



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências

Farmacêuticas



**INVESTIGAÇÕES FITOQUÍMICA E BIOLÓGICAS DE EXTRATOS
OBTIDOS POR TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA DE SEMENTES DE
Paullinia cupana (GUARANÁ)**

LEILA LARISA MEDEIROS MARQUES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Coorientador: Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho

MARINGÁ, 2016

LEILA LARISA MEDEIROS MARQUES

Investigações fitoquímica e biológicas de extratos obtidos por tecnologia supercrítica de sementes de *Paullinia cupana* (guaraná)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Coorientador: Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho

MARINGÁ, 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M357i Marques, Leila Larisa Medeiros
Investigações fitoquímica e biológicas de extratos obtidos por tecnologia supercrítica de sementes de *Paullinia cupana* (Guaraná) / Leila Larisa Medeiros Marques. -- Maringá, 2016.
213 f. : il. col., figs., tabs., quadros + apêndice

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
Co-orientador: Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016

1. *Paullinia cupana* - Estudo fitoquímico. 2. *Paullinia cupana* - Estudo biológico - Atividade Antimicrobiana e Atividade antioxidante. 3. *Paullinia cupana* - Extração supercrítica. 4. Matriz ortogonal - Planejamento estatístico. 5. Modificador - Cossolventes. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Cardozo-Filho, Lucio, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 21.ed. 615.32

MN

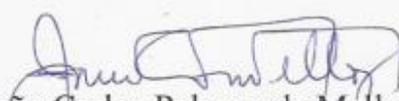
LEILA LARISA MEDEIROS MARQUES

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE EXTRATOS
OBTIDOS POR TECNOLOGIA CRÍTICA DE SEMENTES DE
Paulinia cupana (GUARANÁ)**

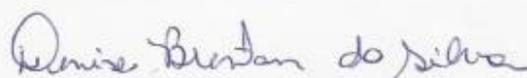
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

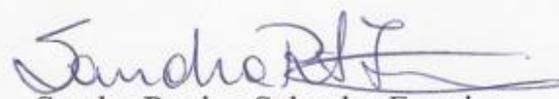
Aprovada em 11 de novembro de 2016

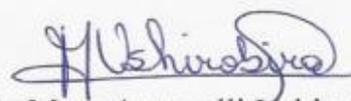
BANCA EXAMINADORA


João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Benício Alves de Abreu Filho
Universidade Estadual de Maringá


Denise Brentan da Silva
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul


Sandra Regina Salvador Ferreira
Universidade Federal de Santa Catarina


Tânia Mara Antonelli Ushirobira
Universidade Estadual de Maringá

A primeira etapa deste trabalho foi realizada em laboratório parceiro da empresa Waters[®], em Campinas (SP), para utilização da tecnologia supercrítica. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando equipamentos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), da Universidade Estadual de Maringá. As atividades antioxidantes foram realizadas no Laboratório Inovação Tecnológicas no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (prof. Dr. Celso Vataru Nakamura), da Universidade Estadual de Maringá. As análises antimicrobianas foram realizadas no Laboratório de Ecologia Microbiana (Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior) da Universidade Estadual de Londrina. As análises de massas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Profa. Dra. Denise Brentan Silva). Além da utilização de toda a estrutura do Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello).

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica (INCT_if), à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e à Fundação Araucária.

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

MARQUES, L. L. M.; CARDOSO-FILHO, L.; DE PAULO, F.; MELLO, J. C. P. Supercritical Fluid Extraction of Compounds from Guaraná (*Paullinia cupana*) Seeds. In: *14th International Congress of Ethnopharmacology*, Puerto Varas, Chile, 23 a 26 de Setembro de 2014.

MARQUES, L. L. M.; PANIZZON, G, P.; GUEDES, T. A.; CARDOSO-FILHO, L.; MELLO, J. C. P. Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds from Guaraná (*Paullinia cupana*) Seeds. In: *10th International Congress of Pharmaceutical Sciences*, Ribeirão Preto, Brasil, 5 a 9 de Setembro de 2015.

**Parte deste trabalho foi publicado na revista Food Chemistry (IF:4,052)-
Capítulo 2.**

MARQUES, L. L. M.; PANIZZON, G, P.; AGUIAR, B. A. A.; SIMIONATO, A. S.; CARDOSO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; OLIVEIRA, A. G.; GUEDES, T. A.; MELLO, J. C. P.

Guaraná (*Paullinia cupana*) Seeds: Selective Supercritical Extraction of Phenolic Compounds. **Food Chemistry**, v. 212, p. 703-711, 2016. ([doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.028](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.028))

*Dedico este trabalho, meus sonhos e minha vida
a Deus, meu fiel amigo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, fiel companheiro, parceiro de todas as horas, pelo seu amor, paciência e suporte. Sem ele, com certeza este trabalho não seria possível.

A minhas filhas, Caroline e Louise, pela compreensão da minha ausência e pelo estímulo que sempre me deram. Aos meus pais, por toda base que estabeleceram para mim.

Ao meu querido, competente e divertido chefinho, Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, principalmente por sua orientação, mas também pela sua amizade.

Aos meus colegas de laboratório e companheiros de pesquisa pelo auxílio, parceria, amizade e risadas. Em especial, agradecer a Mariana Nascimento de Paula pela ajuda com as estruturas químicas.

Aos queridos professores que contribuíram para que este trabalho fosse realizado: Dr. Marcos Bruschi, Dra. Teresinha Aparecida Guedes, Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira (Junior), Dra. Denise Brentan Silva, Dra. Emilene Dias Fiuza Ferreira e Dra. Traudi Klein.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

BIOGRAFIA



Leila Larisa Medeiros Marques nasceu em Altônia, PR, no dia 14 de Setembro de 1978. Em 1995 concluiu o ensino médio no Colégio Estadual La Salle, em Pato Branco, PR. Em 1997 iniciou o curso de Farmácia Industrial na Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, PR. Na graduação participou de projeto de extensão como bolsista sobre Riscos da Automedicação por um ano e também estagiou no Laboratório de Genética de Microrganismos por dois anos. Realizou estágio curricular em Farmácia de Dispensação, onde atuou posteriormente como Farmacêutica Técnica. Também realizou estágio na Empresa de Bebidas-Ambev e na sequência do estágio foi efetivada nesta empresa, para atuar no Controle de Qualidade da Produção de Refrigerantes. Formou-se em Farmácia Industrial em 2001. Iniciou em 2002 o mestrado sob a orientação do prof. Dr. João Batista Buzato. Em 2004, obteve o título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Londrina. Em 2008, por meio de concurso público para professor de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico, tomou posse como servidora pública na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão. Iniciou em 2012 o doutorado em Ciências Farmacêuticas –área de concentração Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, no Laboratório de Biologia Farmacêutica –Palafito.

RESUMO

MARQUES, L. L. M. 2016. Investigações fitoquímica e biológicas de extratos obtidos por tecnologia supercrítica de sementes de *Paullinia cupana* (guaraná). Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá, 214p.

Paullinia cupana H. B. K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, conhecida como guaraná, é uma planta nativa brasileira. Suas sementes contêm altas concentrações de metilxantinas, saponinas e polifenóis, especialmente taninos. A ela é atribuído inúmeras funções farmacológicas como: estimulante, adstringente, analgésica, febrífuga, antimicrobiana, antioxidante, panicolítica, antidepressiva, protetora do trato gastrointestinal e do DNA, para tratamento da hipertensão, diarreia crônica, enxaqueca e neuralgia. Este trabalho preocupou-se em elaborar um artigo de revisão sobre o guaraná, enfocando a versatilidade destas funções farmacológicas. Trouxe ainda o cenário atual desta planta, além de adicionar novos tópicos como controle de qualidade e padronização da droga vegetal e seus extratos. Adicionalmente, este trabalho teve como objetivo empregar tecnologia supercrítica para otimização da extração de compostos bioativos de sementes de guaraná investigando suas atividades antioxidantes, antimicrobianas e seu perfil químico. Essa extração foi realizada empregando um planejamento de matriz ortogonal ($OA_9(3^4)$). Os fatores e níveis estudados foram: modificador (es) (etanol e/ou metanol), tempo de extração (20, 40 e 60 min), temperatura (40, 50 e 60 °C), pressão (100, 200 e 300 bar). O fluido supercrítico utilizado foi o CO_2 acrescido de proporções crescentes de modificadores (10, 20 e 40%), definidos como experimento X, Y e Z, respectivamente. A melhor condição de extração supercrítica, baseado no conteúdo de polifenóis, quantificação de catequina e epicatequina, rendimento dos extratos e custo operacional, foi: 40% etanol:metanol durante 40 min, sob 40 °C e 100 bar. A percentagem de modificador empregado foi proporcional à quantidade de compostos polares extraídos. Extratos provenientes do experimento Z mostraram atividade antimicrobiana promissora ($31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente a cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina. Em testes qualitativos, a fração hexânica do extrato 3 (etanol:metanol 40%; 40 min; 40 °C e 300 bar) apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas *Candida tropicalis*, *S. aureus* e *Lactobacillus fermentum*. Os extratos 1 (etanol; 20 min; 40 °C e 100 bar), 2 (metanol; 60 min; 40 °C e 200 bar) e 8 (metanol; 40 min; 60 °C e 100 bar), do experimento Z, apresentaram maiores valores combinados de atividade antioxidante pelos métodos DPPH, Frap, ABTS e sistema xantina oxidase. A análise química dos extratos do experimento Z demonstrou perfis similares, avaliado por CLAE-DAD-EM. Além de cafeína, principal composto extraído, os extratos continham epicatequina, catequina, teofilina, teobromina, e dímeros e trímeros de proantocianidina tipo A e B. A análise do mapa de calor verificou correlação positiva entre os métodos antioxidantes DPPH, Frap e ABTS e com metabólitos catequina, epicatequina e procianidina do tipo B.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, extração supercrítica, matriz ortogonal; modificador.

ABSTRACT

MARQUES, L. L. M. 2016. Phytochemical and biological research of extracts obtained by supercritical technology from *Paullinia cupana* seeds (guaraná). Ph.D. Dissertation. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 214p.

Paullinia cupana H. B. K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, known as guaraná, is a native Brazilian plant. The seeds contain high concentrations of methylxanthines, saponins, and polyphenols, particularly tannins. The pharmacological it is assigned several functions such as a stimulant, astringent, analgesic, febrifuge, antimicrobial, antioxidant, panicolytic, antidepressant, protective of the gastrointestinal tract and DNA, for treating hypertension, chronic diarrhea, migraine, and neuralgia. This work was concerned to prepare a review article about guaraná, focusing on the versatility of these pharmacological functions. It also presented the current scenario of this plant, besides providing new topics as quality control and standardization of plant drug and its extracts. Additionally, this study aimed to apply the supercritical technology, optimizing the extraction of bioactive compounds from guaraná seeds, investigating its antioxidant, antimicrobial activities, and chemical profile. Supercritical extraction of bioactive compounds of guaraná seeds was carried out and planned using an orthogonal matrix ($OA_9(3^4)$). The factors and levels studied were: modifier (s) (ethanol and / or methanol), extraction times (20, 40, and 60 min), temperature (40, 50, and 60 °C), pressure (100, 200, and 300 bar). Carbon dioxide was used as the supercritical fluid, together with different proportions of modifiers (10, 20, and 40%), defined as experiment X, Y, and Z, respectively. The best conditions for the supercritical extraction, based on the content of polyphenols, epicatechin/catechin quantification, yield, and operating cost, proved to be: 40% ethanol:methanol during 40 min, at 40 °C, and 100 bar. The percentage of modifier used was proportional to the amount of polar compounds extracted. The most of the extracts from the experiment Z showed promising antimicrobial activity (31.25 mg L^{-1}) against the strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In qualitative tests, the hexane fraction of the extract 3 (ethanol:methanol 40%; 40 min; 40 °C, and 300 bar) showed antimicrobial activity against *Candida tropicalis* strains, *S. aureus* and *Lactobacillus fermentum*. The extracts 1 (ethanol, 20 min, 40 °C, and 100 bar), 2 (methanol, 60 min, 40 °C, and 200 bar), and 8 (methanol, 40 min, 60 °C, and 100 bar) from the experiment Z showed highest combined values of antioxidant activity by DPPH, Frap, ABTS methods, and xanthine oxidase system. Chemical analysis of extracts from experiment Z showed similar profiles, as analyzed by HPLC-DAD-MS. In addition to caffeine, the main compound extracted, extracts containing epicatechin, catechin, theophylline, theobromine, and dimers and trimers proanthocyanidin type A and B. The heat map analysis showed a positive correlation between the antioxidant methods (DPPH, Frap, and ABTS), and with catechin, epicatechin, and procyanidin type B.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, supercritical extraction, orthogonal matrix, modifier.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tecnologia de fluido supercrítico aplicado às refeições diárias.	26
Figura 2. Principais famílias de compostos encontrados em extratos de plantas obtidos por EFS de biomassa vegetal e exemplos de cada um.	27
Figura 3. Esquema simplificado de um equipamento de extração com CO ₂ e cossolventes.	28
Figura 4. Detalhes de um equipamento de extração supercrítica MV-10, da Waters®. A. O vaso de extração de aço inoxidável sendo introduzido no forno da coluna. Os vasos podem ser de 5, 10 ou 25 mL. B. Vasos de extração posicionados dentro do forno. C. Detalhe do vaso de extração. D. Coletor de frações com bomba de <i>make-up</i> . E. Módulo de entrega do fluido. Apresenta bomba para o CO ₂ e para o cossolvente. O módulo oferece a opção de entrada para até seis cossolventes. F. Visão geral do equipamento que contém: módulo de entrega do fluido, forno da coluna, BPR (regulador da pressão de retorno), coletor de frações, software e ChromScope.	29
Figura 5. Diagrama de fases de uma substância pura.	30
Figura 6. Cossolventes mais utilizados em EFS a partir de matrizes vegetais baseados em 166 publicações do banco de dados EFS.	33
Figura 7. Gráfico para escolha do planejamento estatístico apropriado.	35
Figura 8. Exemplos de ácidos hidroxibenzoicos (A) e hidroxicinâmicos (B).	38
Figura 9. Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.	38
Figura 10. Estrutura geral de algumas das principais classes de flavonoides.	39
Figura 11. Exemplos de taninos: (A) Tanino hidrolisável (β -1,2,3,4,6-pentagaloiil- β -D-glucose); (B) Tanino condensado (epicatequina-(4 β →8)-catequina).	41
Figura 13. Mortes atribuídas todo ano associadas à resistência a antimicrobianos, comparado as maiores causas de morte. Dados obtidos entre os anos 1990 a 2014. Projeção de mortes por resistência a antimicrobianos para 2050.	46

CAPÍTULO 1

- Figura 3.1 Os frutos e sementes de guaraná. A) Frutos de cor laranja com cápsulas vermelhas contendo sementes pretas parcialmente cobertas por arilos brancos; B) De baixo para cima: sementes recém-coletadas recobertas parcialmente por arilos, sementes secas e torradas em pó, sementes torradas ainda íntegras. 54
- Figura 3.2 Estruturas químicas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que podem estar presentes como contaminantes das sementes de guaraná. 95

CAPÍTULO 2

- Figura 4.1. Análise de superfície de resposta para a extração supercrítica de polifenóis totais de sementes de guaraná (mg EP g sementes⁻¹), definindo os seguintes fatores: **(A) Experimento X.** Tempo de Extração = 2 (40 min) e Temperatura = 2 (50°C); **(B) Experimento Y.** Tempo de Extração = 3 (60 min) e Temperatura = 3 (60°C); **(C) Experimento Z.** Tempo de Extração = 2 (40 min) e Temperatura = 1 (40°C). 137
- Figura 4.2. Microscopia eletrônica de varredura de linhagens de *Staphylococcus aureus* N315 meticilina resistentes (SAMR) tratadas com extratos supercríticos de sementes de *P. cupana*. O Tratamento 3 utilizado para este ensaio teve a seguinte combinação: etanol:metanol, 40 min, 40 °C e 300 bar. **A:** SAMR N315 não tratado (controle) a 10,000x ampliação; **B:** SAMR N315 não tratado (controle) a 80,000x de ampliação; **C:** SAMR N315 tratado com extrato de guaraná a 10,000x de ampliação; **D:** SAMR N315 tratado com guaraná a 80,000x de ampliação. 144
- Figura suplementar 4.1. Análise de superfície de resposta para quantificar a resposta de (A) catequina e (B) epicatequina (µg de substância (100 µg de extrato de guaraná)⁻¹) no experimento Z, selecionando os seguintes fatores: tempo de extração = 2 (40 min) e temperatura = 1 (40 °C). 150

CAPÍTULO 3

Figura 5.1 Gráfico de dispersão CP1 versus CP2 sobre as principais fontes de variabilidade de dados para atividade antioxidante e conteúdo em polifenóis totais em sementes supercríticas de guaraná. Escores (A) gráfico de pesos (B).....	166
Figura 5.2. Cromatogramas a 270 nm dos extratos supercríticos de guaraná.....	168
Figura 5.3. Cromatogramas do extrato 3 obtidos a 270 nm em modo de ionização negativa e positiva. A identificação dos picos encontra-se descrita na Tabela 5.2.....	168
Figura 5.4 Intensidades dos íons observados nos diferentes extratos supercríticos de guaraná (1 a 9) relativos aos principais compostos: teobromina, teofilina e cafeína (A) e catequina e epicatequina (B).	169
Figura 5.5. Coeficientes de correlação entre as atividades antioxidante, os perfis químicos e CPT (conteúdo em polifenóis totais). Azul: correlações positivas; Rosa: correlações negativas. Somente foram exibidas as correlações com $p < 0,05$. A identificação dos compostos encontra-se descrita na Tabela 5.2.....	170
Figura 5.7. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos supercríticos de sementes de guaraná, reveladas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 nm (1) e 366 nm (2). “O”= extrato 3; “A”= fração aquosa; “H”= fração hexânica.....	172
Figura 5.8. Teste de bioautografia, revelado em solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) a 1%, dos extratos supercríticos de semente de guaraná antes (extrato 3, “O”) e depois do desengorduramento (fração aquosa, “A” e fração hexânica, “H”) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123.....	174

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Valores característicos de densidade, difusividade e viscosidade, para o estado gasoso, líquido e supercrítico	30
Quadro 2. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto carbônico básico.....	37
Quadro 3. Classificação dos métodos antioxidantes <i>in vitro</i> em relação aos seus mecanismos de ação antioxidante	44
Quadro 4. Resumo das características dos métodos antioxidantes <i>in vitro</i>	45

CAPÍTULO 1

Quadro 3.1 Área, Produção e Rendimento médio na Safra de guaraná no ano de 2015.	56
Quadro 3.2 Área, Produção e Rendimento médio de guaraná no Decênio (2006-2015).	56
Quadro 3.3 Composição química de sementes de guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) e padrões farmacopeicos.	59
Quadro 3.4. Identificação dos principais constituintes químicos em amostras de guaraná.	63
Quadro 3.5 Atividades farmacológicas das sementes de <i>P. cupana</i> ou suas associações descritas na literatura.	69
Quadro 3.6 Toxicologia das sementes de <i>P. cupana</i> ou suas associações descritas na literatura.	92
Os autores agradecem Capes, Finep, INCT_if e CNPq pelo suporte financeiro e Admir Arantes pelo apoio técnico.	101

CAPÍTULO 2

Tabela 4.1. Resultados obtidos utilizando o delineamento $OA_9(3^4)$	134
Tabela 4.2. Valores médios de CPT (mg EP g sementes ⁻¹) em níveis por fator (modificador, tempo de extração, temperatura, e pressão), nos experimentos X, Y e Z.	136
Tabela 4.3. Análise dos resultados do delineamento estatístico $OA_9(3^4)$	138
Tabela 4.4. Quantificação de cafeína, catequina e epicatequina em cada experimento (X, Y e Z) utilizando CLAE.	140

CAPÍTULO 3

Quadro 5.1. Cepas avaliadas nas análises antimicrobianas segundo sua importância.	161
Tabela 5.1. Atividade antioxidante por quatro métodos e teor de polifenóis dos extratos supercríticos de <i>Paullinia cupana</i>	165
Tabela 5.2. Identificação dos constituintes dos extratos de <i>Paullinia cupana</i> por CLAE-DAD-EM.	169
Tabela 5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos supercríticos de semente de guaraná antes (extrato 3), e depois do desengorduramento (fração aquosa, “FA”; e fração hexânica, “FH”) por meio do método de bioautografia.	173

LISTA DE SIGLAS

(PCA)	Análise de Componentes Principais
(Capes)	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior
(CNPq)	Conselho Nacional de Pesquisa
(CPT)	Conteúdo de polifenóis totais
(CRL)	Captura de radicais livres
(Cuprac)	Capacidade de redução do cobre (II)
(DMO)	Delineamento com matriz ortogonal
(DPPH)	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
(EFS)	Extração por fluido supercrítica
(EFSA)	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
(FDA)	<i>Food and Drug Administration</i>
(Finep)	Financiadora de Estudos e Projetos
(Frap)	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
(Gras)	Geralmente reconhecido como seguro
(INCT_if)	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica
(IOC)	Consumo inibido de oxigênio
(LPIC)	Ensaio da capacidade de inibição da peroxidação lipídica
(Orac)	Capacidade de absorvância do radical oxigênio
(Palafito)	Laboratório de Biologia Farmacêutica
(ROS)	Espécies reativas de oxigênio
(SC-CO ₂)	Gás carbônico supercrítico
(Teac)	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
(Trap)	Parâmetro antioxidante da captura total do radical

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 EXTRAÇÃO SUPERCRTICA.....	24
2.1.1 Aspectos gerais.....	24
2.1.2 O equipamento.....	25
2.1.3 Fluido supercrítico.....	26
2.1.4 Dióxido de carbônico supercrítico (SC-CO ₂)	29
2.1.5 Etapas da extração supercrítica.....	30
2.1.6 Uso de cossolventes	32
2.2 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO EM EXTRAÇÕES	34
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	35
2.4 ANTIOXIDANTES.....	42
2.5 ANTIMICROBIANOS	45
3. CAPÍTULO 1: <i>Paullinia cupana</i> : uma planta multifuncional – uma revisão	49
Resumo	50
3.1. Introdução.....	52
3.2 Histórico.....	53
3.3 Cultura e Processamento	54
3.4 Características botânicas.....	58
3.5 Aspectos químicos.....	59
3.6 Propriedades farmacológicas	65
3.7 Toxicidade	89
3.8 Controle de qualidade.....	90
3.9 Preparação de extratos, padronização e formas farmacêuticas	96
3.10 Conclusões	101
3.11 Referências.....	102
4. CAPÍTULO 2: Sementes de guaraná (<i>Paullinia cupana</i>): extração supercrítica seletiva de compostos fenólicos.....	122
Resumo	124
4.1. Introdução.....	126
4.2. Material e métodos	128
4.2.1 Matéria-prima, amostragem e controle de qualidade	128
4.2.2 Procedimento de extração	128
4.2.3 Delineamento experimental.....	129
4.2.4 Determinação do teor de polifenóis totais (CPT) dos extratos	129

4.2.5	Análise de cromatografia líquida de alta eficiência.....	130
4.2.6	Cepa bacteriana e condições de cultivo	131
4.2.7	Determinação da concentração mínima inibitória (CIM).....	131
4.2.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	132
4.2.9	Análise estatística	132
4.3.	Resultados e discussão	133
4.3.1	Controle de qualidade da droga	133
4.3.2	Rendimento	133
4.3.3	Conteúdo em polifenóis totais (CPT).....	133
4.3.4	Análise dos extratos por CLAE.....	139
4.3.5	Extração supercrítica.....	141
4.3.6	Atividade antimicrobiana	142
4.3.7	Microscopia eletrônica de varredura	143
4.4.	Conclusões	143
4.5.	Referências.....	146
5.	CAPÍTULO 3: Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos supercríticos de guaraná (<i>Paullinia cupana</i>)	151
	Resumo	153
5.1	Introdução	155
5.2	Materiais e Métodos.....	157
5.2.1	Matéria-prima	157
5.2.2	Extração	157
5.2.3	Análises antioxidantes.....	157
5.2.4	Desengorduramento dos extratos preparados por EFS	160
5.2.5	Avaliação antimicrobiana	160
5.2.6	Análises dos extratos por CLAE-DAD-EM	163
5.2.7	Análise estatística	163
5.3	Resultados e Discussão	164
5.3.1	Análise de dados da atividade antioxidante e CPT	164
5.3.2	Análises dos extratos por CLAE-DAD-EM	167
5.3.3	Correlações entre o perfil químico dos extratos e as atividades antioxidantes	167
5.3.4	Análises antimicrobianas.....	171
5.4	Referências.....	176
6.	CONCLUSÕES	182
7.	REFERÊNCIAS.....	185
	APÊNDICE A - Artigo publicado na revista Food Chemistry	212

1. INTRODUÇÃO

1 Há muito tempo, as plantas medicinais têm sido utilizadas para o tratamento,
2 cura e prevenção de uma variedade de doenças. O Brasil tem quase um terço da
3 flora mundial, representado em dez biomas como uma gigantesca biodiversidade, e
4 apresentando um grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas em novas
5 tecnologias e serviços terapêuticos (ARAÚJO et al., 2013). No Brasil, a utilização e a
6 comercialização de plantas medicinais têm sido estimuladas em parte, pela
7 crescente demanda da indústria por novas fontes naturais de medicamentos e
8 antioxidantes e, por outro lado, devido aos efeitos colaterais causados pelos
9 compostos sintéticos. As plantas medicinais apresentam uma imensa diversidade
10 química e muitas destas plantas, frequentemente utilizadas pela população, não
11 tiveram todos os seus princípios ativos elucidados para validá-las como
12 medicamentos ou para aproveitá-las economicamente (MONTANARI e BOLZANI,
13 2001).

