UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FCF/ FEA / FSP
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada - PRONUT

PATRÍCIA BELEZA ANTUNES

**Análise comparativa das frações polpa, casca, semente
e pó comercial do guaraná (*Paullinia cupana*):
caracterização química e atividade antioxidante *in vitro***

Dissertação para a obtenção do título de
Mestre

Orientadora:
Prof^a. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

São Paulo

2011

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Antunes, Patrícia Beleza

A636a Análise comparativa das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná (*paullinia cupana*) : caracterização química e atividade antioxidante *in vitro* / Patrícia Beleza Antunes. -- São Paulo, 2011.
114p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da USP. Faculdade de Saúde Pública da USP. Curso Interunidades em Nutrição Humana Aplicada.

Orientador: Torres, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva

1. Alimento : Análise : Ciência dos alimentos 2. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos 3. Antioxidante : Nutrição I. T. II. Torres, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva, orientador.

641 CDD

PATRÍCIA BELEZA ANTUNES

**Análise comparativa das frações polpa, casca, semente
e pó comercial do guaraná (*Paullinia cupana*):
caracterização química e atividade antioxidante *in vitro***

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

(Orientadora/Presidente)

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011.

Aos meus pais, motivos da minha existência, pelo incentivo e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, pela amizade e companheirismo.

A todas as pessoas que torceram ou fizeram parte desta conquista.

AGRADECIMENTOS

São muitas as pessoas às quais gostaria de declarar minha gratidão, seja pela participação efetiva neste trabalho, seja pelo apoio ou torcida. Pessoas sem as quais não seria possível chegar até aqui...

Agradeço primeiramente aos meus pais, Sérvio e Tute, por serem meus maiores incentivadores e por sempre acreditarem na minha capacidade. Obrigada por nunca terem poupado esforços para a minha educação e dos meus irmãos. Serei sempre infinitamente grata a vocês por tudo! Vocês são o meu combustível!

Aos meus irmãos, Isabela e Pedro, amor do qual não duvido. Minha certeza de amizade eterna. Em especial à minha irmã, que sempre me apoiou a correr atrás dos meus objetivos.

À Profª Elizabeth Torres, pela oportunidade e confiança depositada em mim. Obrigada pela orientação prestada e pela compreensão e ajuda nos momentos em que eu mais precisei. O mestrado foi fundamental para o meu amadurecimento e crescimento profissional e pessoal.

À Dra. Lina Yonekura, por toda ajuda oferecida no decorrer deste trabalho. Sua colaboração foi fundamental para a execução das análises e de grande importância para o meu aprendizado. Obrigada, em especial, pela análise de CLAE. Sua participação neste trabalho foi muito importante!

Aos professores componentes da banca pela disponibilidade em participar e pelas valiosas sugestões.

Às mais do que colegas de trabalho, amigas, que levarei para o resto da vida: Marcela Monteiro, Yara Queiroz, Marina Souza, Julianna Shibao e Thaíse Mendes. Vocês foram essenciais no meu dia a dia. Conhecer vocês já fez com que meu mestrado valesse à pena! Obrigada pela ajuda no laboratório e por todos os momentos de desabafos e, principalmente, de descontração e amizade!

À amiga Yara Queiroz, por ter me ajudado a dar os primeiros passos dentro do laboratório. Obrigada pela confiança e pelos ensinamentos!

À amiga Julianna Shibao, por ter me apresentado ao mestrado. Você foi fundamental nessa conquista!

Às amigas Luíla Andrade e Karen Pacheco, meus orgulhos, por todos os momentos de angústia e alegria compartilhados. Vocês são pessoas muito especiais que estarão sempre no meu coração e pensamento...

À Luciana C. Brigatto Fontes, pela participação no projeto com as análises de DCCR e, principalmente, pela amizade que, embora tenha surgido no final deste trabalho, foi e será sempre muito importante.

À colega de laboratório Carolina Martins, por ter dado início, junto com a Prof^a Beth Torres, ao grupo de pesquisa “guaraná” e por ter incentivado a minha participação e contribuição para o enriquecimento do mesmo.

À Fernanda P. Akaishi, pelo auxílio na análise de fitosteróis e manipulação do CG.

À Rosana Manólio, a quem sempre recorri quando me surgiam as dúvidas de química. Profissional exemplar! Obrigada pela paciência e pela gentileza em me receber, muitas vezes, em “seu” laboratório, sempre alegre e disposta a ajudar.

À Dra. Tatiana Saldanha e Dr. Silvio Vicente, por todo o apoio, incentivo e contribuição para a execução deste trabalho. Vocês foram fundamentais para o “ponta pé” inicial.

A Daniel T. Lebre e Renato L. Romano do Centro de Espectrometria de Massas Aplicada (CEMSA) pelas análises de MS para confirmar a identidade das catequinas.

À minha irmã de alma, Bruna Abreu, por todos os anos de amizade e por sempre me fazer acreditar que tudo daria certo. Obrigada por estar sempre presente e por ser a melhor amiga que uma pessoa pode ter!

Às amigas Giovanna Canelli, Fabiana Freitas, Bruna Abreu, Alessandra Arce e Thalita Oliveira, pelos tantos momentos bons que passamos juntas. Estar com vocês é sinônimo de felicidade!

À Larissa de Pinho, amiga mais que especial. Obrigada por todo carinho e por fazer parte da minha vida, mesmo que, muitas vezes, distante fisicamente.

À família Michellena, por ser minha segunda família e me receber sempre com tanto carinho. Em especial à Vó Júlia, *in memoriam*, por ter sido como uma avó para mim e por me tratar sempre como sua neta.

A todos os colegas de laboratório, pelos momentos agradáveis compartilhados.

À Dra. Geni Sampaio, pelo suporte no laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Guaranapis, pela doação das amostras de guaraná, sem as quais não teria sido possível desenvolver este trabalho.

À Comissão do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada (PRONUT).

À Susi Richter Lapa, pela confiança em oferecer o meu primeiro emprego, pela compreensão nos momentos em que precisei me dedicar ao mestrado, por sua paciência e generosidade em dividir tamanha experiência e, acima de tudo, pela amizade.

Aos amigos da Legali, Adriana Simões, Maria Carolina Lapa e Caio Lapa, por terem me acolhido com tanto carinho, por toda generosidade e ajuda, e por fazerem do trabalho um ambiente tão agradável.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, acreditaram em mim e me incentivam a correr atrás dos meus sonhos.

“Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo”.

Vinícius de Moraes.

RESUMO

ANTUNES PB. Análise comparativa das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná (*Paullinia cupana*): caracterização química e atividade antioxidante *in vitro* [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública/ Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011.

O oxigênio, em determinadas condições, pode promover efeitos prejudiciais à saúde, pois pode produzir moléculas reativas e radicais livres. Como mecanismo de proteção, os organismos desenvolveram sistemas defensivos que, quando em desequilíbrio, podem desencadear o estresse oxidativo. Estudos têm indicado que antioxidantes naturais presentes em alguns alimentos são capazes de auxiliar na contenção deste processo. Os compostos fenólicos, presentes em várias plantas, têm despertado a atenção dos pesquisadores devido à atividade antioxidante. O guaraná (*Paullinia cupana*), planta originária da Amazônia, contém altas concentrações de substâncias bioativas. No entanto, a literatura científica ainda é escassa em relação à semente e praticamente inexistente em relação à casca e polpa no que diz respeito à caracterização química do guaraná, bem como sua atividade antioxidante. Desta forma, o presente projeto pretendeu determinar as principais substâncias bioativas e a atividade antioxidante nestas três frações do guaraná e do guaraná processado, visando ampliar o conhecimento acerca deste alimento e verificar possível utilização de partes hoje descartadas. Inicialmente, foi otimizado um método de extração de compostos fenólicos do guaraná em pó empregando-se diferentes etapas, incluindo solventes e suas concentrações, método de homogeneização, tempo e número de extrações, e os resultados baseados no teor de compostos fenólicos totais. O teor de CF totais foi analisado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Em seguida, foi desenvolvido um delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizando 2 variáveis independentes ($2^2 = 4$ ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios), sendo cada variável avaliada em 5 níveis diferentes. Neste caso, além do teor de CF totais, avaliou-se também o teor de proantocianidinas (PA) totais por hidrólise ácida (butanol-HCl). Após esta padronização, as amostras foram submetidas à análise de composição centesimal, quantificação dos compostos fenólicos e proantocianidinas totais (extraíveis e não extraíveis), carotenóides totais por método espectrofotométrico, avaliação do perfil dos principais fenólicos e metilxantinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e fitosteróis por Cromatografia Gasosa, e análise da atividade antioxidante *in vitro*

pelos métodos de Teste da capacidade de absorvência de oxigênio radical (ORAC) e Ensaio radical 1,1-difenil-2-2picrilhidrazil (DPPH). O método de extração mais eficiente foi o que consistiu em: agitação magnética por 1 h com metanol 30%, centrifugação, re-extrações com metanol 30% seguidas de pelo menos uma etapa de extração com acetona 70%, perfazendo um total de 4 extrações da mesma amostra. O modelo de extração de CF totais apresentou regressão não significativa. O modelo de extração de PA totais apresentou regressão significativa e R^2 de 96%, indicando que para atingir uma extração acima de 80% de PA totais a porcentagem de água deve ser inferior a 20% e a proporção dos solventes acetona/metanol não interferiu na extração desses compostos. As frações polpa, casca e semente do guaraná e o guaraná em pó comercial apresentaram, em média, 2, 14, 51 e 129 mg EAG/ g amostra e 0, 3, 2 e 4 mg EAG/ g de amostra de fenólicos extraíveis e não extraíveis, respectivamente. Os teores de proantocianidinas extraíveis e não extraíveis das frações foram 6, 15, 28 e 46 mg de PA em EqCI/ g de amostra e 0, 3, 2 e 4 mg de PA em EqCI/ g de amostra, respectivamente. Os compostos bioativos encontrados nas amostras foram catequina, epicatequina, PA B1, PA B2, cafeína e teobromina nas seguintes concentrações: 30,05; 20,23; 3,72; 3,37; 39,82 e 0,14 mg/g de pó comercial, respectivamente; 6,63; 0,26; 0,17; 0,06; 35,63 e 0,25 mg/g de semente, respectivamente; e 0,07; 0,01; 0,03; 0,03; 0,02 e 1,17 mg/g de casca, respectivamente. Não foram encontrados CF na polpa. A casca apresentou maior conteúdo de teobromina e nenhuma das amostras apresentou teofilina. Os carotenóides só foram encontrados na casca (34 $\mu\text{g/g}$). Os fitosteróis encontrados nas amostras foram o brassicasterol, campesterol, stigmasterol e β -sitosterol nas seguintes concentrações: 0; 8,01; 6,45 e 40,45 $\mu\text{g/g}$ de polpa, respectivamente; 225,79; 1110,34; 126,41 e 830,49 $\mu\text{g/g}$ de casca, 4,19; 7,94; 9,86 e 98,59 $\mu\text{g/g}$ de semente; e 5,85; 23,90; 11,92 e 151,33 $\mu\text{g/g}$ de pó comercial, respectivamente. A atividade antioxidante dos extratos de fenólicos extraíveis pelo método ORAC foi de 258, 1007, 948 e 2693 $\mu\text{M ET/g}$ de polpa, casca, semente e pó, respectivamente. Por DPPH foi possível avaliar a fração extraível e a não extraível das amostras, sendo necessários 119, 67 e 24 g de casca, semente e pó de guaraná para inibir 1g de DPPH, e 475, 347 e 249 g de casca, semente e pó de guaraná para inibir 1g de DPPH, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que o guaraná é uma boa fonte de compostos bioativos, oferecendo possível atividade antioxidante *in vitro*.

Descritores: Guaraná (*Paullinia cupana*). Atividade antioxidante. Compostos fenólicos. Extração. Substâncias bioativas.

ABSTRACT

ANTUNES PB. Comparative analysis of the fractions pulp, peel, seed and commercial powder of guarana (*Paullinia cupana*): chemical characterization and *in vitro* antioxidant activity [MSc Dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública/ Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011.

The oxygen, in certain circumstances, can promote adverse health effects due to its capacity to produce reactive molecules and free radicals. As a protective mechanism, organisms have developed defensive systems that, when unbalanced, can initiate oxidative stress. Studies have shown that natural antioxidants present in some foods are capable of assisting in the contention of this process. Phenolic compounds present in various plants, have attracted researchers attention due to their antioxidant activity. Guarana (*Paullinia cupana*), an Amazon plant, contains high concentrations of bioactive substances. However, the scientific literature is scarce in relation to guarana seed and practically nonexistent in relation to peel and pulp regarding chemical characterization, as well as their antioxidant activity. Thus, this project aimed to determine the main bioactive compounds and antioxidant activity in these three fractions of guarana and guarana processed in order to enhance our understanding of this food and verify the possible use of the by-product generated from the guarana powder production. Initially, was optimized a method of phenolic compounds extraction of guarana powder using different steps, including solvents and their concentration, homogenization method, time and number of extractions, and the results based on content of total phenolic compounds. The total CF content was analyzed using Folin-Ciocalteu reagent. Then, a central composite rotational design (DCCR) was developed using two independent variables ($2^2 = 4 + 4$ trials axial points + 3 center points, totalizing 11 trials), being each variable evaluated at 5 different levels. In this case, besides the total of CF content, was also evaluated the content of total proanthocyanidins (PA) by acid hydrolysis (HCl-butanol). After this standardization, samples were submitted to analysis of chemical composition, quantification of total phenolics and proanthocyanidins (extractable and non extractable), total carotenoid content by spectrophotometric method, evaluation of major phenolic profile and methyxanthines by High Performance Liquid Chromatography and phytosterols by Gas Chromatography, and analysis of *in vitro* antioxidant activity by the methods of the ability of oxygen radical absorbance test (ORAC) and radical 1,1-diphenyl-2-2picrilhidrazil (DPPH). The most efficient extraction

method was consisting of: magnetic stirring for 1 hour with 30% methanol, centrifugation, re-extracted with methanol 30% followed by at least one extraction step with acetone 70%, making a total of 4 extractions. The extraction model of total CF showed no significant regression. The extraction model of total PA showed significant regression and R^2 of 96%, indicating that to achieve an extraction above 80% of total PA the percentage of water should be less than 20% and the proportion of acetone/methanol did not interfere in the extraction these compounds. The fractions pulp, peel and seeds of guarana and commercial guarana powder showed, on average, 2, 14, 51 and 129 mg EAG/g sample, 0, 3, 2 and 4 mg EAG/g sample extractable and non extractable phenolics, respectively. The fractions contents of extracted and non-extractable proanthocyanidins were 6, 15, 28 and 46 mg of PA in EqCI/g sample and 0, 3, 2 and 4 mg of PA in EqCI/g sample, respectively. The bioactive compounds found in the samples were catechin, epicatechin, PA B1, PA B2, caffeine and theobromine in the following concentrations: 30.05, 20.23, 3.72, 3.37, 39.82 and 0.14 mg/g commercial powder, respectively, 6.63, 0.26, 0.17, 0.06, 35.63 and 0.25 mg/g seed, respectively, and 0.07, 0.01, 0.03; 0.03, 0.02 and 1.17 mg/g of peel, respectively. These CF were not found in the pulp. The peel had a higher content of theobromine and none of the samples showed theophylline. Carotenoids were found only in the peel (34 $\mu\text{g/g}$). The phytosterols found in the samples were brassicasterol, campesterol, stigmasterol and β -sitosterol in the following concentrations: 0, 8.01, 6.45 and 40.45 mg/g pulp, respectively, 225.79, 1110.34, 126.41 and 830.49 mg/g of peel, 4.19, 7.94, 9.86 and 98.59 mg/g of seed, and 5.85, 23.90, 11.92 and 151.33 mg/g of commercial powder, respectively. The antioxidant activity of extractable samples by the ORAC method was 258, 1007, 2693 and 948 mM ET/ g pulp, peel, seed and powder, respectively. For DPPH was possible to evaluate the extractable and non extractable fraction of the samples, which required 119, 67 and 24 g of peel, seed and guarana powder to inhibit 1g of DPPH and 475, 347 and 249 g of peel, seed and powder 1g guarana to inhibit DPPH, respectively. The results suggest that guarana is a good source of bioactive compounds, offering possible *in vitro* antioxidant activity.

Keywords: Guarana (*Paullinia cupana*). Antioxidant activity. Phenolic compounds. Extraction. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura química dos flavonóides	28
Figura 1.2	Estrutura química das catequinas	29
Figura 1.3	Estrutura química de um flavan-3-ól na forma monomérica (a) e a condensação de duas moléculas de flavan-3-óis formando uma proantocianidina (b)	30
Figura 1.4	Estrutura química das metilxantinas	31
Figura 1.5	Estrutura química dos fitosteróis	32
Figura 1.6	Estrutura química de alguns carotenóides	33
Figura 1.7	Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) var. <i>sorbilis</i>	34
Figura 1.8	Guaraná em rama, em bastão, em pó e xarope	35
Figura 2.1	Guaraná em pó comercial	48
Figura 2.2	Curva de contorno do teor de proantocianidinas totais em função do solvente e sua concentração	59
Figura 3.1	Guaraná <i>in natura</i> fornecido pela empresa Guaranápis	69
Figura 3.2	Guaraná após separação manual e embalagem a vácuo. Onde: (A) Casca <i>in natura</i> ; (B) Polpa + semente <i>in natura</i> ; (C) Casca embalada a vácuo; (D) Semente, sem a polpa, embalada a vácuo; e (E) Polpa embalada a vácuo	70
Figura 3.3	Guaraná após porcionamento e embalagem a vácuo e após trituração. Sendo: (A) Casca porcionada e embalada a vácuo; (B) Semente porcionada e embalada a vácuo; (C) Polpa porcionada e embalada a vácuo; (D) Semente, Casca e polpa; (E) Semente triturada; e (F) Casca triturada	71
Figura 3.4	Cromatograma do guaraná em pó.	83
Figura 3.5	Cromatograma da varredura de compostos do guaraná em pó.	84
Figura 3.6	Cromatogramas das transições de ions no guaraná em pó, sendo: (A) 577/289 a.m.u.; (B) 289/245 a.m.u.; e (C) 577/407 a.m.u.	84
Figura 3.7	Cromatogramas e espectros, sendo (A) espectro da fragmentação da catequina (TR: 34,07 min); e (B) espectro da fragmentação da epicatequina (TR: 54,11 min).	85
Figura 3.8	Cromatogramas, sendo (A) guaraná em pó; e (B) semente <i>in natura</i> .	87

Figura 3.9	Espectro dos carotenóides totais da casca do guaraná.	88
Figura 3.10	Espectro dos seguintes carotenóides: licopeno, γ -caroteno, β -caroteno e α -caroteno em éter de petróleo.	89
Figura 3.11	Cromatogramas de fitosteróis do guaraná: (A) Polpa, (B) Casca, (C) Semente e (D) Pó comercial.	92
Figura 3.12	Curvas típicas do teste de capacidade antioxidante por ORAC.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Níveis das variáveis independentes no planejamento experimental do processo de extração de compostos fenólicos totais	49
Tabela 2.2	Eficiência de extração de compostos fenólicos totais do guaraná em pó, apresentados como teores médios e desvio padrão, empregando-se diferentes métodos e solventes de extração	52
Tabela 2.3	Eficiência de extração de compostos fenólicos totais do guaraná em pó, apresentados como teores médios e desvio padrão, empregando-se diferentes concentrações do solvente de extração, seguido de re-extração com acetona 70%	53
Tabela 2.4	Eficiência de extração de compostos fenólicos totais do guaraná em pó, apresentados como teores médios e desvio padrão, empregando-se diferentes concentrações do solvente de extração	53
Tabela 2.5	Influência do método e tempo de extração no teor de compostos fenólicos totais do guaraná em pó, apresentados como teores médios e desvio padrão	54
Tabela 2.6	Influência do número de extrações no conteúdo de compostos fenólicos totais do guaraná em pó, apresentados como teores médios e desvio padrão	55
Tabela 2.7	Delineamento experimental para o teor de compostos fenólicos totais e proantocianidinas em função do solvente de extração e sua concentração	56
Tabela 2.8	Efeito das variáveis independentes sobre o teor de compostos fenólicos totais do guaraná	56
Tabela 2.9	Significância da regressão e do resíduo ao nível de 95% de confiança dos efeitos dos parâmetros significativos do processo de extração de CF totais.	57
Tabela 2.10	Efeitos das variáveis independentes sobre o teor de proantocianidinas totais do guaraná.	58
Tabela 2.11	Significância da regressão e do resíduo ao nível de 95% de confiança dos efeitos dos parâmetros significativos do processo de extração de PA totais.	58

Tabela 3.1	Composição centesimal das frações casca, polpa e semente do guaraná fruto e do guaraná em pó comercial em % de base úmida (e base seca).	81
Tabela 3.2	Teores de compostos fenólicos totais extraíveis e não-extraíveis do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial) em base úmida (e base seca).	82
Tabela 3.3	Teores médios e desvio padrão de proantocianidinas totais extraíveis e não extraíveis do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial) em base úmida (e base seca).	83
Tabela 3.4	Teores médios e desvio padrão de compostos fenólicos do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial) em base úmida (e base seca).	86
Tabela 3.5	Teores médios e desvio padrão de metilxantinas do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial) em base úmida (e base seca).	87
Tabela 3.6	Teores dos principais fitosteróis do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial), em base úmida (e seca).	90
Tabela 3.7	Atividade antioxidante das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná pelos métodos ORAC e DPPH.	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1	Potenciais de detecção dos canais.	75
Quadro 3.2	Gradiente de concentração da fase móvel B.	75
Quadro 3.3	Teor de catequinas em alimentos por porção.	98

