atribui 0, diz-se que o valor da resposta está fora da região desejável. Assim, optou-se por atribuir 1 aos maiores rendimentos de cafeína e CFT, e 0 para os valores intermediários e medianos, conforme descrito abaixo:

a) %Cafeína:

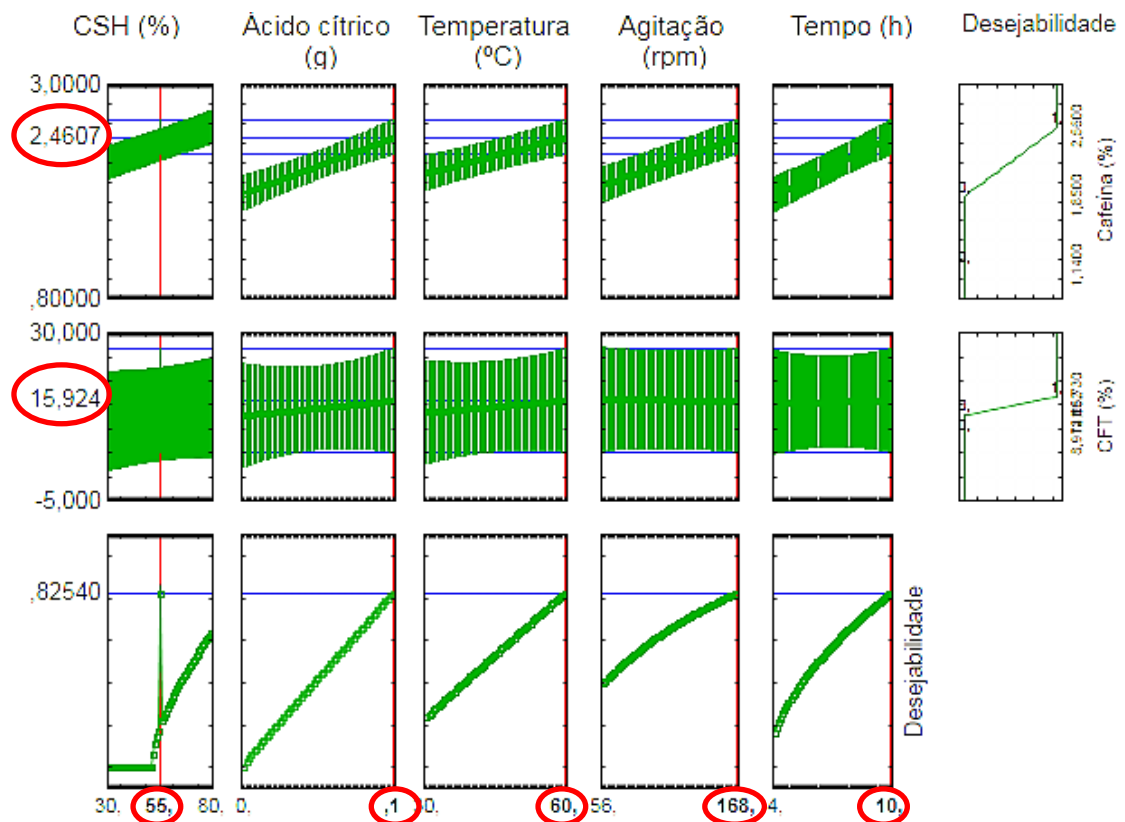
L = 1,14% (d = 0); T = 1,85% (d = 0) U = 2,56% (d=1)

b) %CFT

L = 8,9745 (d = 0) T = 12,8521% (d = 0)U = 16,73021% (d=1)

Em que L, T e U representam o menor valor aceitável, valor intermediário e maior valor aceitável, respectivamente.

Figura 42 – Perfil dos valores previstos e desejabilidade



Fonte: própria (2021)

Os pontos ótimos bem como as respostas encontradas estão circulados em vermelho na Figura 41. Para melhor visualização, serão destacados na Tabela 18:

Tabela 18 – Resultado da função de desejabilidade para as resposta cafeína e CFT

Temperatura	CSH	Ácido cítrico	Agitação	Tempo	Cafeína	CFT
(°C)	(%)	(g)	(rpm)	(h)	(%)	(%)
60	55	0,1	168	10	2,4607	15,924

Fonte: própria (2021)

Os resultados demonstram que os níveis superiores de todas as variáveis apresentaram região de otimização para ambas as respostas estudadas. Como se constatou pela análise individual das respostas, no geral, os pontos ótimos de extração sempre estiveram em torno do valor máximo das variáveis independentes. A exceção ficou por conta da CSH, cujo valor médio de 55 % satisfaz as respostas máximas.

Na literatura, a extração de compostos bioativos de guaraná normalmente emprega soluções hidroalcoólicas em torno de 50% (MAJHENIC; ŠKERGET; KNEZ, 2007; SANTANA e MACEDO, 2018a; SANTANA; ZANINI; MACEDO 2020), o que está de acordo com os valores desta pesquisa.

O tempo pode variar conforme a razão sólido-líquido e temperatura, uma vez que, como se salientou, a extração do guaraná é um processo ativado termicamente. Majhenic, Skerget e Knez (2007) utilizaram 2 h de extração, em temperatura de ebulição, para razão sólido-líquido 1:15. Já Adnadjevic, Koturevich e Jovanovic (2017) empregaram 12 min, a temperaturas entre 40 °C e 70 °C e razão sólido-líquido de 1:80.

No Quadro 6, estão presentes alguns trabalhos que aplicaram maceração para a extração do guaraná. A primeira linha representa os resultados ótimos obtidos para esta pesquisa, sendo que, para critério de comparação, os valores foram expressos em concentração comum no extrato hidroalcoólico.