14 O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) é uma planta originária da
15 região amazônica brasileira intimamente ligada à cultura indígena local. O Brasil é o
16 maior produtor mundial de guaraná, com uma área plantada de 15.043 ha e uma
17 produção de 3.658 t em 2015. Os maiores estados produtores são Bahia (71%) e
18 Amazonas (23%), mas também é produzido em outros estados como Mato Grosso
19 (6%) (IBGE, 2016). Aproximadamente 70% da produção são utilizados na produção
20 de refrigerantes e bebidas energéticas (Suframa, 2003).

21 A semente de guaraná é rica em cafeína. Além disso, ela contém uma alta
22 concentração de polifenóis, particularmente proantocianidinas (HENMAN, 1982;
23 USHIROBIRA et al., 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). A estas substâncias
24 presentes em suas sementes torradas são atribuídos efeitos estimulantes,
25 afrodisíacos e analgésicos. Utilização esta largamente difundida entre os índios
26 amazonenses. Além disso, o guaraná possui uma exuberante diversidade de
27 propriedades terapêuticas relatadas na literatura como: anticarcinogênico
28 (FUKUMASU et al., 2008; FUKUMASU, LATORRE e Z AidAN-DAGLI, 2011;
29 FUKUMASU et al., 2006), antiproliferativo (HERTZ et al., 2015), antimicrobiano,
30 antioxidante (BASILE et al., 2005; DALONSO e PETKOWICZ, 2012; MAJHENIC,
31 SKERGET e KNEZ, 2007; YAMAGUTI-SASAKI, ITO, CANTELI, 2007), cognitivo
32 (GALDURÓZ e CARLINI, 1996; KENNEDY et al., 2008; OTOBONE et al., 2005),
33 citoprotetor (OLIVEIRA et al., 2011), termogênico (ANDERSEN e FOGH, 2001;

34 BOOZER et al., 2001), antidepressivo (AUDI e MELLO, 2000; OTOBONE et al.,
35 2007) e ansiolítico (RANGEL, MELLO e AUDI, 2013; RONCON et al., 2011).
36 Também pode prevenir doenças orais (MATSUURA et al., 2015; YAMAGUTI-
37 SASAKI, ITO, CANTELI, 2007), contra efeitos oxidativos e desordens metabólicas
38 (PORTELLA et al., 2013), entre outros (HAMERSKI, SOMNER e TAMAIO, 2013;
39 MACHADO et al., 2015; SCHIMPL et al., 2013).

40 A escolha do método extrativo e/ou suas condições pode alterar de forma
41 significativa a composição do extrato e conseqüentemente as suas atividades
42 biológicas. Extratos obtidos por tecnologia supercrítica, por exemplo, podem mostrar
43 maior concentração de compostos fenólicos e atividades antirradicalares do que
44 aqueles provenientes de extração sólido-líquida (PINELO et al., 2007). Extratos
45 supercríticos podem ainda ser mais efetivos na extração de substâncias com
46 atividade antimicrobiana, em comparação àqueles obtidos de extração metanólica
47 (LIU et al., 2007). Além disto, a extração pode ser seletiva para um determinado
48 grupo de compostos bioativos em razão da alteração das condições de extração
49 (MARQUES et al., 2016).

50 A extração por fluido supercrítico (EFS) tem inúmeras vantagens sobre a
51 extração convencional. A EFS emprega baixas temperaturas para extração,
52 possibilita a reutilização dos solventes já que os fluidos supercríticos voltam ao
53 estado gasoso em condições de pressão normal e temperatura ambiente, o que
54 também resulta na obtenção de produtos de alto valor agregado, pois esses são
55 livres de resíduos tóxicos de solventes orgânicos (SOUZA, MELLO e LOPES, 2012).
56 Conseqüentemente, as operações de recuperação do produto são minimizadas. Na
57 EFS, o principal solvente supercrítico utilizado é o dióxido de carbono (CO₂). Ele
58 possui condições críticas brandas; facilmente disponível em elevada pureza a um
59 baixo custo, tem baixa tensão superficial, baixa viscosidade com alta difusividade.
60 Além disto, o CO₂ utilizado como fluido supercrítico é seguro, não tóxico, não
61 carcinogênico, não inflamável e inerte. Além disto, para melhorar a extração de
62 compostos polares, modificadores tais como álcoois podem ser adicionados para
63 aumentar seu poder de solvatação (HUANG, SHI e JIANG, 2012).

64 O uso do planejamento fatorial de experimentos é uma estratégia útil no
65 delineamento do mapa de experiências a realizar. Assim, quando o objetivo é a
66 otimização, investigando dois a quatro fatores, podem-se aplicar diferentes tipos de

67 planejamento como, por exemplo, testes ortogonais, desenho de Box-Behnken e
68 modelo composto central (SHARIF et al., 2014).

69 O planejamento de matriz ortogonal (TAGUCHI, 1986; TAGUCHI e KONISHI,
70 1987) é um desenho fracionário fatorial com uma série de ensaios designados por
71 uma matriz ortogonal. Este *design* pode reduzir consideravelmente o número de
72 experimentos, pois quando o efeito de um fator é calculado, a influência de outros é
73 removida da consideração. Várias aplicações deste método são relatadas na
74 literatura (GHAFOOR, AL-JUHAIMI e CHOI, 2012; LIU et al., 2013; WANG et al.,
75 2011). Nestes trabalhos, este modelo foi utilizado para construção de gráficos de
76 superfície de resposta, regressão linear ou outras análises estatísticas que preveram
77 as relações entre as variáveis independentes e as dependentes, estabeleceram a
78 ordem de importância de fatores, alcançando assim, o objetivo de otimizar a
79 extração.

80 Espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$),
81 radicais hidroxilas (OH^{\bullet}), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) têm efeitos danosos à
82 célula. Os antioxidantes podem ser de grande vantagem para a melhoria da
83 qualidade de vida, impedindo ou adiando o aparecimento de doenças degenerativas.
84 Além disto, eles têm um potencial de economia nos custos de prestação de cuidados
85 à saúde (ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013). Investigar plantas que tenham
86 capacidade de captura de radicais livres (CRL) é de interesse, principalmente a fim
87 de encontrar novas fontes promissoras de antioxidantes naturais (em detrimento aos
88 sintéticos), alimentos funcionais e nutracêuticos (MILIAUSKAS, VENSKUTONIS e
89 BEEK, 2004).

90 Tem sido um problema crítico na medicina humana e veterinária a alta
91 incidência de microrganismos resistentes aos antibióticos, surgindo, assim, a
92 necessidade do desenvolvimento de novas terapêuticas e estratégias de
93 antimicrobianos (KUREK et al., 2012). A diversidade de moléculas encontradas em
94 plantas faz das mesmas promissoras fontes de novos agentes antimicrobianos
95 (BARRECA et al., 2014). Esta busca por novos antimicrobianos promove
96 investigações fitoquímica e farmacológicas de plantas, guiadas por informações
97 sobre o seu uso etnobotânico (FILOCHE, SOMA e SISSONS, 2005).

98 Diante deste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi empregar a
99 tecnologia supercrítica para otimizar a extração de compostos bioativos de sementes

100 de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke - *Sapindaceae*),
101 investigando suas atividades antimicrobianas, antioxidantes e seu perfil químico.

102 Os objetivos específicos foram:

- 103 1. elaborar um artigo de revisão sobre os principais aspectos
104 concernentes ao guaraná, enfatizando sua diversidade farmacológica.
105 Apresentar novos tópicos como controle de qualidade e a
106 padronização das sementes de guaraná e seus extratos;
- 107 2. empregar um planejamento ortogonal para a otimização da extração
108 supercrítica de compostos fenólicos de sementes de guaraná, testando
109 quatro fatores em três níveis;
- 110 3. Monitorar a otimização da extração, por meio da análise de polifenóis
111 totais, rendimento e quantificação das principais substâncias extraídas
112 por CLAE;
- 113 4. Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos supercríticos frente
114 a diversos microrganismos de interesse clínico, industrial, alimentício e
115 ambiental. Para isto, realizar o monitoramento qualitativo da ação
116 antimicrobiana por meio de bioautografia e calcular as concentrações
117 mínimas: inibitória (CMI), bactericida (CBM) e fungicida (CFM), destes
118 extratos de guaraná;
- 119 5. Investigar a atividade antioxidante dos extratos supercríticos que
120 apresentaram maiores teores de polifenóis totais, por meio de análise
121 quimiométrica. Os métodos antioxidantes utilizados foram: DPPH,
122 Frap, ABTS e sistema xantina oxidase.
- 123 6. Analisar perfil químico dos extratos supercríticos por CLAE-DAD-EM e
124 sua correlação com atividade antioxidante por meio de análise
125 multivariada.

126 Neste contexto, o presente estudo apresenta:

- 127 • Capítulo 1: artigo de revisão sobre o guaraná, mostrando todo cenário
128 de produção atual, sua versatilidade farmacológica, histórico,
129 características botânicas, aspectos químicos, controle de qualidade e
130 importância da obtenção de extratos padronizados, entre outros
131 tópicos;
- 132 • Capítulo 2: emprego da tecnologia supercrítica para obtenção de
133 compostos bioativos a partir de sementes do guaraná. A otimização

134 deste processo emprega um planejamento estatístico com matriz
135 ortogonal por meio da análise dos principais compostos extraídos,
136 rendimento e teor de polifenóis totais Os fatores testados foram:
137 pressão, temperatura, tempo de extração e adição de modificadores
138 (etanol e/ou metanol);

- 139 • Capítulo 3: avaliação da atividade antimicrobiana frente a
140 microrganismos, de interesse clínico, industrial, alimentício e ambiental,
141 e a atividade antioxidante dos extratos obtidos por tecnologia
142 supercrítica do experimento Z. Traz ainda a análise do perfil químico
143 destes extratos por CLAE-DAD-EM e sua correlação com a atividade
144 antioxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

145 2.1 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

146

147 2.1.1 Aspectos gerais

148 A EFS é geralmente mais rápida que a extração convencional e quando usa o
149 CO₂ supercrítico (SC-CO₂) como solvente, muito mais ecológica. Em todo o mundo
150 há uma pressão para a indústria adotar novos processos sustentáveis que não
151 requerem o uso de solventes orgânicos ambientalmente prejudiciais e também
152 devido à tendência de um rápido aumento dos custos industriais (RAMSEY et al.,
153 2009). O problema com os solventes numa extração convencional é o fato de ser
154 muito difícil de remover todo o solvente residual sem um grande dispêndio de
155 energia e custos. Além disso, o solvente pode provocar alterações químicas nas
156 moléculas do extrato e, assim, provocar efeitos tóxicos nos consumidores. Na
157 extração de matérias-primas naturais com o SC-CO₂, as temperaturas empregadas
158 são baixas e o gás carbônico dissipa-se totalmente após a descompressão (MAUL,
159 1999). Portanto, os processos de extração supercrítica se destacam por
160 características muito importantes como: a obtenção de extratos relativamente
161 limpos, livres da degradação de compostos lábeis ou facilmente oxidados, que
162 podem aparecer da prolongada exposição à alta temperatura e oxigênio, gerando
163 produtos de alta qualidade; o trabalho com solventes não tóxicos; tempo mais curto
164 nas etapas de recuperação de produtos, gerando processos mais rápidos. Assim, a
165 EFS tornou-se uma alternativa importante na extração de materiais de plantas em
166 escala industrial (JUNIOR, LEITE e DRAGANO, 2010; VATAI, ŠKERGET e KNEZ,
167 2009). Outra vantagem distinta de EFS sobre os métodos convencionais é que esta
168 tecnologia permite fornecer mais informações relativas aos processos de extração e
169 seus mecanismos. Estas informações podem ser utilizadas para avaliação
170 quantitativa ou de eficiência da extração e, assim, otimizar o processo
171 posteriormente (LANG e WAI, 2001).

172 A principal desvantagem de uma aplicação em larga escala de EFS, em
173 comparação com os métodos convencionais, é o alto custo do equipamento de alta
174 pressão necessário. No entanto, isto pode muitas vezes ser superado pelas
175 propriedades do produto de qualidade superior, aumentando o valor agregado
176 desses produtos (SOVOVÁ e STATEVA, 2011). Outra vantagem é a base do

177 esquema do processo (extração acrescido de separação), que é relativamente de
178 baixo custo e muito simples de ser ampliada para a escala industrial (REVERCHON
179 e MARCO, 2006). Assim, muitas unidades de grande escala industrial para a EFS de
180 materiais naturais sólidos, principalmente para ingredientes alimentícios e produtos
181 fitofarmacêuticos, são operados em todo o mundo e são economicamente
182 competitivos (SOVOVÁ e STATEVA, 2011).

183 Vem crescendo a utilização da EFS na indústria de alimentos, na farmacêutica
184 (incluindo a indústria de perfumaria para extração de óleos e fragrâncias) e na
185 biotecnológica (reações catalisadas enzimaticamente) (HERRERO et al., 2010). As
186 duas principais aplicações comerciais da EFS na indústria de alimentos são a
187 extração do lúpulo e descafeinização do café. Algumas aplicações da EFS na
188 alimentação diária humana são mostradas na Figura 1. Há um crescente aumento
189 por produtos ricos em compostos biologicamente ativos como antioxidantes,
190 vitaminas lipossolúveis e corantes (REVERCHON e MARCO, 2006; SOVOVÁ e
191 STATEVA, 2011). Vários estudos (CHANG et al., 2000; GHAFLOOR, AL-JUHAIMI e
192 CHOI, 2012; JUNIOR, LEITE e DRAGANO, 2010; LANG e WAI, 2001; LIU, JIAO,
193 LIU, 2013; MURGA et al., 2000; REVERCHON e MARCO, 2006; SOVOVÁ e
194 STATEVA, 2011; VARGAS et al., 2010; WANG, YING, SUN, 2011) evidenciam a
195 utilização da extração supercrítica para obter compostos bioativos a partir de
196 produtos naturais. As principais famílias destes compostos são exemplificadas na
197 Figura 2. Na indústria farmacêutica o SC-CO₂ é também utilizado na produção de
198 partículas em micro e nanoescala (ABDULLAH, 2007). Adicionalmente, a EFS tem
199 também demonstrado algumas vantagens no campo ambiental, além das já citadas,
200 como por exemplo, para obter novos compostos úteis a partir de subprodutos
201 industriais, e para permitir a quantificação e/ou remoção de compostos tóxicos do
202 meio ambiente (HERRERO, MENDIOLA, CIFUENTES, 2010).

203

204 2.1.2 O equipamento

205 A extração é geralmente realizada como um processo semicontínuo. Um
206 esquema simplificado do equipamento de extração com SC-CO₂ e cossolvente pode
207 ser observado na Figura 3. Materiais vegetais são geralmente secos, desintegrados
208 e colocados em um recipiente de extração, de forma que se obtenha um leito fixo de
209 partículas. O solvente supercrítico alimenta o sistema continuamente por uma
210 bomba de alta pressão a uma vazão fixa, dissolvendo os compostos requeridos. A

211 solução fluid para um separador onde os compostos extraídos são precipitados por
 212 mudanças de temperatura e/ou pressão, ou por um agente de separação. O
 213 solvente é, então, continuamente regenerado e recirculado (SOVOVÁ e STATEVA,
 214 2011).

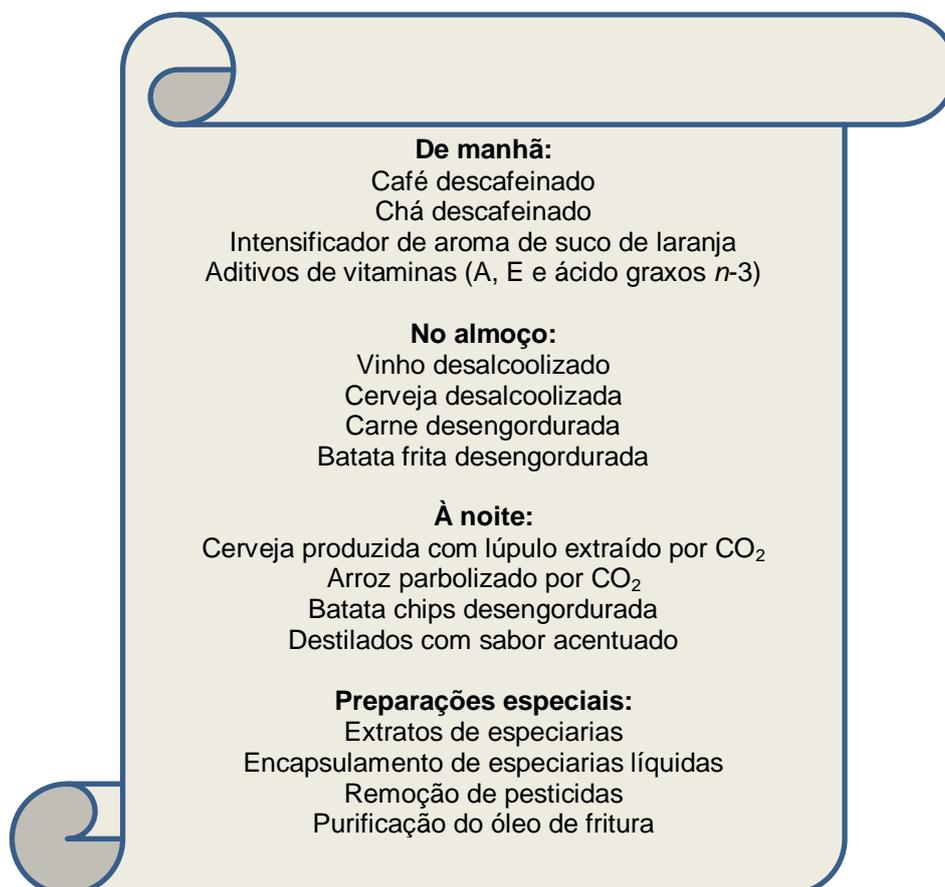


Figura 1. Tecnologia de fluido supercrítico aplicado às refeições diárias.
 Fonte: Brunner (2005).

215 Todas as partes da planta em escala laboratorial da EFS devem ser
 216 concebidas de modo a resistir ao máximo de pressão de operação (KARALE et al.,
 217 2011).

218 Outro exemplo de equipamento de extração supercrítico mais detalhado é
 219 mostrado na Figura 4.

220

221 2.1.3 Fluido supercrítico

222 Quando uma substância é elevada acima de seus pontos críticos de
 223 temperatura e pressão, ela passa para uma condição chamado de “o estado fluido
 224 supercrítico” (Figura 5). Quando a diferença entre a fase líquida e vapor desaparece,
 225 o fluido torna-se crítico. Nesta conjuntura, o fluido de uma fase tem uma

226 compressibilidade isotérmica de infinidade (ABDULLAH, 2007). A temperatura crítica
 227 de um gás é aquela temperatura acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não
 228 importando a quanto se eleve a pressão. A pressão crítica é definida como a
 229 pressão acima da qual o gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto
 230 se diminua a temperatura (BRUNNER, 2005).

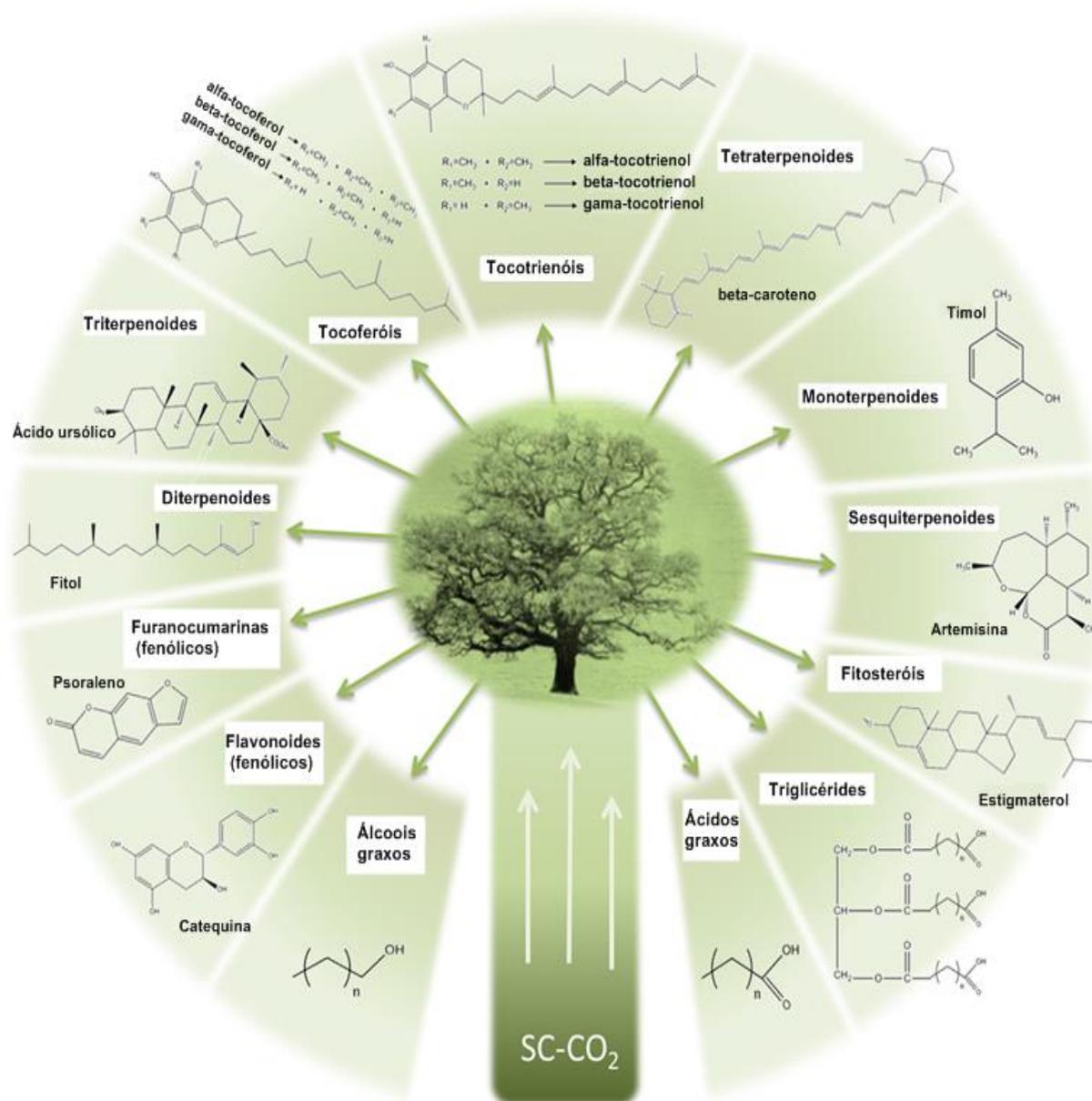


Figura 2. Principais famílias de compostos encontrados em extratos de plantas obtidos por EFS de biomassa vegetal e exemplos de cada um.
 Fonte: Melo, Silvestre e Silva (2014).