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVOS.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA - GUARANÁ (*Paullinia cupana*): CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E INFLUÊNCIA NA PROMOÇÃO DA SAÚDE 26

1.1. Alimentação x Saúde Pública.....	26
1.2. Radicais livres e estresse oxidativo	27
1.3. Substâncias com atividade antioxidante	27
1.4. Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>)	33
1.4.1. Importância econômica.....	35
1.4.2. Subprodutos do guaraná	36
1.4.3. Guaraná x saúde.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DO GUARANA (*Paullinia cupana*)..... 44

RESUMO	44
2.1. Introdução.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	46
2.3. Material e Métodos.....	47
2.3.1. Material.....	47
2.3.2. Métodos	47
2.3.2.1. Preparo das amostras	47
2.3.2.2. Determinação do processo de extração de compostos fenólicos totais	48
2.3.2.3. Planejamento experimental para otimização do solvente utilizado no processo de extração de compostos fenólicos e proantocianidinas totais	49
2.3.2.4. Quantificação de compostos fenólicos totais.....	50
2.3.2.5. Quantificação de proantocianidinas totais.....	50
2.3.3. Análise estatística	51

2.4. Resultados.....	51
2.4.1. Método de extração	51
2.4.2. Planejamento experimental para otimização do solvente utilizado no processo de extração de compostos fenólicos e proantocianidinas totais	55
2.5. Discussão	59
2.6. Conclusões parciais	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

CAPÍTULO 3: GUARANÁ (*Paullinia cupana*): FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

RESUMO	66
3.1. Introdução.....	67
3.2. Objetivos específicos.....	68
3.3. Material e Métodos.....	69
3.3.1. Material.....	69
3.3.2. Métodos	69
3.3.2.1. Preparo das amostras	69
3.3.2.2. Composição nutricional.....	71
3.3.2.3. Método de extração de compostos fenólicos totais (extraíveis e não extraíveis)	73
3.3.2.4. Quantificação de fenólicos totais (extraíveis e não extraíveis)	74
3.3.2.5. Quantificação de proantocianidinas totais (extraíveis e não extraíveis)....	74
3.3.2.6. Determinação dos principais compostos fenólicos e metilxantinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	74
3.3.2.7. Determinação de carotenóides totais	76
3.3.2.8. Determinação de fitoesteróis	77
3.3.2.9. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	78
3.3.2.9.1. Teste da capacidade de absorbância de oxigênio radical (ORAC).....	78
3.3.2.9.2. Ensaio radical 1,1-difenil-2-2picrilhidrazil (DPPH)	79
3.3.3. Análise estatística	80
3.4. Resultados.....	80
3.4.1. Composição nutricional.....	80
3.4.2. Compostos fenólicos (extraíveis e não extraíveis)	82
3.4.3. Carotenóides totais	88

3.4.4. Fitosteróis	89
3.4.5. Capacidade antioxidante.....	92
3.5. Discussão	94
3.5.1. Composição centesimal	94
3.5.2. Compostos fenólicos totais.....	95
3.5.3. Proantocianidinas totais.....	96
3.5.4. Principais compostos fenólicos e metilxantinas	97
3.5.5. Carotenóides totais	99
3.5.6. Fitosteróis	100
3.5.7. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	100
3.6. Conclusões parciais	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
ANEXO A	108
ANEXO B	113
ANEXO C	114

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, a urbanização, a industrialização e a globalização exerceram grande influência sobre o estilo de vida e dieta da população brasileira, caracterizada pelo aumento do consumo de alimentos com altos teores de carboidratos simples, sal e/ou lipídios, associado ao baixo consumo de frutas, verduras e legumes (Mondini & Monteiro, 1994; Monteiro et al., 2000; Carvalho et al., 2006). Em paralelo, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) passaram a liderar as causas de óbito a nível mundial. Em 2001, o grupo das DCNT respondia por cerca de 46% das doenças e 60% da mortalidade ocorrida em todo o mundo (WHO, 2003). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2003), estima-se que haja um aumento de 57% da ocorrência dessas doenças até o ano de 2020. Diante do exposto acima, a mudança nos hábitos alimentares, chamada de transição nutricional (Lajolo, 2002), foi associada diretamente à transição epidemiológica registrada recentemente (WHO, 2003). Sendo assim, pesquisadores passaram a investir seus esforços em investigar a importância da alimentação na manutenção da saúde e diminuição do risco de doenças.

Os inúmeros estudos epidemiológicos desenvolvidos confirmam a relação entre dietas ricas em frutas, verduras e legumes e a redução da incidência de doenças cardiovasculares, cânceres e outras DCNT (Margetts & Buttriss, 2003; WHO, 2003; Lock et al., 2005). Além dos nutrientes, os alimentos de origem vegetal apresentam compostos bioativos, constituintes extra-nutricionais que ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos, que exercem efeito benéfico aos organismos por possuírem potente capacidade antioxidante (Crozier et al., 2006; Lima, 2008; Machado & Simões, 2008). Basicamente, classificam-se como antioxidantes compostos que retardam ou impedem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares, protegendo os sistemas biológicos dos efeitos prejudiciais desses processos (Shahidi & Naczk, 2004). Antioxidantes sintéticos também podem estar presentes em alimentos industrializados quando adicionados intencionalmente. Entretanto, estes possuem apenas o objetivo de evitar sua deterioração e manter seu valor nutricional, evitando a oxidação lipídica, e não de proporcionar benefícios à saúde (Shahidi & Naczk, 2004).

Com a emergência de estudos científicos acerca das propriedades benéficas dos vegetais e o apelo dos profissionais da saúde e da mídia pelo estímulo à alimentação saudável, registrou-se, recentemente, uma crescente procura por parte do consumidor por alimentos seguros e

saudáveis. A preocupação com a saúde, bem como o envelhecimento com qualidade de vida, favorece o crescimento de aproximadamente 10% ao ano do mercado de alimentos com alegação de funcionalidade, tornando-se um campo fértil para pesquisas e oportunidades comerciais (Gouveia, 2006). Assim, a importância da pesquisa acerca de antioxidantes naturais tem crescido substancialmente nos últimos anos, considerando-se o aumento constante da produção de alimentos industrializados visando atender às necessidades da população moderna (Gouveia, 2006; Roesler et al., 2007).

Décadas atrás, o guaraná, amplamente conhecido e utilizado pela população indígena (Herman, 1982), passou a ser visto como uma nova bebida fonte de compostos com atividade antioxidante, como o chá e o café (Hernman, 1982), alimentos com conhecidas propriedades funcionais (Souza, 2009; Vicente, 2009). Pesquisas recentes apontam que o guaraná (*Paullinia cupana*), conhecido pelo seu alto teor de cafeína (responsável por proporcionar o estímulo ao sistema nervoso central), possui em sua composição compostos com possível atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* (Carlson & Thompson, 1998; Basile et al., 2005; Majhenic et al., 2007; Ushirobira et al., 2007).

Basile et al. (2005) e Majhenic et al. (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos de semente de guaraná e encontraram considerável atividade antioxidante, bem como alto teor de compostos fenólicos totais. Ushirobira et al. (2007) observaram atividade antibacteriana e identificaram alguns compostos bioativos (cafeína, catequina, epicatequina e procianidinas) em extratos da semente de guaraná. Entretanto, ainda são poucas as informações relativas às propriedades antioxidantes do guaraná quando comparadas ao elevado número de trabalhos publicados envolvendo outras bebidas estimulantes, como os próprios chá e café, citados acima. A tal fato associa-se também a ausência de estudos acerca do guaraná *in natura*, principalmente das frações casca e polpa.

Em suma, embora existam estudos relacionados ao efeito estimulante e energético do guaraná (*Paullinia cupana*), a literatura científica ainda encontra-se escassa em relação a pesquisas voltadas à sua atividade antioxidante e substâncias bioativas, principalmente no que tange o guaraná *in natura*. A identificação dos compostos bioativos presentes no guaraná poderão esclarecer sua contribuição para a atividade antioxidante *in vitro*.

OBJETIVOS

Determinar as principais substâncias bioativas das frações casca, polpa e semente do guaraná (*Paullinia cupana*) e do pó comercial, bem como sua atividade antioxidante *in vitro*.

Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar a composição centesimal das frações casca, polpa e semente do guaraná, bem como do guaraná em pó comercial;
- b) Otimizar um método de extração de compostos fenólicos do guaraná;
- c) Determinar o teor de compostos fenólicos totais (extraíveis e não-extraíveis);
- d) Determinar o teor de proantocianidinas totais (extraíveis e não-extraíveis);
- e) Quantificar os principais compostos fenólicos;
- f) Quantificar as metilxantinas;
- g) Determinar o teor de carotenóides totais;
- h) Quantificar os principais fitoesteróis;
- i) Avaliar a capacidade antioxidante total das amostras utilizando testes *in vitro*;

Este trabalho foi dividido em capítulos, sendo que o capítulo 1 contempla a revisão de literatura, reunindo os trabalhos mais recentes e relevantes acerca de compostos bioativos e guaraná. O capítulo 2 aborda a otimização do processo de extração de compostos fenólicos do guaraná e o capítulo 3 apresenta a caracterização química e atividade antioxidante *in vitro* do guaraná em pó, bem como da semente, polpa e casca do fruto *in natura*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Basile A, Ferrara L, Del Pezzo M, Meled G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol** 2005; 102: 32–36.
- Carlson M, Thompson RD. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guarana. **J. AOAC Int.** 1998; 81: 691-701.
- Carvalho PGB, Machado CMM, Moretti CL, Fonseca MEN. Hortaliças como alimentos funcionais. **Hortic Bras** 2006; 24: 397-404.
- Crozier A, Yokota T, Jaganath IB, Marks SC, Saltmarsh M, Clifford MN. 2006. Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant-based dietary components. In: Crozier A, Ashihara H, Clifford MN, Eds. **Plant Secondary Metabolites and the Human Diet** 2006; 208-302. Oxford: Blackwell Publishing, PP.
- Gouveia F. Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. **Inovação Uniemp** 2006; 2(5): 32-37.
- Henman AR. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. . **J Ethnopharmacol** 1982; 6: 311-338.
- Lajolo FM. Functional foods: Latin American perspectives. **Brit J Nutr** 2002; 88: 45-150.
- Lima A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** [Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]. São Paulo, 2008.
- Lock K, Pomerleau UJ, Causer L, Altmann DR, McKee M. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. **B World Health Organ** 2005; 83 (2): 100-8.
- Machado FMS, Simões AN. Análise custo-efetividade e índice de qualidade da refeição aplicados à Estratégia Global da OMS. **Rev Saúde Publ** 2008; 42 (1): 64-72.
- Majhenic L, Kerget MS, Knez ZE. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extract. **Food Chem** 2007; 104: 1258-68.
- Margetts B, Buttriss J. Epidemiology linking consumption of plant foods and their constituents with health. In **Plants: Diet and Health**. Goldberg G, Ed. Blackwell

- Publishing: Oxford, U.K., 2003: 49-64.
- Mondini L, Monteiro CA. Mudanças no padrão de alimentação na população urbana brasileira (1962-1988). **Rev Saude Publ** 1994; 28 (6): 433-439.
- Monteiro CA, Mondini L, Costa RBL. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). **Rev. Saude Publ** 2000; 34 (3): 251-8.
- Nacz M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr A** 2004; 1054 (1/2): 95-111.
- Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciencia Tecnol Alime** 2007; 27(1): 53-60.
- Souza MFF. **Chá mate (*Ilex paraguariensis*): compostos bioativos e relação com atividade biológica**. [Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Saúde Pública da USP]. São Paulo, 2009.
- Ushirobira TMA, Yamaguti E, Uemura LM, Audi EA, Mello JCP de. Avaliação físico-química de sementes de guaraná secas por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 2004; 14(1): 15-20.
- Vicente SJV. **Caracterização antioxidante do café (*Coffea arabica*, L.) e efeitos da sua administração oral em ratos**. [Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Saúde Pública da USP]. São Paulo, 2009.
- World Health Organization .WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint Expert Consultation. Geneva; 2003. (WHO - Technical Report Series, 916).

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

GUARANÁ (*Paullinia cupana*): CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E INFLUÊNCIA NA PROMOÇÃO DA SAÚDE

1.1. Alimentação x Saúde Pública

A alimentação é tida como fator determinante para a promoção e manutenção da saúde. Registros epidemiológicos apontam associação inversamente proporcional entre a ingestão de alimentos de origem vegetal, como frutas, verduras e legumes, e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (WHO, 2003; Lock et al., 2005). Tal fato revela a necessidade de adoção de medidas preventivas como promoção de práticas alimentares saudáveis concomitantemente à prática de atividade física (WHO, 2003).

A obesidade mantém-se no pico da curva epidêmica com mínimos sinais de alteração (Brownell & Horgen, 2003). Existe uma série de fatores favoráveis ao desencadeamento das doenças crônicas como a redução de caminhadas e exercícios físicos decorrentes da urbanização, produção de maiores porções de lanches e refeições não permitindo ao consumidor a escolha por uma quantidade menor, produção e consumo cada vez maior de alimentos com altos teores de açúcares e gorduras, comercialização desses alimentos com alta densidade calórica com menor preço, maior disponibilidade e de elevada praticidade de consumo, propagandas apelativas para crianças, entre outros (Brownell & Horgen, 2003). Como estratégia para inverter essa situação, as autoridades, baseadas em pesquisas epidemiológicas, estão continuamente providenciando recomendações para que as pessoas aumentem o consumo de frutas, verduras e legumes como medida preventiva para reduzir os riscos de diversas doenças crônicas. Surge então um novo conceito para os alimentos promotores da saúde, os chamados alimentos funcionais, cuja principal característica é possuir em sua composição compostos não nutrientes que protegem os indivíduos contra as agressões genéticas e do meio ambiente (Angelis, 2001).

1.2. Radicais livres e estresse oxidativo

Contraditoriamente, o oxigênio, integrante essencial da cadeia respiratória, em determinadas circunstâncias pode ocasionar efeitos prejudiciais à saúde, pois é o principal produtor de radicais livres (Leite & Sarni, 2003). O termo radical livre refere-se a espécies altamente reativas que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. A presença de elétrons desemparelhados é responsável por aumentar a sua reatividade química por tenderem a emparelhar este elétron com outro presente em molécula próxima, comportando-se como agentes oxidantes (Halliwell, 1992).

Para se proteger da produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante que visam regular a geração destas espécies, neutralizá-las após sua produção para limitar os níveis intracelulares e minimizar a ocorrência de danos (Sies, 1993; Sies, 2000). Sob condições em que a formação de radicais livres é superior à ação do sistema protetor, há um desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies reativas no organismo, caracterizando o estresse oxidativo, freqüentemente acompanhado por danos e morte celular (Sies, 2000). Desta forma, o somatório das reações oxidativas pode levar a diversos danos celulares, desencadeando alterações progressivas em proteínas, lipídios, açúcares e DNA, reduzindo a capacidade funcional e aumentando os riscos de doenças (Berr, 1998; Finkel & Holbrook, 2000).

1.3. Substâncias com atividade antioxidante

No ambiente natural, as plantas precisam lidar com uma série de fatores desfavoráveis ao seu desenvolvimento, como condições climáticas e patógenos. Portanto, como estratégia para sua defesa, estas possuem a habilidade de sintetizar substâncias com características antioxidantes (Iriti & Faoro, 2006). Estas são metabólitos secundários das plantas capazes de prevenir e neutralizar a formação de radicais livres em função de suas propriedades redutoras e estrutura química, agindo também na quelação de metais de transição, características responsáveis por inibir ou reduzir as lesões causadas pelos radicais livres nas células (Araújo, 1995; Hudson, 1990).

Muitas plantas vêm sendo estudadas como potenciais fontes de antioxidantes naturais para a indústria alimentícia. Vários compostos como os polifenóis têm sido utilizados como protetores da oxidação lipídica, sendo que mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas (Steinberg, 1992; Valenzuela et al., 1992; Gordon, 1996; Hargeman et al., 1998; Dreosti, 2000).

Os compostos fenólicos estão incluídos no grupo dos fitoquímicos alimentares. Sua estrutura contém pelo menos um anel aromático, ao qual está ligada uma ou mais hidroxilas. Possuem atividades farmacológicas, desenvolvendo importante papel na proteção contra diversas doenças, visto que inibem a oxidação lipídica, proliferação de microorganismos, além de serem responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (Valenzuela et al., 1992; Gordon, 1996; Peleg et al., 1998; Moraes-de-Souza, 2007). Dependendo de sua estrutura, estão divididos em vários grupos. Os flavonóides (Figura 1.1) são caracterizados pela presença na estrutura química de dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado (flavanóis, flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides). Já os ácidos fenólicos contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e diferentes grupos funcionais (aldeídos, alcoóis e ácidos carboxílicos) que podem formar ésteres com ácidos orgânicos ou unirem-se a açúcares (Soares, 2002; Moraes-de-Souza, 2007). Outros compostos de natureza fenólica são os estilbenos, lignanos, taninos e ligninas (Manach et al., 2004).

Figura 1.1. Estrutura química dos flavonóides (Lakhanpal & Rai, 2007).

As catequinas (Figura 1.2), pertencentes ao grupo dos flavanóis, auxiliam na proteção contra doenças cardiovasculares ateroscleróticas. A epicatequina e a epigallocatequina possuem propriedades antioxidantes e inibidoras do processo de carcinogênese (Hanasaki et al., 1994). Estes compostos são flavonóides não glicosilados, ao contrário das outras classes de flavonóides. São compostos incolores e hidrossolúveis que contribuem para o amargor e a adstringência dos alimentos que os possuem em sua composição (Manach, 2004; Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006).

Figura 1.2. Estrutura química das catequinas (Nagarajan et al., 2008).

Os taninos são compostos fenólicos que podem ser divididos em condensados e hidrolisáveis. Os taninos condensados ou proantocianidinas (Figura 1.3) são polímeros de flavonóides, cujos monômeros são unidos por uma ligação carbono-carbono (Agostini-Costa et al., 2000). Possuem alto peso molecular e têm como precursores, unidades monoméricas de flavan-3-óis (catequinas e epicatequinas) ligados com flavan-3,4-dióis ou leucoantocianidinas (Efraim et al., 2004). Quando as moléculas que se condensam são catequinas e epicatequinas, as proantocianidinas são denominadas procianidinas (Wollgast & Anklam, 2000). As procianidinas são dímeros, oligômeros ou polímeros de catequinas, unidos por ligações entre C₄-C₆ ou C₄-C₈. Por fazerem parte do grupo dos flavonóides, estas moléculas agem como antioxidantes primários com o potencial de reduzir diretamente a formação de radicais livres, regenerar ou manter o α -tocoferol ou funcionar como quelantes de metais de transição (Fe^{2+} e Cu^{2+}) envolvidos na formação de radicais livres (Zhu et al., 2002).

Figura 1.3. Estrutura química de um flavan-3-ól na forma monomérica (a) e a condensação de duas moléculas de flavan-3-óis formando uma proantocianidina (b). Fonte: Wollgast et al. (2001).

Os flavonóides absorvidos pela dieta agem em conjunto com o sistema endógeno de defesas antioxidantes, protegendo moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos de danos oxidativos, suprimindo a resposta inflamatória e modulando a homeostase vascular (Demrow et al., 1995; Rein et al., 2000). Protegem contra a oxidação da LDL-colesterol por meio da redução de radicais livres, quelação de íons metálicos e regeneração de α -tocoferol. Atuam ainda contra alergias, inflamações, úlceras, virose, tumores e hepatotoxinas, assim como inibem a agregação plaquetária, reduzindo o desenvolvimento de cardiopatias e trombozes (German & Dillard, 2000).

Estudos indicam que o consumo de alimentos ricos em flavonóides pode estar associado ao aumento da capacidade antioxidante do plasma, redução da agregação plaquetária e melhor funcionamento endotelial (Zhu et al., 2002). Entretanto, os grupos fenólicos dos taninos se ligam a grupos -NH de peptídeos e proteínas, inibindo sua hidrólise ou digestão, podendo assim exercer efeitos anti-nutricionais (Shahidi & Naczki, 2004).

Assim como os compostos fenólicos, as metilxantinas (Figura 1.4) exercem importante ação biológica no nosso organismo. A cafeína é um alcalóide farmacologicamente ativo pertencente a este grupo (1,3,7- trimetilxantina). Praticamente 100% de sua ingestão oral é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, atingindo pico de concentração no plasma,

entre 30 e 120 minutos (Mckim & Mckim, 1993; Sawynok & Yaksh, 1993).

Figura 1.4. Estrutura química das metilxantinas (Gnoatto et al., 2007).

Devido à sua atividade ergogênica, seu consumo visando a obtenção de efeitos estimulantes tem se tornado popular nas últimas décadas (Braga & Alves, 2000). Entre os alimentos que contém este alcalóide, o café é o que mais contribui para a sua ingestão devido ao seu alto consumo, mas também é encontrada em chás, cacau, guaraná, chocolate e refrigerantes (Camargo & Toledo, 1998).