Quadro 6 – Comparação dos resultados otimizados com outros autores. TIR – tirosina; AG – ácido gálico

Sistema	Temperatura	RSL	Solvente	Tempo	Resultados	Referência
Erlemeyer em sistema de agitação Shaker com adição de ácido cítrico	60 °C	1/5 (10 g/50 mL)	Solução hidroalcoólicas 55% (v/v)	10 h	CFT: 31, 24 mg TIR/ mL extrato Cafeína: 24,14 mg/mL extrato	Própria (2021)
Frasco com agitador magnético e sistema de condensação	Ebulição	1/15 (10 g semente em 150 mL)	Solução hiroalcoólica 60 % (v/v)	2 h	CFT: 172 mg AG/ g extrato Cafeína: 140 mg/ g extrato	(MAJHENIC; ŠKERGET; KNEZ, 2007)
Frascos plásticos de PET	Ambiente	3/10 (30g de guaraná em pó e 100 mL de solvente)	Etanol 92,8 % (v/v)	7 dias	Índice de taninos: 95,23 (absorbância, 400 nm)	(GARCIA et al, 2015)
Frasco de fundo redondo com agitação magnética	40 °C a 70°C	1/80 (1g de guaraná em pó em 80 mL de solvente)	Água	12 min	Cafeína: 0,4 -0,6 mg cafeína / mL extrato aquoso	(ADNADJEVIC; KOTUREVICB; JOVANOVIC, 2017)
Erlemeyer fechado em sistema Shaker de agitação	40°C	1/3 (p/p) diferentes granulações	Solução hidroalcoólica 50 % (p/p)	6 h	Cafeína: 14,95- 53,01 mg/ mL extrato Catequinas: 19,09 –	(SANTANA e MACEDO, 2018a)

					71,37 mg / mL extrato	
Banho de aquecimento com agitação rotatória	60 °C	1/3 (p/p), diferentes granulações	Solução hidroalcoólica 50 % (p/p)	30 min	Cafeína: 10,94 – 33,91 g / mL extrato; Catequinas: 14,42 - 28,77 g /mL	(SANTA-NA; ZANINI; MACEDO 2020)

Fonte: própria (2021)

Verifica-se que os resultados são comparáveis aos obtidos por Santana, Zanini e Macedo (2020) e Santana e Macedo (2018a), embora a RSL empregada por eles tenha sido superior, além de terem usado sementes trituradas, o que pode justificar alguns resultados superiores obtidos por eles. Majhenic, Škerget e Knez (2007), apesar da RSL inferior, obtiveram melhores resultados, no entanto, também usaram sementes de guaraná para a extração. As sementes costumam ter maiores teores de compostos bioativos que o guaraná em pó comercial, pois passam por poucas etapas de processamento, resultando em uma maior conservação dos princípios ativos.

5 CONCLUSÃO

Esta pesquisa foi a primeira a analisar o efeito do ácido cítrico no processo extrativo dos compostos bioativos do guaraná. A aplicação do planejamento fracionado multivariado foi imprescindível para constatar o efeito estatístico de interação do aditivo com as variáveis tempo e temperatura, algo que não seria perceptível em um planejamento univariável.

Com base na análise de cafeína por espectrofotometria, verificou-se que a agitação, tempo e CSH tiveram efeito positivo significativo no rendimento do alcaloide. Verificou-se que a presença do ácido cítrico teve efeito relevante de interação com o tempo e a temperatura, demonstrando a capacidade do aditivo em alterar a cinética do processo extrativo da cafeína, gerando maiores rendimentos.

As análises de CFT demonstraram que o ácido cítrico favoreceu a obtenção de compostos fenólicos do guaraná, sendo, inclusive, mais relevante que alguns fatores críticos do

processo como temperatura, tempo e agitação. Também foi possível observar o efeito de interação entre o aditivo e a temperatura e o tempo, assim como se observou para a cafeína.

A análise das superfícies de resposta e da função de desejabilidade permitiu indicar um ponto ótimo para a máxima extração de bioativos do guaraná, o qual pode ser obtido para tempo, temperatura, agitação, massa de ácido cítrico e CSH de, respectivamente, 10h, 60 °C, 168 rpm, 1 g e 55 %.

Portanto, nota-se que o ácido cítrico é um aditivo promissor para a produção de extratos de guaraná com alto teor de cafeína e compostos fenólicos. O aditivo não só alterou a cinética do processo, como favoreceu a obtenção de maiores rendimentos tanto em cafeína, quanto em polifenóis, o que justifica seu emprego em sistemas extrativos por maceração.

6 PERSPECTIVAS

O uso de ácido cítrico teve importante efeito de interação com tempo e temperatura para ambos as respostas estudadas. Sendo assim, sugere-se um estudo mais aprofundamento para se entender a dinâmica dessa interação, uma vez que tais fatores estão diretamente relacionados à cinética de um processo extrativo.

O pH é um fator que está diretamente relacionado à presença de acidulantes no meio. Sugere-se que, caso sejam feitos novos estudos extrativos com ácido cítrico, esse fator seja monitorado, bem como seu efeito.

Uma vez que o planejamento fracionado é apenas uma etapa de varredura das variáveis significativas, seria interessante, para trabalhos na mesma linha de pesquisa, que se realizasse um novo planejamento levando-se em conta os fatores mais significativos observados neste estudo. No caso da extração dos CFT, observou-se que os termos quadráticos tem relevância significativa, o que denota a necessidade de um modelo quadrático para a descrição correta dos efeitos das variáveis estudadas.

Um estudo comparativo sobre o efeito de outros aditivos químicos, como ácido ascórbico, e solventes diferentes seria interessante. O ácido cítrico é uma substância facilmente encontrada em sucos de frutos cítricos. Logo, seria interessante o estudo de métodos extrativos usando solventes de frutos. Além de poder promover melhores rendimentos em termos de bioativos, poderia ser uma forma de desenvolver novos produtos nutracêuticos contendo um combinado de frutas e guaraná.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. et al. Natural polyphenols: an overview. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 8, p. 1689-1699, 2017.
- ADNADJEVICA, B.; KOTUREVICB, B.; JOVANOVIĆA, J. Comparative kinetic analysis of isothermal extraction of caffeine from guarana seed under conventional and microwave heating. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 118, p. 61-70, 15 mar. 2017.
- ADOLFO, F. R. Simultaneous determination of Fe and Ni in guarana (*Paullinia cupana* Kunth) by HR-CS GF AAS: Comparison of direct solid analysis and wet acid digestion procedures. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 88, p., 20 fev. 2020.
- AHMED, M. et al. Effects of ultrasonication, agitation and stirring extraction techniques on the physicochemical properties, health-promoting phytochemicals and structure of cold-brewed coffee. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 1, n. 99, p. 290-301, 15 jan. 2019.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, I. U. Extraction of phenolic compounds: a review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200–214, 2021
- ALARA, O.R. et al. *Vernonia cinerea* leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 533–544, 2018
- ALSABIR, S. G. et al. Kinetic and dynamic description of caffeine. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**, v. 8, n. 1, p. 3-9, 2018.
- ANANINGSIH, V. K.; SHARMA, A.; ZHOU, W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. **Food Research International**, v. 50, p. 469–479, 2013.
- ANDRADE, L.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M. Estudo da metodologia de análise de cafeína em sementes de guarana (*Paullinia cupana*). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 7–9, 1999.
- ANGELUCCI, E.; TOCCHINI, R.P.; LAZARINE, V.B.; PRADO, M.A.F. Caracterização química da semente de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Ducke). **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 56, p. 183–192, 1978
- ANTUNES, P. B. **Análise comparativa das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná (*Paullinia cupana*): caracterização química e atividade antioxidante in vitro**. 2011. 114 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada - PRONUT, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo - SP, 2011.
- ARYA, V.; THAKUR, N.; KASHYAP, C. P. Preliminary phytochemical analysis of the extracts of *Psidium* Leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2012.
- ATIOMSSA, T.; GHIOKLALP, A.; Characterization of caffeine and determination of caf-

feine in tea leaves using uv-visible spectrofotometer. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. v. 5, n.1., p. 1-8, 2011.