231 Fluidos supercríticos carregam as propriedades dos gases e dos líquidos
 232 (Quadro 1). A densidade de um fluido supercrítico pode ser mudada pela variação
 233 da pressão aplicada sobre o fluido, por exemplo. Assim, um fluido supercrítico pode

234 ter a densidade que oscila entre aquelas exibidas pelos gases até valores típicos
 235 dos líquidos, quando o fluido é comprimido a altas temperaturas. Um fluido
 236 supercrítico tem a capacidade de dissolver uma variedade de materiais, exatamente
 237 como fazem os líquidos convencionais, mas com o poder de penetração dos gases.
 238 Portanto, na proximidade do ponto crítico, um fluido tem uma densidade (isto é,
 239 poder de solubilização) semelhante àquela na fase líquida juntamente com uma
 240 compressibilidade semelhante à da fase gasosa. Este conjunto de características
 241 torna a transferência de massa mais rápida do que quando se utiliza líquidos como
 242 solventes. Nenhum outro método de extração tem tal flexibilidade. Pequenas
 243 mudanças na temperatura e/ou pressão geram mudanças enormes na densidade e
 244 conseqüentemente no poder de solvatação do solvente supercrítico (KOPCAK e
 245 MOHAMED, 2005; SOVOVÁ e STATEVA, 2011). Isto é uma característica muito
 246 importante dos fluidos supercríticos, pois os solventes convencionais só podem ser
 247 alterados pela adição de outros solventes, ou por aumento considerável de
 248 temperatura (KOPCAK e MOHAMED, 2003).

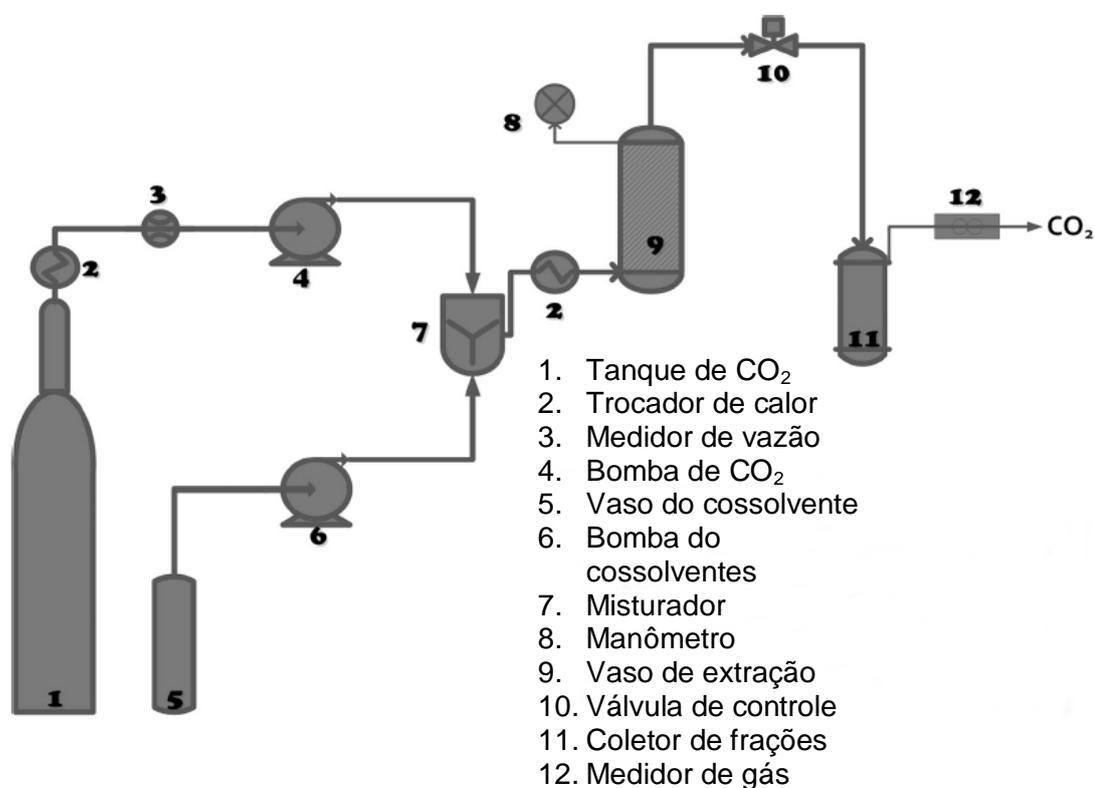


Figura 3. Esquema simplificado de um equipamento de extração com CO₂ e cossolventes.

Fonte: Azmir et al. (2013).

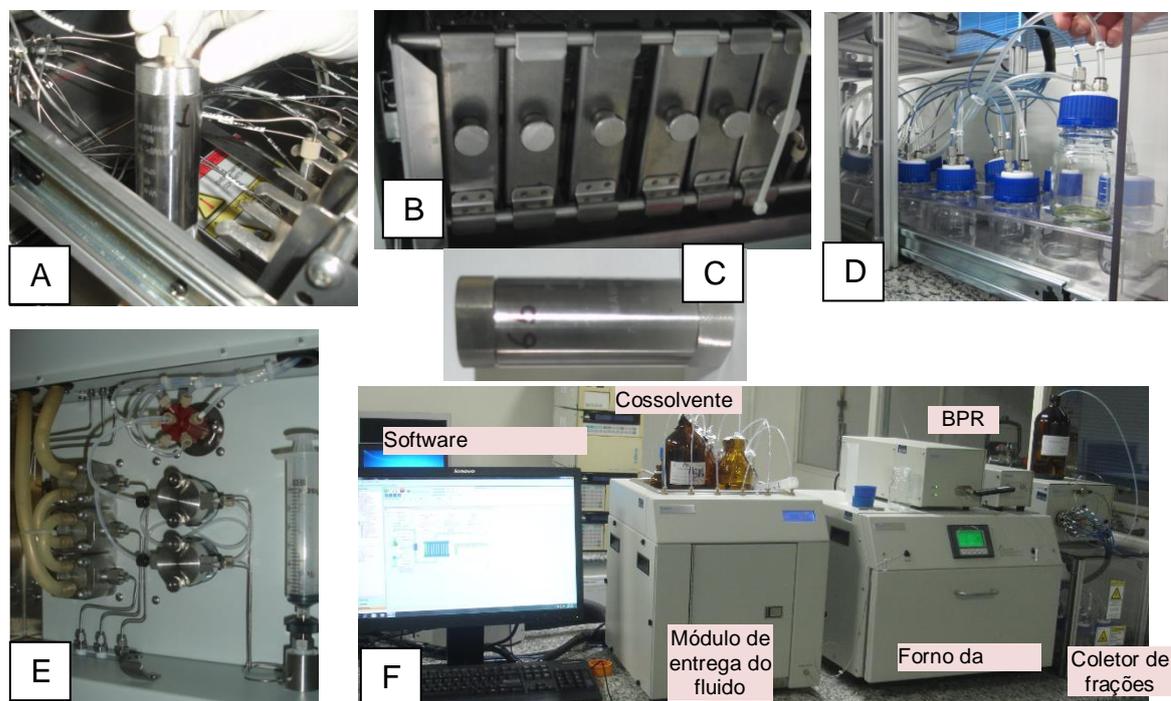


Figura 4. Detalhes de um equipamento de extração supercrítica MV-10, da Waters[®]. A. O vaso de extração de aço inoxidável sendo introduzido no forno da coluna. Os vasos podem ser de 5, 10 ou 25 mL. B. Vasos de extração posicionados dentro do forno. C. Detalhe do vaso de extração. D. Coletor de frações com bomba de *make-up*. E. Módulo de entrega do fluido. Apresenta bomba para o CO₂ e para o cossolvente. O módulo oferece a opção de entrada para até seis cossolventes. F. Visão geral do equipamento que contém: módulo de entrega do fluido, forno da coluna, BPR (regulador da pressão de retorno), coletor de frações, software e ChromScope.

249 2.1.4 Dióxido de carbônico supercrítico (SC-CO₂)

250 O principal solvente supercrítico utilizado na EFS é o dióxido de carbono. A
 251 principal razão é indubitavelmente a sua versatilidade. Ele tem baixo custo, não
 252 inflamável, não explosivo, facilmente acessível em alta pureza, suas condições
 253 críticas são amenas (30,9 °C e 72,8 atm), ambientalmente correto, e geralmente
 254 reconhecido como seguro pelas organizações europeia (EFSA) e americana (FDA).
 255 Ele é também atrativo devido à sua alta difusividade combinado com a sua força do
 256 solvente facilmente ajustável. Adicionalmente, é gasoso à pressão e temperatura
 257 ambiente, o que torna a recuperação do produto muito simples e fornece produtos
 258 livres de solvente (HERRERO, MENDIOLA, CIFUENTES, 2010; MELO, SILVESTRE
 259 e SILVA, 2014; SOVOVÁ e STATEVA, 2011). As propriedades de rápida
 260 transferência de massa associada com a baixa viscosidade do SC-CO₂ promove
 261 uma capacidade mais eficiente em termos de tempo para vários tipos de processos

262 industriais importantes (RAMSEY, SUN, ZHANG, 2009). A habilidade do SC-CO₂ ser
 263 operado em temperaturas baixas usando um meio não oxidante permite a extração
 264 de compostos lábeis e facilmente oxidáveis.

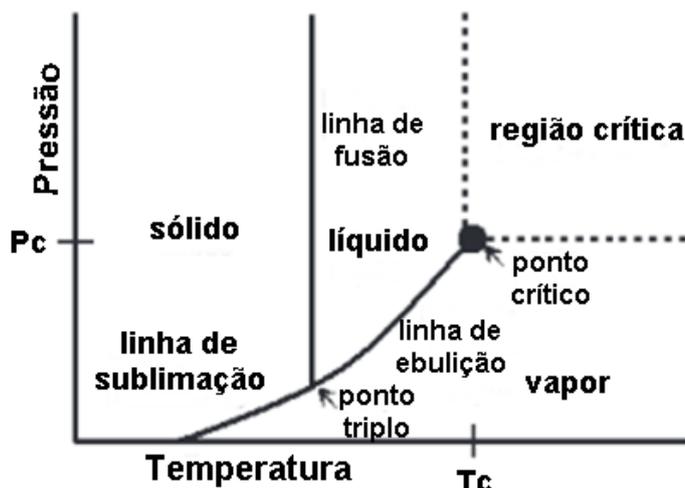


Figura 5. Diagrama de fases de uma substância pura.
 Fonte: Mühlen e Lanças (2004).

Quadro 1. Valores característicos de densidade, difusividade e viscosidade, para o estado gasoso, líquido e supercrítico

Estado do fluido	Densidade (g.cm ⁻³)	Difusividade (cm ² .s ⁻¹)	Viscosidade [g.(cm.s) ⁻¹]
Gás P=1 atm; T= 15-30°C	(0,6-2,0).10 ⁻³	0,1-0,4	(0,6-2,0).10 ⁻⁴
Líquido P=1 atm; T= 15-30°C	0,6-1,6	(0,2-2,0).10 ⁻⁵	(0,2-3,0).10 ⁻²
Fluido Supercrítico P=P _c ; T≈T _c	0,2-0,5	0,7.10 ⁻³	(1-3).10 ⁻⁴
Fluido Supercrítico P=4P _c ; T≈T _c	0,4-0,9	0,2.10 ⁻³	(3-9).10 ⁻⁴

T_c= temperatura crítica; P_c= Pressão crítica
 Fonte: Brunner (2005).

265 2.1.5 Etapas da extração supercrítica

266 O planejamento de processos usando solventes supercríticos é fortemente
 267 dependente do cenário de equilíbrio de fase, que é altamente sensível a mudanças
 268 nas condições de operação. O conhecimento da engenharia do equilíbrio de fases
 269 inclui bancos de dados, dados experimentais, comportamento de fase
 270 fenomenológica, análise termodinâmica, e procedimentos de modelagem
 271 matemática para os cálculos do processo de equilíbrio de fases (HERRERO,
 272 MENDIOLA, CIFUENTES, 2010).

273 Existem dois principais fatores que afetam o desenvolvimento das tecnologias
274 de extração com SC-CO₂, que são a solubilidade (termodinâmica) do soluto no fluido
275 supercrítico e a taxa de transferência de massa (cinética) do soluto para fora das
276 matrizes (HUANG, SHI e JIANG, 2012).

277 Na extração supercrítica, como o solvente pressurizado flui continuamente
278 através do leito de partículas porosas, as moléculas de CO₂ irão difundir-se dentro
279 dos poros e serão adsorvidas na superfície das partículas para formar uma película
280 externa de fluido à volta das partículas sólidas, por meio da interação solvente-
281 matriz sólida. Em seguida, as moléculas de analito serão dissolvidas e
282 convectivamente transportadas para o solvente nos poros através de interação
283 solvente-soluto (HUANG, SHI e JIANG, 2012). A taxa de transferência interna de
284 massa é diretamente proporcional à difusividade interna efetiva e inversamente
285 proporcional ao quadrado do tamanho da partícula, dependendo ainda, do formato
286 da partícula (SOVOVÁ, 2012). Após dessorção, o soluto dissolvido difunde-se
287 através dos poros e, finalmente, o fluido o transporta em grande quantidade
288 (HUANG, SHI e JIANG, 2012). O tempo característico da extração de equilíbrio é
289 diretamente proporcional ao tempo de residência, que é o tempo característico do
290 deslocamento do fluido a partir de extrator; e é inversamente proporcional a taxa de
291 vazão específica (SOVOVÁ, 2012). Na saída da unidade de extração, o fluido é
292 liberado para o estado gasoso e o soluto precipita-se e sua quantidade pode ser
293 avaliada (HUANG, SHI e JIANG, 2012). Se a temperatura é mantida constante, o
294 produto da separação é alcançado por despressurização. Por outro lado, produtos
295 extraídos podem também ser separados do SC-CO₂ por aumento da temperatura, ou
296 de forma mais complexa, pela variação da temperatura e pressão, ou ainda por um
297 sólido que pode ser usado para promover a separação por adsorção. Parâmetros
298 importantes de operação da EFS a serem considerados são a temperatura, pressão,
299 vazão de CO₂ e a umidade do material a ser extraído (KARALE, DERE, HONDE,
300 2011).

301 É possível, por meio da modelagem matemática, simular os problemas da
302 extração, dando a oportunidade de generalizar os resultados experimentais, e, se
303 bem sucedida, obter indicações sobre sistemas diferentes daqueles estudados.
304 Além disso, a modelagem matemática é útil no desenvolvimento de procedimentos
305 de aumento de escala do laboratório à escala piloto e industrial. Para isto, vários
306 aspectos têm que ser considerados (REVERCHON e MARCO, 2006): 1) a estrutura

307 do material sólido. O conhecimento dos aspectos botânicos e/ou microscopia óptica
308 ou microscopia eletrônica de varredura (MEV) do material são necessários para
309 visualizar a sua estrutura. Por exemplo, as sementes são essencialmente formadas
310 por estruturas especializadas que operam como pequeno recipiente contendo o
311 óleo; 2) localização dos compostos a serem extraídos. A distribuição do soluto no
312 interior do substrato sólido pode ser muito diferente. As substâncias extraíveis
313 podem estar livres sobre a superfície do material sólido ou no interior da estrutura do
314 próprio material; 3) interações dos solutos com a matriz sólida. Dependendo das
315 interações entre os compostos e a estrutura sólida, diferentes equilíbrios podem
316 estar envolvidos; 4) integridade das estruturas. Parte dos compostos a ser extraída
317 pode estar próximo da superfície da estrutura, devido à ruptura de células durante a
318 moagem. Este caso é característico de partículas de sementes trituradas, na qual
319 uma parte não negligenciável do óleo é livre na superfície de partículas. Além disso,
320 alterações nas membranas podem ocorrer devido à secagem, liberando parte do
321 material solúvel; 5) forma das partículas. Assim, sua forma pode influenciar a difusão
322 do solvente supercrítico, alterando qualitativamente e quantitativamente a composição
323 dos extratos.

324

325 *2.1.6 Uso de cossolventes*

326 Solubilidade é uma das propriedades termofísicas requeridas para o
327 planejamento do processo de extração. A principal desvantagem do CO₂ supercrítico
328 é sua baixa polaridade, que faz com que a extração de substâncias polares como os
329 polifenóis, por exemplo, seja muito baixa. Problema este que pode ser resolvido com
330 o emprego de modificadores (cossolventes) para mudar a polaridade do fluido
331 supercrítico e aumentar seu poder de solvatação para o analito de interesse
332 (HERRERO, MENDIOLA, CIFUENTES, 2010). Desta forma ocorre uma alta
333 solubilidade devido ao aumento de forças de interação com o soluto e/ou por
334 aumento da densidade, e conseqüentemente, o poder de solvatação.

335 Dois procedimentos principais para estudar cossolventes ou modificadores em
336 EFS são; o primeiro, e o mais comum, é a mistura do modificador com o fluxo de
337 CO₂, enquanto que o segundo é uma mistura do modificador com a matéria-prima na
338 célula de extração. Este último está sempre associado a um passo de extração
339 estático, em que o modificador, em contato íntimo com a matriz, é capaz de

340 substituir as moléculas de analito ligadas em centros ativos da matriz e libertá-las
341 para a fase de fluido supercrítica (ROZZI e SINGH, 2002).

342 A adição de relativamente pequenas percentagens (1-10%) de cossolventes ao
343 SC-CO₂ expande a gama de extração para incluir analitos polares. Os modificadores
344 podem também reduzir as interações analito-matriz melhorando a extração
345 quantitativa das substâncias de interesse (BRAVI et al., 2007).

346 Segundo Melo, Silvestre e Silva (2014), dos 166 trabalhos pesquisados que
347 fizeram uso de cossolvente em matrizes vegetais, o etanol aparece em 53% deles e
348 o metanol vem em seguida com 21% (Figura 6). O etanol é um solvente inócuo tanto
349 para saúde humana quanto ao meio ambiente. Ele tem forte vantagem sobre o
350 metanol ou *n*-hexano, por exemplo, particularmente quando a EFS é dedicada à
351 indústria alimentícia, farmacêutica ou de cosméticos. Além disto, o etanol é
352 substancialmente polar, o que significa que a adição de pequenas quantidades pode
353 aumentar expressivamente a polaridade do solvente supercrítico.

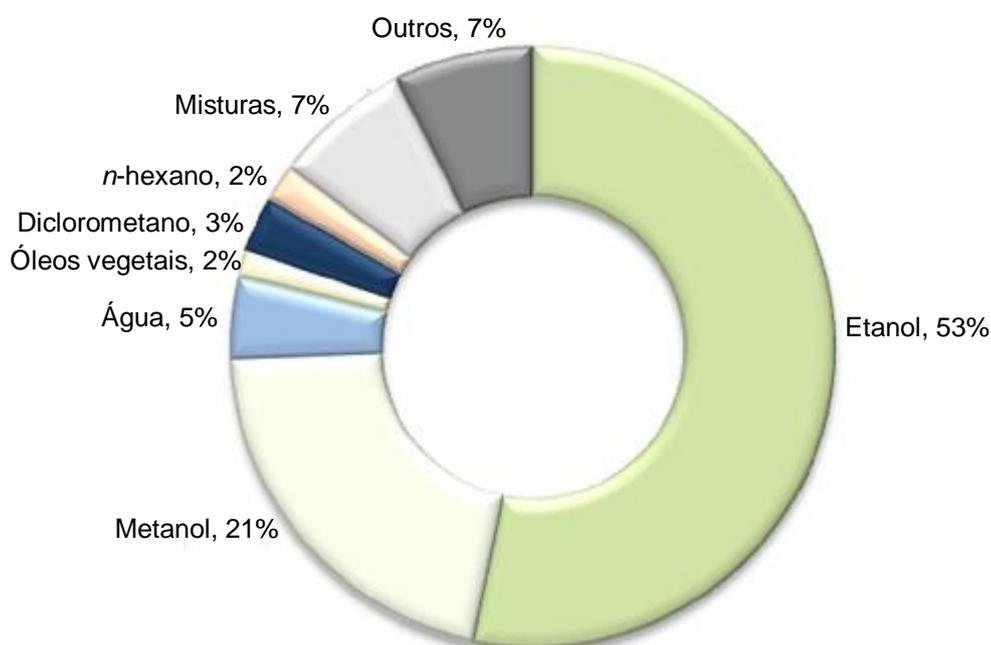


Figura 6. Cossolventes mais utilizados em EFS a partir de matrizes vegetais baseados em 166 publicações do banco de dados EFS.

Fonte: Melo, Silvestre e Silva (2014).

354 Para extração de compostos fenólicos, vários investigadores tem escolhido a
355 adição de modificadores tais como etanol, metanol ou a mistura destes, para facilitar
356 a extração destes compostos de diferentes plantas. No caso destes estudos, as
357 percentagens dos cossolventes utilizados foram de 2% (MURGA, RUIZ, BELTRÁN,

358 2000), 5% (GOLI, BARZEGAR e SAHARI, 2005), 10% (VARGAS, VARELA,
359 FERREIRA, 2010), 16,7% (PALMA, PIÑEIRO e BARROSO, 2001), 70%, e até
360 99,8% (CHANG, CHIU, CHEN, 2000). Maróstica-Junior e colaboradores (2010)
361 afirmam que tanto etanol quanto metanol obtiveram resultados quantitativamente
362 similares. Etanol e metanol interagem com polifenóis por meio de pontes de
363 hidrogênio, dipolo-dipolo e outras ligações, o que os tornam interessantes na
364 extração destes compostos (LANG e WAI, 2001).