A capacidade antioxidante da cafeína, encontrada em grandes quantidades no guaraná, ocorre em função do mecanismo de captação dos radicais hidroxila e oxigênio singlete, o que a torna um antioxidante com poder similar ao da glutathione e superior ao ácido ascórbico (Shi et al., 1991). Está geralmente associada à teofilina e a teobromina, dois compostos do mesmo grupo, responsáveis pela dilatação dos brônquios e vasos sanguíneos, respectivamente (Ducke, 1987; Camargo & Toledo, 1998).

Outro grupo de compostos naturalmente presente nas plantas e com potente atividade biológica são os fitoesteróis. Como o nome já diz, são esteróis vegetais e são encontrados, basicamente, na forma pura ou esterificada, bem como conjugados na forma de glicosídeos (Figura 1.5). A ingestão desses compostos tem sido comprovadamente relacionada à redução dos níveis de colesterol plasmático (Jones et al., 1997; Ling & Jones, 1995; Schlierf et al. 1978). Isso porque os fitosteróis possuem estrutura química semelhante ao colesterol, com diferenciação na sua configuração apenas da cadeia lateral. Não são sintetizados pelo sistema endógeno sendo, portanto, provenientes exclusivamente da dieta, entrando no organismo por meio apenas de absorção intestinal. Os mecanismos pelos quais os fitosteróis inibem a absorção de colesterol incluem inibição da formação de micelas de sais biliares e colesterol e a competição com a borda em escova para a absorção do colesterol ingerido (Ling & Jones, 1995).

Existe uma grande variedade de fitosteróis, mas os mais frequentemente encontrados na natureza são: campesterol, β -sitosterol, stigmasterol e o brassicasterol (Ling & Jones, 1995).

Figura 1.5. Estrutura química dos fitosteróis (Ito et al., 2010).

Os carotenóides, inicialmente relacionados apenas à pigmentação de vegetais, exercem efeitos biológicos que podem estar associados à prevenção e proteção contra diversas desordens graves de saúde como cânceres e doenças do coração, além da sua já conhecida atividade pró vitamina A (Britton, 1995). Dentre as possíveis explicações para tal propriedade estão o seu papel na proteção contra danos causados às membranas e a modificação de suas propriedades de fluidez e permeabilidade (Britton, 1995).

Os carotenóides (Figura 1.6) são estruturas químicas compostas por 40 átomos de carbono, frequentemente tetraterpenóides, cuja coloração varia entre amarelo, laranja e vermelho. Assim como os demais compostos já mencionados, os carotenóides são encontrados em vegetais e podem ser classificados em carotenos, hidrocarbonetos poliênicos, e xantofilas, sintetizadas a partir dos primeiros por meio de hidroxilação e epoxidação (Ambrósio et al., 2006).

Figura 1.6. Estrutura química de alguns carotenóides. Fonte: Ambrósio et al. (2006).

1.4. Guaraná (*Paullinia cupana*)

O guaraná (*Paullinia cupana*), alimento tipicamente brasileiro, possui produção intensa e praticamente exclusiva no país, sendo apreciado principalmente por suas propriedades energéticas.

Basicamente, guaraná são frutos extraídos da *Paullinia cupana* Kunth var. *typica*,

encontrada principalmente na Venezuela e Colômbia, e *Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* [(Mart.) Ducke], oriunda da flora brasileira, ambas nativas da Amazônia (Correia, 1984; SUFRAMA, 2003). É uma planta arbustiva de clima tropical e de baixo crescimento (Henman, 1982; Saldana et al., 2002). Possui folhas grandes, cor verde escura e frutifica em cachos. Esta planta é encontrada em estado nativo nas regiões compreendidas entre os rios Amazonas, Maués, Paraná do Ramos e Negro (estado do Amazonas) e na bacia do Rio Orinoco, na Venezuela (SUFRAMA, 2003).

O fruto é pequeno, possui formato arredondado e casca vermelha. Uma vez atingida a maturação completa, o fruto se abre deixando à mostra a semente de cor castanho-escura, parcialmente coberta por uma polpa espessa e branca, conhecida como arilo (Figura 1.7) (Kuskoski et al., 2004). O guaraná comercial é produzido apenas das sementes, sendo as outras partes do fruto descartadas.

Figura 1.7. Guaraná (*Paullinia cupana*) var. *sorbilis*.

A tecnologia empregada na obtenção do guaraná em pó é baseada nos procedimentos realizados pelos índios, com substituição, em algumas etapas, do trabalho manual por máquinas. As etapas do processamento consistem em fermentação e despolpamento (para a obtenção da semente), lavagem, peneiragem, secagem, torrefação, seleção e moagem (SUFRAMA, 2003).

Segundo o Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Ocidental (2008), são comercializadas quatro formas diferentes de guaraná (Figura 1.8): em rama (grão torrado), em bastão (guaraná em rama triturado, pilado e misturado com água, moldado em formato de bastão, seco e defumado), guaraná em pó (grão torrado e moído) e xaropes (produto exclusivo de indústrias de alta tecnologia e nível de capitalização). O guaraná em pó, forma como o produto normalmente é comercializado, é resultante da semente finamente triturada, moída ou pilada após secagem.

Figura 1.8. Guaraná em rama, em bastão, em pó e xarope.

1.4.1. Importância econômica

O Brasil é praticamente o único país a produzir guaraná em escala comercial em cultivos racionais e sistemáticos, sendo a Bahia, Amazonas, Mato Grosso, Acre e Pará os principais estados produtores (SUFRAMA, 2003). Por ser uma planta genuinamente brasileira, possui grande importância econômica e social, especialmente na Região Amazônica, em função da elevada demanda de sementes pelas indústrias de bebidas para atender ao promissor mercado de refrigerantes e energéticos.

Após muito tempo de produção concentrada no estado do Amazonas, terra natal da espécie, o título de maior produtor nacional é hoje da Bahia, com produção de 2816 toneladas em 2001, contra 542 no Amazonas (SUFRAMA, 2003).

Visando estimular a economia do país, a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Amazônica Ocidental tem focado em atividades de pesquisa que busquem melhorar técnicas de produção e desempenho da cultura, preservando o meio ambiente e aumentando a renda do produtor rural (SUFRAMA, 2003; EMBRAPA, 2005). Assim, tem desenvolvido cultivares resistentes a pragas e de elevada produtividade, sendo estas disponibilizadas aos agricultores da região (FAPESP, 2000).

A cultura ganhou produtividade, sendo que cada planta passou a atingir a produção de 1,5 kg/ano contra os 200 gramas anteriores (FAPESP, 2000). O produto desponta, então, com grande potencial para os mercados interno e externo, sendo uma cultura de grande importância para a agricultura familiar. Segundo o IBGE (2002), a área plantada do Brasil, em 2000, era de 12.043 hectares com uma produção de 4.274 toneladas de sementes, que gerou um rendimento médio de R\$ 10.277.000,00. Os principais estados produtores foram Bahia (2.770 toneladas), Amazonas (899 toneladas) e Mato Grosso (390 toneladas) (IBGE, 2002).

A produção de guaraná em ramas no país, em 2003, era estimada em torno de 4.300 toneladas/ ano, sendo 70% dessa produção destinados às indústrias de refrigerantes gaseificados, sob a forma de xarope, enquanto que 30% comercializados sob a forma de xarope, pó, bastão, extrato para consumo interno e para a exportação (SUFRAMA, 2003).

Só a AMBEV, indústria produtora de bebidas gaseificadas (marcas BRAHMA e ANTARCTICA) que utiliza o xarope de guaraná para a sua produção, absorve cerca de 70% do guaraná em sementes produzido anualmente em Maués, o equivalente a 168 toneladas em 2000 e 140 toneladas em 2001 de matéria-prima processada. Este mercado tende a crescer conforme o aumento da demanda de refrigerantes à base de guaraná registrado recentemente, principalmente em países de renda per capita mais elevada (SUFRAMA, 2003).

Neste mesmo canal de comercialização, o guaraná em pó alcança um mercado de dimensões bem mais amplas. Mercados ainda a serem explorados, mas muito promissores, dado o crescimento acelerado da demanda por alimentos e bebidas energéticas e com propriedades funcionais para o beneficiamento da saúde e estética (SUFRAMA, 2003).

1.4.2. Subprodutos do guaraná

A geração de elevadas quantidades de resíduos agroindustriais durante o período de safra constitui um grande problema ambiental (Food and Agriculture Organisation, 2006). Muitos desses resíduos possuem compostos fenólicos que apresentam função antibacteriana, os quais resistem à degradação biológica (Señer & Vidal, 2001). Os custos de manutenção e estocagem destes resíduos são fatores economicamente limitantes (Lowe & Buckmaster, 1995).

Estudos realizados com subprodutos de vegetais indicam a presença de elevados teores de compostos fenólicos em vários subprodutos, podendo-se citar o bagaço da uva (Ishimoto, 2008) e da maçã (Will et al., 2000), casca do café (Farah & Donangelo, 2006) e da cebola (Waldron, 2001), entre outros. Desta forma, os subprodutos de vegetais têm sido vistos como potenciais fontes de compostos valiosos. Pensando nisso, pesquisadores têm focado seus estudos em analisar o potencial nutritivo e funcional de diferentes resíduos agroindustriais hoje descartados. Além de ecológico, o aproveitamento destes pode reduzir os custos do processamento de novos produtos, além dos gastos com a criação animal, visto que muitos

destes resíduos são empregados na forma de ração, e gerar renda extra para indústria e pequenos produtores (EMBRAPA, 2009).

1.4.3. Guaraná x saúde

As sementes de guaraná se caracterizam pelo alto teor de alcalóides do tipo metilxantinas, principalmente cafeína (até quatro vezes maior que o encontrado no pó de café) e, em menor quantidade, a teofilina e teobromina (Ducke, 1987). As sementes de guaraná apresentam ainda compostos fenólicos tais como catequinas, epicatequinas, proantocianidinas, além de saponinas, amidos e gorduras (Henman, 1982; Simão et al., 1984; Majhenic et al., 2007). Dessa forma, recentemente, pesquisadores têm concentrado esforços em avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do guaraná (Basile et al., 2005; Fukumasu et al., 2006; Majhenic et al., 2007).

Em estudo realizado por Majhenic et al. (2007), no qual foram analisados diferentes tipos de extratos de sementes de guaraná, foram observadas elevadas quantidades de compostos fenólicos totais, catequinas e cafeína, evidenciando seu potencial antioxidante, bem como suas atividades antibacteriana e antifúngica.

O extrato aquoso de guaraná em pó demonstrou possuir propriedades inibitórias da agregação plaquetária e formação de trombozes, potencialmente devido aos teores de compostos como catequinas e proantocianidinas (Subbiah, 2005).

Martins (2010), ao desenvolver estudo da capacidade antioxidante *in vivo* do guaraná em pó em indivíduos adultos com sobrepeso e perfil lipídico acima do considerado normal, observou que o consumo de uma única dose de guaraná (3 g dissolvidos em 200 ml de água) aumentou o *lag time* de oxidação da LDL, elevou a atividade antioxidante do plasma avaliada por ORAC e protegeu o DNA contra ataque de radicais livres dos participantes observado pelo ensaio Cometa.

Além de ser utilizado como estimulante dos sistemas nervoso e cardiovascular, o guaraná é empregado na medicina popular com uma variedade de propósitos terapêuticos como anti-diarréico, diurético, analgésico, antipirético e no tratamento da enxaqueca, assim como afrodisíaco (Henman, 1982; Majhenic et al., 2007). É empregado também como medicamento cardiovascular e na prevenção da aterosclerose (Kuskoski et al., 2004). Além

disso, recentemente, observou-se que a consumo de guaraná reduz a incidência e multiplicação de lesões no fígado de ratos induzidas por substâncias cancerígenas, efeito atribuído à redução da proliferação celular (Fukumasu et al., 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostini-Costa TS, Santos JR, Garruti DS, Feitosa T. Caracterização, por cromatografia em camada delgada, dos compostos fenólicos presentes em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.). **B Cent Pesqui Proc A** 2000; 18(1): 129-137.
- Ambrósio CLB, Campos FACS, Faro ZP. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Rev Nutr** 2006; 19(2):233-243.
- Angelis RC. Novos conceitos em nutrição: reflexões a respeito do elo da dieta e saúde. **Arq Gastroenterol** 2001; 38(4).
- Araújo JMA. **Química de alimentos: teoria e prática**. Imprensa Universitária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG – Brasil, 1995.
- Basile A, Ferrara L, Del Pezzo M, Meled G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol** 2005; 102: 32–36.
- Berr C, Richard MJ, Roussel AM, Bonithon-Kopp C. Systemic oxidative stress and cognitive performance in the population-based EVA study. **Free Radical Bio Med** 1998; 24 (7/8): 1202-1208.
- Braga LC, Alves MP. A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de *endurance*. **Rev Bras Cienc Mov** 2000; 8(3): 33-37.
- Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB J** 1995; 1551-1558.
- Brownell K, Horgen KB. **Food fight: the inside story of the food industry, America's obesity crisis, and what can be done about it**. McGraw-Hill, New York; 2003, 352 pag.
- Camargo MCR, Toledo MCF. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência Tecnol Alime** 1998; 18(4).
- Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Ocidental (CPAA). **O que é o guaraná?**

Disponível

em:

<

<http://www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeproducao/guarana/docs/oque.html>>

Acessado em 15 de junho de 2009.

Correia P. In: Souza Araújo AAS, Mercuri LP, Seixas SRS, Storpirtis S, Matos JR. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Rev Bras Ciênc Farm** 2006; 42 (2): 269-277.

Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. **Circulation** 1995; 91: 1182-1188.

Dreosti IE. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition** 2000; (16): 692-694.

Duke JA. “**Handbook of Medicinal Herbs**”, CRC Press. Florida, 1987; p.349.

Efraim P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para a produção de chocolate**. [Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas]. Campinas, 2004.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de produção. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: EMBRAPA 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Guarana/CultivodoGuaranazeiroRO/index.htm>>. Acessado em 10 de janeiro de 2010.

Farah A, Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. **Braz J Plant Physiol** 2006; 18(1): 23-36.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Guaraná: clones para uma produção maior. Pesquisa On line. Edição Impressa 59 - Novembro 2000.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature** 2000; 408: 239-247.

Food and Agriculture Organisation, 2006. FAOSTAT database. <<http://www.fao.org>>.

Fukumasu H, Avanzo JL, Nagamine MK, Barbuto JA, Rao KV, Dagli MLZ. Paullinia cupana Mart var. sorbilis guaraná reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz J Med Biol Res** 2008; 41: 305-310.

German B, Dillard CJ. Phytochemicals: nutraceutical and human health. **J Sci Food Agr** 2000; 80: 1744-56.

Gnoatto SCB, Bassani VL, Coelho GC, Schenkel EP. Influência do método de extração nos

- teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., aquifoliaceae). **Quím Nova** 2007; 30 (2): 304-307.
- Gordon MH. Dietary antioxidants in disease prevention. **Nat Prod Rep** 1996; 265-273.
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **J Agr Food Chem** 1998; 46: 1887-1892.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem** 1992; 59: 1609-23.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Bio Med** 1997; 16 (6): 845-850.
- Henman AR. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **J Ethnopharmacol** 1982; 6: 311-338.
- Hudson BJB. **Food Antioxidants** 1990. Elsevier Science Publishers LTD.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.** Produção Agrícola Municipal - Culturas temporárias e permanentes. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão 2002; 29: 1-88, Rio de Janeiro.
- Iriti M, Faoro F. Grape phytochemicals: a bouquet of old and new nutraceuticals for human health. **Med Hypotheses** 2006; 67: 833-838.
- Ishimoto EY. **Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters.** [Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da USP]. São Paulo, 2008.
- Ito N, Hakamata H, Kusu F. Simultaneous determination of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Anal Methods** 2010; 2, 174-179.
- Jones PJH, MacDougall DE, Ntanios F, Vanstone CA. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. **Can J Physiol Pharm** 1997; 75: 217-227.
- Kuskoski EM, Roseane F, García AA, Troncoso GAM. Propriedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae-Columbia** 2005; 12 (2): 45-52.
- Lakhanpal P, Rai DK. Quercetin: a versatile flavonoid. **Internet Journal of Medical Update** 2007; 2 (2): 22-37; Jul-Dec.
- Leite HP, Sarni RS. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev Bras Nutr Clín** 2003; 18 (2): 87-94.

- Ling WH, Jones PJH. Minireview dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. **Life Sci** 1995; 57(3): 195-206.
- Lock K, Pomerleau UJ, Causer L, Altmann DR, Mckee M. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. **B World Health Organ** 2005; 83 (2): 100-8.
- Lowe ED, Buckmaster DR. Dewatering makes big difference in compost strategies. **Biocycle** 1995; 36: 78–82.
- Majhenic L, Kerget MS, Knez ZE. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extract. **Food Chem.** 2007; 104: 1258-68.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr** 2004; 79 (5): 727-747.
- Martins CA. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó.** [Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da USP]. São Paulo, 2010.
- Matsubara S, Rodriguez-Amaya DB. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência Tecnol Alime** 2006; 26 (2): 401-407.
- Mckim EM, Mckim WA. Caffeine: How much is too much? **The Canadian Nurse** 1993; 89 (11): 19-22.
- Moraes-de-Souza RA. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de Ervas consumidas no Brasil.** [Dissertação de mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP]. São Paulo, 2007.
- Nagarajan S, Nagarajan R, Brauhut SJ, Bruno F, McIntosh D, Samuelson L, Kumar J. Biocatalytically Oligomerized Epicatechin with Potent and Specific Anti-proliferative Activity for Human Breast Cancer Cells. **Molecules** 2008, 13 (11): 2704-2716.
- Peleg H, Bodine KK, Nobile AC. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chem Senses** 1998; 23 (3): 371-78.
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. **J Nutr** 2000; 130: 2109S-2114S.
- Saldana MDA, Zetzi C, Mohamed RS, Brunner G. Decaffeination of guarana seeds in a microextraction column using water-saturated CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids** 2002; 22: 119–127.

- Sawynok J, Yaksh TL. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. **Pharmacol Rev** 1993; 45 (1): 43-51.
- Schlierf G, Oster P, Heuck CC, Raetzer H, Schellenberg B. Sitosterol in juvenile type II hyperlipoproteinemia. **Atherosclerosis** 1978; 30: 245-248.
- Señer RA, Vidal PA. **Oportunidades de valorización de los residuos de la industria vinícola** (Valorisation opportunities of the residues from the winery industry). I Encuentro Internacional de Gestión de residuos orgánicos en el ámbito rural mediterráneo. Cátedra Zurich de Medio Ambiente de la Universidad de Navarra. 2001.
- Shahidi F, Nacz M. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press 2004.
- Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda I, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - engineering and technology. **Food Rev Int** 2005; 21: 139-166.
- Sies H. What is oxidative stress? In: Keany JF. **Oxidative stress and vascular disease**. Kluwer Academic Publishers 2000.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. Review. **Eur J Biochem** 1993; 215 (2): 213-219.
- Simão AM, Muradian J, Carvalho JP. Isolamento do pigmento vermelho natural do pó de guaraná e doseamento de cafeína no extrato clorofórmico. **Rev Agr** 1984; 59 (2): 187-207.
- Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr** 2002; 15 (1): 71.
- Steinberg D. Metabolism of lipoproteins and their role in the pathogenesis of atherosclerosis. **Ather Rev** 1992; 18: 1-6.
- Subbiah MTR. Guarana consumption: a review of health benefits and risks. **Alternative & Complementary Therapies** 2005; 212-213.
- Superintendência da Zona Franca de Manaus**. Potencialidades Regionais: estudo da viabilidade econômica, Guaraná. Manaus: SUFRAMA, 2003.
- Valenzuela A, Nieto S, Cassels BK, Speisky H. Inhibitory effect of boldine on fish oil oxidation. **J Am Oil Chem Soc** 1992; 68: 935-937.
- Waldron, K.. Useful ingredients from onion waste. **Food Sci Technol** 2001; 15: 38-39,41.
- Will F, Bauckhage K, Dietrich H. Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. **Eur Food Res Technol** 2000; 211: 291-297.
- Wollgast J, Pallaroni L, Agazzi ME, Anklam E.. Analysis of procyanidins in chocolate by

reversedphase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. **J Chromatogr** 2001; 926(1): 211-220.

World Health Organization .WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.** Report of a Joint Expert Consultation. Geneva; 2003. (WHO - Technical Report Series, 916).

Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. **Society for Experimental Biology and Medicine** 2002; 227: 321-329.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*)

RESUMO

Presentes nos vegetais, os compostos fenólicos (CF) são alvo constante de pesquisas devido aos benefícios à saúde trazidos por alimentos que os possuem em sua composição. A extração de CF presentes nos alimentos é influenciada, dentre outros fatores, pela natureza do composto e pelo método de extração empregado. Desta forma, o objetivo deste capítulo foi otimizar um método de extração de CF totais do guaraná em pó, dividido em 2 partes. Na parte 1 foram avaliados: (a) os solventes metanol:água nas proporções 30:70, 50:50, 80:20 e 99:1, seguidos ou não de extração com acetona:água (70:30); (b) homogeneização: ultraturrax por 10 min, agitação magnética por 1 h e 2 h e sonicação por 15 min e 30 min; e (c) número de extrações (de 1 a 5). O teor de CF totais foi analisado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Na parte 2, foi desenvolvido um delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizando 2 variáveis independentes ($2^2 = 4$ ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios), sendo cada variável avaliada em 5 níveis diferentes. Neste caso, além do teor de CF totais, avaliou-se também o teor de proantocianidinas (PA) totais por hidrólise ácida (butanol-HCl). Como resultado da parte 1, o método de extração mais eficiente foi o que consistiu em agitação magnética por 1 h, solvente metanol:água na proporção 30:70 e re-extrações com o mesmo solvente, seguidas de pelo menos uma etapa de extração com acetona:água, perfazendo um total de 4 extrações da mesma amostra. Os resultados da parte 2 de CF e PA totais variaram entre 105,95 e 122,82 mg EAG/ g guaraná, e 58,21 e 86,63 mg EqCI/ g guaraná, respectivamente. O modelo de extração de CF totais apresentou regressão não significativa. O modelo de extração de PA totais apresentou regressão significativa e R^2 de 96%, indicando que para atingir uma extração acima de 80% de PA totais a porcentagem de água deve ser inferior a 20% e a proporção dos solventes acetona/metanol não interferiu na extração desses compostos. Portanto, é possível supor que os CF do guaraná apresentam características moderadamente polares, que a água como co-solvente aumenta a permeabilidade do solvente na matriz do alimento, favorecendo o rendimento da extração e

aponta a necessidade de se realizar extrações consecutivas com solventes de diferentes polaridades a fim de se extrair uma gama maior de compostos. O resultado sugere que o guaraná em pó é fonte de CF, indicando possível atividade antioxidante *in vitro*.

Palavras-chave: guaraná, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

2.1. Introdução

Os estudos e as conseqüentes publicações relacionadas às análises de CF em alimentos surgiram há muitos anos e vêm crescendo cada vez mais, em função do amplo interesse em se aprofundar o conhecimento acerca dos benefícios trazidos por alimentos que os possuem em sua composição. Entretanto, a análise de CF é influenciada, principalmente, pela natureza do composto e pelo método, solvente e tempo de extração empregados; logo, varia de um alimento para o outro (Naczk & Shahidi, 2004; Stalikas, 2007).

Basicamente, a solubilidade dos CF em um determinado solvente depende da polaridade do mesmo utilizado, do grau de polimerização desses compostos e de suas interações com outros constituintes da matriz do alimento em questão. Além disso, são substâncias muito reativas e susceptíveis à ação de enzimas. Tal fato explica a inexistência de um procedimento universal e aponta para a necessidade de seleção criteriosa e individual do método de extração para cada fonte natural de antioxidante (King & Young, 1999; Agnelo & Jorge, 2007). Portanto, é comum encontrar recomendações do uso consecutivo de solventes com diferentes polaridades de modo a possibilitar a extração eficiente de constituintes com estrutura química diversificada (Naczk & Shahidi, 2004).

Os CF são usualmente extraídos por solventes como água, metanol, etanol e acetona ou uma mistura desses solventes, em diferentes concentrações, uma vez que as moléculas que contém um radical glicosídeo são solúveis em água e as agliconas (polifenóis sem a molécula de açúcar) que são menos polares, são mais solúveis em outros solventes. Logo, a combinação de solventes pode ser empregada visando aumentar o rendimento da extração que dependerá, conforme dito, da polaridade dos CF presentes na amostra, bem como do grau de polimerização e da interação com outros constituintes da matriz alimentar (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003).

A maioria dos estudos relacionados à concentração e composição de compostos fenólicos em alimentos estuda apenas os polifenólicos extraíveis; ou seja, são analisados apenas os extratos orgânico-aquosos, enquanto que concentrações significativas destes compostos são encontradas nos resíduos dos processos de extração (compostos fenólicos não-extraíveis). Estes fenólicos não-extraíveis são, principalmente, taninos hidrolisáveis e proantocianidinas associados a fibras e proteínas. Assim, para a determinação destes compostos, há a necessidade de tratamento químico ou enzimático para a liberação dos mesmos da matriz do alimento antes da análise por espectrofotômetro ou cromatografia. Dessa forma é então possível se estimar a quantidade total desses compostos presente no alimento (Saura-Calixto et al, 1991; Hellström & Mattila, 2008).

Tendo em vista o exposto acima é possível constatar a complexidade da otimização de um processo de extração de CF. Levando em consideração que pesquisas científicas geralmente exigem tempo e elevado número de ensaios, o que as torna, muitas vezes, inviáveis, diversas tentativas têm sido realizadas a fim de reduzir o número de ensaios e, com isso, poupar tempo e gastos, garantindo a mesma confiabilidade. Uma delas é a técnica que emprega os delineamentos compostos. O DCCR é considerado um delineamento eficiente, o qual requer poucos ensaios para sua realização e se comporta bem segundo os critérios de otimização (Mateus et al., 2001). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar um método de extração de compostos fenólicos do guaraná em pó.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos deste capítulo foram:

- (a) verificar, dentre os métodos de extração mais utilizados na literatura científica, qual o mais eficiente para quantificar o teor de CF totais do guaraná em pó;
- (b) otimizar um método de extração de CF avaliando as seguintes variáveis: proporção do solvente, método de homogeneização e número de extrações; e
- (c) utilizar a metodologia de DCCR visando a otimização da extração de CF.

2.3. Material e métodos

2.3.1. Material

O guaraná em pó foi doado pela Empresa Guaranapis que dispõe de plantios próprios e é a maior produtora de guaraná do Brasil (lote número 03 2010).

De acordo com informações do fabricante, a fazenda, localizada no município de Ituberá (Costa do Dendê), Rodovia Ituberá Gandú Km11, Região do Baixo Sul da Bahia, é dividida em blocos (1 a 28), sendo que cada bloco conta com uma área aproximada de dois hectares. No período da colheita, os funcionários são enviados em grupos por bloco. Ao final do dia, a produção é recolhida, com auxílio de trator, e armazenada em cochos de fermentação. O guaraná é então fermentado, sendo movimentado rotativa e constantemente (o de baixo passa para cima e o de cima passa para baixo) por quatro dias, período este que corresponde ao resto da abertura dos grãos.

Em seguida, o guaraná é despulpado, lavado, seco em estufas e ensacado. Neste vem estampado a logo da empresa, data da colheita, data da secagem, o estufeiro em que secou e o número do lote. O guaraná em pó é produzido de acordo com as seguintes etapas de processamento: fermentação, despulpamento, lavagem, peneiragem, secagem, torrefação, seleção e moagem.

2.3.2. Métodos

2.3.2.1. Preparo das amostras

Foram homogeneizadas três amostras de um mesmo lote de guaraná em pó (Figura 2.1) e armazenadas em recipiente próprio em temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata.

Figura 2.1. Guaraná em pó comercial.

2.3.2.2. Determinação do processo de extração de compostos fenólicos totais

Inicialmente, foram realizados pré-testes com os seguintes solventes: etanol, acetona, metanol, metanol acidificado e água, e as técnicas de extração desenvolvidas de acordo com os seguintes autores:

- (a) Bystrom et al. (2008): 80 mL dos solventes metanol:água (80:20, v:v) ou acetona:água (70:30, v:v), 3 g de amostra, agitação magnética por 2 h em temperatura ambiente, repouso overnight a 22°C, filtração e re-extração com 50 mL do solvente, com volume ajustado para 200 mL;
- (b) Majhenic et al. (2007): 50 mL dos solventes acetona:água (35:65, v:v) ou etanol:água (60:40, v:v), 3 g de amostra, agitação magnética por 2 h em temperatura ambiente e filtração, com volume ajustado para 50 mL;
- (c) Larrauri et al. (1997): 40 mL do solvente metanol:água (50:50, v:v), 5 g de amostra, homogeneização em Ultra-turrax por 10 min em potência média, centrifugação a $18000 \times g$ por 15 min em temperatura ambiente e re-extração com 80 mL do solvente acetona:água (70:30, v:v), repetindo o mesmo procedimento acima, com volume ajustado para 100 mL; e
- (d) Pérez-Jiménez & Saura-Calixto (2005): 20 mL do solvente metanol:água acidificado (50:50, pH 2,0), 2 g de amostra, agitação magnética por 1 h em temperatura ambiente e re-extração com o solvente acetona:água (70:30, v:v), repetindo o mesmo procedimento acima, com volume ajustado para 50 mL.

A partir destes resultados, foram avaliados: (a) os solventes metanol:água nas proporções 30:70, 50:50, 80:20 e 99:1, seguidos ou não de extração com acetona:água (70:30); (b) homogeneização: ultra-turrax por 10 min, agitação magnética por 1 h e 2 h e sonicação por 15 min e 30 min; e (c) número de extrações (de 1 a 5).

A otimização do processo de extração de CF utilizou guaraná em pó comercial como amostra teste, em função da quantidade restrita das demais amostras de guaraná *in natura* (fruto).

2.3.2.3. Planejamento experimental para otimização do processo de extração de compostos fenólicos e proantocianidinas totais

O DCCR foi realizado com 2 variáveis independentes, sendo elas: (a) % de água; e (b) % de acetona/metanol. O delineamento foi composto por 11 ensaios ($2^2 = 4$ ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais), aplicável a metodologia de superfície de resposta (Rodrigues & Iemma, 2005; Fontes et al., 2011). Cada variável foi avaliada em 5 níveis diferentes, conforme apresentado na Tabela 2.1, com 3 repetições no ponto central.

Tabela 2.1. Níveis das variáveis independentes no planejamento experimental do processo de extração de compostos fenólicos totais.

Variáveis independentes	-1,41	-1	0*	+1	+1,41
Água (%)	20	29	50	71	80
% de acetona em metanol	0	15	50	85	100

*Ponto central

As variáveis dependentes analisadas foram: (a) teor de CF totais; e (b) teor de PA totais.

2.3.2.4. Quantificação de compostos fenólicos totais

A dosagem dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras foi realizada de acordo com Singleton & Rossi (1965), com adaptações. Este método se baseia na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina. A cor azul produzida pela redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelos CF é medida espectrofotometricamente em 765 nm. Foi utilizado ácido gálico como padrão.

Em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH), foram pipetados 120 µL de extrato da amostra convenientemente diluído e 50 µL de solução do reagente Folin-Ciocalteu diluído 5 vezes. Após agitação e incubação em temperatura ambiente por 3 minutos, foram pipetados 30 µL de solução de carbonato de sódio a 200 g/L, seguido de incubação por 1 hora a 37°C e posterior leitura da absorbância em comprimento de onda de 765 nm, utilizando-se o leitor de placas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.). Para o cálculo do teor de CF totais das amostras foi elaborada curva de calibração com o padrão em sete concentrações diferentes (0, 1, 2, 5, 10, 15 e 25 µg/mL).

Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/g de produto (mg EAG/ g).

2.3.2.5. Quantificação de proantocianidinas totais

O conteúdo de PA totais foi determinado por meio de método espectrofotométrico descrito por Porter et al. (1986), com adaptações. Este método baseia-se na hidrólise ácida do polímero de PA em antocianina na presença de sulfato ferroso que, por sua vez, promove a catálise da reação, com formação de cor vermelha. Esta é medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 550 nm.

Em tubo Pyrex 13 x 100 mm com tampa rosqueada de teflon foram adicionados 6 mL de n-butanol-HCl (95:5, v:v), 1 mL do extrato e 200 µL do reagente de ferro (0,5 g de $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ em 25 mL de HCl 2N). Os tubos foram agitados brevemente em vórtex, tampados de forma a deixar a tampa frouxa e levados a banho-maria em ebulição por 50 minutos. Após resfriados os tubos com água, a absorbância foi lida.

A absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 550 nm, confirmado pelo espectro de absorção do padrão diluído no mesmo solvente de extração da amostra, utilizando-se o leitor de placas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.). Foram pipetados 200 µL da amostra em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH). Para o cálculo do teor de PA totais das amostras foi elaborada curva de calibração com o padrão cloreto de cianidina em cinco concentrações diferentes (1, 5, 10, 20 e 30 µg/mL).

Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalente de cloreto de cianidina/g de amostra (mg EqCI/ g).

2.3.3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do “software” Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 13.0 for Windows. Inicialmente, foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de aderência à curva de distribuição normal. Em seguida, foi aplicada análise de variância (ANOVA) e *post-hoc* de Tukey na avaliação de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos. Os dados foram apresentados como média e desvio-padrão.

As análises de variância, equação de regressão e curvas de contorno do DCCR foram realizadas através do software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft).”

2.4. Resultados

2.4.1. Método de extração

De acordo com a Tabela 2.2, o método de extração que resultou em um maior teor de compostos fenólicos totais foi o descrito por Larrauri et al. (1995), que emprega duas etapas de extração e solventes de diferentes polaridades, sendo metanol: água (50:50, v:v) e acetona:

água (70:30, v:v).

Tabela 2.2. Eficiência de extração de compostos fenólicos totais do guaraná em pó, empregando-se diferentes métodos e solventes de extração.

Extração	Fenólicos totais (mg EAG*/g de guaraná em pó comercial)
Metanol 80% [†]	74,19 ± 0,35 ^(e)
Acetona 70% [†]	70,10 ± 0,63 ^(d)
Etanol 60% [‡]	67,08 ± 0,31 ^(b, c)
Acetona 35% [‡]	65,20 ± 1,82 ^(b)
Metanol 50% + Acetona 70% [¥]	92,79 ± 0,00 ^(f)
Metanol 50% acidificado + Acetona 70% [§]	44,41 ± 0,48 ^(a)

Onde: [†] Bystrom et al. (2008); [‡] Majhenic et al. (2007); [¥] Larrauri et al. (1997); e [§] Pérez-Jiménez & Saura-Calixto (2005).

* EAG = equivalentes de ácido gálico.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Em estudo de otimização do processo de extração de CF do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade), também conhecido como uva-do-monte ou bilberry, foi observado que os teores de CF totais encontrados não variaram de forma significativa conforme aplicados volumes distintos de solvente (Vizzoto & Pereira, 2009). Sendo assim, no presente estudo, com o objetivo de evitar o uso excessivo de solvente, bem como poupar amostra, foi realizado teste de redução da quantidade de amostra e solvente utilizados para a extração de CF, encontrando nenhuma interferência no resultado final. O método aplicado a partir de então se baseou na pesagem de 0,5 g de amostra para 20 mL de solvente em ambas as etapas.

Dando continuidade, determinado o método mais eficiente, a primeira variável proposta foi a proporção do solvente. A proporção de solvente metanol:água que apresentou maior capacidade de extração de CF totais foi metanol:água (30:70, v:v) (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Eficiência de extração de compostos fenólicos totais do guaraná em pó, empregando-se diferentes concentrações do solvente de extração, seguido de re-extração com acetona 70%.

Extração	Fenólicos totais (mg EAG*/g de guaraná em pó comercial)
Metanol 30% + Acetona 70%	91,86 ± 2,24 ^(c)
Metanol 50% + Acetona 70%	81,40 ± 1,33 ^(b)
Metanol 80% + Acetona 70%	84,62 ± 1,08 ^(b)
Metanol 99% + Acetona 70%	70,09 ± 0,31 ^(a)

* EAG = equivalentes de ácido gálico.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

As mesmas concentrações do solvente metanol:água da primeira etapa de extração foram testadas (30:70, 50:50, 80:20, e 99:1, v: v), porém sem a segunda etapa, constituída pelo solvente acetona:água (70:30, v:v), a fim de se fazer uma comparação entre a eficiência de extração dos solventes individuais e combinados.

Com este teste, foi possível observar que o solvente metanol:água (30:70, v:v), quando aplicado isoladamente, não apresenta a mesma eficiência de extração do que quando seguido de acetona (Tabela 2.4). O metanol, quando empregado isoladamente, apresentou resultados maiores quando nas concentrações 50:50 e 80:20 (v:v).

Tabela 2.4. Eficiência de extração de compostos fenólicos totais do guaraná em pó, empregando-se diferentes concentrações do solvente de extração.

Extração	Fenólicos totais (mg EAG*/g de guaraná em pó comercial)
Metanol 30%	68,40 ± 1,52 ^(b)
Metanol 50%	80,13 ± 2,95 ^(c)
Metanol 80%	81,83 ± 1,07 ^(c)
Metanol 99%	63,15 ± 0,92 ^(a)

* EAG = equivalentes de ácido gálico.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Após determinada a concentração do solvente que extrai o maior teor de CF totais, ou seja, metanol:água (30:70, v:v) seguido de acetona:água (70:30, v:v), foram avaliados métodos e tempos distintos de extração.

Tendo em vista que a temperatura branda de extração de CF não influencia o conteúdo total encontrado e que, quando sob altas temperaturas, este conteúdo diminui, pois são substância altamente oxidáveis, optou-se por prosseguir as análises em temperatura ambiente de forma a evitar a degradação e conseqüente perda das mesmas (Andreo & Jorge, 2006; Caetano et al., 2009).

Com relação ao tempo, geralmente, o período de extração varia em torno de 1 minuto a 24 horas. Entretanto, períodos demasiadamente longos de extração aceleram a oxidação dos fenólicos exigindo que agentes redutores sejam adicionados ao solvente do sistema (Nacz & Shahidi, 2004).

No presente estudo, foi observado que a extração com agitação magnética por 1 hora apresentou teor significativamente maior de CF totais (Tabela 2.5). Da mesma forma, a extração por 2 horas também demonstrou eficiência. Porém, com o intuito de preservar os compostos presentes na amostra e acelerar o processo de extração, otimizando tempo, optou-se por prosseguir as análises empregando-se extração com agitação magnética por 1 hora.

Tabela 2.5. Influência do método e tempo na eficiência da extração de compostos fenólicos totais do guaraná em pó.

Extração	Fenólicos totais (mg EAG*/g de guaraná em pó comercial)
Extração por 10 minutos em Ultra-turrax	68,40 ± 1,52 ^(b)
Extração por 1 hora com agitação magnética	77,70 ± 3,06 ^(c)
Extração por 2 horas com agitação magnética	73,03 ± 1,67 ^(b, c)
Extração por 15 minutos em sonicador	33,43 ± 0,33 ^(a)
Extração por 30 minutos em sonicador	35,68 ± 1,29 ^(a)

* EAG = equivalentes de ácido gálico.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Em seguida, analisou-se a influência do número de extrações no teor de CF extraídos. De acordo com os resultados observados na Tabela 2.6, mais do que o solvente empregado, o número de extrações influenciou o teor final de CF totais, desde que pelo menos em uma das extrações seja utilizada a acetona. Outro dado importante a ser destacado é o fato de que

quando se extrai cinco vezes, o teor de CF começa a diminuir, confirmando o fato de que estes são compostos altamente oxidáveis quando expostos à temperatura ambiente por muito tempo.

Tabela 2.6. Influência do número de extrações na eficiência de extração de compostos fenólicos totais do guaraná em pó.

Extração Solvente (nº de extrações)	Fenólicos totais (mg EAG*/g de guaraná em pó comercial)
Metanol:água (1)	65,84 ± 0,59 ^(a)
Metanol:água (2)	86,05 ± 1,45 ^(b)
Metanol:água (3)	87,26 ± 2,22 ^(b)
Metanol:água (1) + Acetona:água (1)	89,38 ± 3,25 ^(b, c)
Metanol:água (2) + Acetona:água (1)	93,99 ± 2,75 ^(b, c, d)
Metanol:água (3) + Acetona:água (1)	100,08 ± 2,35 ^(d, e)
Metanol:água (1) + Acetona:água (2)	97,18 ± 6,05 ^(c, d)
Metanol:água (1) + Acetona:água (3)	97,94 ± 0,95 ^(d, e)
Metanol:água (2) + Acetona:água (2)	106,04 ± 3,51 ^(e)
Metanol:água (2) + Acetona:água (3)	101,06 ± 2,04 ^(d, e)

* EAG = equivalentes de ácido gálico.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Assim, optou-se por padronizar o método de extração empregando-se quatro extrações, duas com solução metanol:água (30:70, v:v) e duas com acetona:água (70:30, v:v), com agitação magnética por 1 hora, tendo em vista que este foi o método que apresentou melhores resultados no conteúdo total de CF.

2.4.2. Planejamento experimental para otimização do processo de extração de compostos fenólicos e proantocianidinas totais

A matriz do planejamento experimental para CF e PA totais encontra-se na Tabela 2.7. Os resultados de CF e PA totais variaram entre 105,95 e 122,82 mg EAG/ g guaraná, e 58,21

e 86,63 mg EqCI/ g guaraná, respectivamente.

Tabela 2.7. Delineamento experimental para o teor de compostos fenólicos totais e proantocianidinas em função do solvente de extração e sua concentração.

Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes	
Ensaio	Água (%)	Acetona/metanol (%)	CF totais (mg EAG*/ g guaraná)	PA totais (mg EqCI**/ g guaraná)
1	29 (-1)	15 (-1)	115,08	80,22
2	71 (+1)	15 (-1)	105,95	58,98
3	29 (-1)	85 (+1)	112,5	86,36
4	71 (+1)	85 (+1)	116,17	69,63
5	20 (-1,41)	50 (0)	116,19	83,58
6	80 (+1,41)	50 (0)	110,23	58,21
7	50 (0)	0 (-1,41)	109,34	62,98
8	50 (0)	100 (+1,41)	122,82	81
9	50 (0)	50 (0)	116,1	70,50
10	50 (0)	50 (0)	119,51	78,05
11	50 (0)	50(0)	115,28	71,74

* EAG = equivalentes de ácido gálico.

** EqCI = equivalentes de cloreto de cianidina.

Os efeitos das variáveis independentes sobre o teor de CF do guaraná estão apresentados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8. Efeito das variáveis independentes sobre o teor de compostos fenólicos totais do guaraná.