ATROCH, A. L. F.; FILHO, F. J. do N. Guarana - *Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. In: RODRIGUES, S.; BRITO, E. S. de; SILVA, E. de O. **Exotic Fruits: Reference Guide**. 1. ed. [S. l.]: Academic Press, 2018. p. 226-236. ISBN 9780128031384.

AVATO, P. et al. Seed oil composition of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Lipids**. v. 38, p. 773–780, 2003.

AZWANIDA, N. N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, n. 3, p. 196, 2015.

BANSODE, R. R. et al. Bioavailability and hypolipidemic effects of peanut skin polyphenols. **Journal of Medicinal Food**, p. 1–8, 2014.

BARONE, J.; ROBERTS, H. Caffeine consumption. **Food and Chemical Toxicology**. v. 34, p.119–129, 1996.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32–3, 2005.

BAUMANN, T.W.; SCHULTHESS, B.H.; HÄNNI, K. Guarana (*Paullinia cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. **Phytochemistry**, v. 39, p. 1063–1070, 1995.

BEAUFORT, B. La mercatique transatlantique d'un végétal psychoactif: le guaraná entre remède et aliment (1840-1921). **Revista franco-brasileira de geografia**, ano 35, p. 1-35, 29 maio 2018

BERTIN, R.L. et al. Nutrient composition and identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 55, p. 404-411, 2014.

BIMAKR, M. et al. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Malva sylvestris* leaves and its comparison with agitated bed extraction technic. **Food Sci Biotechnol**. V 26, n. 6, p. 1481-1490, 2017.

BITTENCOURT, L.S. et al. The protective effects of guarana extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chemical Toxicology**. v. 53, p. 119–125, 2013.

BOASQUÍVIS, P. F. et al. Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and Huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 16, 4 jul. 2018.

CAMPOS, A.R., et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1199–1202, 2003.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability

and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 155 - 171, 2014.

CARCIOCHIA, R. A. et al. Reduction of environmental impacts of caffeine extraction from guarana by using ultrasound assistance. **Food and Bioproducts Processing**, p. 266–275, 26 fev. 2021.

CÁRDENAS, S.; LUCENA, R. Recent advances in extraction and stirring integrated techniques. **Separations**, v. 4, n. 1, p. 6, 15 mar. 2017.

CARDOSO, Domingos et al. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New Haven - CT, v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 3 nov. 2017.

CARRAGETAA, D. F. et al. Anti-obesity potential of natural methylxanthines. **Journal of Functional Foods**, v. 43, p. 84-94, 19 jun. 2018.

CHEN, D. et al. Investigation of biomass torrefaction based on three major components: Hemicellulose, cellulose, and lignin. **Energy Conversion and Management**, v. 169, p. 228-237, 21 maio 2018.

CHOUNG, M. et al. Comparison of extraction and isolation efficiency of catechins and caffeine from green tea leaves using different solvent systems. **Food Science & Technology**, v. 49, n. 6, p. 1572-1578, jun. 2021.

CHOUNG, M.G. et al. Comparison of extraction and isolation efficiency of catechins and caffeine from green tea leaves using different solvent systems. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, ed. 6, p. 1572–1578, 2013.

COLOMER, R. et al. Natural Polyphenols and their Synthetic Analogs as Emerging Anticancer Agents. **Current Drug Targets**, v. 18, p. 145-157, jan. 2016.

CONAB. **Análise mensal**: Guaraná. Brasil, out. 2020. Disponível em: [COX, S. et al. Evaluation of ethanol-based extraction conditions of sorghum bran bioactive compounds with downstream anti-proliferative properties in human cancer cells. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. 01589, maio 2019.](https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-guara-na/item/download/34085_2e7ca5fa392c53d9553a6acc0dbe5854#:~:text=No%20per%C3%A0Do%20entre%202015%20e%202019%2C%20a%20%C3%A1rea%20destinada%20%C3%A0,compara%C3%A7%C3%A3o%20com%20o%20ano%20anterior. Acesso em: 16 mar. 2021.</p></div><div data-bbox=)

CUSSLER, E. L. **Diffusion mass transfer in fluid systems**. 3. ed. United States of America: Cambridge University Press, 2007. ISBN 978-0-521-87121-1.

D'ARCHIVIO, A. A.; MAGGI, M. A.; RUGGIERI, F. Investigation by response surface methodology of extraction of caffeine, gallic acid and selected catechins from tea using water-ethanol mixtures. **Food Analytical methods**, v. 9, p. 2773–2779, 11 mar. 2016.

DEMIR, E.; SERDAR, G.; SOKMEN, M. Comparison of some extraction methods for Isolation of catechins and caffeine from Turkish green tea. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 2, n. 2, p. 15-25, jul. 2015.

DENG, J. et al. Technological aspects and stability of polyphenols. In: GALANAKIS, C. M. et al. **Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications**. [S. l.]: Woodhead Publishing, 2018. cap. 9, p. 295-323. ISBN 978-0-12-813572-3.

DZAH, C. S. et al. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. **Food Bioscience**, v. 35, p. 1-9, 2020.

EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; OLIVEIRA, L. F. C.; ALIA, J. M.; LE HYARIC, M.; AMEIDA, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 532, p. 177-186, 2005.

ELHAG, H. E. E. A. et al. Optimization of protein yields by ultrasound assisted extraction from *Eurycoma longifolia* roots and effect of agitation speed. **Journal of King Saud University – Science**, v. 31, n. 4, p. 913-930, 8 jan. 2018.

FANTINI, M. et al. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9236, 2015.

FIGUEROA, A. L. G. Guaraná, a máquina do tempo dos Sateré-Mawé. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém-PA, v. 11, n. 1, Ciências Humanas, p. 55-85, 15 jan. 2016.