365 **2.2 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO EM EXTRAÇÕES**

366

367 Um dos principais aspectos que deveriam ser considerados na EFS é a
368 otimização da extração. O uso de valores ótimos de diferentes variáveis
369 influenciando a extração pode significativamente aumentar a recuperação ou
370 rendimento da extração de um composto alvo. Com o objetivo de efetivamente
371 otimizar estas variáveis (temperatura, pressão, tempo, tipo e percentagem de
372 modificadores, por exemplo), diferentes abordagens devem ser aplicadas (Figura 7).
373 Estas estratégias podem ser agrupadas em estratégias de equilíbrio de fases e
374 otimização estatística utilizando um planejamento experimental (HERRERO,
375 MENDIOLA, CIFUENTES, 2010). O uso de designs experimentais é uma das
376 estratégias mais comuns para realizar um método de extração robusto (BIANCHI e
377 CARERI, 2008).

378 Ferramentas de planejamento estatístico avaliam a importância do efeito dos
379 solventes e suas misturas sobre os rendimentos de extratos, atividades
380 antioxidantes e teores de polifenóis visando à otimização do processo de extração.
381 O design com matriz ortogonal (DMO) (TAGUCHI, 1986; TAGUCHI e KONISHI,
382 1987) é um planejamento fatorial fracionário que utiliza uma série de ensaios
383 atribuídos por matriz ortogonal. Este design pode reduzir consideravelmente o
384 número de experimento porque quando o efeito de um fator é calculado, a influência
385 de outros é removida da análise (SHARIF, 2014). O DMO pode efetivamente ser
386 usado para estudar a influência de quatro fatores diferentes simultaneamente.
387 Adicionalmente, podem-se investigar os principais efeitos para experimentos onde
388 fatores incluídos não tem o mesmo número de níveis (HERRERO, MENDIOLA,
389 CIFUENTES, 2010).

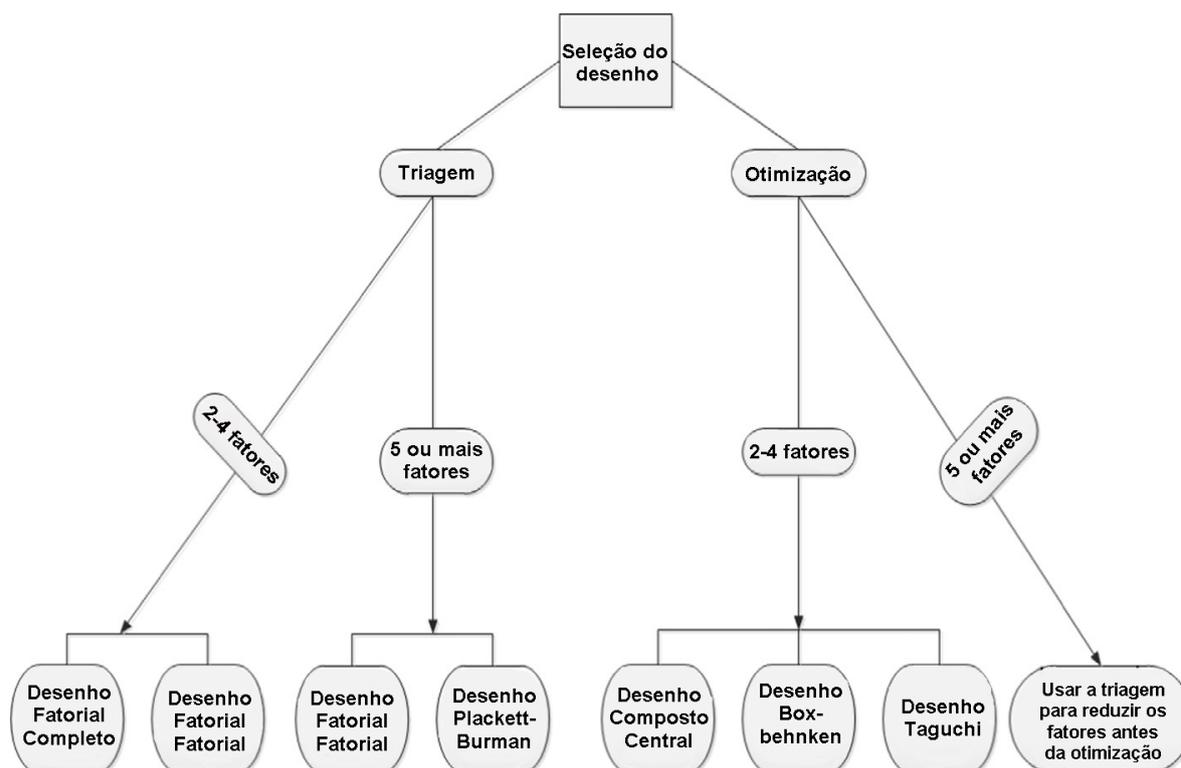


Figura 7. Gráfico para escolha do planejamento estatístico apropriado.
 Fonte: Sharif et al. (2014).

390 Algumas das vantagens do DMO incluem o maior número de informações por
 391 experimento do que as abordagens não planejadas, bem como a minimização do
 392 número de ensaios e tempo para manter o custo experimental a um nível mínimo.
 393 Ele ainda torna possível o cálculo das interações entre as variáveis experimentais
 394 dentro do intervalo estudado levando a um melhor conhecimento do processo, e
 395 facilita a determinação das condições operacionais necessárias para o aumento de
 396 escala do processo (VICENTE, MARTINEZ e ARACIL, 2007). Vários trabalhos na
 397 literatura (GHAFOOR, AL-JUHAIMI e CHOI, 2012; LIU et al., 2008; LIU, JIAO, LIU,
 398 2013; WANG, YING, SUN, 2011) utilizaram esta metodologia para extração
 399 supercrítica de compostos bioativos a partir de plantas. Estes autores alcançaram a
 400 otimização da extração supercrítica, investigando também a relação entre as
 401 variáveis e definindo a ordem de importância dos fatores.

402

403 2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

404

405 Os compostos fenólicos incorporam um vasto grupo de compostos
 406 relacionados com o crescimento de plantas, desenvolvimento e defesa. Neste último

407 caso formam-se em condições de estresse como infecções, fermentos e radiação
408 ultravioleta (BECKMAN, 2000). Estes compostos geralmente exibem uma
409 organolepsia ativa devida à sua contribuição para a cor e o sabor dos produtos
410 vegetais. Do ponto de vista estrutural, os compostos fenólicos possuem ao menos
411 um anel aromático com uma ou mais hidroxilas (MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014).

412 Estão amplamente distribuídos no Reino Vegetal e nos microrganismos,
413 fazendo parte do metabolismo animal. No entanto, os animais são incapazes de
414 sintetizar o anel aromático, e os compostos fenólicos são produzidos em pequena
415 quantidade utilizando o anel benzênico de substâncias presentes na dieta alimentar.
416 Já os vegetais, e a maioria dos microrganismos, conseguem sintetizar o anel
417 benzênico. Assim, o anel benzênico pode ser usado para produção de compostos
418 fenólicos (SIMÕES et al., 2007).

419 Investigações objetivando a extração de compostos fenólicos de produtos
420 naturais tem atraído especial interesse. Isto principalmente devido a estes
421 compostos desempenharem um papel fundamental na prevenção de doenças
422 cardiovasculares, certos tipos de câncer, diabetes, disfunções cerebrais, outras
423 condições associadas ao processo de envelhecimento; apresentar ainda efeito
424 antimicrobiano, antialérgico, antioxidante, antitrombótico, entre outros
425 (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002;
426 MANACH, MAZUR e SCALBERT, 2005; MIDDLETON, KANDASWAMI e
427 THEOHARIDES, 2000).

428 As propriedades antioxidantes têm sido atribuídas aos compostos fenólicos
429 devido a vários possíveis mecanismos, como sua habilidade de sequestrar radicais
430 livres, bloquear reações de radicais em cadeia, reduzir diretamente peróxidos e
431 estimular a atividade enzimática de defesa (MARÓSTICA-JUNIOR, LEITE e
432 DRAGANO, 2010). Os antioxidantes fenólicos mais comuns são flavonoides, ácidos
433 fenólicos, fenóis simples, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO e JORGE, 2007).

434 A classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto carbônico
435 básico pode ser observada no Quadro 2. Destes, os ácidos fenólicos, flavonoides e
436 taninos são considerados como os principais compostos fenólicos da dieta alimentar
437 (KING e YOUNG, 1999).

Quadro 2. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto carbônico básico.

Classe de compostos fenólicos	Esqueleto básico
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzoicos	C6–C1
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C6–C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoides	C6–C3
Naftoquinonas	C6–C4
Xantonas	C6–C1–C6
Estilbenos, antraquinonas	C6–C2–C6
Flavonoides, isoflavonoides	C6–C3–C6
Lignananas, neolignananas	(C6–C3) ₂
Diflavonoides	(C6–C3–C6) ₂
Melaninas vegetais	(C6) _n
Ligninas	(C6–C3) _n
Taninos hidrolisáveis	(C6–C1) <i>n</i>
Taninos condensados	(C6–C3–C6) <i>n</i>

Fonte: Simões et al. (2007).

438 Os ácidos fenólicos são divididos em dois subgrupos, os ácidos
 439 hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos (Figura 8). Os ácidos hidroxibenzoicos incluem
 440 ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácidos vanílico e
 441 siríngico, que em comum têm a estrutura C6-C1. Ácidos hidroxicinâmicos, por outro
 442 lado, são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C3-C6),
 443 sendo os mais comuns: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido
 444 sinápico (SIMÕES, SCHENKEL, GOSMANN, 2007). A atividade antioxidante dos
 445 ácidos fenólicos aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, como é o caso do
 446 ácido gálico que possui três hidroxilas, e mostra uma alta atividade antioxidante. No
 447 entanto, a substituição dos grupos hidroxilas na posição 5 e 3- com grupos metoxilas
 448 como em ácido siríngico reduz a atividade (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA,
 449 1996).

450 Os flavonoides fazem parte de um dos grupos fenólicos mais importantes e
 451 diversificados entre os produtos de origem natural. Eles representam mais da
 452 metade dos compostos fenólicos que ocorrem naturalmente (BALASUNDRAM,
 453 SUNDRAM e SAMMAN, 2006; SIMÕES, SCHENKEL, GOSMANN, 2007). Os
 454 flavonoides são compostos de baixo peso molecular, que consiste de quinze átomos

455 de carbono, dispostas em configuração de C6–C3–C6. A estrutura química dos
 456 flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por
 457 três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 9).
 458 Variações nos padrões de substituição do anel C resultam nas principais classes de
 459 flavonoides como, por exemplo, flavonóis, flavonas, flavanonas, flavan-3-ol (ou
 460 catequinas), isoflavonas e antocianinas (HOLLMAN e KATAN, 1999) (Figura 10).

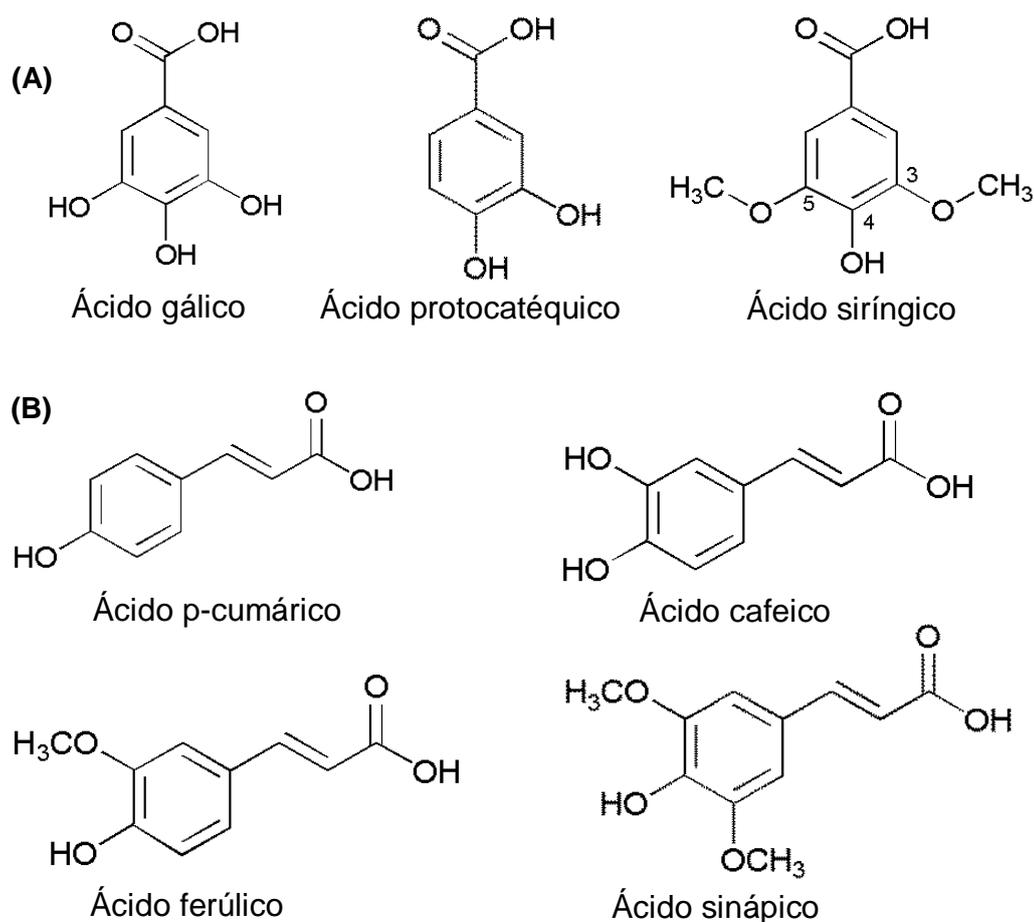


Figura 8. Exemplos de ácidos hidroxibenzoicos (A) e hidroxicinâmicos (B).
 Fonte: Balasundram, Sundram, e Samman (2006).

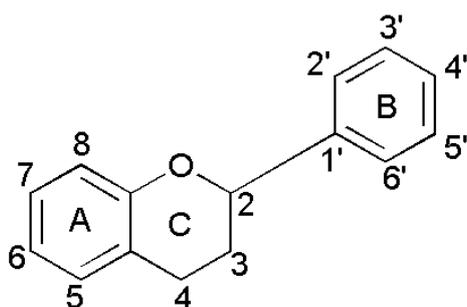


Figura 9. Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.
 Fonte: Simões et al. (2007).

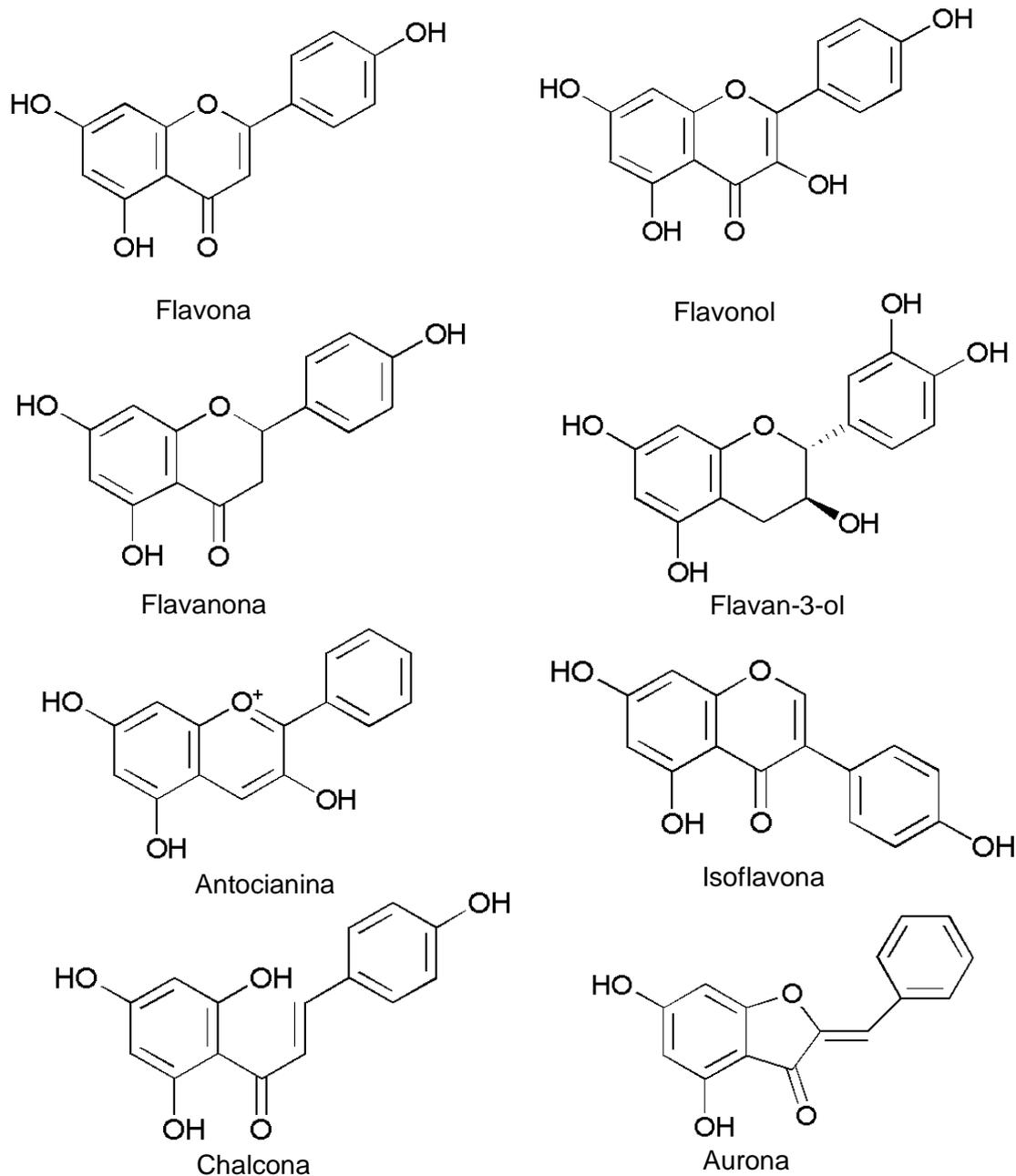


Figura 10. Estrutura geral de algumas das principais classes de flavonoides.
 Fonte: Hollman e Katan (1999).

461 A relação estrutura-atividade dos flavonoides é geralmente mais complicada do
 462 que a dos ácidos fenólicos devido à relativa complexidade das moléculas dos
 463 flavonoides. Algumas das características estruturais e a natureza das substituições
 464 nos anéis B e C determinam a atividade antioxidante dos flavonoides. Alguns fatores
 465 importantes incluem o grau de hidroxilação e as posições dos grupos -OH do anel B,
 466 a ligação dupla entre C-2 e C-3, conjugado com o grupo 4-oxo no anel C aumenta a
 467 capacidade de captura de radicais por flavonoides, e a ligação dupla entre C-2 e C-

468 3, combinado com um 3-OH, em anel C, também aumenta a capacidade de captura
469 de radicais ativos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006; PIETTA, 2000).

470 Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular
471 entre 500 e 3000 Dalton, as quais apresentam a habilidade de formar complexos
472 insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas. Esta complexação é
473 a base para algumas de suas propriedades biológicas como controle de insetos,
474 fungos e bactérias e outras atividades farmacológicas (SIMÕES, SCHENKEL,
475 GOSMANN, 2007).

476 Classicamente, segundo a estrutura química, os taninos são classificados em
477 dois grupos, hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) e condensados
478 (proantocianidinas) (Figura 11). Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um
479 poliol central, geralmente β -D-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas
480 com o ácido gálico. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e
481 é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da
482 ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos. São amplamente encontrados no reino
483 vegetal, os taninos condensados ou proantocianidinas, sendo polímeros de flavan-3-
484 ol e/ou flavan-3,4-diol (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006; SIMÕES,
485 SCHENKEL, GOSMANN, 2007) (Figura 12).

486 A maioria dos compostos fenólicos é sensível, instável e muito susceptível à
487 degradação. Os maiores fatores de degradação são temperatura, a presença de
488 oxigênio e luz. Por isto é importante entender os fatores que influenciam a
489 estabilidade de polifenóis e identificar métodos apropriados de extração para
490 controle da degradação oxidativa destes compostos, para evitar a ocorrência de
491 reações indesejadas como hidrólise, oxidação, degradação e rearranjo
492 (MARÓSTICA-JUNIOR, LEITE e DRAGANO, 2010).

493 Diversos taninos têm mostrado possuir efeitos protetores contra o câncer,
494 como a epigallocatequina-3-galato do chá verde (SUGISAWA et al., 2004),
495 teafulvinas e teaflavinas do chá preto (DHAWAN et al., 2002) e procianidinas de
496 sementes de uvas (LU et al., 2004). Todas estas substâncias estão sendo estudadas
497 na quimioprevenção do câncer (LAMBERT e YANG, 2003). Em vários modelos
498 experimentais de úlceras gástricas, os taninos apresentaram uma atividade
499 antioxidante, promoveram reparação do tecido, exibiram efeitos anti-*Helicobacter*
500 *pylori* e ainda mostraram-se envolvidos com processos anti-inflamatórios. A

501 presença de taninos explica os efeitos antiúlcera de muitas drogas vegetais usadas
 502 popularmente (JESUS et al., 2012).

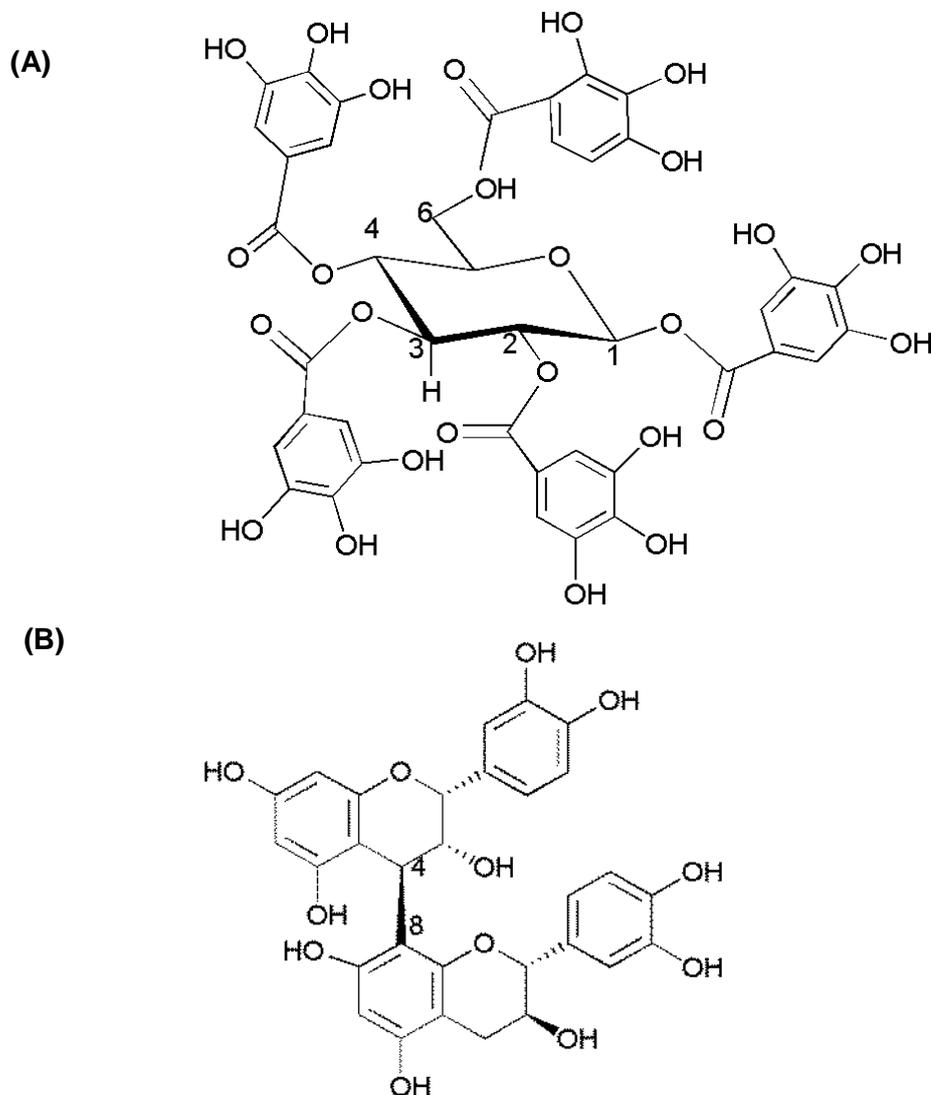


Figura 11. Exemplos de taninos: (A) Tanino hidrolisável (β -1,2,3,4,6-pentagaloiil- β -D-glucose); (B) Tanino condensado (epicatequina-(4 β →8)-catequina).
 Fonte: Simões, Schenkel e Gosmann (2007).