Fator	Efeito	DP	p	R ² = 0,86
Média	115,7032	1,8581	0,0000	
Água (L)	-3,4762	1,8609	0,1351	
água (Q)	-3,6215	2,4675	0,2160	
Acetona/Metanol (L)	6,6816	1,8609	0,0229	
Acetona/Metanol (Q)	-0,7344	2,4675	0,7808	

Água x Acetona/Metanol 6,4000 2,6278 0,0710

Onde: L: efeito linear; Q: efeito quadrático; DP: desvio padrão; p: nível de significância; e R^2 : coeficiente de correlação.

Em negrito estão os efeitos dos fatores que são significativos para CF. O parâmetro água: acetona/metanol pode ser considerado significativo, pois o valor está muito próximo de 0,05. Dessa forma, os parâmetros que exerceram maior influência na extração de CF totais, em ordem de significância, foram: média, acetona/metanol (L) e interação água: acetona/metanol.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, verificou-se pela análise de variância (ANOVA) a significância da regressão e do resíduo ao nível de 95% de confiança, utilizando teste F, para o planejamento estudado, conforme Tabela 2.9.

Tabela 2.9. Significância da regressão e do resíduo ao nível de 95% de confiança dos efeitos dos parâmetros significativos do processo de extração de CF totais.

	SQ	GL	QM	F_{calculado}	F_{tabelado}	R²
					(0,05;2;7)	
Regressão	129,9813	2	64,9906	6,7397	4,74	0,65
Resíduo	67,5003	7	9,6429			
Total	197,4816	9				

Onde: SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; e R^2 : coeficiente de correlação.

Barros Neto et al. (2003) sugeriram que para uma regressão ser significativa não apenas estatisticamente, mas também útil para fins preditivos, o valor de F calculado para a regressão deve ser, no mínimo, quatro vezes o valor do F tabelado. Portanto, o modelo representou regressão não significativa. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) obtido para modelo ajustado foi de 0,65, indicando que este elucida apenas 59% da variação dos dados observada. Sendo assim, como modelo não é significativo, não se gera as superfícies de resposta e curvas de contorno.

Os efeitos das variáveis independentes sobre o teor de PA estão apresentados na Tabela 2.10. Em negrito estão os efeitos dos fatores que são significativos para PA.

Tabela 2.10. Efeitos das variáveis independentes sobre o teor de proantocianidinas totais do guaraná.

Fator	Efeito	DP	p	R² = 0,97
Média	71,1066	1,6662	0,0000	
Água (L)	-18,4904	1,6687	0,0003	
Água (Q)	0,9201	2,2127	0,6988	
Acetona/Metanol (L)	10,7224	1,6687	0,0030	
Acetona/Metanol (Q)	2,2228	2,2127	0,3719	
Água x Acetona/Metanol	2,2550	2,3564	0,3927	

Onde: L: efeito linear; Q: efeito quadrático; DP: desvio padrão; p: nível de significância; e R²: coeficiente de correlação.

Os parâmetros que exerceram maior influencia na extração de CF totais, em ordem de significância, foram: média, água (L) e acetona/metanol (L).

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, verificou-se pela ANOVA a significância da regressão e do resíduo ao nível de 95% de confiança, utilizando teste F, para o planejamento estudado, conforme Tabela 2.11.

Tabela 2.11. Significância da regressão e do resíduo ao nível de 95% de confiança dos efeitos dos parâmetros significativos do processo de extração de PA totais.

	SQ	GL	QM	F_{calculado}	F_{tabelado}	R²
					(0,05;2;7)	
Regressão	911,0158	2	455,5079	96,9124	4,74	0,96
Resíduo	32,902	7	4,7002			
Total	943,9178	9				

Onde: SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; e R²: coeficiente de correlação.

Analisando os resultados, é possível constatar que o modelo apresentou regressão significativa e que o coeficiente de determinação (R²) obtido para o modelo ajustado foi de 0,96, indicando que este responde 96% das variações dos dados observadas.

A equação de regressão obtida para PA totais esta exposta na Equação 1:

$$PA = 72,3600 - 9,2452 \times \text{Água} + 5,3612 \times \text{Acetona/Metanol (L)}$$

Para atingir uma extração acima de 80% de PA totais a porcentagem de água deve ser inferior a 20% e a proporção dos solventes acetona/metanol não interferiu na extração desses compostos (Figura 2.2).

Figura 2.2. Curva de contorno do teor de PA totais em função da proporção de água: acetona/metanol.

A ausência de significância na avaliação da interferência da proporção dos solventes em relação à extração de CF totais, permite-nos supor que os CF presentes no guaraná em pó possuem polaridade variada. Em contrapartida, os resultados observados na extração de PA totais indicam que a proporção dos solventes interfere diretamente no teor extraído, caracterizando-as como compostos com alta polaridade.

2.5. Discussão

A análise de CF é influenciada, principalmente, pela natureza do composto, bem como pelo método, solvente e tempo de extração empregados (Nacz & Shahidi, 2004; Stalikas, 2007). Assim, o processo de extração dos CF naturalmente presentes nos alimentos pode ser realizado de diversas maneiras, variando tanto o solvente quanto o método de extração empregada, de acordo com o objetivo. A eficiência do processo de extração depende da

combinação de pelo menos dois ciclos de extração, utilizando-se soluções de solventes orgânicos aquosos, com diferentes polaridades, de modo a extrair compostos com diferentes estruturas químicas (Pérez-Jiménez et al. 2008).

No presente estudo, o método de extração de CF mais eficiente foi o que utilizou quatro extrações, sendo duas com solução metanol:água (30:70, v:v) e duas com acetona:água (70:30, v:v), e agitação magnética por 1 hora.

Lapornik et al. (2005) desenvolveram um estudo com resíduos de frutas vermelhas e observaram que o conteúdo de fenólicos nos extratos metanólico e etanólico aumentou com o aumento do tempo de extração, corroborando com o presente estudo.

O metanol é tido como o solvente mais adequado para a obtenção de extrato bruto, visto que possibilita a extração de um maior número de compostos em função da sua polaridade média (Cechinel Filho & Yunes, 1998). A água, em combinação com outros solventes orgânicos, contribui para criar um meio moderadamente polar favorecendo a extração de CF (Naczki & Shahidi, 2004; Shi et al., 2005).

Estudos sugerem que a mistura do solvente metanol com água, como co-solvente, aumenta consideravelmente o rendimento de extração devido ao aumento da permeabilidade do solvente na matriz do alimento (Pekic et al., 1997).

Yilmaz & Toledo (2006) relataram que misturas de acetona:água, nas proporções 50:50 e 75:25 (v:v), foram mais eficientes na extração de CF em semente de uva do que os sistemas etanol:água 60:40 e metanol:água 70:30 (v:v). Igualmente, Majhenic et al. (2007) constaram que o extrato de semente de guaraná que possuía maior quantidade de CF totais foi o obtido por solução acetona:água (35:65, v:v), bem como em estudo realizado com mirtilo (Vizzoto & Pereira, 2009). Tais pesquisas corroboram com o presente estudo, o que nos permite supor que este resultado foi encontrado em função do já conhecido elevado teor de PA presentes no guaraná (Majhenic et al., 2007), moléculas de alto grau de polimerização e, portanto, menos polares e mais solúveis em acetona.

Caetano et al. (2009), em estudo desenvolvido com resíduos agroindustriais da acerola, observaram que o processo de extração sequencial empregando solventes de diferentes polaridades e três ciclos de extração para cada solvente permitiu uma extração de CF variada. Isso evidencia que o número de extração somente não resulta em um maior teor de compostos extraídos e sim a necessidade da utilização de solventes de diferentes polaridades de forma sequencial, com o intuito de se extrair uma maior variedade de compostos. Neste mesmo estudo, a maioria dos CF presentes na acerola foi solubilizada em

acetona:água (80:20, v:v). Concordando com a presente pesquisa, Manian et al. (2008), ao analisarem o figo, também encontraram maior eficiência de extração desses fitoquímicos quando empregada acetona:água na proporção de 70:30 (v:v) em sequência à solução hidrometanólica.

Autores relatam que solventes de alta polaridade, como a água, e solventes apolares, não resultam em extrações eficientes (Liu et al., 2000, Chirinos et al., 2006). Portanto, é possível supor que os CF do guaraná possam apresentar características moderadamente polares.

Tendo em vista o exposto acima é possível constatar a complexidade da otimização de um processo de extração de CF. Levando em consideração que pesquisas científicas geralmente exigem tempo e elevado número de ensaios, o que as torna, muitas vezes, inviáveis, diversas tentativas têm sido realizadas a fim de reduzir o número de pontos experimentais e, com isso, poupar tempo e gasto garantindo a mesma confiabilidade (Mateus et al., 2001).

No presente estudo, os resultados do processo de extração realizado pela análise de DCCR permite-nos supor que para atingir uma extração acima de 80% de PA totais a porcentagem de água deve ser inferior a 20%, sendo que a proporção dos solventes acetona/metanol não interferiu na extração desses compostos. Avaliados os parâmetros que exerceram maior influência na extração de CF totais verificou-se ausência de significância no modelo de regressão.

Ainda são poucos os estudos que utilizam o DCCR como ferramenta para a padronização do processo de extração de CF. Além disso, os poucos dados existentes são conflitantes. Em estudo desenvolvido com diversas espécies de cebola, no qual foi otimizado método de extração de CF por meio de planejamento fatorial 2^4 , o solvente metanol apresentou maior eficiência de extração quando comparado ao solvente acetato de etila. Depois de identificado o solvente ótimo para a extração, foram avaliados a influência do tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções de agitação (Souza et al., 2009).

Em estudo desenvolvido com carambola, o resultado do DCCR apontou que a concentração do solvente acetona foi o fator principal na influência da extração de CF. As condições ótimas de extração de CF da carambola foram acetona:água (49:51, v:v), temperatura de 48,82°C e duração de 126,49 min (Yap et al., 2009). Semelhante, em pesquisa realizada com folhas de henna, as condições ótimas para a extração de CF definidas pelo DCCR foram: solvente acetona:água (48:52, v:v), duração de 73,78 min e temperatura de

39,57°C (Uma et al., 2010).

2.6. Conclusões parciais

Em suma, os compostos fenólicos do guaraná em pó foram extraídos em maior quantidade quando empregada a mistura dos solventes metanol:água (30:70, v:v) e acetona:água (70:30, v:v) e quatro ciclos de extração, indicando a necessidade da utilização da acetona em ao menos um ciclo de extração. Tal fato provavelmente se deve ao elevado teor de PA presente na semente do guaraná, composto este de alta afinidade com a acetona. O tempo de homogeneização também interferiu de forma crescente ao conteúdo de CF totais.

O DCCR foi de grande importância para delinear estatisticamente a melhor condição de extração de PA totais e indicou ser uma importante ferramenta na otimização deste processo, a partir da combinação das variáveis de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz** 2007 66 (1): 232-240.
- Andreo D, Jorge N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração**. B.CEPPA, Curitiba 2006; 24 (2): 319-336.
- Barros-Neto B de, Scarmínio IS, Bruns RE. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, Editora da UNICAMP, 2ª edição, 2003.
- Bystrom Fontes LM, Lewis BA, Brown DL, Rodriguez E, Obendorf RL. Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. ‘Montgomery’ fruits. *Food Chemistry* 111 (2008) 1017–1024.
- Caetano ACS, Melo EA, Lima VLAG, Maciel MIS, Araújo CR. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Braz. J. Food Technol.** 2009; 12 (2): 155-160.
- Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente

- ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova** 1998; 21 (1).
- Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavon) Tubers. **Separation and Purification Technology** 2006; 55: 217-225.
- Escríbano-Bailón MT, Santos-Buelga C. Methods in polyphenol analysis. Polyphenol Extraction from Foods. **The Royal Society of chemistry** 2003: 1-15.
- Fontes, LCB, Oliveira FG, Collares-Queiroz FP. Optimization of the deep-fat processo f sweet chips in palm olein or stearin. **American Journal of Food Technology** 2011; 6(5): 348-361.
- Hellström JK, Mattila PH. HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. **J. Agric. Food Chem.** 2008; 56: 7617-7624.
- King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc** 1999; 50 (2): 213-8.
- Lapornik B, Prosek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, 2005; 71 (2): 214-222.
- Larrauri JÁ, Rupérez P, Saura-Calixto F. Effects of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **J. Agric. Food Chem.** 1997; 45: 1390-1393.
- Liu FF, Ang CYW, Springer D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* Using Surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 2000; 48: 3364-3371.
- Majhenic L, Kerget MS, Knez ZE. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extract. **Food Chem.** 2007; 104: 1258-68.
- Manian R, Anusuya N, Siddhuraju P, Manian S. The antioxidant activity and free radical scavenging potencial of two different solvent extracts os *Camellia sinensis* (L) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemistry** 2008; 107 (3): 1000-1007.
- Mateus NB, Barbin D, Conagin A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum** 2001; 23(6): 1537-1546.
- Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr A** 2004; 1054 (1/2): 95-111.

- Pekic B. et al. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. **Food Chemistry** 1998; 61 (1/2): 201-206.
- Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. **J. Agric. Food Chem.** 2005; 53: 5036-5040.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díazrubio ME, Serrano J, Goni I, Saura-Calixto F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International** 2008; 41 (3): 274-285.
- Porter, L.J., Hrtstich, L.N., and Chan, B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry*, 25:223–230. In: Shahidi F, Nacz M. *Phenolics in Food & Nutraceuticals*. Editora CRC PRESS, Boca Raton, Florida, 2004.
- Rodrigues MI, Iemma AF. *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos*. 1ª edição, Casa do Pão Editora, Campinas, SP, 326p. 2005.
- Saura-Calixto F, Goni I, Manas E, Abia R. Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fibre constituents: determination in grape pomaces. **Food Chemistry** 1991; 39 (3), 299–309.
- Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda I, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - engineering and technology. **Food Reviews International** 2005; 21: 139-166.
- Singleton VL, Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vitic** 1965; 16: 144-58.
- Souza MM, Recart VM, Rocha M, Cipolatti EP, Bandiale-Furlong E. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* (Impr.) 2009; 68(2).
- Stalikas CD. Review. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **J. Sep. Sci.** 2007; 30: 3268 – 3295.
- Uma DB, Ho CW, Wan Aida WM. Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) Leaves. **Sains Malaysiana** 2009; 39 (1): 119-128.
- Vizzotto M, Pereira MC. **Metodologia Científica: Otimização do Processo de Extração de Compostos Fenólicos Antioxidantes de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)**. Pelotas:

Embrapa Clima Temperado, 2009; 19 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 101).

Yap CF, Ho CW, Wan Aida WM, Chan SW, Lee CY, Leong YS. Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolic Compounds from Star Fruit (*Averrhoa carambola* L.) Residues. **Sains Malaysiana** 2009; 38(4): 511–520.

Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis** 2006; 19 (1): 41-44.

CAPÍTULO 3

GUARANÁ (*Paullinia cupana*): CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

RESUMO

O Brasil abriga uma grande variedade de frutas nativas ainda inexploradas, dentre elas o guaraná. Estudos indicam que o guaraná pode apresentar capacidade antioxidante justificada pela presença de alguns polifenóis. Portanto, este capítulo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e caracterizar os principais compostos bioativos do guaraná e suas frações. Foram analisados o guaraná fruto, separado manualmente em polpa, casca e semente, e o guaraná em pó comercial. Foram realizadas as seguintes análises: (a) composição centesimal; (b) CF e PA totais (extraíveis e não- extraíveis), empregando Folin-Ciocalteau e hidrólise ácida (butanol-HCl), respectivamente; (c) principais compostos bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); (d) carotenóides totais por espectrofotometria; (e) fitosteróis por Cromatografia Gasosa; e (f) atividade antioxidante *in vitro* pelo teste ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e pelo Ensaio radical DPPH[•] (1,1-difenil-2-2picrilhidrazil). As frações polpa, casca e semente do guaraná e o guaraná em pó comercial apresentaram, 2, 14, 51 e 129 mg EAG/g de CF extraíveis e 0, 3, 2 e 4 mg EAG/g de CF não-extraíveis. Os teores de PA extraíveis e não-extraíveis das frações foram 6, 15, 28 e 46 mg EqCI/ g e 0, 3, 2 e 4 mg de EqCI/ g, respectivamente. Os compostos bioativos encontrados nas amostras foram catequina, epicatequina, PA B1, PA B2, cafeína e teobromina nas seguintes concentrações: 30,05; 20,23; 3,72; 3,37; 39,82 e 0,14 mg/g de pó comercial, respectivamente; 6,63; 0,26; 0,17; 0,06; 35,63 e 0,25 mg/g de semente, respectivamente; e 0,07; 0,01; 0,03; 0,03; 0,02 e 1,17 mg/g de casca, respectivamente. Não foram encontrados CF na polpa. A casca apresentou maior conteúdo de teobromina e nenhuma das amostras apresentou teofilina. Os carotenóides só foram encontrados na casca (34 µg/g). Os fitosteróis encontrados nas amostras foram o brassicasterol, campesterol, stigmasterol e β-sitosterol nas seguintes concentrações: 0; 8,01; 6,45 e 40,45 µg/ g de polpa, respectivamente; 225,79; 1110,34; 126,41 e 830,49 µg/g de casca, 4,19; 7,94; 9,86 e 98,59 µg/ g de semente; e 5,85; 23,90; 11,92 e 151,33 µg/g de pó comercial, respectivamente. A atividade antioxidante dos

extratos de fenólicos extraíveis pelo método ORAC foi de 258, 1007, 948 e 2693 $\mu\text{M ET/g}$ de polpa, casca, semente e pó, respectivamente. Por DPPH foi possível avaliar a fração extraível e a não extraível das amostras, sendo necessários 119, 67 e 24 g de casca, semente e pó de guaraná para inibir 1g de DPPH, e 475, 347 e 249 g de casca, semente e pó de guaraná para inibir 1g de DPPH, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que o guaraná é uma boa fonte de compostos antioxidantes, oferecendo possíveis efeitos benéficos à saúde quando consumidos diariamente.

Palavras-chave: guaraná, atividade antioxidante, compostos bioativos.

3.1. Introdução

Há uma crescente evidência científica associando dieta rica em frutas e verduras à diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e processos degenerativos relacionados ao envelhecimento (Kris-Etherton et al., 2002; Stanner et al., 2004).

Estudos indicam que os compostos bioativos presentes nas plantas são capazes de impedir ou reduzir o estresse oxidativo e, conseqüentemente, as doenças geradas por esse processo (Weisburger & Williams, 2000; Zumbé, 1998; Wollgast & Anklam, 2000).

O Brasil abriga uma variedade imensa de frutas nativas ainda inexploradas de grande interesse para a agroindústria e possível fonte de rendimentos para a população (Alves et al., 2008; Arraz et al., 2009; Rufino et al., 2010).

Estudos recentes indicam que o guaraná, planta nativa do Brasil, pode apresentar capacidade antioxidante justificada pela presença considerável de polifenóis, especialmente taninos condensados, além de altos teores de alcalóides do tipo metilxantinas, como a cafeína (Basile et al., 2005; Fukumasu et al., 2006; Majhenic et al., 2007).

Em suma, além de ser usado como estimulante dos sistemas nervoso e cardiovascular, o guaraná vem sendo empregado na medicina popular com uma variedade de propósitos terapêuticos, como anti-diarréico, diurético, analgésico, antipirético e no tratamento de enxaqueca (Henman, 1982; Majhenic et al., 2007).

Diversos fatores decorrentes do processamento podem afetar a capacidade

antioxidante de vegetais, positiva ou negativamente. Tendo em vista que o guaraná passa pelo processo de torrefação, e o aquecimento pode ocasionar decréscimo de polifenóis, bem como favorecer a formação de novos compostos como os produtos da reação de Maillard, faz-se necessário levar em consideração essa possível alteração analisando a matéria-prima antes do processamento (Nicoli et al., 1999; Daglia et al., 2000; López-Galilea et al., 2006).

A geração de elevadas quantidades de resíduos agroindustriais pela indústria de alimentos é considerada um dos principais problemas ambientais. Assim, diversos estudos vêm sendo realizados com esses subprodutos a fim de verificar a presença de possíveis compostos bioativos e sua aplicação em indústria farmacêutica ou cosmética, por exemplo (Will et al., 2000; Waldron, 2001; Farah & Donangelo, 2006; Food and Agriculture Organisation, 2006; Ishimoto, 2008).

Assim, o objetivo deste capítulo foi estimar a capacidade antioxidante *in vitro*, bem como a caracterização de compostos bioativos do guaraná e suas frações, contribuindo para o aumento do conhecimento acerca desta fruta nativa.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos deste capítulo desenvolvidos nas frações casca, polpa, semente e pó comercial no guaraná foram:

- (a) Determinar a composição centesimal;
- (b) Determinar o teor de compostos fenólicos totais (extraíveis e não-extraíveis);
- (c) Determinar o teor de proantocianidinas totais (extraíveis e não-extraíveis);
- (d) Quantificar os principais compostos fenólicos;
- (e) Quantificar as metilxantinas;
- (f) Determinar o teor de carotenóides totais;
- (g) Quantificar os principais fitoesteróis;
- (h) Avaliar a capacidade antioxidante total das amostras utilizando testes *in vitro*.

3.3. Material e métodos

3.3.1. Material

As amostras de guaraná, fruto (Figura 3.1) e pó comercial, foram fornecidas pela Empresa Guaranápis. A safra dos frutos utilizados é referente ao período de novembro a março de 2010 e o guaraná em pó lote número 03 2010.