FILHO, F. J. N. **Novas cultivares estimulam a produção de guaraná no Brasil**. Manaus - AM, 1 mar. 2012. 1 fotografia. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1462561/novas-cultivares--estimulam-a-producao-de-guarana-no-brasil>. Acesso em: 18 maio 2021.

FORNI, C. et al. Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. **BioMed Research International**. p. 1–16, 2019.

FOURAT, M. et al. Multiresponse Optimization of Pomegranate Peel Extraction by Statistical versus Artificial Intelligence: Predictive Approach for Foodborne Bacterial Pathogen Inactivation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2019, p. 18, 2019.

FRAGA, C.G. et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health.

Food & Function journal, v. 10, p. 514–528, 2019

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.

FURLONG, E. B.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. D. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Repositório Institucional da Universidade Federal do Rio Grande**, Rio Grande, v. 13, p. 105-114, 15 jul. 2003

- GADKARI, P. V.; & BALARAMAN, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 122–138, 2015.
- GARCIA, T. P. R et al. Quantificação de taninos em extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) realizado através de planejamento experimental. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2-15, Campinas – SP. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, p. 978-983, 2015.
- GARCIA-VAQUERO, M.; RAJAURIA, G.; TIWARIA, B. Conventional extraction techniques: Solvent extraction. In: **Sustainable Seaweed Technologies**. [S. l.]: Elsevier, 2020. cap. 7, p. 171-189. ISBN 978-0-12-817943-7.
- GERKE, I. B. B. et al. Solid–liquid extraction of bioactive compounds from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves: Experimental study, kinetics and modeling. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 8, p. 12892, 8 out. 2018.
- GHASEMZADEH-MOHAMMADI, V.; ZAMANI, B.; AFSHARPOUR, M.; MOHAMMADI, A. Extraction of caffeine and catechins using microwave-assisted and ultrasonic extraction from green tea leaves: an optimization study by the IV-optimal design. **Food Science and Biotechnology**, v.26, p. 1281–1290, 2017.
- GLEICHENHAGEN, M.; SCHIEBER, A. Current challenges in polyphenol analytical chemistry. **Current Opinion In Food Science**, v. 7, p. 43–49, 2016.
- GONZALEZ, A. M et al. Pharmacokinetics of caffeine administered in a time-release versus regular tablet form. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. v. 11, p. 23, 2014.
- GOUVEA, R.; KASSICIEH, S. Using resources in R&D policy planning: Brazil, the Amazon and biotechnology. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 72, n. 5, p. 535-547, 7 jun. 2005.
- HASKELL, C. F. et al. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guarana in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, p. 65–70, 2007.
- HAYA, S.; BENTAHAR, F.; TRARI, M. Optimization of polyphenols extraction *from orange peel*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, p. 614–621, 19 nov. 2018
- HELDMAN, D. R.; LUND, D. B. **Handbook of food engineering**. 2. ed. [S. l.]: CRC Press, 2007.
- HENMAN, A.R., Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **Journal ethnopharmacol**, v. 6 , 311–338, 1982.
- HU, C. et al. Studies on the mechanism of efficient extraction of tea components by aqueous ethanol. **Food Chemistry**, v. 194, p. 312-318, mar. 2016.
- HUMAN, C. et al. Identification of a novel di-C-glycosyl dihydrochalcone and the thermal

stability of polyphenols in model ready-to-drink beverage solutions with *Cyclopia subternata* extract as functional ingredient. **Food Chemistry**, v. 351, p. 129273, 30 jul. 2021.

IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Unit operations in food engineering**. United States of America: CRC Press LLC, 2003. 884 p. ISBN 1-56676-929-9.

ISHIZU, T.; TSUTSUMI, H.; SATO, T. Mechanism of Creaming Down Based on Chemical Characterization of a Complex of Caffeine and Tea Catechins. **Chem. Pharm. Bull**, v. 64, p. 676 – 686, 2016.

JOSHI, D.; ADHIKARI, N. An overview on common organic solvents and their toxicity. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 28, n. 3, p. 1-18, 29 jun. 2019.

JUN, X.,. Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. **J. Food Eng.** v. 94, p.105–109, 2009.

KALMAN, D. et al. An acute clinical trial evaluating the cardiovascular effects of an herbal ephedra–caffeine weight loss product in healthy overweight adults. **International Journal Of Obesity**, v. 26, p. 1363, 2002.

KENNEDY, D.O et al. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 79, p. 401–411, 2004.

KOBER, H. et al. Genoprotective and hepatoprotective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 48–52, 2016.

LATOSIŃSKA, J. N.; LATOSIŃSKA, M. **The question of caffeine**. Poznan, Poland: Intech, 2017. ISBN 9789535132745.

LEFEBVRE, T.; DESTANDAU, E.; LESELLIER, E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review: ThibaultEmilieEric. **Journal of Chromatography A**, v. 1635, n. 4, p. 461770, jan. 2021.

LEFEBVRE, T.; DESTANDAU, E.; LESELLIER, E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. **Journal of Chromatography**, v. 1635, p. 461770, 4 jan. 2021.

LEITE, M. G. A.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Development of shampoo formulations with guarana extract: Influence of thickening agents in the texture profile. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 7, n. 1, p. 1-6, jan. 2020.

LI, A. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, p. 6020–6047, 2014.

LIANG, Y.; XU, Y. Effect of pH on cream particle formation and solids extraction yield of black tea. **Food Chemistry**, v. 74, p. 155-160, 2001.

LIMA, W.P. et al., Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 1019–1028, 2005.