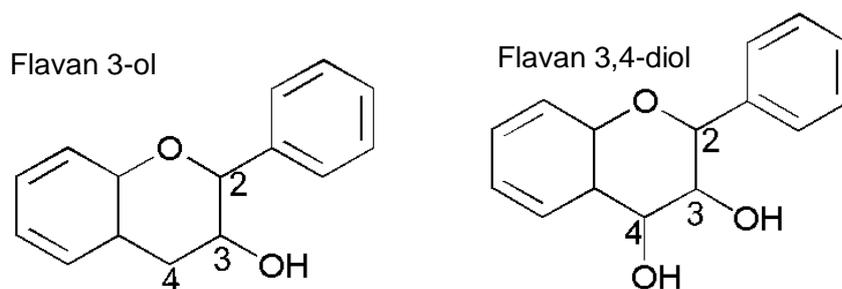


Figura 12. Monômeros básicos de taninos condensados.
 Fonte: Simões et al. (2007).

503 Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas a três
504 características que incluem, a complexação com íons metálicos, atividade
505 antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de complexar com
506 outras moléculas (HASLAM, 2005).

507

508 **2.4 ANTIOXIDANTES**

509

510 Radicais livres podem ser derivados de oxigênio (ROS- espécies reativas de
511 oxigênio) ou derivados do nitrogênio (RNS- espécies reativas de nitrogênio). As
512 moléculas derivadas do ROS são: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}),
513 hidroperóxil (HO_2^{\bullet}), peróxil (ROO^{\bullet}), alcoxil (RO^{\bullet}), como radicais livres, e peróxido de
514 hidrogênio (H_2O_2) como não radical. Apesar de não ser um radical livre, pela
515 ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito
516 do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH^{\bullet} .
517 Espécies oxidantes derivadas do nitrogênio são, principalmente, óxido nítrico (NO^{\bullet}),
518 dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}), ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) e trióxido dinitrogênio
519 (N_2O_3) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SHEKHAR, HOWLADER e KABIR,
520 2016).

521 O stress oxidativo é definido como uma produção excessiva de espécies
522 oxigenadas/nitrogenadas reativas que não podem ser neutralizadas pela ação de
523 antioxidantes, mas também como uma incapacidade do organismo em neutralizar
524 estas espécies reativas pelo sistema de proteção antioxidante (PISOSCHI e POP,
525 2015). Esta condição resulta em danos aos biopolímeros incluindo ácidos nucleicos,
526 proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e carboidratos. Portanto o estresse
527 oxidativo está associado ao aparecimento de doenças, incluindo câncer (KINNULA e
528 CRAPO, 2004; SINGH et al., 2016), doenças cardiovasculares (KIKUCHI et al.,
529 2013; ROBERT e ROBERT, 2014), desordens neurológicas (KHAN et al., 2016; LI et
530 al., 2013; SAS et al., 2007), doença de Alzheimer (BONDA et al., 2014; BONDA et
531 al., 2010; SMITH et al., 2009), doença de Parkinson (BOLNER et al., 2016;
532 SARRAFCHI et al., 2016), envelhecimento (AHSANUDDIN, LAM e BARON, 2016;
533 LIAO e KENNEDY, 2016; MAURYA et al., 2016; MIGLIORE e COPPEDE, 2009) e
534 aterosclerose (NIKI, 2011; SINGH, DEVI e GOLLEN, 2015; SINGH e JIALAL, 2006).

535 Antioxidantes são compostos ou sistemas que podem interagir de forma segura
536 com radicais livres e terminar a reação em cadeia antes que as moléculas vitais
537 sejam danificadas, isto é, são capazes de atrasar ou impedir a oxidação do substrato
538 (OROIAN e ESCRICHE, 2015). Para isto, eles podem utilizar vários mecanismos: 1)
539 eliminação de espécies que iniciam a peroxidação, 2) quelação de íons metálicos de
540 modo que eles sejam incapazes de gerar espécies reativas ou decompor peróxidos
541 lipídicos, 3) extinção O^{\bullet} , evitando a formação de peróxidos, 4) quebra da reação em
542 cadeia auto-oxidativa, e/ou 5) redução das concentrações localizadas de O_2 (ASIMI,
543 SAHU e PAL, 2013).

544 Antioxidantes naturais são considerados seguros e têm aceitação do
545 consumidor em comparação aos antioxidantes sintéticos (ASIMI, SAHU e PAL,
546 2013). Os compostos antioxidantes tais como ácidos fenólicos, polifenóis e
547 flavonoides sequestram as espécies reativas de oxigênio e, assim, inibem os
548 mecanismos oxidativos que conduzem a inúmeras doenças como as já citadas
549 (NOGUCHI, 1999; OROIAN e ESCRICHE, 2015).

550 A atividade antioxidante não deveria ser concluída baseada em um único
551 modelo de teste antioxidante devido à natureza complexa dos compostos
552 fitoquímicos. Na prática, diversos métodos antioxidantes são utilizados para
553 determinar a atividade antioxidante *in vitro*. Os antioxidantes agem por mecanismos
554 variáveis e nenhum ensaio pode abranger os diferentes modos de ação do
555 antioxidante. Portanto, é difícil comparar totalmente um método com o outro (ALAM,
556 BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013; BADARINATH et al., 2010). Dependendo das
557 reações envolvidas, estes ensaios podem ser classificados de forma genérica em
558 dois tipos (Quadro 3), os ensaios baseados em reações de transferência de um
559 átomo de hidrogênio (HAT) e ensaios baseados na transferência de elétrons (ET)
560 (CHANDA e DAVE, 2009; HUANG, OU e PRIOR, 2005).

561 O ensaio com cubeta convencional de atividade sequestradora de radical vem
562 sendo substituído desde 2008 pelo ensaio em microplaca de 96 poços. O ensaio em
563 cubeta utiliza o espectrofotômetro UV-visível para visualizar a absorvância. Já o
564 ensaio em microplaca utiliza leitor de placas ELISA para isto. O primeiro método é
565 fastidioso, consome muito tempo, permite que apenas uma amostra seja lida por vez
566 e exige grande quantidade de reagente. O segundo método lê inúmeras amostras de
567 uma vez, mesmo com repetições, com pequena quantidade de reagente e com
568 economia de tempo (BADARINATH, RAO, CHETTY, 2010).

Quadro 3. Classificação dos métodos antioxidantes *in vitro* em relação aos seus mecanismos de ação antioxidante

Métodos de Transferência de átomo de Hidrogênio (HAT)
Orac= Capacidade de absorvância do radical oxigênio LPIC= Ensaio da capacidade de inibição da peroxidação lipídica Trap= Parâmetro antioxidante da captura total do radical IOC= Consumo inibido de oxigênio Clareamento da crocina (<i>bleaching</i>) Atividade sequestradora de radicais hidroxilas por p-NDA (anilina p-butrisidunetil) Eliminação de radicais H ₂ O ₂ Método de eliminação do radical ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) Sasa= Eliminação de radicais superóxidos por álcalis
Métodos de transferência de elétrons (ET)
Teac= Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox Frap= Poder Antioxidante de Redução do Ferro Ensaio de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) Cuprac=Capacidade de redução do cobre (II) Fenóis totais por Folin-Ciocalteu Ensaio do DMPD (N, N-dimetil-p-fenilenodiamina)

Fonte: Badarinath et al. (2010)

569 Geralmente testes antioxidantes *in vitro* utilizando captura de radicais livres
 570 são relativamente simples de executar. Dentre estes o método DPPH é rápido,
 571 considerado simples por não envolver muitas etapas e reagentes, e de baixo
 572 custo em comparação a outros testes. A acessibilidade estérica do radical DPPH
 573 é um dos principais determinantes da reação, uma vez que pequenas moléculas,
 574 que têm maior acesso ao sítio do radical, têm relativamente maior capacidade
 575 antioxidante (MAGALHÃES et al., 2008). Por outro lado, muitos compostos
 576 grandes que reagem rapidamente com o radical peroxil podem reagir lentamente
 577 ou pode até ser inerte neste ensaio. Por outro lado o ensaio de descoloração do
 578 ABTS é aplicável em antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (ALAM, BRISTI e
 579 RAFIQUZZAMAN, 2013). As características de alguns métodos antioxidantes *in*
 580 *vitro* são mostrados no Quadro 4.

Quadro 4. Resumo das características dos métodos antioxidantes *in vitro*.

Método Antioxidante	Simplicidade	Instrumentação requerida	Relevância Biológica	Mecanismo	Tempo requerido
Orac	++	+	+++	HAT	++
Trap	--	--	+++	HAT	+++
Frap	+++	+++	--	ET	--
Teac	+	+	-	ET	-
Fenólicos Totais por Folin-Ciocalteu	+++	-	-	ET	+
Autografia por CCD	+++	+	---	ET, HAT	---
Ensaio de atividade antioxidante celular	-	-	+++	HAT	+++
Cuprac	+++	+++	---	HAT	+
Análise fluorométrica	++	++	+	HAT	+
Quimioluminescência aprimorada	---	+++	+++	HAT	+++
ABTS	+	+	+	HAT	+

+, ++, +++= Característica desejável a altamente desejável;

-, --, ---= Característica indesejável a altamente indesejável.

HAT= Método de transferência de átomo de Hidrogênio; ET= Método de transferência de elétrons; Orac= Capacidade de absorvância do radical oxigênio; Trap= Parâmetro antioxidante da captura total do radical; Frap= Poder Antioxidante de Redução do Ferro; Teac= Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox; Cuprac= Capacidade de redução do cobre (II); ABTS= (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)).

Fonte: adaptado de Badarinath et al. (2010).

581 Devido à complexidade da composição dos produtos naturais, a separação de
582 cada composto antioxidante e seu estudo individual é custoso e ineficiente, não
583 abrangendo ainda as possíveis interações sinérgicas entre os compostos
584 antioxidantes presentes nas plantas (BADARINATH, RAO, CHETTY, 2010).

585 **2.5 ANTIMICROBIANOS**

586

587 O uso indiscriminado e indevido de fármacos antimicrobianos no tratamento de
588 infecções bacterianas levou ao surgimento e disseminação de cepas bacterianas
589 resistentes (MIKULASOVA, CHOVAANOVA e VAVERKOVA, 2016). O surgimento e a
590 propagação de bactérias resistentes aos medicamentos continuam sendo uma
591 ameaça para a saúde pública no tratamento de infecções bacterianas. O rápido
592 aumento do número destes microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos
593 aliado a baixa taxa de desenvolvimento e introdução de novos antimicrobianos
594 representam um grande desafio para a medicina humana em todo o mundo
595 (CHUKWUJEKWU e VAN STADEN, 2016). Isto tem provocado a redução da eficácia

596 dos tratamentos e aumento da morbidade, mortalidade, e de custos de cuidados de
 597 saúde (COAST, SMITH e MILLAR, 1996; FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012). A
 598 Figura 13 aborda dados estatísticos sobre as doenças que causam mais mortes
 599 anualmente no mundo e a perspectiva futura no que diz respeito à resistência a
 600 antimicrobianos. Smith e Coast (2013) afirmam que para calcular o verdadeiro ônus
 601 econômico de resistência, tem-se que considerar os encargos associados ao fato de
 602 não se ter medicamentos antimicrobianos eficazes.

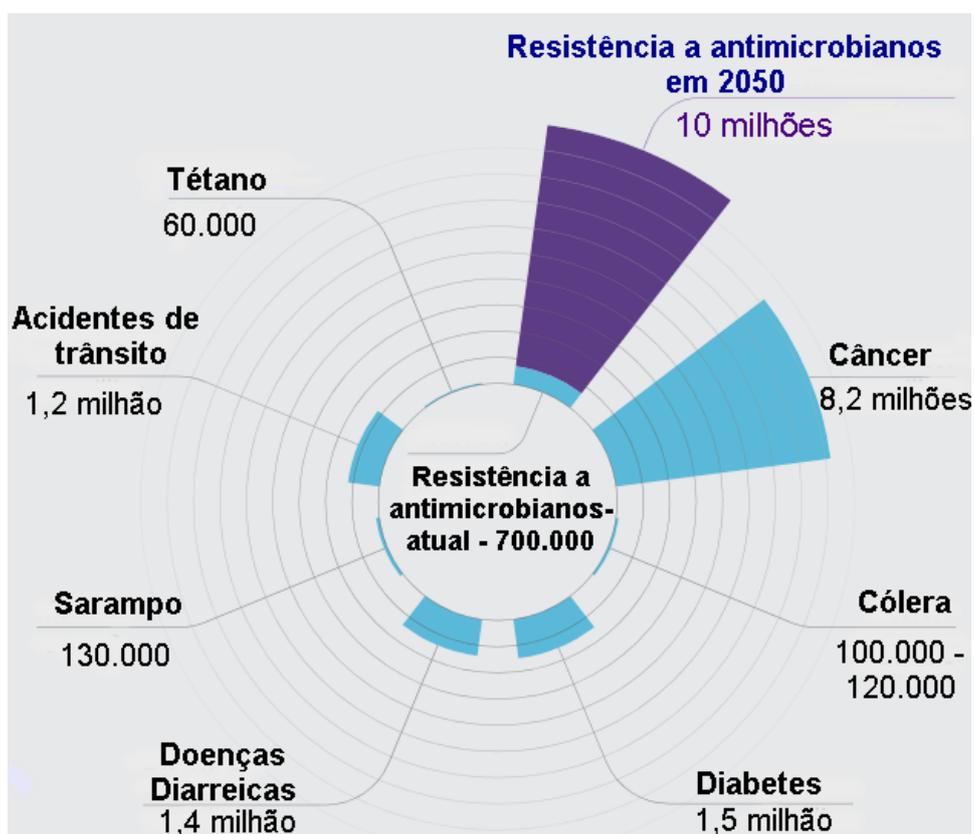


Figura 13. Mortes atribuídas todo ano associadas à resistência a antimicrobianos, comparado as maiores causas de morte. Dados obtidos entre os anos 1990 a 2014. Projeção de mortes por resistência a antimicrobianos para 2050.

Fonte: Review on Antimicrobial Resistance (**Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014**)

603 Os principais mecanismos da resistência bacteriana a antimicrobianos são: (1)
 604 inativação enzimática (β -lactamases ou enzimas modificadoras de
 605 aminoglicosídeos), (2) mutações que alteram o alvo intracelular para um dado
 606 antimicrobiano, (3) redução da concentração intracelular do antibiótico por
 607 mudanças na permeabilidade da membrana ou por superexpressão de bombas de

608 efluxo, que jogam os antimicrobianos para o exterior da célula microbiana
609 (FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012).

610 Bombas de efluxo bacterianas, um tipo de resistência intrínseca observadas
611 em muitas bactérias, são proteínas integrantes da membrana plasmática com
612 funções excretoras. Elas expulsam compostos tóxicos produzidos a partir de seus
613 próprios processos metabólicos. Ao mesmo tempo, elas são capazes de reconhecer
614 agentes nocivos, tais como antibióticos, corantes, solventes orgânicos e
615 detergentes, e expulsá-los antes de alcançar os seus objetivos. Sistemas de efluxo
616 bacterianos podem ser específicos, expulsando apenas um antibiótico ou uma
617 classe de antibióticos, ou ainda são capazes de promover a extrusão de várias
618 classes de compostos antimicrobianos, sendo designado como bombas de efluxo de
619 resistência a múltiplos fármacos (KUMAR e SCHWEIZER, 2005). A descoberta e
620 desenvolvimento de agentes que inibam a atividade de transporte de bombas de
621 efluxo, e que poderiam ser usados em combinação com antibióticos existentes, têm
622 motivado a busca por compostos sintéticos ou naturais que atuam como inibidores
623 de bombas de efluxo (EPs) (MIKULASOVA, CHOVAANOVA e VAVERKOVA, 2016).

624 As plantas produzem um amplo espectro de metabólitos secundários que são
625 utilizados como mecanismos de defesa contra invasores patogênicos (DIXON,
626 2001). Vários estudos estão sendo conduzidos na busca de novos agentes
627 antimicrobianos, extraídos de plantas, para que possam ser utilizados em produtos
628 farmacêuticos, cosméticos e na indústria alimentícia, já que essas plantas podem
629 apresentar baixa toxicidade, além do fácil acesso pelas comunidades carentes e
630 serem de baixo custo (COSTA et al., 2008). Identificou-se ainda que alguns
631 compostos de plantas, não são necessariamente antimicrobianos ativos, mas que
632 poderiam diminuir a resistência de patógenos aos antibióticos, quando administrados
633 em conjunto destes (MIKULASOVA, CHOVAANOVA e VAVERKOVA, 2016). Assim,
634 as pesquisas utilizando plantas caminham no sentido de não apenas verificar seu
635 potencial antimicrobiano, mas também como fonte de compostos que possam mudar
636 essa ação (JUNIOR et al., 2016). Desta forma, estudos têm demonstrado o uso de
637 extratos de plantas, ou seus compostos isolados, atuando como inibidores da
638 extrusão desses antimicrobianos pela célula bacteriana (BRAGA et al., 2005;
639 CHITEMERERE e MUKANGANYAMA, 2011; ETTEFAGH et al., 2011; ROY et al.,
640 2013).

641 Chukwujekwu e van Staden (2016) investigaram a atividade antimicrobiana de
642 extratos de plantas bem como a interação delas com antibiótico selecionados frente
643 a linhagens bacterianas antibiótico-resistentes. Estes extratos aumentaram as
644 atividades de alguns dos antibióticos clinicamente ineficazes contra duas bactérias
645 Gram-negativas, isto é, estes extratos tenderam a reverter a resistência
646 antimicrobiana.

647 Diversos estudos têm demonstrado a atividade antibacteriana de extratos de
648 semente de guaraná. Estes extratos podem ser empregados como alternativa ao
649 controle da placa dental (BARBOSA e MELLO, 2004), demonstrou atividade frente à
650 bactéria cariogênica *Streptococcus mutans* (YAMAGUTI-SASAKI, ITO, CANTELI,
651 2007) e bactéria antibiótico-resistente, como é o caso do *Staphylococcus aureus*
652 meticilina resistente (MARQUES, PANIZZON, AGUIAR, 2016), além de apresentar
653 esta ação frente a várias outras cepas de bactéria e fungos (BASILE, FERRAR, DEL
654 PEZZO, 2005; MAJHENIC, SKERGET e KNEZ, 2007).

655 Portanto, diante deste cenário atual, há uma preocupação concernente à
656 resistência bacteriana e com a busca por novos agentes antimicrobianos por muitos
657 grupos de pesquisa, voltados para a química medicinal e farmacologia.

3. CAPÍTULO 1: *Paullinia cupana*: uma planta multifuncional – uma revisão

658

***Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review**

659

L. L. M. Marques^a, T. Klein^b, E. D. F. Ferreira^a and J. C. P. Mello^{a*}

660

1. Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790,

661

Maringá, PR, CEP-87020-900, Brasil

662

2. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa. Av

663

General Carlos Cavalcanti, 4748, Ponta Grossa, PR, CEP 84030-900, Brasil

664

3. *Autor para correspondência: Fone: +55 44 30114816; Fax: +55 44 3011-4999. E-mail:

665

mello@uem.br

666

667

Resumo

668

669

As sementes de guaraná *Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae, possuem diversas

670

funções farmacológicas descritas na literatura como antimicrobiana, antioxidante,

671

hepatoprotetora, anticarcinogênica, emagrecedora, estimulante, cognitiva, entre

672

outras. Muitas destas ações são em decorrência, provavelmente, do alto teor de

673

metilxantinas e taninos de suas sementes. O Brasil, maior produtor mundial de

674

guaraná, utiliza a maioria de sua produção para indústria de refrigerantes, e em

675

menor quantidade para a de cosmético e farmacêutica. Apesar da região Amazônica

676

ter a maior área plantada, a maior produção (71%) vem do estado da Bahia, Brasil.

677

Este trabalho discorre principalmente sobre todas as possibilidades de ações

678

farmacológicas já investigadas do guaraná, além de trazer novos tópicos como

679

toxicologia e controle de qualidade das sementes e seus extrativos. Além disto, uma

680

ampla discussão sobre a forma de preparação da droga vegetal e/ou seus extratos

681

foi abordada, enfocando a importância de sua padronização e como estes fatores

682

vão impactar diretamente nas propriedades farmacológicas dos extratos do guaraná.

683 Abreviaturas e siglas

- 684 (Ambev): Companhia de Bebidas das Américas
- 685 (AO): ácido oleico
- 686 (ASCs): adipócitos- mesenquiais senescentes
- 687 (CAR): capacidade antioxidante relativa
- 688 (CCD): análises cromatográficas por cromatografia de camada delgada
- 689 (CE): eletroforese capilar
- 690 (CHO): células de ovário de hamster chinês
- 691 (CLAE): cromatografia líquida de alta eficiência
- 692 (CPA): adenosina ciclopentil
- 693 (DEN): nitrodietilamina
- 694 (DMSO): dimetilsulfóxido
- 695 (EBP): extrato bruto liofilizado
- 696 (EGCG): epigalocatequina-3-galato
- 697 (Embrapa): Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- 698 (EPA): extrato semipurificado de guaraná
- 699 (ESG): extrato seco de guaraná
- 700 (ETM): modelo de labirinto T elevado
- 701 (FAQ): fração aquosa
- 702 (FMA): fungos micorrízicos arbusculares
- 703 (fMRI): ressonância magnética funcional
- 704 (GO): glioxal
- 705 (HPAs): hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- 706 (IBGE): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- 707 (MGO): metilglioxal
- 708 (NO): óxido nítrico
- 709 (PEA): extrato purificado A
- 710 (RBC): células vermelhas sanguíneas
- 711 (RMN): ressonância magnética nuclear
- 712 (TIE) Técnica de Insetos Estéreis
- 713 (UV): ultravioleta

714

715 **3.1.Introdução**

716 O guaraná impressiona pela versatilidade de ações farmacológicas atribuídas a
717 esta planta (BITTENCOURT et al., 2014; BITTENCOURT et al., 2013; DEL GIGLIO
718 et al., 2013b; HERTZ et al., 2015; KOBER et al., 2015; MACHADO et al., 2015;
719 MATSUURA et al., 2015; PORTELLA et al., 2013; RANGEL, MELLO e AUDI, 2013;
720 RONCON et al., 2011). Há centenas de anos cultivada e muito utilizada pelos índios,
721 hoje é explorada comercialmente principalmente pela indústria de refrigerantes, mas
722 também por outras indústrias como de cosméticos e farmacêutica.