Guaraná *in natura*

Figura 3.1. Guaraná *in natura* fornecido pela empresa Guaranápis.

3.3.2. Métodos

3.3.2.1. Preparo das amostras

O fruto foi separado manualmente em casca, polpa e semente. As amostras foram armazenadas em embalagem a vácuo, na ausência de luz e mantido a -20°C até o momento das análises (Figura 3.2). Após o primeiro descongelamento, as amostras foram acondicionadas em pequenas porções e embaladas a vácuo, de forma a evitar o descongelamento freqüente das mesmas e conseqüente degradação. Dessa forma, a cada análise as amostras foram trituradas com auxílio de moedor de café (modelo Cadence) até que

alcançassem a forma de pó, e homogeneizadas (Figura 3.3). Para análise do guaraná em pó comercial foram homogeneizadas três amostras de um mesmo lote (03 2010) e armazenadas em recipiente próprio em temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata.

Figura 3.2. Guaraná após separação manual e embalagem a vácuo. Onde: (A) Casca *in natura*; (B) Polpa + semente *in natura*; (C) Casca embalada a vácuo; (D) Semente, sem a polpa, embalada a vácuo; e (E) Polpa embalada a vácuo.

Figura 3.3. Guaraná após porcionamento e embalagem a vácuo e após trituração. Sendo: (A) Casca porcionada e embalada a vácuo; (B) Semente porcionada e embalada a vácuo; (C) Polpa porcionada e embalada a vácuo; (D) Semente, Casca e polpa; (E) Semente triturada; e (F) Casca triturada.

3.3.2.2. Composição nutricional

As amostras foram analisadas conforme método preconizado pela AOAC (1995) para

umidade, proteínas, lipídios e cinzas.

- ❖ Umidade: realizada por método gravimétrico, o qual se baseia na determinação da perda de peso do alimento submetido a aquecimento em estufa a 105°C, resultando no resíduo seco ou dessecado.
- ❖ Proteínas: realizadas por meio do método de Micro-Kjeldhal, o qual envolve as etapas de digestão, destilação e titulação para a determinação da concentração de nitrogênio da amostra, a partir do qual se calculou o teor de proteína total. Foi utilizado o fator 5,75 para conversão de nitrogênio total em proteína bruta.
- ❖ Cinzas (Resíduo Mineral Fixo): determinadas por incineração do produto a 550°C. Foram pesados aproximadamente 2 g de cada amostra dessecada em cadinhos calcinados e tarados.
- ❖ Carboidratos: determinados por diferença das porcentagens de umidade, proteínas, cinzas, fibras e lipídios.
- ❖ Valor energético dos alimentos em 100 g: para a estimativa foram empregados os coeficientes de Atwater (Watt & Merrill, 1963), ou seja, 4 kcal/g (17 kJ/g) para proteínas, 4 kcal/g (17 kJ/g) para carboidratos e 9 kcal/g (37 kJ/g) para lipídios.
- ❖ Lipídios totais: determinados pelo método de extração por Soxhlet. Foram pesados 2 g de cada amostra e transferidas para o cartucho de extração. Em seguida, os cartuchos contendo as amostras foram pendurados no extrator de Soxhlet e os reboilers, previamente tarados, foram acondicionados em seus respectivos “buracos”. Em seguida, o solvente foi adicionado e, após abertura da água, iniciou-se o refluxo. Após 3 horas de cartucho mergulhado no solvente e 3 horas do cartucho suspenso, o solvente foi evaporado e os reboilers foram levados à estufa 105°C e pesados após resfriados.
- ❖ Fibras: As análises de fibras totais foram padronizadas em nosso Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública/USP. O método utilizado foi o enzimático-gravimétrico (Lee *et al.*, 1992), cujos procedimentos estão resumidamente descritos a seguir:
 - Em cadinhos de fundo de vidro sinterizado (capacidade 50 mL; porosidade 40-60 mm) foram adicionados, aproximadamente, 1g de lã de vidro como auxiliar de filtração. Os cadinhos foram deixados 24 horas em solução de extrato a 2%, depois lavados com auxílio de cepilho e enxaguados com água destilada. Foram secos em estufa a 105°C e incinerados em mufla a 525°C por 5 horas, resfriados e lavados com HCl 0,5N.

- Um grama de amostra (casca, polpa e semente de guaraná e guaraná em pó) foi pesado em triplicata. Em seguida, foram adicionados 40 mL de solução tampão MES/TRIS, 50 µL de enzima α -amilase, 100 µL de protease, 5 mL de HCl 0,561N e 100 µL de amiloglicosidase. A partir deste hidrolisado foram determinados os teores de fibra alimentar total (FT).
- Os resultados de FT foram obtidos após subtração dos valores de cinzas, proteínas ($N \times 5,75$ – determinado por destilação em micro-Kjeldahl) e brancos (resíduo das provas em branco corrigido para cinzas e proteínas).

3.3.2.3. Método de extração de compostos fenólicos (extraíveis e não-extraíveis)

Para a extração de compostos fenólicos extraíveis (ou livres), foi utilizado o método de extração padronizado no capítulo 2 que emprega quatro ciclos de extração, sendo duas com solução metanol:água (30:70, v:v) e duas com acetona:água (70:30, v:v), sob agitação magnética por 1 hora cada e centrifugação a $18000 \times g$ por 15 min em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram recolhidos a cada etapa e juntados em balão volumétrico para análise.

Já os compostos fenólicos não-extraíveis das amostras foram determinados nos resíduos da extração de fenólicos livres. O método de análise empregado foi o descrito por Hartzfeld et al. (2002), o qual emprega hidrólise ácida.

Todo o resíduo da extração de fenólicos livres (aproximadamente 0,5g) foi transferido para tubos Pyrex (capacidade de 70 mL) com tampa rosqueada de teflon. Foram adicionados 10 mL de metanol e 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Os tubos foram tampados com força de forma a evitar que o solvente fosse evaporado e que o espaço restante dentro do tubo funcionasse como condensador. Os tubos foram então acondicionados em bloco previamente aquecido a $85^\circ C$ e deixados por 20 h. Após resfriadas, as amostras foram transferidas para tubo de centrifuga e centrifugados nas mesmas condições descritas acima, sendo o sobrenadante recolhido em balão volumétrico, acondicionados em frascos âmbar e analisados.

3.3.2.4. Quantificação de compostos fenólicos totais (extraíveis e não-extraíveis)

A determinação de compostos fenólicos totais das três frações do fruto e do pó comercial foi realizada também de acordo com Singleton & Rossi (1965), o qual emprega o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito no item 2.3.2.4 (capítulo 2). Foi utilizado o ácido gálico como padrão e os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/ g de amostra (mg EAG/g).

3.3.2.5. Quantificação de proantocianidinas totais (extraíveis e não-extraíveis)

O conteúdo de PA totais foi determinado por meio de método espectrofotométrico descrito por Porter et al. (1986), de acordo com o item 2.3.2.5 do capítulo 2.

Para a análise das PA não-extraíveis (ou hidrolisáveis), todo o resíduo da extração de compostos fenólicos extraíveis (método padronizado no capítulo 2) foi transferido para o tubo e adicionados os reagentes. Os mesmos procedimentos descritos para PA extraíveis foram executados. No entanto, ao serem resfriados, antes da leitura, todo o volume dos tubos foi transferido para tubos de centrífuga, sendo os tubos lavados 2 vezes com 2 mL de n-butanol cada e centrifugados a $18000 \times g$ por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e acondicionado em balão volumétrico de 25 mL e o resíduo lavado 2 vezes de 5 mL cada com n-butanol, seguido de re-centrifugação. Os sobrenadantes foram unidos, o volume ajustado com butanol e, em seguida, realizada a leitura da absorbância. Foi feito um branco contendo somente o solvente de extração (metanol: acetona: água), o butanol-HCl e o reagente de ferro.

3.3.2.6. Determinação dos principais compostos fenólicos e metilxantinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A separação dos compostos foi realizada em um sistema de Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência com detector eletroquímico (HPLC-ECD), equipado com bomba Modelo 584, injetor automático Modelo 542 mantido a 4°C, detector Eletroquímico Multicanal Coularray™ Modelo 5600A com 8 canais, programados de acordo com a Quadro 3.1, e UV-vis Modelo 528 a 272 nm, ambos da Marca ESA (Chelmsford, MA).

Quadro 3.1. Potenciais de detecção dos canais.

Potenciais de detecção dos canais								
Canal	1	2	3	4	5	6	7	8
Comprimento de onda (nm)	100	200	300	400	500	600	700	UV a 272

Foi utilizada coluna cromatográfica T3 Atlantis® (4,6 × 150 mm) com diâmetro de partícula de 5 µm, e pré-coluna T3 Atlantis® (T3 4,6 × 20mm), ambas da Marca Waters Co (Milford, MA).

As fases móveis utilizadas foram:

- (a) fase A, composta por água:acetonitrila 98:2 (v:v) em 5 mM de acetato de amônio; pH 3,6, ajustado com ácido fórmico; e
- (b) fase B, composta por água: acetonitrila 30:70 (v:v) em 5 mM de acetato de amônio; pH 3,6, ajustado com ácido fórmico.

O fluxo aplicado foi de 0,8 mL/minuto com o gradiente de concentração de acordo com o Quadro 3.2.

Quadro 3.2. Gradiente de concentração da fase móvel B.

Gradiente de concentração							
Minutos	0,0	40	100	110	120	122	135
% B	5,0	10	30	100	100	5,0	5,0

A identificação dos analitos foi realizada pela comparação do tempo de retenção dos picos identificados na amostra com os picos obtidos pela injeção de padrões comerciais, e confirmados por voltamograma. Os resultados foram calculados a partir da elaboração de curva de calibração dos padrões catequina, epicatequina, proantocianidina B1, proantocianidina B2, cafeína, teobromina e teofilina.

A análise foi desenvolvida utilizando-se o extrato obtido de acordo com o descrito no

item 2.4.1 (capítulo 2).

Os métodos para análise das catequinas e metilxantinas do guaraná foram validados determinando-se a linearidade, bem como os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), calculada para cada analito.

A identidade dos compostos foi confirmada por CLAE (Modelo 1200, Agilent Technologies) acoplada a espectrômetro de massas (Triplo quadrupolo híbrido, íon trap linear, 3200Qtrap, ABSciex). Esta análise foi realizada em colaboração com o CEMSA, utilizando a mesma coluna e gradiente descritos acima. As análises de MS/MS foram realizadas no modo negativo, com os seguintes parâmetros para a fonte: curtain gas, 15; cad gas, high; temperature, 650 °C; nebulizer gas, 55; heater gas, 55; ion spray voltage, -4500 V; declustering potential, -30 V; entrance potential, -10 V; colision energy, -10 V. A detecção foi feita no modo EMS (Enhanced Mass Scan) e EPI (Enhanced Product Ion), e confirmada no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) através das transições 289/245 para catequina e epicatequina, e 577/289 e 577/407 para procianidinas B1 e B2.

3.3.2.7. Determinação de carotenóides totais

Os carotenóides foram extraídos de acordo com Wilberg & Rodriguez-Amaya (1995). Este método consiste na extração sucessiva (em torno de 3 vezes ou até o extraído tornar-se incolor) de 3 g de amostra e adição de 40 mL de solução etanol-hexano (1:1) contendo 200 mg/L de 2,6-di-*tert*-butil-*p*-cresol (BHT), visando evitar a oxidação dos carotenóides, a cada extração. A homogeneização foi realizada com auxílio de Ultra-turrax até que se atingisse consistência uniforme (aproximadamente 3 minutos). O homogenato foi então centrifugado a $18.000 \times g$ por 15 min a temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para um funil de separação contendo 25 mL de hexano e 20 mL de água. Após agitação por 30 a 60 segundos, a fase aquosa foi depositada em um segundo funil de separação e re-extraída 3 vezes com 40 mL de etanol:hexano (1:1). A fração hexânica contida no primeiro funil de separação foi lavada 3 vezes com água deionizada, coletada, e a solução levada a rotavapor a 40°C para sua concentração. O volume final foi ajustado para 25 mL.

As amostras foram analisadas em cubetas de quartzo realizando-se, inicialmente, o espectro de absorbância no UV-visível. Assim, supôs-se que o carotenóide presente em maior

quantidade na amostra foi o β -caroteno e obteve-se o coeficiente de extinção molar do mesmo para, em seguida, calcular seus teores presentes nas amostras.

O cálculo foi realizado de acordo com Talcott e Howard (1999), empregando-se a seguinte equação:

$$(AV \times 10^6) / (A^{1\%}_{1\text{cm}} \times 100G)$$

Onde:

A: absorvância em 450 nm;

V: volume total do extrato;

$A^{1\%}_{1\text{cm}}$: coeficiente de extinção; e

G: peso da amostra em gramas.

Os resultados encontrados foram expressos em μg de carotenóide/g de amostra.

3.3.2.8. Determinação de fitosteróis

Para a obtenção da fração de fitosteróis foi utilizado o método de saponificação preconizado por Saldanha *et al.* (2006). Este método utiliza solução aquosa KOH 50% e álcool etílico, sob agitação magnética constante a temperatura ambiente, na ausência de luz, por 22 horas. Em seguida são adicionados água e hexano e agitados com auxílio do vórtex. A fração insaponificável é recolhida e, após repetir o procedimento três vezes, totalizando quatro extrações, esta é levada ao rotavapor a 40°C para sua concentração.

A derivatização foi realizada de acordo com Johnson e Dutta (2003) com modificações. Este método se baseia na reação decorrente da adição de Tri-Sil a temperatura ambiente, na ausência de luz, por 2 horas. Em seguida o Tri-Sil é evaporado sob fluxo de nitrogênio (N_2) e o hexano adicionado, com agitação, sendo o sobrenadante filtrado e seco novamente sob N_2 e diluído previamente à injeção.

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo a Gás, Modelo CG-2010, Marca Shimadzu, equipado com detector de ionização em chama e com coluna capilar Factor Four (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm) da Varian, USA. As condições cromatográficas empregadas foram as seguintes:

- injeção em modo split 1:20;
- temperatura do injetor 290°C e do detector 350°C;
- condições das colunas: temperatura inicial 230°C $\xrightarrow{2^{\circ}\text{C/min}}$ 264°C (5 minutos) $\xrightarrow{1^{\circ}\text{C/min}}$ 275°C (2 minutos);
- tempo da corrida: 35 minutos.

Os resultados foram calculados a partir da elaboração de curva de calibração dos padrões brassicasterol, campesterol, stigmasterol e β -sitosterol, cujas concentrações foram de 10 a 250 $\mu\text{g/mL}$, de 1 a 180 $\mu\text{g/mL}$, de 1 a 250 $\mu\text{g/mL}$ e de 1 a 180 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

O método foi validado de acordo com os seguintes parâmetros: linearidade, precisão e limites de detecção e quantificação.

3.3.2.9. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

3.3.2.9.1. Teste da capacidade de absorbância de radical oxigênio (ORAC)

O método ORAC é baseado na proteção de uma sonda fluorescente (fluoresceína) contra o ataque de um radical livre (AAPH). É um dos únicos métodos que combina tempo e grau de proteção. O meio reacional é composto de fluoresceína (3',6'-dihidroxi[isoben'zofuran-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona), o radical livre estável AAPH [dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-aminopropanol)] dissolvidos em tampão fosfato com pH 7,4. Após a adição da amostra e condicionamento a 37°C, o caráter antioxidante da amostra protege a fluoresceína do radical livre, mantendo a fluorescência por tempo maior. Como padrão foi utilizado o Trolox.

Foram utilizados os métodos descritos por Ou et al. (2001) e Prior et al. (2003), com modificações.

Em microplaca FLUOTRAC 200 com 96 cavidades (fundo plano, cor preta, Greiner BIO-one Brasil), foram pipetados 50 μL de amostra (convenientemente diluída), 150 μL de fluoresceína (93,54 nmol/L) e 50 μL de AAPH (221 mmol/L). Para o branco e diluições foi utilizado tampão fosfato (75mmol/L, pH 7,4).

Para as 3 soluções (branco, Trolox e amostra) determina-se a área sob a curva (AUC)

pela expressão:

$$AUC = (0,5 + F_5/ F_0 + F_{10}/ F_0 + F_{15}/ F_0 + ... + F_{60}/ F_0) \times 5$$

A fluorescência foi mensurada a 37°C, com excitação de 493 nm e emissão de 515 nm, durante 60 minutos a cada 5 minutos, utilizando-se o leitor de placas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.). Para o cálculo da capacidade antioxidante das amostras foi elaborada curva de calibração com o padrão (400 µmol/ L) em seis concentrações diferentes (0; 2,5; 5; 10; 20; 30 e 40 µM).

Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de Trolox (µM)/g de amostra.

3.3.2.9.2. Ensaio radical 1,1-difenil-2-2picrilhidrazil (DPPH[•])

Esta técnica está baseada na capacidade do radical DPPH[•] em reagir com doadores de hidrogênio (antioxidantes). O caráter antioxidante da amostra reduz o DPPH[•] ao ceder um átomo de hidrogênio, produzindo DPPH que não apresenta a coloração violeta original deste radical. O grau de descoloração do DPPH[•] é medido espectrofotometricamente em solução metanólica até a absorbância constante, em 515 nm. Quanto maior a descoloração, maior o caráter antioxidante da amostra. Foi utilizado o método proposto pela Embrapa (Rufino et al., 2007), com modificações.

A partir do material extraído, foram preparadas soluções com diferentes concentrações. Em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH), foram pipetados 200 µL de DPPH (150 µmol/ L) e 20 µL de amostra (convenientemente diluída). Para o branco, foram pipetados apenas 200 µL de metanol e, para o controle, 200 µL de DPPH (150 µmol/ L) e 20 µL de metanol.

A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 515 nm, utilizando-se o leitor de placas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc.). Para o cálculo da capacidade antioxidante das amostras foi elaborada curva de calibração com o padrão (DPPH) em oito concentrações diferentes (0; 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 80 µM).

O resultado foi expresso em g de guaraná/g de DPPH.

3.3.3. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada conforme especificado no item 2.3.3 do capítulo 2.

3.4. Resultados

3.4.1. Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal das amostras de guaraná em suas frações polpa, casca, semente e pó comercial em base úmida encontram-se representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição centesimal das frações casca, polpa e semente do guaraná fruto e do guaraná em pó comercial em % de base úmida (e base seca).

	Polpa	Casca	Semente	Pó comercial
Energia total em kcal	48,2 ± 1,6 ^(b) (326,6 ± 11,8)	21,7 ± 0,7 ^(a) (153,2 ± 5,6)	140,9 ± 4,8 ^(c) (254,3 ± 11,9)	336,8 ± 13,2 ^(d) (359,6 ± 13,9)
Umidade	85,2 ± 0,2 ^(d)	85,8 ± 0,3 ^(d)	44,6 ± 0,4 ^(b)	6,3 ± 0,0 ^(a)
Proteínas	2,5 ± 0,2 ^(a) (17,2 ± 1,5)	1,5 ± 0,0 ^(a) (10,5 ± 0,2)	8,1 ± 0,1 ^(b) (14,6 ± 0,2)	10,3 ± 1,0 ^(c) (11,0 ± 1,0)
Lipídios	0,6 ± 0,1 ^(a) (4,0 ± 0,5)	1,4 ± 0,0 ^(a) (9,7 ± 0,4)	2,2 ± 0,3 ^(a) (3,9 ± 0,6)	4,9 ± 1,5 ^(b) (5,2 ± 1,6)
Carboidratos	8,2 ± 0,5 ^(b) (55,5 ± 4,2)	0,8 ± 0,2 ^(a) (5,9 ± 2,1)	22,3 ± 1,8 ^(c) (40,3 ± 4,0)	62,8 ± 1,3 ^(d) (67,1 ± 1,4)
Fibras totais	2,0 ± 0,5 ^(a) (13,3 ± 3,7)	10,0 ± 0,2 ^(b) (70,3 ± 1,6)	21,9 ± 2,1 ^(d) (39,6 ± 3,7)	13,9 ± 1,5 ^(c) (14,8 ± 1,6)
Cinzas	1,5 ± 0,0 ^(c) (10,1 ± 0,2)	0,5 ± 0,0 ^(a) (3,5 ± 0,2)	1,0 ± 0,0 ^(b) (1,7 ± 0,1)	1,7 ± 0,0 ^(d) (1,8 ± 0,0)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (p< 0,05).

Destaca-se desta etapa do trabalho o alto teor de fibras totais encontradas na casca. Aproximadamente 70% da casca do guaraná em base seca são equivalentes à fibra. A semente *in natura* apresentou teor de fibra consideravelmente maior em relação à semente processada (pó comercial).

3.4.2. Compostos fenólicos (extraíveis e não-extraíveis)

O guaraná em pó comercial apresentou elevado conteúdo de fenólicos totais quando comparado às demais frações do guaraná (polpa, casca e semente; Tabela 3.2). Observou-se uma ampla diferença dos teores de fenólicos totais do guaraná fruto quando comparados em base úmida e base seca. Isso porque, tanto a polpa quanto a casca, apresentam umidade extremamente alta (aproximadamente 85%) e a semente, umidade intermediária (em torno de 45%). Já no pó comercial, cuja umidade é baixa (em média 6%), essa diferença, obviamente, não foi possível ser observada.

Tabela 3.2. Teores de compostos fenólicos totais extraíveis e não-extraíveis do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial) em base úmida (e base seca).