- LIU, W. et al. The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation of mushroom polyphenoloxidase. **Food Chemistry**, v. 140, p. 289–295, 2013.
- LÓPEZ-CERVANTES, J. et al. Effect of solvents and methods of stirring in extraction of lycopene, oleoresin and fatty acids from over-ripe tomato. **International Journal of Food Science Nutrition**, v. 65, n. 2, p. 187–193, 2014.
- MACHADO, K. N. et al. A rapid simultaneous determination of methylxantines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná. **Food Chemistry**, 2018.
- MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 104, p. 1258-1268, 2007.
- MAKRIS, D. P.; BOSKOU2, D. Plant-Derived Antioxidants as Food Additives. In: **Plants as a source of natural antioxidants**. 2015. cap. 9, ISBN 9781780642666.
- MANDAL, A. P. et al. Effect of Extraction Conditions on Assam Green Tea. **International Journal of Phytomedicine**. p 225-231, 2014.
- MARQUES, L. L. M. Paullinia .cupana: a multipurpose plant – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 34, 2017
- MARTINI, D. B. C. et al. Coffee consumption and oxidative stress: a review of human intervention studies. **Molecules**. v. 21, n. 8, p. 1-21, 2016.
- MARTINS, M. et al. Evaluation of ochratoxin A and fungi in powdered guarana (*Paullinia cupana* Kunth), a caffeine rich product from Amazon forest. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 6, p. 545-550, 5 fev. 2014.
- MARX, F. Analysis of guarana seeds. II. Studies on the composition of the tannin fraction. **Z Lebensm Unters Forch**, v. 190, p. 429–431, 1990.
- MATTEI, R. et al. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal Ethnopharmacol**. v. 60, p. 111–116, 1998.
- MEDEIROS, H.; FORZZA, R. C.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. Relatives of Guaraná (*Paullinia cupana*, Sapindaceae) in Southwestern Brazilian Amazon. **The American Society of Plant Taxonomists**, v. 41, n. 1, p. 202-228, 2016.
- MENEGHETTI, G. A.; SILVA, L. de J. de S. Elements for reflection and analysis of conditions of guaraná production in Amazonas. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba - PR, v. 4, n. 1, p. 427-442, 20 dez. 2020.
- MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**. v. 63, p. 431–450, 2012.
- MONTEIRO, J. et al. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. **Molecules**. v. 21, n.8, p. 974, 2016.
- MUSA, K. H. et al. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. **Food Analytical methods**, v. 4, p. 100–107, 20 abr. 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 996, Phenol. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol>. Acesso em: 8 out. 2021.

Nazaré, R.F.R. **Processamento de guarana em pó solúvel**. Embrapa, Belém, PA, Brasil, p. 24, 1998.

NEHLIG, A. Effects of coffee/caffeine on brain health and disease: What should I tell my patients? **Practical Neurology**, p. 1-7, 2015.

NEHLIG, A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. **Pharmacological Reviews**, v. 70, p. 384-411, abr. 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 7 fev. 2016.

OREOPOULOU, A.; TSIMOGIANNIS, D.; OREOPOULOU, V. Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. In: WATSON, R.R. **Polyphenols in Plants**. Cambridge, MA, USA: Ed. Academic Press, 2019, cap. 15, p. 243–259, ISBN 978-0-12-813768-0.

OREOPOULOVA, A. et al. Hydro-alcoholic extraction kinetics of phenolics from oregano: Optimization of the extraction parameters. **Food and Bioproducts Processing**, v. 123, p. 378–389, 4 ago. 2020.

OSHI, D. R.; ADHIKARI, N. An overview on common organic solvents and their toxicity. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 28, n. 3, p. 1-18, 29 jun. 2019.

OUYANG, Q. et al. Tea polyphenols promote Fenton-like reaction: pH self-driving chelation and reduction mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 366, p. 514-522, 15 jun. 2019.

OZORIO, P. R. da S.; ATROCH, A. L.; FILHO, F. J. do N. Agro-morphological characterization and genetic diversity of *paullinia cupana* var. *Sorbilis*. **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 166-178, 4 dez. 2019.

PALMA, C et al. Guarana (*Paullinia cupana*) improves anorexia in patients with advanced cancer. **Journal of Dietary Supplements**, v. 13 n. 2, p. 221–231, 2016.

PARVEZ, S.; WANI, I. A.; MASOODI, F. A. Extraction Optimization of Green Tea Beverage (Noon Chai) for Yield, Polyphenols and Caffeine Using Response Surface Methodology. **Arabian Journal for Science and Engineering**, 2021.

PEIXOTO, H. et al. Anti-aging and antioxidant potential of *Paullinia cupana* var. *sorbilis*: findings in *Caenorhabditis elegans* indicate a new utilization for roasted. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 61, 2017.

PINELA, J. et al. Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: a nutraceutical oriented optimization study. **Separation and Purification Technology**, v. 164, p. 114–124, 2016.

POLO, S. H. O. **Estrutura e desenvolvimento de sementes de paullinia L. (Sapindaceae)**.

2006. 118 p. Tese (Mestrado em biologia vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2006

POMPORTES, L. Cognitive performance enhancement induced by caffeine, carbohydrate and guarana mouth rinsing during submaximal exercise. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 589, 2017.

PSARROU, I. et al. Extraction kinetics of phenolic antioxidants from the hydro distillation residues of *Rosemary* and effect of pretreatment and extraction parameters. **Molecules**, v. 25, p. 4520, 4 fev. 2020.

QUADRA, G. R. et al. A global trend of caffeine consumption over time and related environmental impacts. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 1-6, 2020.

QUINTIN, D. et al. Active biocompounds to improve food nutritional value. **Trends in Food Science & Technology**, v. 84, p. 19-21, 12 fev. 2019.

RANGEL, M. P.; MELLO, J. C. P. D.; AUDI, E. A. Evaluation of neurotransmitters involved in the anxiolytic and panicolytic effect of the aqueous fraction of *Paullinia cupana* (guaraná) in elevated T maze. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 358–365, 2013.

RESEARCH AND MARKETS. **Global Caffeine Market Size**: Report. 1. ed., 2020. ID 4992316.

ROCULLI, P.; GALINDO, F.G.; MENDOZA, F.; WADSÖ, L.; ROMANI, S.; ROSA, M.D.; SJOHOLM, I. Effects of the application of anti-browning substances on the metabolic activity and sugar composition of fresh-cut potatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 01, p. 151–157, 2007.

ROGGIA, I. et al. Guarana: Stability-Indicating RP-HPLC method and safety profile using microglial cells. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 94, 12 p., dez. 2021.

RUSAK, G. et al. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v. 110, p. 852–858, 17 jun. 2008.

RYBAK, M. E. et al. Urine excretion of caffeine and select caffeine metabolites is common in the US population and associated with caffeine intake. **Journal of Nutrition**, v. 145, p. 766–774, 2015.

SALIHović, M. et al. DFT study and biological activity of some methylxanthines. **Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina**, 42, p. 31-36, 2014

SALOMÃO-OLIVEIRA, A. et al. Benefits and effectiveness of using *Paullinia cupana*: a review article. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 6, n. 8, p. 497-503, 2018.

SANTANA, Á. L.; MACEDO, G. A. Effects of hydroalcoholic and enzyme-assisted extraction processes on the recovery of catechins and methylxanthines from crude and waste seeds of guarana (*Paullinia cupana*). **Food Chemistry**, p. 222-230, 30 dez. 2018a.

SANTANA, Á. L.; MACEDO, G. A. Health and technological aspects of methylxanthines and polyphenols from guarana: A review. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], p. 457–468,

25 maio 2018b.