723 Em 2013, dois trabalhos (HAMERSKI, SOMNER e TAMAIO, 2013; SCHIMPL et
724 al., 2013) se debruçaram em dar uma visão geral sobre o guaraná, principalmente
725 sobre suas propriedades farmacológicas e muito se estuda sobre a cafeína do
726 guaraná, seus benefícios e malefícios (BECK, 2005; NAWROT et al., 2003; NYSKA
727 et al., 2005; TFOUNI et al., 2007). Mas o fato é que existem muitos aspectos a
728 serem abordados ainda sobre este assunto. O guaraná possui grande quantidade de
729 taninos que apresentam os mais diversos efeitos farmacológicos (DALONSO e
730 PETKOWICZ, 2012; PELOZO, CARDOSO e MELLO, 2008; SOUSA et al., 2010;
731 YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Estas atividades estão relacionadas com a
732 composição química destes extratos decorrentes das diversas formas de extração, e
733 é fundamental que o controle de qualidade da droga vegetal e a padronização dos
734 extratos, ainda muito pouco explorados na maioria dos trabalhos científicos, façam
735 parte das discussões nos trabalhos. Comumente as sementes de guaraná são
736 utilizadas por meio de uma simples dissolução de pó em água da semente torrada e
737 moída isolada ou em associação com outras drogas vegetais, que são encontradas
738 comercialmente. Por outro lado com extrações tradicionais, fracionárias ou ainda
739 supercríticas é possível até mesmo selecionar os compostos bioativos extraídos
740 (MARQUES et al., 2016), causando uma variedade de efeitos farmacológicos ainda
741 longe de ser esgotada.

742 O objetivo desta revisão é apresentar o atual estado da arte do guaraná, por
743 meio da sua produção, das substâncias químicas identificadas e caracterizadas a
744 partir de suas sementes. Como foco principal, exaurir o que foi publicado sobre o
745 guaraná, a respeito de suas possíveis ações farmacológicas. Além disto, apresentar
746 novos e importantes tópicos como toxicologia, controle de qualidade da droga

747 vegetal e extrativos, acrescido de uma ampla discussão sobre a forma de
748 preparação de extratos e sua padronização.

749

750 **3.2 Histórico**

751 A planta do guaraná já é conhecida há muito tempo, antes da conquista da
752 América. Ela foi domesticada nas florestas interfluviais entre o baixo rio Tapajós e o
753 baixo rio Madeira na Amazônia Brasileira (SMITH e ATROCH, 2007). Os índios
754 Maués do Brasil descobriram esta fruta e chamaram-na de guaraná. Eles foram os
755 primeiros consumidores da bebida de guaraná (KURI, 2008). Os frutos de guaraná
756 são de cor laranja, com cápsulas vermelhas que contêm sementes pretas,
757 parcialmente cobertos por arilos brancos. O contraste das cores do fruto
758 parcialmente abertos confere a aparência de globos oculares que dá crédito a lenda
759 (Figura 3.1A). É atribuído a esta tribo, a lenda de origem da domesticação do
760 guaraná. Este mito traz um deus malévolo que atrai um filho querido da aldeia para a
761 selva e o mata por ciúmes. O povo da aldeia encontra o filho morto, deitado na
762 floresta. Um deus benevolente consola a aldeia com um presente sob a forma de
763 guaraná. Ele arranca o olho esquerdo da criança e o planta na floresta, onde se
764 torna a variedade selvagem de guaraná. O olho direito é plantado na aldeia, que
765 brota e produz frutos que se assemelham ao olho de criança (BECK, 2005).

766 A primeira descrição escrita do guaraná foi feita por um missionário jesuíta
767 chamado João Felipe Betendorf, em 1669. O missionário ao penetrar na Amazônia
768 notou que os índios consumiam uma bebida feita de guaraná, o qual descreviam
769 propriedades diuréticas, sendo também eficaz contra dores de cabeça, febres e
770 câimbras. Em meados do século XVIII, outros relatos trazem o uso do guaraná no
771 combate a diarreias e para atenuar os riscos do calor (HENMAN, 1982; SMITH e
772 ATROCH, 2007). A partir daí, muitas características desta planta passaram a ser
773 exploradas e pesquisas em torno da constituição química ganharam espaço
774 (HENMAN, 1982). Devido à ampla utilização do guaraná, principalmente decorrente
775 de seu efeito estimulante do sistema nervoso central, o mesmo foi descrito
776 oficialmente na Farmacopeia Brasileira de 1977 (BRASIL, 1977).

777 A primeira substância do guaraná foi isolada em 1826, chamada inicialmente
778 de guaranina, uma tetrametilxantina idêntica à cafeína, além de teofilina e
779 teobromina. Com estudos mais aprofundados, os pesquisadores passaram a atribuir
780 as propriedades medicinais do guaraná às várias xantinas e na quantidade

781 expressiva de taninos presentes na planta (HENMAN, 1982). Os efeitos estimulantes
782 do guaraná são mais duradouros do que os efeitos do café aparentemente porque
783 no guaraná estão presentes os taninos.

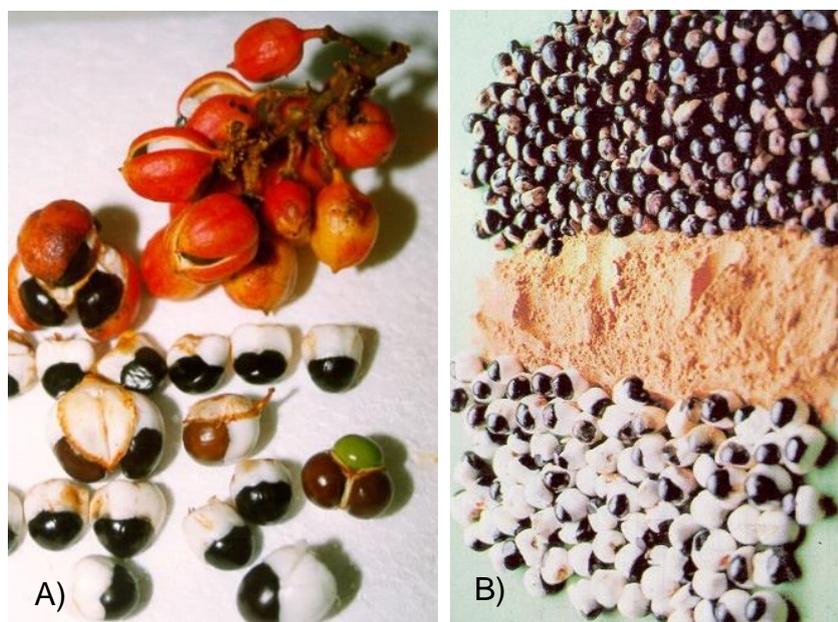


Figura 3.1 Os frutos e sementes de guaraná. A) Frutos de cor laranja com cápsulas vermelhas contendo sementes pretas parcialmente cobertas por arilos brancos; B) De baixo para cima: sementes recém-coletadas recobertas parcialmente por arilos, sementes secas e torradas em pó, sementes torradas ainda íntegras.

Fonte: do autor (2012)

784 3.3 Cultura e Processamento

785 O Brasil é, praticamente, o único produtor de guaraná no mundo. O guaraná é
786 originário da Amazônia, encontrado inicialmente na parte sudeste do Estado do
787 Amazonas (AM), em Maués e Parintins (CORRÊA, 1984; MACHADO, 1946),
788 existindo em abundância na região de Maués, a 250 km de Manaus. Pode ser
789 encontrado também em pequenas áreas da Amazônia Venezuelana. Nas últimas
790 décadas, seu cultivo tem sido incentivado em outras áreas, sobretudo nos vales dos
791 rios Purus, Tapajós (AM), nos Estados do Pará, Acre e Rondônia, na região
792 cacaueteira da Bahia (BA) entre Salvador e Ilhéus, no Vale do Ribeira em São Paulo e
793 na região de Alta Floresta, Mato grosso (MT) (CORRÊA, 1984; DUKE, 1987;
794 HENMAN, 1982; SUFRAMA, 2003).

795 Em 1974, a produção nacional, proveniente de Maués e das demais zonas
796 produtoras do Estado do Amazonas foi calculada em torno de 180 a 200 toneladas
797 de sementes secas, enquanto que, em 1977, um estudo realizado por Tocchini e
798 colaboradores observou um aumento na produção, para 300 toneladas de sementes
799 secas (NAZARÉ e FIGUEIREDO, 1982). Em 2003, a produção foi estimada em torno
800 de 4.300 toneladas por ano (SUFRAMA, 2003). No entanto, devido à sua
801 significativa exploração econômica, a produção não atendeu à demanda o que
802 tornou constante o risco de adulterações.

803 Até os anos 1980, a cidade de Maués (AM) foi o líder indiscutível na produção
804 de guaraná, com 90% da produção de pequenos produtores no Brasil. No entanto, a
805 expansão da utilização comercial das sementes levou milhares de agricultores no
806 Sul da Bahia, reconhecidamente como área de crescimento do cacau, a plantarem o
807 guaraná (Quadro 3.1). Isto ocorreu principalmente devido ao uso do extrato de
808 guaraná em refrigerantes e pelas indústrias, farmacêutica e de beleza.

809 Um estudo de campo, realizado em 2008, no município de Alta Floresta (MT),
810 região a qual proporciona características ideais de clima e solo para o cultivo dessa
811 fruta nativa da Amazônia, encontra-se cerca de quarenta dos principais produtores
812 de guaraná no Brasil. Alguns autores relataram que as plantações de guaraná no
813 estado do Mato Grosso ocupavam aproximadamente 89,6 ha, dos quais 46,8 ha
814 estavam no setor oeste de Alta Floresta (GOUVEIA et al., 2012).

815 Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE,
816 2016), as plantações de guaraná no país ocupavam aproximadamente 15.043 ha em
817 2015, dos quais 8.113 ha encontravam-se no Estado do Amazonas (AM), 6.500 ha
818 na Bahia (BA) e 361 ha no Mato Grosso (MT). O Estado do Amazonas e Bahia,
819 juntos representam 93% da área de crescimento do guaraná no Brasil no ano de
820 2015. Apesar do estado do Amazonas ter a maior área plantada a maior produção
821 vem da Bahia (71%) devido ao seu alto rendimento (Quadro 3.1).

822 Apesar do aumento do interesse no guaraná por suas propriedades medicinais
823 e estimulantes, por consequência pelo setor industrial alimentício, farmacêutico e de
824 cosméticos, na última década houve um crescimento significativo na área plantada,
825 porém os valores de rendimento médio, que leva em consideração a produção pela
826 área plantada, continuam similares (Quadro 3.2).

Quadro 3.1 Área, Produção e Rendimento médio na Safra de guaraná no ano de 2015.

Estado	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Produção (t)	Rendimento médio (kg ha⁻¹)
Acre	6	4	2	500
Amazonas	8.113	4.912	855	174
Pará	63	25	13	520
Bahia	6.500	6.500	2.600	400
Mato Grosso	361	325	188	578
Total	15.043	11.766	3.658	2.172

Fonte: IBGE (2016).

Quadro 3.2 Área, Produção e Rendimento médio de guaraná no Decênio (2006-2015).

Ano	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Produção (t)	Rendimento médio (kg ha⁻¹)
2006	13.356	13.039	2.989	229
2007	13.210	13.144	3.388	258
2008	15.321	14.904	3.056	205
2009	15.278	15.271	4.604	301
2010	13.980	10.552	3.739	354
2011	14.382	10.989	4.151	378
2012	13.998	11.489	3.794	330
2013	13.916	11.269	3.662	325
2014	13.278	11.348	3.588	316
2015	15.043	11.766	3.658	311

Fonte: IBGE (2016).

827 O guaraná é muito utilizado na indústria alimentícia na forma de xaropes,
828 extratos e destilados, empregados principalmente como agentes flavorizantes e
829 como uma fonte de cafeína pela indústria de refrigerantes (DUKE, 1987; HENMAN,
830 1982).

831 A grande importância econômica do guaraná está relacionada com o uso em
832 bebidas. Somente a Ambev (Companhia de Bebidas das Américas) absorve 70% do
833 guaraná em sementes anualmente produzido em Maués, AM. O restante de toda a
834 produção é destinado à indústria de fitofármacos (30%) e à exportação,
835 principalmente para o Japão e Estados Unidos (SUFRAMA, 2003). Durante a gestão
836 do presidente Emílio Garrastazu Médici (1905-1985) foi assinado a Lei n. 5.823 de
837 14.11.1972, conhecida como a Lei dos Sucos, que foi regulamentada pelo Decreto-

838 Lei n. 73.267, de 6.12.1973. Essa lei estabeleceu quantitativos de 0,2 grama a 2
839 gramas de guaraná para cada litro de refrigerante, e de 1 grama a 10 gramas de
840 guaraná para cada litro de xarope (HOMMA, 2014). Este fato provocou uma grande
841 demanda pelo produto, devida a crescente produção de refrigerantes de guaraná,
842 incentivando seu cultivo e técnicas agrícolas que melhorem a sua produção.

843 Como o consumo do guaraná pelas indústrias de refrigerantes, farmacêutica,
844 química e de cosméticos tem crescido a cada dia, o mercado é promissor para os
845 agricultores.

846 Um fator limitante da produção e expansão da guaranicultura no Amazonas é a
847 antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* (Albuq.) considerada
848 uma doença importante na cultura. Diversos estudos avaliam a diversidade genética
849 de *C. guaranicola* (BENTES e NETO, 2011; BENTES e MATSUOKA, 2002;
850 DUARTE, ALBUQUERQUE e CORRÊA, 1995) com o intuito de fornecer subsídios
851 para o manejo da doença e melhoramento da cultura. Devido à presença de
852 diferentes tipos de lesão e à evolução da doença nos folíolos infectados, um estudo
853 foi feito com o objetivo de verificar a existência ou não de diferentes tipos na
854 população do patógeno. Oito tipos de patógenos foram obtidos a partir de
855 isolamentos monospóricos oriundos de lesões formadas em folíolos jovens de
856 diferentes plantas de guaranazeiro (DUARTE, ALBUQUERQUE e CORRÊA, 1995).
857 Bentes e Neto (2011) relataram a variabilidade genética de vinte isolados obtidos a
858 partir de plantas infectadas em cultivos de guaranazeiro.

859 Bogas e colaboradores (2015) sugerem que antracnose pode reestruturar
860 comunidades bacterianas endofíticas, selecionando certas estirpes na filosferas de
861 *P. cupana*. A compreensão destas interações é importante para o desenvolvimento
862 de estratégias de biocontrole para *Colletotrichum*. Outro estudo (SILVA et al., 2016)
863 realizou o isolamento de bactérias endofíticas das sementes de guaraná e testou a
864 atividade antagonista destas bactérias frente ao agente da antracnose
865 (*Colletotrichum gloeosporioides*). Estes autores sugerem que estas bactérias podem
866 ser aplicadas para aumentar o crescimento da planta e a resistência à antracnose.

867 Adicionalmente, variedades de guaraná estão sendo pesquisadas pela
868 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) para aumentar sua
869 produção e resistência a doenças. Variedades resistentes à antracnose (por
870 exemplo, a cultivar BRS Marabitana e guaraná BRS Saterê) foram lançadas em
871 2013. A expectativa para o futuro é que se eleve em até 40% a produção de guaraná

872 da Amazônia sem necessidade de desmatar mais a floresta. Além disto, foi
873 desenvolvido um maquinário para despulpamento do guaraná sem a necessidade de
874 fermentação (SANTOS, 2014).

875

876 **3.4 Características botânicas**

877 O nome oficial atualmente aceito para o guaraná é *Paullinia cupana* Kunth,
878 Sapindaceae, segundo o The Plant List (The Plant List, 2013). Também é aceito
879 como sinônimo *Paullinia sorbilis* Mart. (FORZZA, 2010; FUNK et al., 2007). O nome
880 científico vem de Christian Franz Paullini, um botânico alemão e médico que viveu
881 no século 18 (1643-1712), que pela primeira vez classificou o guaraná, apesar desta
882 planta já ser cultivada há centenas de anos na Amazônia brasileira (KURI, 2008).

883 O guaranazeiro é uma planta tropical de baixa altitude, arbustiva, lenhosa,
884 trepadeira adaptada ao clima quente e úmido (LUNGUINHO, 2007). O caule
885 principal e os diferentes ramos apresentam sulcos profundos em número de 4 ou 5.
886 Os ramos são pilosos na extremidade, mas glabros na base, com 4 a 8 mm de
887 diâmetro. Sua casca é muito escura e o corpo lenhoso é simples. As folhas são
888 isoladas, em disposição dística, compostas pinadas com cinco folíolos e têm 40 cm
889 de comprimento e de largura. As inflorescências têm forma de cacho e são de dois
890 tipos: as de ramo que se desenvolvem nas axilas das folhas, e, as penduladas, que
891 se desenvolvem nas gavinhas (CORRÊA, 1984). Menezes Jr (DE MENEZES-
892 JÚNIOR, 1942) mostra que as inflorescências podem apresentar comprimentos
893 maiores que 30 cm. As flores são parcialmente unissexuadas, zigomorfas e
894 pequenas, com comprimento aproximado entre 1,5 a 2 cm a partir do ponto de
895 inserção do pedúnculo (ESCOBAR, CORREA e AGUILERA, 1984). Os frutos são
896 cápsulas elipsoides ou esféricas, apiculadas, de cor vermelha quando maduros,
897 medindo de 2 a 3 cm (Figura 3.1). Possuem uma ou duas sementes ovoides, com
898 tamanho aproximadamente 12 mm de comprimento, com um arilo abundante antes
899 da maturação. A semente é desigualmente convexa dos dois lados, às vezes
900 encimada por um curto apículo, glabra, lúzida, de cor pardo-purpurina, ou pardo-
901 negra e apresenta um largo hilo, que é guarnecido pelo arilo, carnoso, membranoso
902 e esbranquiçado. O embrião, desprovido de albúmen, possui um curto eixo radículo-
903 caulinar inferior e espessos cotilédones, desiguais, carnosos, firmes, plano-convexos
904 (CORRÊA, 1984; DE MENEZES-JÚNIOR, 1942).

905

906 3.5 Aspectos químicos

907 O guaraná é derivado das sementes da *P. cupana*, conhecida por suas
 908 propriedades estimulantes. As sementes são comercialmente parte útil da planta
 909 devido as grandes quantidades de cafeína, teobromina, teofilina, alta concentração
 910 de taninos e outros compostos, como saponinas, polissacarídeos, proteínas, gordura
 911 (Quadro 3.3) (ANGELUCCI et al., 1978; BAUMANN, SCHULTHESS e HÄNNI, 1995;
 912 HENMAN, 1982; HIGGINS, TUTTLE e HIGGINS, 2010; NAZARÉ, 1998; SCHIMPL
 913 et al., 2014; SPOLADORE, BOAVENTURA e SÁES, 1987; USHIROBIRA et al.,
 914 2004; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), e elementos traço, como manganês,
 915 rubídio, níquel e estrôncio (DE GOIS et al., 2016). Embora a concentração de
 916 cafeína possa variar amplamente na preparação de guaraná, cada grama de
 917 guaraná oferece cerca de 50 mg de cafeína. Os efeitos da ingestão do guaraná são
 918 semelhantes à cafeína, no entanto, a duração da ação pode ser muito diferente com
 919 o guaraná, devido a possíveis interações decorrentes da presença de saponinas e
 920 taninos (BABU, CHURCH e LEWANDER, 2008).

921 Os valores estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010), para
 922 amostras de guaraná estão representados no Quadro 3.3.

Quadro 3.3 Composição química de sementes de guaraná (*Paullinia cupana*) e padrões farmacopeicos.

Substância	Conteúdo (%)	Referência	Valores Farmacopeicos
Cafeína	2,41 – 5,07%	(ANDRADE, SCHENKEL e BERGOLD, 1999; BAUMANN, SCHULTHESS e HÄNNI, 1995; BITTENCOURT et al., 2014; HENMAN, 1982; SPOLADORE, BOAVENTURA e SÁES, 1987; ZEIDAN-CHULIA et al., 2013)	> 5%
Taninos totais	5,0 – 14,1%	(FUKUMASU et al., 2006a; MARX, 1990; USHIROBIRA et al., 2004; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)	> 4%
Proteínas	7,0 – 8,0%	(ANGELUCCI et al., 1978; NAZARÉ, 1998)	--
Polissacarídeo	30 – 47%	(ANGELUCCI et al., 1978; NAZARÉ, 1998)	--
Açúcares	6,0 – 8,0%	(ANGELUCCI et al., 1978)	--
Fibras	3,0%	(ANGELUCCI et al., 1978)	--
Ácidos graxos	0,16%	(ANGELUCCI et al., 1978)	--
Cinzas totais	1,06 – 2,88%	(ANGELUCCI et al., 1978; MATTEI et al., 1998; NAZARÉ, 1998)	< 3,0%
Umidade	4,3 – 10,5%	(ANGELUCCI et al., 1978; MATTEI et al., 1998; NAZARÉ, 1998)	< 9,5%

923 Dentre os principais constituintes químicos do guaraná (Quadro 3.4)
924 encontram-se a cafeína, teobromina e teofilina, designadas como metilxantinas.
925 Estes compostos são, muitas vezes, classificados como alcaloides purínicos, em
926 razão de sua marcante atividade biológica, distribuição restrita e presença estrutural
927 de nitrogênio heterocíclico. Entretanto, em razão de suas origens biogenéticas,
928 provenientes de bases púricas e não de aminoácidos, como também de seu caráter
929 anfótero as metilxantinas são mais propriamente classificadas como
930 pseudoalcaloides (MORAES et al., 2003).

931 Métodos de extração e análise de metilxantinas em amostras de semente de
932 guaraná vêm sendo muito utilizados. Um estudo realizado por Brenelli (2003)
933 verificou valores inferiores a 1,4% de cafeína extraída de amostras de pó de guaraná
934 utilizando o método de extração por Soxhlet. Outros estudos observaram teores de
935 4,8% (SALDAÑA et al., 2002) e 4,1% (MEHR, BISWAL e COLLINS, 1996) de
936 cafeína, a partir de sementes de guaraná, em um período relativamente curto
937 aplicando a extração de fluido supercrítico.

938 São descritos na literatura alguns métodos para a identificação e quantificação
939 desses constituintes do guaraná (metilxantinas e taninos totais), dentre eles
940 encontram-se o ensaio espectrofotométrico (ANDRADE, SCHENKEL e BERGOLD,
941 1999; PELOZO, CARDOSO e MELLO, 2008; RIBEIRO e COELHO, 2012; ROGGIA
942 et al., 2016; SOUSA et al., 2011; USHIROBIRA et al., 2004), espectroscopia de
943 Raman (EDWARDS et al., 2005), eletroforese capilar (KOFINK,
944 PAPAGIANNOPOULOS e GALENSA, 2007; SOMBRA et al., 2005) e cromatografia
945 líquida de alta eficiência (CLAE) (KLEIN, LONGUINI e MELLO, 2012; MARX e MAIA,
946 1990; USHIROBIRA et al., 2004).