	Compostos fenólicos extraíveis (mg EAG*/g)	Compostos fenólicos não-extraíveis (mg EAG*/g)
Polpa	$2,04 \pm 0,17^{(a)}$ (13,81 $\pm$ 1,16)	$0,24 \pm 0,04^{(a)}$ (1,62 $\pm$ 0,30)
Casca	$13,85 \pm 1,07^{(a)}$ (97,85 $\pm$ 7,58)	$2,96 \pm 0,05^{(c)}$ (20,92 $\pm$ 0,37)
Semente	$51,36 \pm 4,50^{(b)}$ (92,68 $\pm$ 8,12)	$2,25 \pm 0,23^{(b)}$ (4,06 $\pm$ 0,41)
Pó comercial	$128,64 \pm 7,76^{(c)}$ (137,36 $\pm$ 8,28)	$4,09 \pm 0,28^{(d)}$ (4,37 $\pm$ 0,29)

* EAG = equivalentes de ácido gálico.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Os resultados da determinação de PA totais das três frações do guaraná e do pó comercial estão expostos na Tabela 3.3. As frações casca, semente e pó comercial apresentam teores elevados desses taninos. A semente e o pó, quando em base seca, apresentam concentrações muito semelhantes. Entretanto, faz-se necessário destacar o alto teor de PA extraíveis e não-extraíveis na casca, quando em base seca.

Tabela 3.3. Teores médios e desvio padrão de proantocianidinas totais extraíveis e não extraíveis do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial) em base úmida (e base seca).

	Proantocianidinas extraíveis (mg EqCI*/ g)	Proantocianidinas não-extraíveis (mg EqCI*/ g)
Polpa	6,16 ± 0,60 ^(a) (41,75 ± 4,08)	0,51 ± 0,08 ^(a) (3,43 ± 0,56)
Casca	15,49 ± 2,43 ^(b) (109,47 ± 17,15)	2,97 ± 0,19 ^(c) (20,98 ± 1,35)
Semente	28,03 ± 1,83 ^(c) (50,58 ± 3,30)	2,44 ± 0,10 ^(b) (4,40 ± 0,18)
Pó comercial	45,90 ± 2,45 ^(d) (49,01 ± 2,62)	3,59 ± 0,09 ^(d) (3,83 ± 0,09)

* EqCI: Equivalente de cloreto de cianidina

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Os CF identificados no guaraná em pó comercial por meio de HPLC-ECD e seus respectivos tempos de retenção (TR) foram: catequina (32 min), epicatequina (52 min), proantocianidina B1 (26 min) e proantocianidina B2 (45 min) (Figura 3.4).

Figura 3.4. Cromatograma do guaraná em pó.

Os CF identificados no guaraná em pó comercial por meio de HPLC-ECD foram confirmados por MS/MS. Pelo cromatograma de varredura de compostos do guaraná em pó

foi possível comparar o TR dos compostos e confirmar somente a presença de catequina e epicatequina, com o TR de 34,07 e 54,11 min, respectivamente (Figura 3.5).

Figura 3.5. Cromatograma da varredura de compostos do guaraná em pó.

A confirmação de catequina, epicatequina e proantocianidinas, realizada por meio da análise em que buscam-se compostos conhecidos e com condições otimizadas por infusão (MRM), encontra-se na Figura 3.6.

Figura 3.6. Cromatogramas das transições de íons no guaraná em pó, sendo: (A) 577/289 a.m.u.; (B) 289/245 a.m.u.; e (C) 577/407 a.m.u.

As transições dos íons 577/289 e 577/407 correspondem às PA dímeros (B) e dos íons 289/245 às catequinas e epicatequinas (Appeldorn, 2009).

Avaliando os espectros de massa em conjunto com os dados de TR dos cromatogramas do guaraná e dos padrões é possível supor que os compostos evidenciados na Figura 3.6 são catequinas, epicatequinas e proantocianidina dímeros B1 e B2, que tem sido detectado em sementes de guaraná.

Os picos com maior intensidade foram fragmentados para obtenção do espectro de fragmentação. Os íons observados foram 289 e 245, correspondentes aos compostos catequina e epicatequina (figura 3.7).

Figura 3.7. Cromatogramas e espectros, sendo (A) espectro da fragmentação da catequina (TR: 34,07 min); e (B) espectro da fragmentação da epicatequina (TR: 54,11 min).

Na Tabela 3.4 estão expostos os resultados de CF encontrados no presente estudo. Assim como o observado na análise de CF totais, não foi detectado nenhum dos compostos analisados na polpa. A casca também não apresentou teores consideráveis dos CF analisados. Os maiores teores de catequina, epicatequina e PA B1 e B2 foram observados no guaraná em pó. Mesmo levando-se em consideração que a semente possui quase 50% de umidade, a mesma apresentou teores menores de todos os CF analisados quando comparada ao guaraná em pó.

Tabela 3.4. Teores médios e desvio padrão de compostos fenólicos do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial) em base úmida (e base seca).

	Fenólicos (mg /g)			
	Catequina	Epicatequina	Proantocianidina	Proantocianidina
			B1	B2
Polpa	ND	ND	ND	ND
Casca	0,07 ± 0,01 (0,48 ± 0,10)	0,01 ± 0,01 (0,08 ± 0,06)	0,03 ± 0,01 (0,19 ± 0,11)	0,03 ± 0,02 (0,20 ± 0,18)
Semente	6,63 ± 0,57 (11,95 ± 1,03)	0,26 ± 0,13 (0,47 ± 0,24)	0,17 ± 0,04 (0,31 ± 0,08)	0,06 ± 0,01 (0,11 ± 0,02)
Pó comercial	30,05 ± 0,11 (32,09 ± 0,12)	20,23 ± 0,31 (21,60 ± 0,33)	3,72 ± 0,07 (3,97 ± 0,08)	3,37 ± 0,07 (3,60 ± 0,08)

ND = Valores abaixo do limite de detecção

Comparando o guaraná *in natura* e processado (semente e pó, respectivamente), observa-se que a proporção entre catequina e epicatequina é substancialmente menor no guaraná que sofreu tratamento, sendo 1,5:1 e 25:1 para semente e pó, respectivamente. Os cromatogramas (Figura 3.8) evidenciam essa diferença.

Figura 3.8. Cromatogramas, sendo (A) guaraná em pó; e (B) semente *in natura*.

A semente e o pó comercial de guaraná foram as amostras que apresentaram maiores teores de cafeína (Tabela 3.5). Como já era de se esperar, os níveis de teobromina encontrados foram baixos, quando comparados à cafeína, e não foram encontrados teores de teofilina em nenhuma das amostras.

Tabela 3.5. Teores médios e desvio padrão de metilxantinas do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial) em base úmida (e base seca).

	Metilxantinas (mg /g)	
	Cafeína	Teobromina
Polpa	0,03 ± 0,04 (0,22 ± 0,28)	0,01 ± 0,00 (0,05 ± 0,00)
Casca	0,02 ± 0,00 (0,13 ± 0,02)	1,17 ± 0,06 (8,25 ± 0,42)
Semente	35,63 ± 1,43 (64,29 ± 2,57)	0,25 ± 0,09 (0,44 ± 0,15)
Pó comercial	39,82 ± 0,02 (42,52 ± 0,23)	0,17 ± 0,01 (0,18 ± 0,01)

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

3.4.3. Carotenóides totais

O espectro de carotenóides da fração casca do guaraná encontra-se na Figura 3.9. Baseando-se no espectro, no solvente utilizado, no comprimento de onda da absorbância máxima [λ_{max} , nm] e na % III/II encontrados na literatura (Rodriguez-Amaya, 2001), foi possível constatar que, na realidade, há uma mistura de carotenóides presentes na casca, dado à incompatibilidade dos dados encontrados no presente estudo com dados referentes aos carotenóides mais comuns em alimentos. O espectro que mais se aproximou do encontrado neste estudo foi o do β -caroteno (Figura 3.10), portanto a concentração de carotenóides totais foi calculada em equivalentes de β -caroteno.

Figura 3.9. Espectro dos carotenóides totais da casca do guaraná.

Figure 3.10. Visible absorption spectra of lycopene (—), γ -carotene (---), β -carotene (-.-.), and α -carotene (....) in petroleum ether.

Figura 3.10. Espectro dos seguintes carotenóides: licopeno, γ -caroteno, β -caroteno e α -caroteno em éter de petróleo. Fonte: Rodriguez-Amaya (2001).

O conteúdo de carotenóides totais da fração casca encontrado foi de $34,05 \pm 1,15 \mu\text{g/g}$. Ao realizar a extração de carotenóides das demais frações do guaraná, não foi identificado o espectro de carotenóides, indicando ausência desse composto nas demais amostras (polpa, semente e pó comercial).

3.4.4. Fitosteróis

Os resultados obtidos da análise de fitosteróis do guaraná estão expostos na Tabela 3.6. De acordo com a mesma, faz-se necessário ressaltar o alto teor de fitosteróis na casca, no total $2,3 \text{ mg/g}$ em base úmida, sobretudo campesterol e β -sitosterol. Com relação à polpa, semente e pó, os resultados variaram de $0,01$ a $0,15 \text{ mg/g}$ em base úmida.

Tabela 3.6. Teores dos principais fitosteróis do guaraná (casca, polpa, semente e pó comercial), em base úmida (e seca).

Guaraná	Fitosteróis (µg/ g)			
	Brassicasterol	Campesterol	Stigmasterol	β-sitosterol
Polpa	ND	8,01 ± 0,79 ^(a) (54,33 ± 5,37)	6,45 ± 0,68 ^(a) (43,76 ± 5,68)	40,45 ± 4,18 ^(a) (274,32 ± 28,35)
Casca	225,79 ± 29,45 ^(b) (1531,19 ± 199,72)	1110,34 ± 111,89 ^(b) (7529,74 ± 758,81)	126,41 ± 18,41 ^(b) (857,26 ± 124,84)	830,49 ± 51,27 ^(c) (5631,94 ± 347,71)
Semente	4,19 ± 2,14 ^(a) (28,40 ± 14,50)	7,94 ± 0,77 ^(a) (53,84 ± 5,23)	9,86 ± 0,23 ^(a) (66,83 ± 1,57)	98,59 ± 3,23 ^(a, b) (668,57 ± 21,87)
Pó comercial	5,85 ± 0,51 ^(a) (39,67 ± 3,44)	23,90 ± 1,59 ^(a) (162,08 ± 10,08)	11,92 ± 0,29 ^(a) (80,84 ± 1,96)	151,33 ± 4,35 ^(b) (1026,23 ± 29,47)

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05)

ND = Valores abaixo do limite de detecção

A

B

C

Figura 3.11. Cromatogramas de fitosteróis do guaraná: (A) Polpa, (B) Casca, (C) Semente e (D) Pó comercial.

3.4.5. Capacidade antioxidante

Curvas típicas desse experimento podem ser observadas na Figura 3.12.

Figura 3.12. Curvas típicas do teste de capacidade antioxidante por ORAC.

Podemos observar que o pó comercial apresenta valor de atividade antioxidante por ORAC consideravelmente maior quando comparado às demais amostras de estudo (Tabela 3.7). No entanto, se convertermos os resultados obtidos para peso seco observa-se resultados diferentes (1750 ± 323 , 7113 ± 460 , 1710 ± 37 e 2876 ± 72 para polpa, casca, semente e pó, respectivamente). Ou seja, a casca, que possui umidade muito elevada, apresenta atividade antioxidante visível e significativamente maior quando em peso seco. Ao contrário da polpa que, apesar de também possuir grau de umidade elevado, manteve-se com baixa atividade antioxidante em ambas as bases (úmida e seca).

Tabela 3.7. Atividade antioxidante das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná pelos métodos ORAC e DPPH.

Guaraná	ORAC ^A ($\mu\text{M ET}^*/\text{g}$)	DPPH ^A (g guaraná/ g DPPH)	
	Fração extraível	Fração extraível	Fração não extraível
Polpa	$258 \pm 48^{(a)}$	-	-
Casca	$1007 \pm 65^{(b)}$	$118,79 \pm 21,35^{(c)}$	$474,83 \pm 81,32^{(c)}$
Semente	$948 \pm 21^{(b)}$	$66,54 \pm 11,75^{(b)}$	$346,98 \pm 89,80^{(a,b)}$
Pó comercial	$2693 \pm 67^{(c)}$	$24,07 \pm 1,30^{(a)}$	$249,41 \pm 2,16^{(a)}$

^AResultados expressos em base úmida

* ET = equivalentes de trolox

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

De mesma forma que o observado no método ORAC, pode-se afirmar que o guaraná em pó possui capacidade antioxidante por DPPH maior em relação às demais amostras de estudo. Esse resultado foi maior na fração extraível. Tal fato pode ser justificado pela maior quantidade de compostos fenólicos encontrados na fração extraível do que na fração não extraível. A polpa não apresentou atividade antioxidante pelo método DPPH em ambas as frações analisadas.

3.5. Discussão

3.5.1. Composição centesimal

A obtenção de dados referentes à composição centesimal dos alimentos é muito importante para se estimar a ingestão de um determinado alimento, bem como, sua contribuição para a dieta da população.

No presente estudo, ao avaliar a composição centesimal do guaraná, a casca foi responsável pelo maior teor de fibras totais observado. Além disso, a semente *in natura* apresentou teor de fibra consideravelmente maior em relação à semente processada (pó comercial).

As fibras alimentares despertaram, nos últimos tempos, grande interesse de especialistas da saúde. Elas formam um conjunto de substâncias derivadas de vegetais resistentes à ação das enzimas digestivas humanas. Portanto, produzem efeitos fisiológicos benéficos ao organismo, sendo responsáveis, por exemplo, pelo aumento do volume do bolo fecal e regularização do funcionamento intestinal, redução do colesterol plasmático, além de estimularem o retardo do esvaziamento gástrico e, com isso a diminuição da absorção de glicose (Mattos & Martins, 2000).

Em estudo realizado com a casca do maracujá observou-se uma quantidade de aproximadamente 26% de fibra alimentar total em base seca (Córdova et al., 2005), consideravelmente inferior ao observado no presente trabalho.

A aveia, tida como principal fonte de fibra alimentar de uma dieta habitual possui apenas entre 7,1 e 12,1% de fibra total. No farelo, por exemplo, o conteúdo de fibra alimentar está entre 15 e 19% (Frolich & Nyman, 1988). Logo, é possível afirmar que a casca do guaraná, bem como a semente, é uma poderosa fonte de fibras.

Em pesquisa desenvolvida com guaraná em pó foram observados valores de composição centesimal semelhantes aos encontrados presente estudo, exceto pelo elevador teor de carboidratos e baixo teor de lipídios, 78,41% e 2,85%, respectivamente (Martins, 2010). No entanto, o método utilizado para análise de lipídios não foi o mesmo, sendo que Martins (2010) utilizou o método de Folch. Além disso, a autora do referido estudo não realizou análise de fibras, o que justifica o alto teor de carboidratos.

3.5.2. Compostos fenólicos totais

O guaraná em pó comercial apresentou conteúdo de fenólicos totais superior ao observado nas demais frações do guaraná *in natura* (polpa, casca e semente).

Em trabalho desenvolvido com semente de guaraná, Majhenic et al. (2007) investigaram o conteúdo de fenólicos totais extraíveis em diferentes sistemas de solventes e constataram que os teores variaram entre 119 e 185 mg EAG/ g de extrato seco. Em estudo semelhante, Martins (2010) reproduziu os mesmos métodos de extração propostos por Majhenic et al. (2007) e apresentou resultados de compostos fenólicos totais substancialmente maiores, entre 303,19 e 948,71 mg EAG/ g de extrato seco, do que os encontrados no estudo citado acima.

Corroborando com o presente estudo, Rockenbach et al. (2008) que, ao desenvolverem estudo com a uva, também verificaram maiores valores de fenólicos totais extraíveis quando obtidos pela extração com os sistemas de solventes acetona 50 e 70% (v/v), verificaram teores de fenólicos totais extraíveis de 79,5 e 75,6 mg EAG/ g em base seca para a variedade *Ancelota* e 65,9 e 69,0 mg EAG/ g em peso seco para a variedade *Tannat*.

O conteúdo de fenólicos totais de oito tipos comerciais de vinhos brasileiros e dois sucos de uva foram avaliados em estudo realizado por Ishimoto et al. (2006). Os teores encontrados foram de, em média, 1647, 803 e 305 mg EAG/ L para vinho tinto, rosé e branco respectivamente, e 1150 mg EAG/ L para sucos de uva.

O chá, produto com elevados teores de catequinas, assim como a uva e o guaraná, também vem sendo foco de estudos nas últimas décadas. Em relação aos fenólicos totais extraíveis, extratos etanólicos de chá verde apresentaram teor de 13,0 mg EAG/ mL, enquanto extratos etanólicos de erva-mate tostada apresentaram 3,4 mg EAG/ mL (Saldanha, 2005). Ainda com relação ao chá, em estudo desenvolvido com resíduos do processamento da erva-mate em que foram testadas extrações com diferentes solventes (etanol, metanol, metanol acidificado e água), o teor máximo de fenólicos totais encontrado foi de 115,1 mg/ g de pó de mate (Vieira et al., 2009).

Dados científicos relacionados à análise de fenólicos não-extraíveis são limitados, visto que, em geral, estudos reportam concentrações e composições apenas de fenólicos extraíveis, ignorando os compostos retidos nos resíduos.

Estudos desenvolvidos com frutas, nos quais são investigados fenólicos extraíveis e

não-extraíveis, geralmente encontram concentração de fenólicos não-extraíveis maior do que a de fenólicos extraíveis (Arranz et al., 2009; Pérez-Jimenez et al., 2009; Arranz et al., 2010). Como exemplo pode-se citar o estudo desenvolvido por Arranz et al (2009), no qual foram avaliados os teores de compostos fenólicos extraíveis e não-extraíveis da maçã, do pêssego e da nectarina. Os resultados obtidos para compostos fenólicos extraíveis foram 14,9 mg/g, 25,91 mg/g e 10,27 mg/g, e para não extraíveis foram 80,3 mg/g, 52,8 mg/g e 65,8 mg/g em matéria fresca, respectivamente. Tais resultados vão em direção oposta aos encontrados no presente trabalho. Uma possível justificativa é o fato de que, no presente, foi desenvolvido método de extração máxima para o guaraná, totalizando 4 ciclos de extração; ou seja, foram extraídos ao máximo. Já nos demais estudos é realizada uma única etapa de extração, o que, provavelmente, não é capaz de extrair todos os fenólicos livres.

3.5.3. Proantocianidinas totais

Na presente pesquisa, as frações casca, semente e pó comercial apresentaram teores elevados de PA. A semente e o pó, quando em base seca, apresentaram concentrações muito semelhantes, o que sugere a ausência da perda desses compostos durante o processamento. Entretanto, faz-se necessário destacar o alto teor de PA extraíveis e não-extraíveis na casca, quando em base seca.

O conteúdo de PA encontrado em extratos de semente de guaraná, portanto PA extraíveis, obtidos com metanol puro, acetona: água (35:75, v:v) e etanol: água (60:40, v:v) variaram de 38,9 a 60,5 mg de proantocianidina/ g de extrato (Majhenic et al, 2007). No entanto, torna-se difícil a comparação com o atual estudo, tendo em vista que os autores não relatam a concentração dos extratos.

Em estudo realizado com maçã, pêssego e nectarina, os teores de PA extraíveis foram 5,3 mg/ 100 g, 22 mg/ 100 g e 8,56 mg/ 100 g em matéria fresca, respectivamente. Já para PA não-extraíveis os teores encontrados foram significativamente maiores, sendo 45,77 mg/ 100 g, 59,1 mg/ 100 g e 45,8 mg/ 100 g, respectivamente (Arranz et al., 2009). Comparando estes resultados com os do presente estudo é possível supor que os teores de PA não extraíveis podem estar superestimados em função da ausência de um método de extração adequado para as amostras de estudo, visando extração máxima dos compostos fenólicos extraíveis, como foi

feito no presente estudo.

De forma geral, avaliando os dados de PA extraíveis e não-extraíveis, torna-se claro que os teores de PA são subestimados quando analisado somente a fração extraível.

3.5.4. Principais compostos fenólicos e metilxantinas

Os maiores teores de catequina, epicatequina e PA B1 e B2 foram observados no guaraná em pó. Comparando o guaraná *in natura* e processado (semente e pó, respectivamente), observa-se que a proporção de catequina e epicatequina é substancialmente menor no guaraná que sofreu tratamento térmico e que os teores de PA B1 e B2 são significativamente maiores no pó comercial em relação à semente.

Sabe-se que o processamento pode influenciar significativamente o teor de flavanóis, bem como o perfil de monômeros e oligômeros. Existem diversos estudos que indicam a existência de reações de epimerização de flavan-3-óis em chá verde durante a torrefação (Wang & Helliwell, 2000), fato que pode justificar o maior teor de epicatequina em relação à catequina no guaraná em pó observado no presente estudo.

Garrido et al. (2008), ao avaliarem teores de CF em cascas de amêndoas submetidas a tratamentos sob diferentes temperaturas, observaram que as amostras submetidas à torrefação apresentaram maiores teores tanto de CF totais como de monômeros de flavanóis quando comparado às amostras que sofreram processo térmico com temperaturas mais baixas. Em contrapartida, elevadas temperaturas são capazes de influenciar negativamente o teor de flavanóis de cacau e chocolate. Ao ser submetido à torrefação, a perda no teor de PA pode alcançar 50% quando comparado a processamentos com temperaturas mais baixas (Hackman et al., 2008).