SANTANA, A.; ZANINI, J.; MACEDO, G. Dispersion-assisted extraction of guarana processing wastes on the obtaining of polyphenols and alkaloids. **Food Process Engineering**, v. 43, n. 3, p. 13381, 2020.

SANTOS, L. P. Sistema mecanizado de processamento póscolheita de guaraná: nova tecnologia para o agronegócio e a agricultura familiar. In: KASPCHAK, M. M. W. **A Engenharia de Produção na Contemporaneidade 2**: Atena Editora, 2018. v. 1, cap. 24, p. 283-293. ISBN 978-85-85107-99-4.

SAWYNOK, J. Caffeine and pain. **International Association for the Study of Pain**, v. 152, p. 726-729, 2011.

SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONÇALVES, J. F. de C. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, 18 p., 16 ago. 2013.

SERDAR, G. et al. New approaches for effective microwave assisted extraction of caffeine and catechins from green tea. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 3, n. 1, p. 3-13, 12 ago. 2016.

SHAH, S.R. et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of the stems of *Flam-mulina velutipes* and *Hypsizygus tessellatus* (white and brown var.) extracted with different solvents. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 2018

SHAHEEN, S. et al. Extractor dimensions affect optimization of laboratory-scale batch solid-liquid extraction of polyphenols from plant material: potato peels as a case study. **Chemical Engineering Communications**, p. 1-3, 2020.

SHALMASHI, A. et al. Isolation of caffeine from tea waste using subcritical water extraction. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, p. 701-711, 30 jun. 2009.

SHIRMOHAMMAD, Y.; EFHAMISISIA, D.; PIZZI, A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 316-332, 2018.

SILVA, C. P. et al. Guarana as a source of bioactive compounds. **Journal of Food Bioactives**, v. 6, p. 1-5, 2019.

SILVA, G. S. da et al. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. **Food Research International**, v. 102, p. 700-709, 20 set. 2017

SILVA, L. A. DA. Mechanisms and biological effects of caffeine on substrate metabolism homeostasis: A systematic review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, ano 6, v. 7, p. 215-221, 13 jun. 2017.

SOUZA, E. D. S. **As práticas tradicionais e a introdução das inovações tecnológicas no cultivo do guaraná (paullinia cupana var sorbilis) junto aos produtores de maués/am.** 2016. 80 p. Dissertação (Mestrado em ciência) - Instituto de Agronomia Programa de Pós-Graduação em Educação Agrícola, Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Seropédica - RJ, 2016.

SPILLER, A. G. **Caffeine**. New York: CRC Press, 1998. ISBN 0-8493-2647-8.

SPOLADORE, D. S.; BOAVENTURA, M. A. M.; SÂES, L. A. Teor de cafeína em sementes matrizes do guaranazeiro. **VI Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo**, Campinas – SP, p.425-429, 1987.

SULAIMAN, S.F.; et al. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. **Journal of food composition and analysis**, v. 24, p. 506-515, 2011.

TAVARES, A. M. et al. **Cultura do guaranazeiro no amazonas**. 4. ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. José Clério Rezende Pereira, 2005. 21 p. ISSN 1679888

TEJ, G. N. V. C.; NAYAK, P. K. Mechanistic considerations in chemotherapeutic activity of caffeine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 312–319, 28 mai. 2021.

TEMPLE, J. L. The safety of ingested caffeine: a comprehensive review. **Journal Frontiers in Psychiatry**, 26 maio 2017. Psychopharmacology, p. 8-80.

TIWARI, B. K.; BRUNTON, N. P.; BRENNAN, C. S. **Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction**. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-1-4443-3810-2.

TOMÉ-CARNEIRO, J.; VISIOLI, F. Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1145-1174, out. 2016.

TREVISAN, M.T.S., MACEDO, F.V.V. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from plants to treat Alzheimer's disease. **Química Nova**, v. 26, p. 301–304, 2003.

TREYBAL, R. E. **Operaciones de transferencia de masa**. 2. ed. [S. l.]: McGraw Hill Education, 1981. 862 p.

TRICAUD, S.; PINTON, F.; PEREIRA, H. dos S. Saberes e práticas locais dos produtores de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis*) do médio Amazonas: duas organizações locais frente à inovação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, Belém-PA, v. 11, n. 1, 1 jan. 2016. Dossiê Dinâmicas das Agriculturas Amazônicas, p. 33-53.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

TSAO, R. et al. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2003.

TURANO, J. **Process for the manufacture of extract from dry guarana seeds**. WO2006032119A1. Depósito: 19 out. 2005. Concessão: 30 mar. 2006.

USHIROBIRA, T.M.A et al. Avaliação físico-química de sementes de guarana secas por diferentes métodos. *Revista Brasileira Farmacognosia*. v. 14, p. 15–20, 2004.

VANDEPONSEELE, A. et al. Study of Influential Parameters of the Caffeine Extraction from Spent Coffee Grounds: From Brewing Coffee Method to the Waste Treatment Conditions.

Clean Technology, v. 3, p. 335–350, 2021.

VILLANO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-235, 15 jan. 2021.

VINATOURO, M.; MASONB, T.; CALINESCUA, I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 159-178, 13 dez. 2017.

VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566-571, 2013.

WECKERLE, C.S.; STUTZ, M.A.; BAUMANN, T.W. Purine alkaloids in Paullinia. **Phytochemistry**. v. 64, p. 735–742, 2003.

WELTY, J. R. et al. **Fundamentals of momentum, heat, and mass transfer**. 5. ed. United States of America: John Wiley & Sons, 2007. 729 p. ISBN 978-0470128688.

YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**. v. 12, p. 1950–1963, 2007.

YONEKURA, L. et al. “Bioavailability of catechins from guaraná (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects”, **Food & Function**, v.7. p. 2970-2978, 2016.

ZEIDÁN-CHULIÁ, F. et al. Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and guarana) exerts cytotoxic effects on human neuronal sh-sy5y cells by decreasing reactive oxygen species production. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 22 p., 2013.

ZHU, Q. Y et al. Stability of green tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4624–4628, 1997..

ZIAEDINI, A.; JAFARI, A.; ZAKERI, A. Extraction of antioxidants and caffeine from green tea (*Camellia sinensis*) leaves: kinetics and modeling. **International Food Science and Technology**, v. 16, n. 6, p. 505, 16 dez. 2010.

ZIMMERMANN, B. F.; GLEICHENHAGEN, M. The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: How to get most out of it. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1543–1548, 7 jun. 2011.