947 A cafeína, identificada como 1,3,7-trimetilxantina, é encontrada em grande
948 quantidade nas sementes do guaraná. O Instituto Agrônomo de São Paulo, Brasil,
949 realizou um estudo de caracterização do teor de cafeína no tegumento, na amêndoa
950 e sementes de 40 plantas matrizes de guaraná. Verificaram-se teores médios de
951 cafeína de 2,33% na amêndoa, 1,09% no tegumento e 2,15% na semente como um
952 todo (SPOLADORE, BOAVENTURA e SÁES, 1987).

953 Diferentes amostras comerciais de sementes de guaraná foram analisadas por
954 meio de cromatografia gasosa e o conteúdo de cafeína apresentado foi inferior à
955 concentração mínima exigida (3,0%) pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010),
956 variando de 2,41 a 4,07% (PAGLIARUSSI, FREITAS e BASTOS, 2002). Por outro

957 lado, estudos utilizando métodos espectrofotométricos relatam valores entre 4,88 a
958 6,20% de metilxantinas, e 3,0 a 5,5% de taninos totais (SOUSA et al., 2011;
959 USHIROBIRA et al., 2004; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Essa diferença se
960 deve, provavelmente, a uma colheita realizada sem procedimento padronizado, em
961 diferentes épocas, coleta de frutos imaturos, e, principalmente, diferentes
962 procedimentos de secagem. Este último pode ser observado no trabalho de
963 Ushirobira e colaboradores (2004), que demonstraram diferentes teores de
964 metilxantinas e taninos nos diferentes métodos de secagem das sementes.

965 Metilxantinas e catequinas foram identificadas em diversas preparações
966 contendo guaraná, incluindo sementes secas, pós, tabletes e cápsulas (CARLSON e
967 THOMPSON, 1998). Meurer-Grimer e colaboradores (1998) investigaram o conteúdo
968 do alcaloide purina em três amostras de guaraná e 39 produtos comerciais, e
969 observaram que a maioria das amostras de guaraná apresentava a cafeína (2,95 a
970 5,12%) como o alcaloide principal, com traços de teobromina e teofilina. Já outro
971 estudo, com o objetivo determinar os teores de cafeína em diferentes marcas de
972 guaraná em pó disponíveis comercialmente, relatou uma grande variabilidade nos
973 teores de cafeína, valores de 0,95 a 3,67% (TFOUNI et al., 2007). Outros estudos
974 encontraram valores semelhantes para determinação de cafeína (3,95%) e taninos
975 (0,87%) (SOUSA et al., 2010) em sementes de guaraná. Essa variabilidade
976 encontrada se deve, possivelmente, à diferença de procedência, aspectos genéticos,
977 ambientais e processo de secagem a que a matéria-prima foi submetida.

978 Sombra e colaboradores (2005) analisaram derivados do guaraná por
979 eletroforese capilar (CE), comparando os resultados obtidos com os resultados do
980 CLAE. Os resultados obtidos foram semelhantes aos estudos anteriores para
981 cafeína, variando de 1,3% a 3,3%, embora o tempo de análise na EC seja duas
982 vezes menor do que CLAE, e com consumo de solvente de cem vezes menor. Foi
983 demonstrado com o uso de eletroforese capilar em amostras de guaraná, a
984 separação quiral dos enantiômeros catequina e *ent*-catequina, epicatequina e *ent*-
985 epicatequina (KOFINK, PAPAGIANNPOULOS e GALENSA, 2007).

986 Um estudo da composição da fração de taninos presentes em amostras de
987 sementes de guaraná demonstrou que a quantidade de taninos totais foi
988 consideravelmente alta, em torno de 12 a 14,1% de matéria seca, constituídos
989 principalmente de taninos condensados, como proantocianidinas (10,7%) e
990 catequina (5,98%) e epicatequina (3,78%) (MARX, 1990).

991 Além dos estudos citados anteriormente, os quais quantificam os constituintes
992 na droga vegetal, outros utilizam o extrato da semente de guaraná como produto nas
993 análises.

994 Uma avaliação química do extrato semipurificado das sementes do guaraná
995 revelou a presença cafeína, catequina, epicatequina e procianidinas B2, B3 e B4
996 (USHIROBIRA et al., 2007), além de *ent*-epicatequina e procianidinas A2 e C1
997 (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007) por meio de ressonância magnética nuclear
998 (RMN) e espectrometria de massas (Quadro 3.4).

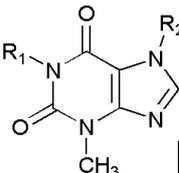
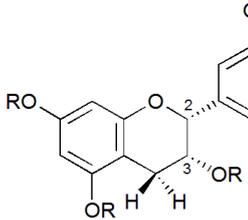
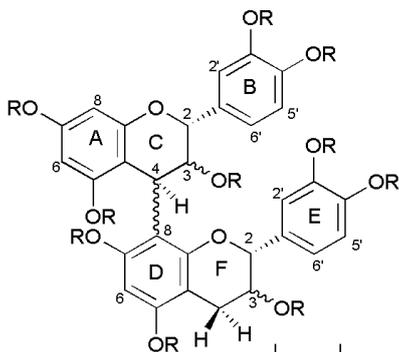
999 Klein e colaboradores (2012) identificaram e quantificaram alguns dos
1000 constituintes do estudo anterior (USHIROBIRA et al., 2007). Eles relataram que o
1001 extrato semipurificado de guaraná (EPA) apresentava taninos condensados, como
1002 180,750 µg de catequina (mg de EPA)⁻¹, 278,875 µg de epicatequina (mg de EPA)⁻¹
1003 e 300,875 µg de cafeína (mg de EPA)⁻¹. Recentemente, foi desenvolvido método de
1004 cromatografia eletrocínética micelar na separação e validação de EPA e este
1005 demonstrou ser eficiente na separação quiral da catequina, epicatequina,
1006 procianidina B1, B2 e B4, bem como da cafeína (MELLO e ITO, 2012).

1007 Outros estudos, utilizando tanto extratos aquosos (BARBOSA e MELLO, 2004;
1008 CAMPOS et al., 2011) quanto extratos hidroalcoólicos (BITTENCOURT et al., 2013;
1009 LIMA et al., 2005; PORTELLA et al., 2013) revelaram quantidades semelhantes à
1010 observada no estudo com droga vegetal. Estes valores variaram de 1,2% a 7,97%
1011 de cafeína e 1,5% a 12% de taninos. Essas diferenças se devem, provavelmente, a
1012 fatores genéticos, ambientais, assim como condições de extração.

1013 A semente de guaraná também contém acilglicerol e cianolipídios, uma classe
1014 de lipídios encontrada em algumas famílias, como por exemplo, Sapindaceae e
1015 Boraginaceae. A composição química do óleo extraído a partir das sementes de
1016 guaraná indicou a presença de cianolipídios, constituindo 3% do total de óleo das
1017 sementes de guaraná, e acilgliceróis representando 28%. As análises de RMN
1018 indicaram a presença de cianolipídios tipo I, ácido *cis*-vacênico (30, 4%), ácido *cis*-
1019 11-eicosenóico (38,7%) como principais ácidos graxos. Ácido paulínico (7,0%)
1020 também apresentou em quantidades abundantes e o ácido oleico (37,4%) foi o ácido
1021 graxo dominante de cadeia acil dos acilgliceróis (Avato and others 2003). Dalonso e
1022 Petkowick (2012) investigaram a presença de polissacarídeos, compostos com alto
1023 peso molecular presentes em amostras de guaraná. Estes autores relataram a

1024 presença de pectina e um grupo de polissacarídeos denominados hemiceluloses,
1025 como as xilanas.

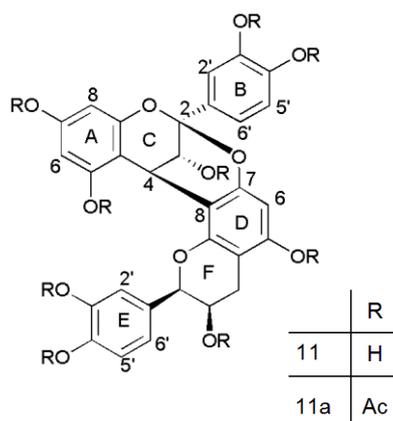
Quadro 3.4. Identificação dos principais constituintes químicos em amostras de guaraná.

Metilxantinas																											
Nome substância	Estrutura química	Referências																									
Cafeína (1) (1,3,7-Trimethylxanthine)	 <table border="1" data-bbox="758 678 930 882"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>H</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	1	CH ₃	CH ₃	2	H	CH ₃	3	CH ₃	H	(ANDRADE, SCHENKEL e BERGOLD, 1999; BAUMANN, SCHULTHESS e HÄNNI, 1995; BITTENCOURT et al., 2013; KLEIN, LONGUINI e MELLO, 2012; MARX e MAIA, 1990; MEURER-GRIMES, BERKOV e BECK, 1998; PAGLIARUSSI, BASTOS e FREITAS, 2006; PAGLIARUSSI, FREITAS e BASTOS, 2002; SCHIMPL et al., 2014; SOMBRA et al., 2005; SOUSA et al., 2010; TFOUNI et al., 2007; USHIROBIRA et al., 2004; USHIROBIRA et al., 2007; WECKERLE, STUTZ e BAUMANN, 2003; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)													
		R ₁	R ₂																								
1		CH ₃	CH ₃																								
2	H	CH ₃																									
3	CH ₃	H																									
Teobromina (2) (3,7-dimethylxanthine)																											
Teofilina (3) (1,3-dimethylxanthine)																											
Taninos																											
Taninos Condensados																											
Nome substância	Estrutura química	Referências																									
Epicatequina (4)	 <table border="1" data-bbox="786 1205 981 1375"> <thead> <tr> <th></th> <th>2</th> <th>3</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>.....</td> <td>.....</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>.....</td> <td>▶</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>▶</td> <td>▶</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		2	3	R	4	H	5	▶	H	6	▶	▶	H	(KLEIN, LONGUINI e MELLO, 2012; KOFINK, PAPAGIANNOPOULOS e GALENSA, 2007; MARX, 1990; SOUSA et al., 2010; USHIROBIRA et al., 2004; USHIROBIRA et al., 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)									
		2	3	R																							
4		H																							
5	▶	H																								
6	▶	▶	H																								
Catequina (5)																											
<i>ent</i> -epicatequina (6)																											
Procianidina B1 (7)	 <table border="1" data-bbox="730 1749 1013 1973"> <thead> <tr> <th></th> <th>3(C)</th> <th>3(F)</th> <th>4→8</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>7</td> <td>.....</td> <td>▶</td> <td>▶</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>.....</td> <td>.....</td> <td>▶</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>▶</td> <td>▶</td> <td>.....</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>▶</td> <td>.....</td> <td>.....</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		3(C)	3(F)	4→8	R	7	▶	▶	H	8	▶	H	9	▶	▶	H	10	▶	H	(KLEIN, LONGUINI e MELLO, 2012; USHIROBIRA et al., 2004; USHIROBIRA et al., 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)
		3(C)	3(F)	4→8	R																						
7		▶	▶	H																						
8		▶	H																						
9	▶	▶	H																							
10	▶	H																							
Procianidina B2 (8)																											
Procianidina B3 (9)																											
Procianidina B4 (10)																											

(Continua)

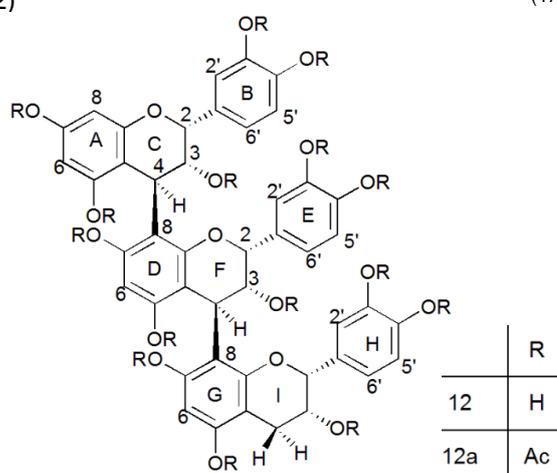
Quadro 3.4. (Conclusão)

Procianidina A2 (11)



(YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)

Procianidina C1 (12)



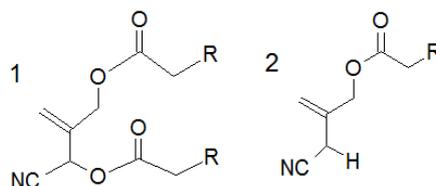
(YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)

Cianolipídios e Acilgliceróis**Nome substância****Estrutura química****Referências**

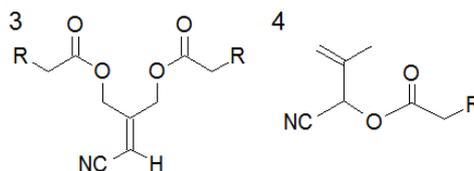
Cianolipídios

(AVATO et al., 2003)

1.1-ciano-2-

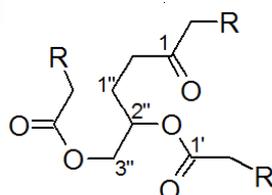
hidroximetilprop-2-en-1-ol-
diester2.1-ciano-2-metilprop-1-en-
3-ol-ester

3.1-ciano-2-

hidroximetilprop-1-en-3-ol-
ester4.1-ciano-2-metilprop-2-en-
1-ol-ester

Acilgliceróis

(AVATO et al., 2003)



1026 **3.6 Propriedades farmacológicas**

1027 Certas plantas e produtos fitoterápicos, vendidos como suplementos
1028 alimentares, são medicamentos populares muitas vezes com uso abusivo e
1029 anunciados como seguros e com apelo ao natural. Como muitos suplementos
1030 alimentares, no entanto, estas substâncias são regulamentadas, porém sem estudos
1031 de segurança e podem ter efeitos clínicos estimulantes e alucinógenos, mas
1032 websites continuam a tornar esses produtos facilmente disponíveis e acessíveis.
1033 Uma grande variedade de suplementos para perda de peso é comercializada com
1034 alegações de eficácia (ANDERSEN e FOGH, 2001; ARMSTRONG, 2001; BOOZER
1035 et al., 2001; ONAKPOYA e ERNST, 2012; OPALA et al., 2006). A falta de dados de
1036 segurança e/ou mesmo de eficácia dos muitos ingredientes encontrados nestes
1037 produtos, mesmo os ingredientes mais frequentemente incluídos, é causa de
1038 preocupação (BAGHKHANI e JAFARI, 2002; LUDE et al., 2016; MOADDEB,
1039 TOFADE e BEVINS, 2011).

1040 O pó de guaraná é um produto facilmente disponível tanto em
1041 estabelecimentos de produtos naturais como pela internet. Ele é comercializado
1042 sozinho ou em associação com outras drogas vegetais, criando a probabilidade de
1043 ocorrer efeitos aditivos ou sinérgicos (SPINELLA, 2001). Ele está incluído também
1044 em uma variedade de bebidas energéticas. Estas são encontradas facilmente em
1045 academias e supermercados, contendo estimulantes e aditivos. O guaraná também
1046 ganhou popularidade, pois é supostamente considerado um “alimento funcional”. As
1047 sementes de guaraná, como já discutido, contém grande quantidade de cafeína (40–
1048 80 mg de cafeína por grama de extrato de guaraná), além de teobromina e teofilina
1049 (HENMAN, 1982), que são substâncias estimulantes. A bebida com maior conteúdo
1050 natural de cafeína no mundo é feito a partir das sementes torradas de guaraná
1051 (PRANCE e NESBITT, 2005). A exposição em longo prazo para os vários
1052 componentes destas bebidas energéticas pode resultar em alterações significantes
1053 no sistema cardiovascular (HIGGINS, TUTTLE e HIGGINS, 2010) e até convulsões
1054 (IYADURAI e CHUNG, 2007). Quando o guaraná é adicionado a bebidas
1055 energéticas, o guaraná aumenta a quantidade de cafeína metabolizada (MCGUIRE,
1056 2014). Uma série de eventos adversos é relatada ao uso do guaraná e incluem
1057 irritabilidade, palpitações, ansiedade, distúrbios do sistema nervoso central e
1058 mioglobinúria (DONADIO et al., 2000; GALDURÓZ e CARLINI, 1994; HALLER,

1059 JACOB e BENOWITZ, 2005; PITTLER, SCHIMIDT e ERNST, 2005; RICHARDSON,
1060 SLONE e MICHELS, 2007; SHARPE, GRANNER e CONWAY, 2006). O guaraná
1061 também podem exacerbar as crises epilépticas, baixando o limiar de convulsão ou
1062 prolongar a duração das crises (SPINELLA, 2001). Apesar destes relatos, o
1063 guaraná, quando tomado sozinho tem poucos efeitos adversos, sendo que a maioria
1064 deles é similar àqueles observados após o consumo de produtos contendo alta
1065 quantidade de cafeína (RAVI SUBBIAH, 2005). A dose diária aceita como segura de
1066 cafeína para adultos é de 400 mg (NAWROT et al., 2003).

1067 Efeitos afrodisíacos em coelhos foram relatados a partir de administração de
1068 uma associação de extratos vegetais, comercialmente disponível, contendo guaraná
1069 (ANTUNES et al., 2001). Em outro estudo (DE AQUINO et al., 2016), moscas
1070 mediterrâneas macho foram alimentadas com dietas adicionadas de guaraná em pó
1071 (3%). As moscas mediterrâneas são pragas de importância global para horticultura,
1072 entretanto podendo ser controladas usando a Técnica de Insetos Estéreis (TIE). O
1073 sucesso do TIE depende do desempenho sexual dos machos criados em
1074 laboratório, quando libertados para o campo. Os experimentos indicaram que os
1075 machos mantidos com dietas enriquecidas mostrou maior sucesso no acasalamento,
1076 podendo representar uma nova e viável opção para aumentar a eficiência da TIE.

1077 O guaraná foi colocado entre as plantas com atividade psicoanalépticas
1078 (estimulantes) com ênfase em propriedades anorexígenas ou propriedades de
1079 redução de peso. O consumo de guaraná é capaz de induzir mudanças no
1080 metabolismo lipídico, mas as substâncias que realmente induzem às alterações
1081 relatadas parecem estar envolvidas com o conteúdo de metilxantinas do extrato
1082 (LIMA et al., 2005).

1083 Preparações contendo guaraná em associação com outras drogas vegetais são
1084 muito utilizadas para perda de peso em humanos (ANDERSEN e FOGH, 2001;
1085 BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005; BOOZER et al., 2001; BULKU et al., 2010; OPALA
1086 et al., 2006; RUXTON et al., 2007), mostrando resultados positivos. O guaraná,
1087 devido ao seu conteúdo em metilxantinas, é capaz, entre outros efeitos, de bloquear
1088 a adenosina e receptores que inibem a fosfodiesterase, que aumenta ações de
1089 noradrenalina (CARLINI, 2003). Em vista dos efeitos da cafeína de elevação da
1090 pressão arterial, o guaraná deve ser evitado por pessoas hipertensivas. É também
1091 fortemente recomendado que a combinação de guaraná com suplementos contendo
1092 ma hung (efedra) e produtos com alcaloides de efedrina deva ser evitada, pois pode

1093 aumentar o risco de infarto do miocárdio e morte súbita (BOOZER et al., 2001;
1094 NYSKA et al., 2005). Ainda, Rodrigues e colaboradores (2012) demonstraram que
1095 antiarrítmicos como a amiodarona, por exemplo, também não devem ser associados
1096 com o consumo de guaraná, pois este pode diminuir a concentração plasmática da
1097 amiodarona, particularmente no coração.

1098 O guaraná possui uma impressionante quantidade de funções farmacológicas
1099 descritas na literatura (Quadro 3.5).

1100 Têm sido descritos vários estudos demonstrando os efeitos protetores do
1101 guaraná. Ele possui propriedade gastroprotetora e oferece benefícios terapêuticos
1102 muito melhores que a cafeína nos distúrbios gastrointestinais (CAMPOS et al.,
1103 2003). Também em testes utilizando animais, Kober e colaboradores (2015)
1104 evidenciaram o efeito hepatoprotetor do extrato de guaraná. Outros estudos também
1105 apontam os efeitos citoprotetores do guaraná (DE OLIVEIRA et al., 2002; FREITAS
1106 et al., 2007; LEITE et al., 2013; LEITE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), inclusive
1107 como neuroprotetor (BITTENCOURT et al., 2014) ou inibidor da acetilcolinesterase
1108 (TREVISAN e MACEDO, 2003). Sugerindo assim, que esta planta poderia ser uma
1109 alternativa promissora para prevenção e/ou tratamento da doença de Alzheimer,
1110 apesar desta doença ser de etiologia múltipla. Além disto, o extrato aquoso de
1111 guaraná também protegeu danos ao DNA, em testes em animais (FUKUMASU et al.,
1112 2006a; KOBER et al., 2015).

1113 O extrato seco de guaraná (ESG) vem sendo utilizado em formulações tópicas
1114 destinadas à prevenção e tratamento da lipodistrofia ginoide porque causa aumento
1115 do número de vasos sanguíneos na derme quando utilizado a 50% (CHORILLI et al.,
1116 2004). A liberação transdérmica simultânea das principais substâncias presentes
1117 nos extratos de guaraná foi estabelecida, com taxas de penetração sendo altamente
1118 dependentes da concentração e do veículo (HEARD et al., 2006).

1119 Estudos no nosso grupo demonstraram que o extrato bruto e semipurificado de
1120 guaraná apresentam efeito antidepressivo no tratamento crônico comparável ao do
1121 antidepressivo imipramina (AUDI e MELLO, 2000). Estes efeitos não podem ser
1122 relacionados com as metilxantinas presentes porque os resultados obtidos com esta
1123 substância isoladamente são diferentes daqueles encontrados com a administração
1124 dos extratos (OTOBONE et al., 2007). Assim, alguns taninos condensados, que
1125 foram isolados da fração semipurificada poderiam ser os responsáveis por esta
1126 atividade, já que podem agir no sistema nervoso central porque conseguem

1127 atravessar a barreira hematoencefálica (YOU DIM, SHUKITT-HALE e JOSEPH,
1128 2004). Sugere-se que outro mecanismo que não o de bloqueador de agonista de
1129 adenosina, adenosina ciclopentil (CPA), esteja envolvido na atividade antidepressiva
1130 do guaraná, pois a cafeína e não o guaraná apresenta este mecanismo (CAMPOS et
1131 al., 2005).

1132 Dois outros estudos foram realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores
1133 para avaliar a efetividade do extrato de guaraná nos sintomas de fadiga e de
1134 depressão induzidos pela quimioterapia em pacientes com tumores sólidos
1135 (MIRANDA et al., 2008) ou pós-irradiação (MIRANDA et al., 2009). Em ambos os
1136 casos os pacientes não apresentaram diferença significativa nos efeitos da fadiga e
1137 depressão após estes tratamentos, quando comparado o grupo tratado com o
1138 controle. No entanto, em outros dois estudos realizados por grupos de pesquisa
1139 distintos, também avaliando o efeito do extrato de guaraná, os resultados
1140 mostraram-se positivos. O extrato de guaraná padronizado mostrou-se efetivo, de
1141 toxicidade aceitável e baixo custo no tratamento da fadiga relacionada à
1142 quimioterapia em pacientes com câncer de mama (CAMPOS et al., 2011) e
1143 pacientes com tumores sólidos (DEL GIGLIO et al., 2013a).