De forma geral, a diferença observada entre os teores de fenólicos da semente *in natura* e do pó comercial (semente processada) também pode ser justificada pelo período da safra. O amadurecimento e outros fatores ambientais, antes da colheita, podem influenciar o conteúdo de flavanóis no vegetal. Duas variedades de uva foram analisadas quanto ao teor de catequinas, dímeros e PA totais em suas sementes e bagaços durante o período de dois anos. Os resultados encontrados apontaram diferença significativa entre as diferentes estações do ano (Hackman et al., 2008).

Em estudo realizado com guaraná em pó comercial e semente de guaraná foram encontrados valores semelhantes de catequina, epicatequina, cafeína, teobromina e teofilina entre as amostras analisadas (Carlson & Thompson, 1998), o que não foi observado no presente estudo. No entanto, no estudo acima citado, as sementes foram submetidas, após trituração, a secagem por 1 hora, quando atingiram umidade semelhante a do pó comercial. Sendo assim, é possível supor, mais uma vez, que o aumento de temperatura influencia o teor de compostos fenólicos.

Observando o Quadro 3.3 é possível fazer uma comparação entre o teor de catequinas dos alimentos por porção.

Quadro 3.3. Teor de catequinas em alimentos por porção.

Alimento (porção)	mg/kg (ou mg/L) em base úmida	mg/porção
Chocolate (50 g)	460–610	23–30
Feijão (200 g)	350–550	70–110
Damasco (200 g)	100–250	20–50
Cereja (200 g)	50–220	10–44
Uva (200 g)	30–175	6–35
Pêssego (200 g)	50–140	10–28
Blackberry (100 g)	130	13
Maçã (200 g)	20–120	4–24
Chá verde (200 mL)	100–800	20–160
Chá preto (200 mL)	60–500	12–100
Vinho tinto (100 mL)	80–300	8–30
Cidra (200 mL)	40	8
Guaraná em pó (3 g)	50300	151

Adaptado de: Manach et al., 2004.

O teor de catequinas presente na porção do guaraná é substancialmente maior quando comparado às porções das principais fontes deste composto, equiparando-se apenas ao chá verde.

Em estudo desenvolvido por Carlson e Thompson (1998), as amostras de guaraná em pó e semente de guaraná *in natura* apresentaram teores semelhantes de cafeína e teobromina entre as amostras analisadas, sendo eles: 43,77 e 0,37, e 42,30 e 0,32 mg/g guaraná (base seca) para semente e pó comercial, respectivamente. Corroborando com o atual estudo e com estudos desenvolvidos com amostras de café, a cafeína apresentou estabilidade térmica, uma vez que o conteúdo de cafeína não variou entre o grão cru e o torrado (Monteiro & Trugo, 2005; Abrahão et al., 2008).

Em estudo realizado com grãos crus e torrados de café, o teor de cafeína encontrado foi em torno de 6 mg/g de grão (Abrahão et al., 2008). Quatorze amostras de diferentes marcas de café em pó apresentaram teores de cafeína entre 5,34 e 10,51 mg/ g café (Camargo & Toledo, 1998). Sendo assim, avaliando os resultados de cafeína obtidos no presente estudo e em demais estudos com guaraná é possível constatar que o guaraná apresenta teores maiores deste composto quando comparados aos teores encontrados no café (Toledo & Camargo, 1998; Monteiro & Trugo, 2005; Abrahão et al., 2008)

3.5.5. Carotenóides totais

Em estudo realizado com quatro diferentes cultivares de manga foi obtido uma média de 25 µg de carotenóides totais/g de polpa (Ribeiro et al., 2007). Diversos vegetais comumente consumidos foram analisados quanto aos seus teores de carotenóides totais, a exemplo: abóbora amarela, pimentão verde, tomate e fava, cujos teores foram 21, 24, 31, 19 µg de carotenóides/ g de amostra em base úmida, respectivamente (Kandlakunta et al., 2008). A cenoura, o espinafre, o aipo, a salsa e a pimenta vermelha apresentam em média 76, 33, 29, 56 e 29 µg de β-caroteno / g de amostra em base úmida, respectivamente (Heinonen et al., 1989). Dessa forma, a casca do guaraná apresenta valores semelhantes aos encontrados nos estudos citados acima, podendo ser considerada uma nova fonte de carotenóides.

3.5.6. Fitosteróis

Os resultados deste trabalho indicam que o guaraná e, principalmente, a casca pode ser uma possível fonte de fitosterol.

Outras frutas nativas do Brasil já foram analisadas quanto aos seus conteúdos de fitosteróis. Mucajá, inajá e jenipapo apresentaram as concentrações mais altas que variaram entre 0,26-2,36 mg/g, 1,19-2,85 mg/g e 2,16 mg/g em base úmida, respectivamente (Costa et al., 2010). Outro estudo desenvolvido com frutas encontraram teores variando entre 0,02 e 0,33 mg/g, sendo as maiores concentrações obtidas na laranja, tangerina e manga (Han et al., 2008).

3.5.7. Atividade antioxidante *in vitro*

O ORAC é um método de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* largamente utilizado, visto que é o único método que avalia não só o tempo de proteção, mas também a extensão da mesma, não se limitando ao valor final como ocorre no teste do DPPH (Ou et. al., 2001).

No presente trabalho, o pó comercial e a casca apresentaram valores consideravelmente maiores quando comparado às demais amostras de estudo, quando em base úmida e seca respectivamente.

Em estudo realizado com diversas frutas da Amazônia, Gonçalves et al. (2010) constataram que, no geral, o camu-camu apresentou maior capacidade antioxidante por ORAC, em média 800 $\mu\text{M ET/g}$ de amostra em base seca, seguido de tucumã e uxi. Valores de atividade antioxidante observados em sementes de uva foram 638, 345 e 311 $\mu\text{M ET/g}$ de semente de uva em base seca, variando com o tipo de uva (Yilmaz & Toledo, 2006). Assim, é possível supor que o guaraná em pó e a fração casca apresentam elevada atividade antioxidante *in vitro*, quando comparados os resultado com os estudos citados acima.

Ao analisarmos os valores encontrados para atividade antioxidante por DPPH, é possível constatar que a fração extraível do guaraná apresenta atividade antioxidante maior do que a fração não-extraível. Tal fato é provavelmente justificado pela maior quantidade de

compostos fenólicos encontrados na primeira em relação à segunda. Além disso, é possível afirmar que o guaraná em pó comercial possui maior atividade antioxidante, seguido pela semente *in natura* e casca em ambas as frações (extraível e não-extraível). A polpa não apresentou atividade antioxidante em ambas as frações analisadas.

Dados referentes à atividade antioxidante do guaraná podem ser encontrados em estudo realizado com extrato de semente de guaraná, os extratos metanol, acetona 35% e etanol 60% mostraram-se efetivos na capacidade antioxidante por DPPH com inibição superior a 85% (Majhenic et al., 2007).

A maior atividade antioxidante do pó em comparação à semente pode justificada pela maior presença de CF no pó, bem como pelo processamento térmico e consequente formação dos produtos da Reação de Maillard, cuja atividade antioxidante vem sendo investigada (Morales & Babbel, 2002). Santos et al. (2007), ao estudar a atividade antioxidante do café, concluíram que o processamento, bem como o grau de torrefação do café, não alteraram a capacidade de inibir a peroxidação lipídica do café. Tal fato pode ser atribuído à presença de compostos com atividade antioxidante como fenólicos, mas também produtos provenientes da reação de Maillard.

3.6. Conclusões parciais

Em suma, os resultados obtidos neste capítulo indicam que o guaraná é uma boa fonte de compostos antioxidantes, como catequinas e proantocianidinas, principalmente o pó comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão SA, Pereira RGFA, Lima AR, Ferreira EB, Malta MR. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesqui Agropecu Bras** 2008; 43(12): 1799-1804.
- Alves RE, Brito EA, Rufino MSM, Sampaio CG. Antioxidant activity measurement in

- tropical fruits: A case study with acerola. **Acta Hort** 2008; 773: 299–305.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16^a ed. Arlington; 1995.
- Arranz S, Saura-Calixto F, Shaha S, Kroon PA. High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. **J Agric Food Chem**. 2009; 57: 7298–7303.
- Arranz S, Saura Calixto F. Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. **J Cereal Sci** 2010; 51: 133-318.
- Basile A, Ferrara L, Del Pezzo M, Meled G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol** 2005; 102: 32–36.
- Camargo MCR, Toledo MCF. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência Tecnol Alime** 1998; 18(4).
- Carlson M, Thompson RD. Liquid Chromatographic Determination of Methylxanthines and Catechins in Herbal Preparations Containing Guaraná. **J AOAC Int** 1998; 81(4): 691-698.
- Córdova KRV, Gama TMMTB, Winter CMG, Kaskantzis Neto G, Freitas RJS. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. **B. CEPPA** 2005; 23 (2): 221-230.
- Costa PA, Ballus CA, Teixeira-Filho J, Godoy HT. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Res Int** 2010; 43(6): 1603-1606.
- FOOD RES INT**
- Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Bertè F, Gazzani G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **J Agr Food Chem** 2000; 48(5): 1449-1454.
- Farah A, Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. **Braz J Plant Physiol** 2006; 18(1): 23-36.
- Food and Agriculture Organisation, 2006. FAOSTAT database. <<http://www.fao.org>>.
- Frolich W, Nyman M. Minerals, phytate and dietary fibre in different fractions of oat-unique grain. **J Cereal Sci** 1988; 7 (1): 73-82.
- Fukumasu H, Avanzo JL, Nagamine MK, Barbuto JA, Rao KV, Dagli MLZ. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis* guaraná reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz J Med Biol Res** 2008; 41: 305-310.

- Garrido I, Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Polyphenols and Antioxidant Properties of Almond Skins: Influence of Industrial Processing. **J Food Sci** 2008; 73(2): 106-115.
- Gonçalves AESS, Lajolo FM, Genovese MI. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **J Agric Food Chem**. 2010; 58: 4666-4674.
- Hackman RM, Polagruto JA, Zhu QY, Sun B, Fujii H, Keen CL. Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. **Phytochem Rev** 2008; 7: 195-208.
- Han JH, Yang YX, Feng MY. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. **Biomed Environ Sci** 2008; 21(6): 449-453.
- Hartzfeld PW, Forkner R, Hunter MD, Hagerman AE. Determination of hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. **J Agric Food Chem**. 2002; 50: 1785-4790.
- Heinonen MI, Ollilainen V, Linkola EK, Varo PT, Koivistoinen PE. Carotenoids in Finnish Foods: Vegetables, Fruits, and Berries. **J Agric Food Chem** 1989; 37: 655-659.
- Henman AR. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **J Ethnopharmacol** 1982; 6: 311-338.
- Ishimoto EY, Ferrari CKB, Bastos DHM, Torres EAFS. *In vitro* antioxidant activity of brazilian wines and grape juices. **Journal of Wine Research** 2006; 17 (2): 107 – 115.
- Ishimoto EY. **Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters**. [Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da USP]. São Paulo, 2008.
- Johnson RB, Dutta PC. Characterization of side-chain oxidation products of sitosterol and campesterol by chromatographic and spectroscopic methods. **J Am Oil Chem Soc** 2003; 80:767-76.
- Kandlakunta B, Rajendran A, Thingnganing L. Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin. **Food Chem** 2008; 106: 85–89.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonamone A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am J Med** 2002; 113: 71-88.
- Lee SC, Prosky L. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods – Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **J AOAC Int**

- 1992; 75(3): 395-416.
- López-Galilea I, Andueza S, Di Leonardo I, Peña MP, Cid C. Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee. **Food Chem** 2006; 94: 75-80.
- Majhenic L, Kerget MS, Knez ZE. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extract. **Food Chem** 2007; 104: 1258-68.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr** 2004 May 1, 2004;79:727-4.
- Martins CA. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó**. [Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da USP]. São Paulo, 2010.
- Mattos LL, Martins IS. Consumo de fibras alimentares em população adulta. **Rev Saude Publ** 2000; 34 (1): 50-55.
- Monteiro MC, Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Quím Nova** 2005; 28(4): 637-641.
- Morales FJ, Babbel MB. Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media. **J Agric Food Chem** 2002; 50: 2788-2792.
- Nicoli MC, Anese M, Parpinel NT. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends Food Sci Tech** 1999; 10: 94-100.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J Agric Food Chem** 2001; 49: 4619-26.
- Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. **J Agric Food Chem** 2005; 53: 5036-5040.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Saura-Calixto F. Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: An approach to quantification of the missing proanthocyanidins. **Food Res Int** 2009; 42: 1381–1388.
- Porter, L.J., Hrtstich, L.N., and Chan, B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry*, 25:223–230. In: Shahidi F, Naczki M. **Phenolics in Food & Nutraceuticals**. Editora CRC PRESS, Boca Raton, Florida, 2004.
- Prior et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **J Agric Food Chem** 2003; 51: 3273-3279.

- Ribeiro SMR, Queiroz JH, Queiroz MELR, Campos FL, Sant'ana HMP. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. **Plant Food Hum Nutr** 2007; 62: 13–17.
- Rockenbach II, Silva GL, Rodrigues E, Kuskoski EM, Fett R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciência Tecnol Alime** 2008; 28(Supl.): 238-244.
- Rodriguez-Amaya DB. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, 2001.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto FD. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado técnico on line. **Embrapa** 2007, Fortaleza CE.
- Saldanha, LA. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. [Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da USP]. São Paulo, 2005.
- Saldanha T, Sawaya ACF, Eberlin MN, Bragnolo N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of UV, RI and APCI-MS detectors. **J Agric Food Chem** 2006; 54: 4107-13.
- Santos MH, Batista BL, Duarte SMS, Abreu CMP, Gouvêa CMCP. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Quím Nova** 2007; 30(3): 604-610.
- Singleton VL, Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Viticult** 1965; 16: 144-58.
- Stanner SA, Hughes J, Kelly CN, Buttriss J. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. **Public Health Nutr** 2004; 7(3): 407-422.
- Talcott ST, Howard LR. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. **J Agric Food Chem** 1999; 47: 2109-2115.
- Vieira MA, Maraschin M, Pagliosa CM, Podestá R, Amboni RDMC. **Análise de compostos fenólicos, metilxantinas, tanino e atividade antioxidante de resíduo do processamento da erva-mate: uma nova fonte potencial de antioxidantes**. 2nd International Workshop – Advances in cleaner production. Key elements for a sustainable world: energy, water and climate change. São Paulo, 2009.
- Waldron K. Useful ingredients from onion waste. **Food Sci Technol** 2001; 15: 38–39,41.
- Wang H, Helliwell K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. **Food Chem** 2000;

70(3): 337-344.

- Watt BK, Merrill AL. **Composition of foods**. Washington, DC: USDA, 1963. 129p. (Agriculture Handbook n.8.).
- Weisburger JH, Williams GM. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicology Science** 2000; 49: 231-246.
- Wilberg VC, Rodriguez-Amaya DB. HPLC Quantitation of Major Carotenoids of Fresh and Processed Guava, Mango and Papaya. **Lebensm-Wiss Technol** 1995; 28: 474-480.
- Will F, Bauckhage K, Dietrich H. Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. **Eur Food Res Technol** 2000; 211: 291-297.
- Wollgast J, Anklan E. Review in polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Res Int** 2000; 33: 423-447.
- Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **J Food Compos Anal** 2006; 19 (1): 41-44.
- Zumbé A. Polyphenols in cocoa: are there health benefits? **BNF Nutrition Bulletin** 1998; 23: 94-102.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma geral, os resultados do presente estudo indicam que o guaraná em pó apresenta altos teores de compostos bioativos, como cafeína e fenólicos, principalmente catequinas e proantocianidinas, e capacidade antioxidante *in vitro*.

Os CF do guaraná em pó são extraídos com maior eficiência quando empregada a mistura dos solventes metanol:água (30:70, v:v) e acetona:água (70:30, v:v) e quatro ciclos de extração, indicando a necessidade da utilização da acetona em ao menos um ciclo de extração.

O DCCR indicou ser uma importante ferramenta na otimização do processo de extração de PA do guaraná em pó.

O tratamento térmico pareceu influenciar a existência de reações de epimerização de monômeros de catequinas, fato que pode justificar o maior teor de epicatequina em relação à catequina no guaraná em pó observado no presente estudo.

A cafeína demonstrou possuir estabilidade térmica, visto que apresentou valores semelhantes entre a semente *in natura* e a torrada.

O estudo sugere também que a casca possui conteúdo elevado de substâncias com potencial antioxidante, como fenólicos, carotenóides e fitosteróis, além de fibras alimentares. Tal informação indica a necessidade de aprofundamento de estudos acerca desse subproduto agroindustrial como fonte de compostos bioativos por indústrias farmacêutica, cosmética, entre outras.

Vale ressaltar também a necessidade de estudos futuros acerca do alto teor de PA presentes no pó de guaraná comercial e sua implicação no fornecimento de elevadas quantidades de taninos, cujo consumo excessivo pode prejudicar a absorção de nutrientes necessários para a saúde humana.

ANEXO A – Curvas de calibração dos padrões

Curva padrão para a quantificação de compostos fenólicos totais. Onde: y: valor da absorbância; x: teor de compostos fenólicos totais; e R^2 : coeficiente de correlação

Curva padrão para a quantificação de proantocianidinas totais. Onde: (a) y: valor da absorbância; (b) x: teor de proantocianidinas totais; e R^2 : coeficiente de determinação do modelo.

A

B

C

D

Curvas de calibração dos padrões de fenólicos, sendo: (A) Catequina; (B) Epicatequina; (C) Proantocianidina B1; e (D) Proantocianidina B2. Onde: y: valor da área; x: teor de fenólicos; e R^2 : coeficiente de correlação.

A

B

C

Curvas de calibração dos padrões de metilxantinas, sendo: (A) Cafeína; (B) Teobromina; e (C) Teofilina. Onde: y: valor da área; x: teor de metilxantinas; e R^2 : coeficiente de determinação do modelo.

A

B

C

D

Curvas de calibração dos padrões de fitosterol, sendo: (A) Brassicasterol; (B) Campesterol; (C) Stigmasterol; e (D) β-Sitosterol. Onde: y: valor da área; x: teor de fitosterol; R^2 : coeficiente de determinação do modelo.

Curva padrão para a determinação da atividade antioxidante por ORAC. Onde: y: valor da área sob a curva (AUC); x: capacidade antioxidante em equivalentes de trolox; R^2 : coeficiente de determinação do modelo.

Curva padrão para determinação da atividade antioxidante por DPPH. Onde: y: valor da absorbância; x: concentração de DPPH em µM; R^2 : coeficiente de determinação do modelo.

ANEXO B – Validação dos métodos

Parâmetros de validação do método quantificação de fenólicos.

Parâmetros	C	EC	PC B1	PC B2
Linearidade (nmol/mL)	0,2-50	0,2-50	0,2-50	0,2-50
Limite de detecção (µg/mL)	0,0041	0,0030	0,0045	0,0038
Limite de quantificação (µg/mL)	0,0138	0,0101	0,0149	0,0126

Onde: C = catequina, EC = epicatequina, PC B1 = proantocianidina B1, PC B2 = proantocianidina B2.

Parâmetros de validação do método de quantificação de metilxantinas.

Parâmetros	Cafeína	Teobromina	Teofilina
Linearidade (nmol/mL)	0,8-200	1-10	1-10
Limite de detecção (µg/mL)	0,0480	0,0270	0,0351
Limite de quantificação (µg/mL)	0,1600	0,0899	0,1170

Parâmetros de validação do método de derivatização de fitosteróis.

Parâmetros	Stigmasterol	Campesterol	β-Sitosterol	Brassicasterol
Linearidade (µg/mL)	1-250	1-180	1-180	10-250
Limite de detecção (µg)	6×10^{-5}	3×10^{-5}	9×10^{-6}	6×10^{-6}
Limite de quantificação (µg)	2×10^{-4}	1×10^{-4}	3×10^{-5}	2×10^{-5}
Precisão CV (%)	0,05	0,1	0,07	0,05

ANEXO C

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

OF.COEP/276/09

São Paulo, 16 de setembro de 2009.

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP **encaminhou** o protocolo de pesquisa n.º **2016**, intitulado "**(CEA) SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DO GUARANÁ (Paullinia cupana)**", sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Patrícia Bezerra Antunes** e orientação da Professora Doutora **Elizabeth Apa. F. da S. Torres**, para apreciação do Sub-Comitê de Ética Ambiental.

O Sub-Comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública analisou as informações sobre os resíduos químicos do projeto sob sua responsabilidade, concluindo pela sua aprovação, haja vista que os resíduos a serem gerados encontram-se dentro da categoria que a Faculdade de Saúde Pública está licenciada, aduzindo que o destino dado aos mesmos será adequado, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Interno de Biossegurança.

Cabe informar que a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo possui desde 10 de novembro de 2004, "Certificado de Aprovação para o Destino de Resíduos Industriais", sob n.º 45001604, expedido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), específico para o destino de "reagentes de laboratórios" que tem como procedimento padrão a contratação de empresa licenciada para o transporte e incineração desses resíduos.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – COEP/FSP, em sua **7.ª/09 Sessão Ordinária** realizada em **11/09/2009** considera o protocolo de pesquisa **APROVADO**.

Atenciosamente,

Cláudio Leone
Professor Titular

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP

Ilm.ª Sr.ª

Prof.ª Dr.ª Elizabeth Ap. F. da Silva Torres
Departamento de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública – USP