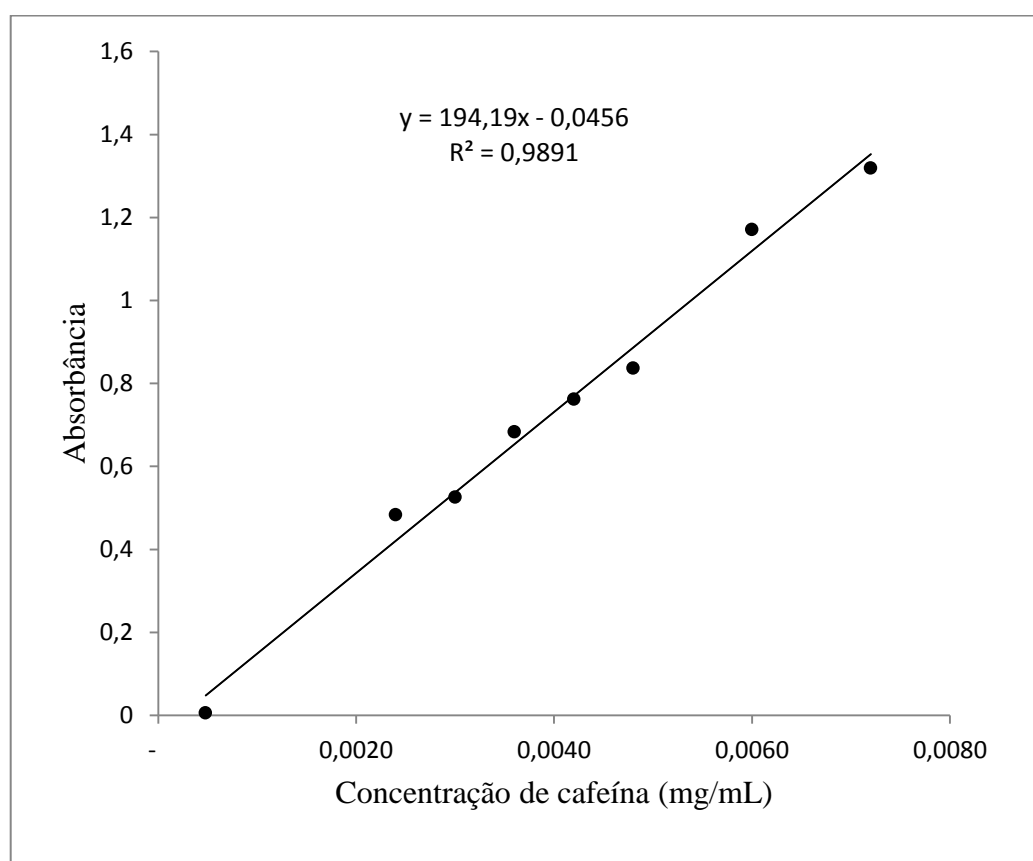
APÊNDICE A – Dados das curvas padrão das análises espectrofotométricas

Tabela A1 – Dados da curva padrão de cafeína

Solução	Cf (mg/mL)	Absorbância (AU*)
CAF1	0,0005	0,006
CAF2	0,0024	0,483
CAF3	0,0030	0,526
CAF4	0,0036	0,683
CAF5	0,0042	0,762
CAF6	0,0048	0,837
CAF7	0,0060	1,171
CAF8	0,0072	1,319

Fonte: própria (2021)

Figura A1 – Curva padrão de cafeína vs absorbância



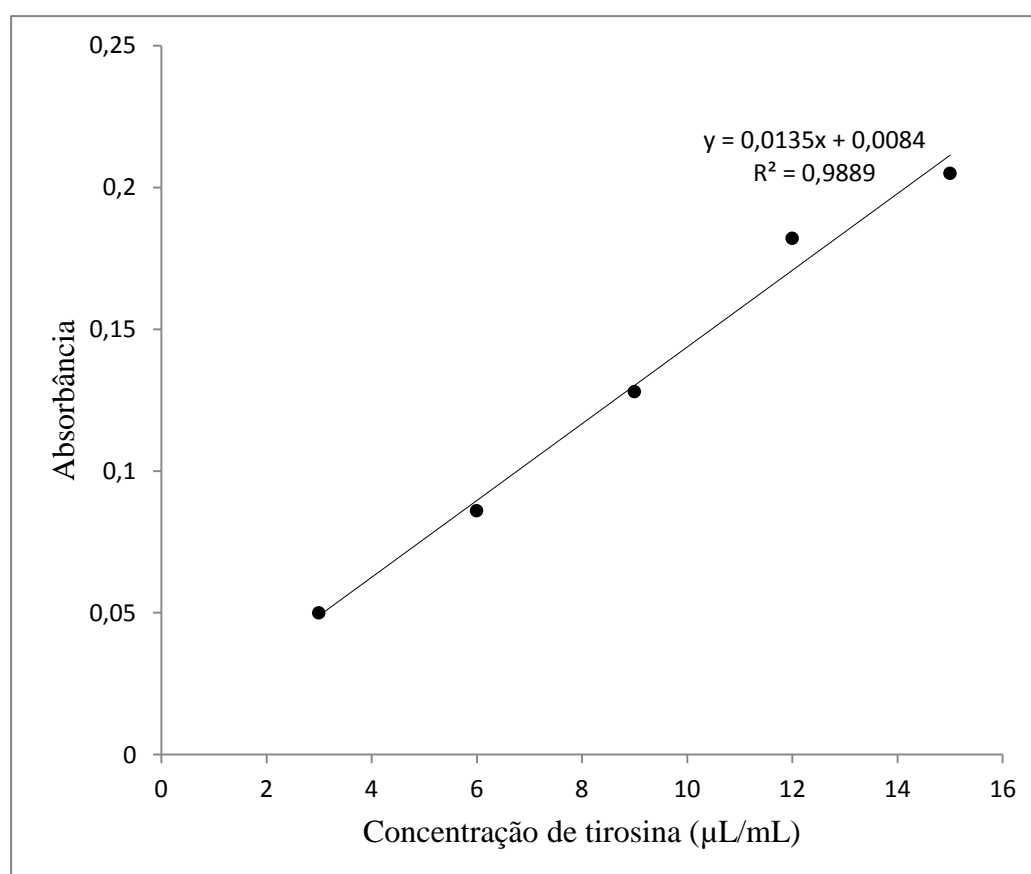
Fonte: própria (2021)

Tabela A2 – Dados da curva padrão de tirosina

Solução	Concentração TR (ug/mL)	Absorbância (AU*)			
		A1	A2	A3	Média
Branco	0	0,042	0,042	0,042	0,042
TR1	3	0,05	0,05	0,049	0,05
TR2	6	0,086	0,087	0,086	0,086
TR3	9	0,129	0,127	0,128	0,128
TR4	12	0,181	0,182	0,184	0,182
TR5	15	0,204	0,206	0,206	0,205

Fonte: Própria (2021)

Figura A2 – Curva padrão de absorbância vs tirosina



Fonte: Própria (2021)

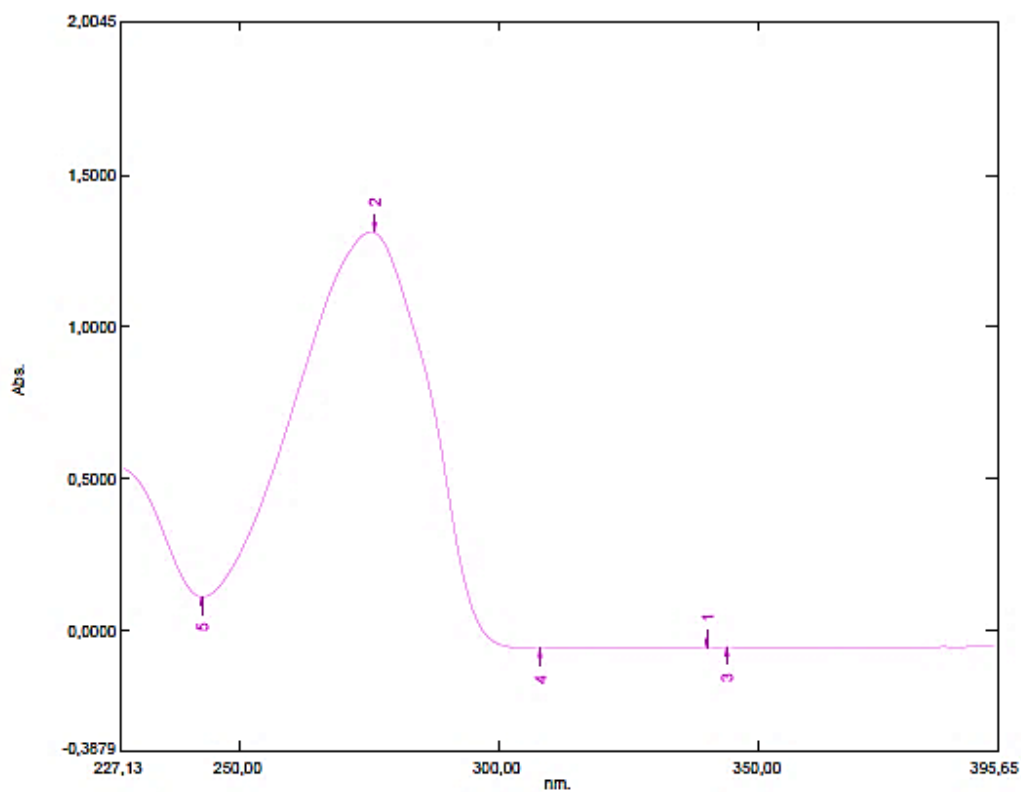
APÊNDICE B – Dados das análises espectrofotométricas das amostras

Tabela B1 – Dados de absorvância para as análises de CFT e cafeína

Amostra	Absorvância	
	Cafeína (275 nm)	CFT (660 nm)
N1	0,29	0,122
N2	0,256	0,164
N3	0,183	0,126
N4	0,229	0,152
N5	0,221	0,119
N6	0,211	0,152
N7	0,145	0,152
N8	0,398	0,187
N9	0,225	0,174
N10	0,263	0,216
N11	0,256	0,158

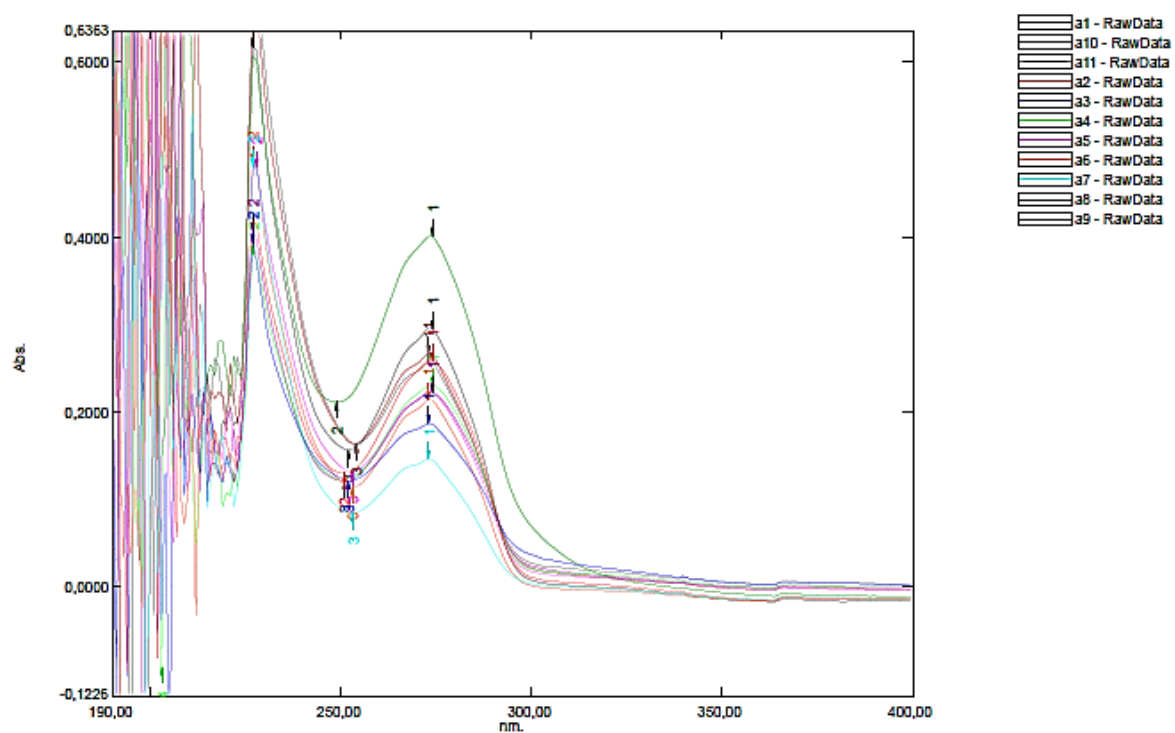
Fonte: própria (2021)

Figura B1 – Espectro de cafeína da solução padrão de diclorometano



Fonte: própria (2021)

Figura B2 – Espectro de cafeína das amostras de guaraná após extração líquido-líquido com diclorometano



Fonte: própria (2021)