1144 Por apresentar diversas substâncias com propriedades sabidamente
1145 quimiopreventivas e antineoplásicas, como as metilxantinas e polifenóis, e assim
1146 podendo agir como quimiopreventivo na carcinogênese, o guaraná é considerado
1147 uma planta promissora. Ele pode reduzir a expansão celular de células neoplásicas,
1148 diminuir a incidência e multiplicidade das lesões macroscópicas, reduzir a
1149 proliferação e aumentar a apoptose das células tumorais, conseqüentemente,
1150 reduzindo a área do tumor (Fukumasu and others 2006b, 2008, 2011).

1151 Em estudo para verificar os efeitos agudos do guaraná na cognição, ansiedade
1152 e sono em voluntários normais, os resultados foram negativos, sugerindo a
1153 necessidade de estudos com tratamentos crônicos, como utilizado popularmente
1154 (GALDURÓZ e CARLINI, 1994). Em outro estudo, avaliando a administração crônica
1155 do guaraná sobre a cognição de voluntários normais e idosos, os resultados não
1156 causaram alterações suficientes para caracterizar qualquer manifestação clínica
1157 detectável (GALDURÓZ e CARLINI, 1996). No entanto, duas razões podem explicar
1158 os resultados obtidos: tempo insuficiente de tratamento e os testes utilizados não
1159 foram suficientemente sensíveis para detectar as alterações esperadas.

Quadro 3.5 Atividades farmacológicas das sementes de *P. cupana* ou suas associações descritas na literatura.

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
1. Ação tônica	Extrato aquoso (40 °C, 2h, 2X)	<i>In vivo</i> : amostras sanguíneas de camundongos	Avaliar ação tônica do guaraná em camundongos normais e exercitados e glicogenolíticos induzidos por epinefrina	Controle: sem tratamento	20; 100; e 500 mg kg ⁻¹	Extrato aquoso com atividade supressora da hipoglicemia induzida por exercícios em camundongos, o que confirma seu uso tradicional como tônico	(MIURA et al., 1998)
2. Controle de fogachos	Não está claro. O extrato continha 7,97% cafeína e 1,47% taninos	<i>In vivo</i> : mulheres	Avaliar se o guaraná diminui o número e a gravidade dos fogachos em mulheres após diagnóstico de câncer de mama	placebo	50 mg do extrato seco oralmente 2x por dia, por 6 semanas	Observou-se redução no número e gravidade dos fogachos	(OLIVEIRA et al., 2013)
3. Relaxação do corpo cavernoso (efeito afrodisíaco)	Associação: Catuama®. Mistura de extratos hidroalcóolicos de 4 plantas: 5% guaraná, 1% <i>Zingiber officinalis</i> (ginger), 5% <i>Trichilia catigua</i> (catuaba), e 5% <i>Ptychopetalum olacoides</i> (muirapuama). Também foram obtidos extratos etanólicos (1:1) extraídos por 7 dias a 25 °C para cada planta	<i>Ex vivo</i> : corpo cavernoso isolado de coelho	Investigar os efeitos do Catuama® e suas plantas constituintes isoladas no tecido do corpo cavernoso de coelho usando bioensaio em cascata	Controle positivo: acetilcolina (0,6nmol) ou trinitrato de gliceril (1,3 nmol)	Injeções em bolus da Catuama®: 1, 3 e 10 mg, e dose individuais de guaraná (0,5–5 mg), <i>Z. officinalis</i> (1–10 mg), <i>P. olacoides</i> (2–20 mg) e <i>T. catigua</i> (1–10 mg)	Catuama® causou relaxamento de curta duração e dose-dependente. Dos 4 extratos testados individualmente, o guaraná foi o mais efetivo, indicando que é o principal responsável pelo efeito de relaxamento do no corpo cavernoso de coelho, sugerido ser atribuído a Catuama®	(ANTUNES et al., 2001)
4. Perda de peso e retardo no esvaziamento gástrico	Associação: preparação de extratos de drogas vegetais (YGD) (cápsulas), contendo: 112 mg erva-mate, 95 mg guaraná, e 36 mg de damiana, administradas com 420 mL de suco de maçã	<i>In vivo</i> : humanos	Determinar retardo no esvaziamento gástrico e perda de peso durante 10 e 45 dias e de manutenção de peso ao longo de 12 meses	Cápsulas de placebo (lactose) administradas com 420 mL de suco de maçã	3 cápsulas de YGD por dia	Ocorreu retardo significativo no esvaziamento gástrico, reduziu o tempo de plenitude gástrica percebida e significativa perda de peso ao longo de 45 dias, em pacientes com sobrepeso tratados em um contexto de cuidados básicos de saúde	(ANDERSEN e FOGH, 2001)
5. Perda de peso	Associação: mistura comercial Metabolife-356® contendo Ma Huang e guaraná como principais ingredientes ativos. Cada comprimido continha 12 mg alcalóides efedrina e 40 mg cafeína	<i>In vivo</i> : humanos (25 a 55 anos) com IMC ≥ 29 e ≤ 35 kg m ⁻²	Examinar, em pessoas com sobrepeso, a segurança em curto prazo e eficácia na perda de peso, de um suplemento vegetal que contém Ma Huang, guaraná e outros ingredientes	Placebo: um comprimido idêntico na aparência, mas sem a mistura de planta	2 comprimidos, 30 min antes da refeições, 3x por dia por 2 meses. Ao dia: 72 mg - alcalóides efedrina; 240 mg - cafeína	Identificou-se perda de peso, perda de gordura, redução da circunferência da cintura e do quadril e níveis de triglicerídeos baixaram; ainda apresentou efeitos adversos com riscos potenciais (palpitações auto-relatados, o aumento da glicose no soro e aumentos transitórios na pressão arterial sistólica)	(BOOZER et al., 2001)

(continua)

Quadro 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
6. Perda de peso	Associação: as 4 misturas (cápsulas) continham doses variadas de chá verde (em que epigalocatequina-3-galato (EGCG) representou 45% do peso seco) e guaraná (com dose fixa de cafeína). Também continham quantidades desconhecidas de catequinas	<i>In vivo</i> : homens (20 a 50 anos) com IMC entre 20 e 27 kg m ⁻²	Comparar o efeito de mistura de extratos de chá verde e guaraná (dose fixa de cafeína e variáveis de EGCG) em 24 h, no gasto energético e oxidação de gordura. Determinar se há um efeito dose-dependente de EGCG, e se sim, qual dose produz melhor efeito sem induzir cardio-estimulação significativa	Placebo: celulose	3 cápsulas por dia. Cada cápsula com dose fixa de cafeína (200 mg) e quantidades variáveis de EGCG (90; 200; 300; e 400 mg)	A mistura EGCG-cafeína deve ser considerada bom complemento a um programa de perda de peso e tem potencial para tratamento da obesidade. Autores sugerem que dose de 90 mg de EGCG (3X ao dia) representa a concentração ótima para produzir um efeito sobre a oxidação de macronutrientes	(BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005)
7. Efeito ergogênico e de "queima gordura"	Foram testados 2 extratos: A. Extrato obtido por percolação no solvente ethanol:água (6.6:3,4 v/v), com 0,153 g g ⁻¹ de cafeína. B. Extrato descafeinado por extração com clorofórmio (taninos e catequinas não foram removidos)	<i>In vivo</i> : ratos Wistar	Avaliar o efeito da suplementação de guaraná (14 dias) sobre os aspectos do metabolismo lipídico em ratos sedentários e ratos treinados	Ratos sedentários e treinados não suplementados	0,130 e 0,325 g kg ⁻¹ (extrato seco por peso corpóreo)	O consumo de guaraná é capaz de induzir alterações no metabolismo lipídico, devido ao conteúdo de metilxantinas do extrato	(LIMA et al., 2005)
8. Perda de peso e mudança na composição corporal	Associação de 2 comprimidos A. comprimidos com extratos de aspargos, chá verde, chá preto, guaraná, mate e feijão roxo; B. extratos de vagens do feijão roxo, garcinia cambogia e cromo na forma de leveduras	<i>In vivo</i> : humanos (21 a 55 anos, com IMC entre 25,2 e 39,6 kg m ⁻²)	Avaliar a eficácia e segurança dos extratos na redução de peso e as alterações na composição corporal	placebo	Dois comprimidos por refeição, em duas refeições principais. Comprimido A, uma hora antes da refeição Comprimido B, meia hora após a refeição	Diminuição da gordura e aumento da massa magra corporal. Não houve diferença significativa nas medidas de peso e IMC	(OPALA et al., 2006)
10. Perda de peso	Associação: Zotrim®, comprimidos contendo extratos de erva-mate, guaraná e Damiana (YGD). Cada comprimido de YGD contém: guaraná (95 mg); erva-mate (112 mg); damiana (35 mg), com total de ≈11,2 mg cafeína	<i>In vivo</i> : humanos	Avaliar o efeito da administração de YGD sobre a diminuição do peso, IMC, circunferência da cintura e percepção de fome e saciedade, em um grupo de profissionais de saúde	Placebo: comprimidos de lactose	2 comprimidos 15 min antes das refeições por 1 semana; aumentando para 3 comprimidos 15 min antes das refeições por 5 semanas. Total: 6 semanas, 3 refeições por dia	Redução significativa no peso auto-reportados, circunferência da cintura e circunferência do quadril. 22% dos indivíduos tiveram uma perda de peso linicamente significativa	(RUXTON et al., 2007)

(continua)

Quadro 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
11. Perda de peso e atividade antioxidante	Associação: extratos em pó de <i>Salvia officinalis</i> , <i>Camellia sinensis</i> , guaraná, e duas vitaminas (tiamina e niacina) (STG). A quantidade de cada componente não foi informada	<i>In vivo</i> : Ratos Fisher-344	Testar nova dieta que fornece suporte nutricional por acelerar o metabolismo e manter peso e energia saudáveis, além de avaliar a segurança e eficácia de STG	Controle: Grupo 1 que recebeu ração normal	Grupo 2: 1X STG.. Grupo 3: 7X STG 1X: . ração normal com 192 mg de STG por kg	A administração de STG não reduziu drasticamente o ganho de peso, no entanto, ela ajudou a manter o peso corporal saudável juntamente com uma capacidade antioxidante significativa dos órgãos-alvo vitais (fígado, coração e rins)	(BULKU et al., 2010)
12. Proteção contra lesões gástricas	Extrato de semente seca. Não há informações sobre forma de preparação do extrato e nem a quantificação de seus componentes principais	<i>In vivo</i> : ratos e camundongos	Analisar os efeitos do extrato de guaraná em lesões gástricas induzidas por indometacina e etanol, secreção gástrica e trânsito gastrointestinal e comparar com os efeitos da cafeína pura	Controle: água de torneira;	Extrato de guaraná 50 e 100 mg kg ⁻¹ e cafeína 20 e 30 mg kg ⁻¹	O guaraná parece oferecer benefícios terapêuticos muito melhores do que a cafeína em desordens gastrointestinais	(CAMPOS et al., 2003)
13. Efeito hepatoprotetor	Sementes guaraná pó diluídas em água (12,240 mg g ⁻¹ de cafeína, 6,733 mg g ⁻¹ de teobromina, 4,336 mg g ⁻¹ de catequinas totais e 16 mg g ⁻¹ de taninos condensados)	<i>In vivo</i> : ratos machos Wistar	Avaliar o efeito hepatoprotetor do pó de sementes de guaraná em lesão hepática induzida por CCl ₄ (tetracloreto de carbono) em ratos	Agente hepatoprotetor: silimarina (100 mg kg ⁻¹). CCl ₄ (1 mL kg ⁻¹ , 50% CCl ₄ em azeite) para indução da hepatotoxicidade. Controle: água	100, 300 e 600 mg kg ⁻¹ , diariamente por 14 dias	Os resultados indicam que o guaraná tem atividade hepatoprotetora na lesão hepática induzida por CCl ₄ em ratos, impedindo a quebra das cadeias de DNA celulares	(KOBBER et al., 2015)
14. Efeito antialérgico	Extrato hidroetanólico a 30% (refluxo por 2h). O extrato seco foi dissolvido em DMSO e diluído em salina ou tampão	<i>In vivo</i> : camundongos	Investigar os efeitos do extrato hidroetanólico de sementes de guaraná (GSE) no aumento da permeabilidade vascular induzida por estimulação por IgE de camundongos e efeitos na degranulação de mastócitos induzido por IgE	Controle: salina	0,1; 0,3; ou 1,0 g kg ⁻¹	GSE administrado oralmente inibiu a reação de anafilaxia cutânea passiva induzida pela IgE anti-dinitrofenol. GSE também inibiu a liberação de β-hexosaminidase a partir de células RBL-2H3 induzidas pelas vias mediadas por receptor de IgE. Estes resultados indicam que a GSE teve um efeito inibidor sobre a reação alérgica e pode ter aplicação terapêutica em doenças inflamatórias alérgicas	(JIPPO et al., 2009)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
15. Ação antiagregante	Extrato aquoso de <i>P. cupana</i> e 4 frações separadas por CCD	<i>In vitro</i> : sangue de humanos e coelhos e <i>In vivo</i> : coelhos	Para avaliar a ação antiagregante do extrato de guaraná na agregação plaquetária induzida por (adenosina difostato) ou araquidonato, mas não por colágeno	Controle: sem tratamento	Não há relatos das concentrações utilizadas para o estudo, somente o volume utilizado para os testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Extratos de guaraná inibem a agregação de plaquetas em coelhos, após administração tanto intravenosa quanto oral	(BYDLOWSKI, YUNKER e SUBBIAH, 1988)
16. Ação antiagregante	Extrato aquoso de <i>P. cupana</i> e 4 frações separadas por CCD	<i>In vitro</i> : sangue de coelhos	Avaliar o efeito do extrato de guaraná sobre a agregação de plaquetas, estudando os seus efeitos sobre a síntese plaquetária de tromboxano em coelhos	Controle: sem tratamento	100mg mL ⁻¹	O guaraná tem uma ação antiagregante sobre as plaquetas e isto pode ser em parte pela diminuição de síntese de tromboxano. Os autores sugerem que uma das frações contendo principalmente cafeína seria parcialmente responsável por esta ação, além de outros compostos que podem estar presentes	(BYDLOWSKI, D'AMICO e CHAMONE, 1991)
17. Efeito sobre os vasos sanguíneos da derme papilar	Extrato seco de guaraná (ESG) incorporado em bases auto-impulsionantes. Não há informações sobre a forma de preparo do extrato	<i>In vivo</i> : ratos Wistar (via tópica)	Estudar os efeitos da emulsão com diferentes concentrações de extrato, misturados com dois promotores químicos de permeação cutânea (ácido oleico ou miristato de isopropila), sobre os vasos sanguíneos da derme papilar de ratos	Grupo controle não recebeu formulação	ESG 20% ou 50%	O rato não se mostrou um modelo experimental bom para estudo de hipoderme. ESG 20% não provocou alterações significativas na derme papilar de ratos. ESG 50% aumentou a microcirculação cutânea, sendo que os promotores químicos de absorção não potencializaram os efeitos	(CHORILLI et al., 2004)
18. Efeito cognitivo e força muscular	Guaraná em pó adicionado a complexo composto por creatina, disperso em 500 mL de água	<i>In vivo</i> : humanos	Comparar os efeitos da ingestão de suplemento creatina + guaraná (G +CRE) sobre a força muscular e desempenho cognitivo	Placebo: água com gás aromatizada sem açúcar	Complexo composto por: 1 g de creatina; 1,5 g guaraná; 150 mg de taurina; 133 mg de cafeína; 120 mg de L-glutamina; 106,7 mg de vitamina C; 100 mg de L-arginina e 1,1 mg de vitamina B1. Ingerido em duas doses, 60 e 30 min antes do exercício	O suplemento de creatina + guaraná parece ter um efeito benéfico sobre a força muscular e desempenho cognitivo decisional. Assim, pode ter interesse para melhorar o desempenho de atletas em esportes com altas restrições cognitivas	(POMPORTES, L. et al., 2015)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
20. Melhora no desempenho geral do corpo	Suspensão do pó das sementes de <i>P. cupana</i> em água: Tween-80. O pó continha 2,1% cafeína e 16% taninos	<i>In vivo</i> : camundongos Swiss e ratos Wistar	Avaliar ação do guaraná no desempenho geral do corpo <i>in vivo</i> : o desempenho físico (nado forçado), aprendizagem e a memória (esquiva ativa e passiva) e teste de labirinto Lashley III e longevidade. Comparar os efeitos anti-fadiga com o ginseng	Suspensão controle: água/Tween 80. Droga referência: cafeína (0,1 mg mL ⁻¹)	Guaraná: 0,3 e 3,0 mg mL ⁻¹ ; Ginseng: 5 mg mL ⁻¹	Os animais tratados com 0,3mg mL ⁻¹ de guaraná apresentaram melhor performance física e foi útil para a manutenção de memória adquirida previamente	(ESPINOLA et al., 1997)
21. Efeito cognitivo	Guaraná em pó (cápsulas). O pó continha 2,1% cafeína e 16% taninos	<i>In vivo</i> : humanos (acima de 60 anos)	Avaliar os efeitos da administração em longo prazo de guaraná sobre a cognição de voluntários idosos normais	Placebo: cápsulas de açúcar mascavo. Droga referência: cafeína (12,5mg)	Duas cápsulas de guaraná por dia (500 mg cada) por 5 meses	Não houve alterações cognitivas significantes nos voluntários. O tempo de tratamento pode ter sido insuficiente e os testes neuropsicológicos empregados não foram sensíveis suficientes para testar as alterações esperadas	(GALDURÓZ e CARLINI, 1996)
22. Melhora do desempenho cognitivo	Extrato seco etanólico de guaraná; <i>Panax ginseng</i> , e sua combinação. Ambos padronizados. Ginseng: percolação exaustiva (40% etanol-60% de água, a temperaturas < 40 °C). Guaraná: percolação exaustiva (50% etanol-50% água, a temperaturas < 50 °C), metilxantinas (11-13%)	<i>In vivo</i> : humanos	Fornecer análise dos efeitos cognitivos e de humor, no tratamento com guaraná. Avaliar o potencial de efeitos aditivos ou sinérgicos após a combinação comum, disponível comercialmente, de guaraná com <i>Panax ginseng</i>	Cápsulas de gelatina: sem extratos	2 cápsulas por dia: 75 mg de guaraná (≈12% cafeína), 200 mg of <i>ginseng</i> , ou a combinação deles (75 mg 200 mg ⁻¹)	Doses únicas de ambos (guaraná e ginseng), e uma combinação dos dois, melhorou o desempenho cognitivo, em comparação com o placebo, em sujeitos jovens e sadios	(KENNEDY et al., 2004)
23. Efeitos cognitivos	Extrato bruto liofilizado (EBPC) e os constituintes semipurificados (EPA e EPB). Não tem informação sobre o modo de extração (Patente N. PI 0006638-9)	<i>In vivo</i> : ratos Wistar	Investigar os efeitos do tratamento crônico do EBPC ou do EPA e EPB de sementes de guaraná no comportamento cognitivo em ratos	Controle ou escopolamina (2,0 mg kg ⁻¹). Controle: tratado com o NaCl 0,9% e 0,2% Tween 80)	EBPC (30,0 ou 60,0 mg kg ⁻¹) e EPA (2,0 ou 4,0 mg kg ⁻¹), e EPB (2,0 ou 4,0 mg kg ⁻¹)	EBPC e EPA de extratos de sementes de guaraná foram ativos por via oral e exibiram efeito nootrópico significativo. O tratamento crônico mostrou o mesmo aumento no peso corporal e tempo de vida médio, indicando uma baixa toxicidade dos extratos	(OTOBONE et al., 2005)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
24. Efeito cognitivo	Extrato padronizado (KENNEDY et al., 2004) de sementes de guaraná (PC-102) (11-12% cafeína)	<i>In vivo:</i> humanos	Avaliar os efeitos agudos de comportamento dose-dependente de extrato de guaraná, pela primeira vez em humanos	Placebo: sem o extrato de guaraná	1 cápsula por dia que contém: 37,5 mg, 75 mg; 150 mg; ou 300 mg	Guaraná melhorou o desempenho da memória secundária e aumento as taxas de alerta e humor. As duas doses mais baixas produziram efeitos cognitivos mais positivos que o doses mais altas	(HASKELL et al., 2007)
25. Desempenho cognitivo e ativação funcional cerebral	Utilizados 2 suplementos comerciais: A) <i>Berocca® boost</i> , multivitamínico e sais minerais com adição de guaraná (40mg cafeína por comprimido); B) <i>Berocca® performance</i> (não tem guaraná em sua composição e mais altos níveis de vitaminas do complexo B e vitamina C)	<i>In vivo:</i> humanos	Determinar se <i>Berocca® boost</i> e <i>Berocca® performance</i> poderiam diferencialmente afetar o humor e desempenho mental quando comparado com o placebo. Examinar substratos neurais usando ressonância magnética funcional (fMRI) para determinar tais efeitos	Placebo: 330 mL bebida efervescente com coloração semelhante	1 comprimido por dia para cada grupo (suplemento com e sem guaraná)	fMRI revelou que ambos os tratamentos multivitamínicos aumentaram a ativação em áreas associadas com a memória de trabalho e processamento de atenção, com o efeito sendo maior no grupo tratado com o suplemento contendo guaraná. Além disso, houve um aumento da ativação cerebral nos grupos tratados com os suplementos, contendo guaraná ou não	(SCHOLEY et al., 2013)
26. Efeito cognitivo	Suplemento comercial vitamínico mineral contendo guaraná e ginseng, em comprimido efervescente Isoxan Actiflash®. Cada comprimido: 300 mg guaraná e 100 mg ginseng. Suplemento de cafeína comercial Natrol®: 100 mg cafeína	<i>In vivo:</i> humanos	Avaliar o desempenho cognitivo e variabilidade da frequência cardíaca após a ingestão: do suplemento comercial com 300 mg guaraná; um suplemento de cafeína ou um suplemento de placebo	Placebo	1 comprimido por dia para cada grupo (suplemento com guaraná, com cafeína ou placebo)	Os resultados sugerem que a ingestão de um multivitamínico-mineral adicionado de guaraná melhora o desempenho de tomada de decisão e é acompanhada por uma regulação do sistema nervoso autônomo estável durante a primeira hora	(POMPORTE S, LAURA et al., 2015)
27. Efeitos sobre cognição, ansiedade e sono	Guaraná em pó (cápsulas). O pó continha 2,1% cafeína e 16% taninos	<i>In vivo:</i> humanos	Verificar eventuais efeitos agudos do guaraná sobre a cognição, a ansiedade e sono de voluntários normais	Grupo 1: placebo; Grupo 2: cafeína (12,5 mg);	2 cápsulas por dia por (500mg cada) por três dias consecutivos	Os autores não conseguiram comprovar nenhuma mudança significativa sobre os efeitos pesquisados com o tratamento com o pó de guaraná	(GALDURÓZ e CARLINI, 1994)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
28. Efeitos ansiolíticos	O extrato foi preparado (1kg) por turbólise (acetona:água) (7:3;v/v) na proporção de líquido extrator de 10% (m/V). 158g extrato EBPC liofilizado (processo patenteado) foi particionado com acetato de etila: PEA (44 g) e FAQ (114g)	<i>In vivo</i> : ratos Wistar	Para investigar os efeitos da administração crônica de extrato semipurificado (PEA) de guaraná em ratos submetidos ao modelo de labirinto T elevado (ETM) de ansiedade generalizada e transtorno do pânico	Controle positivo: paroxetina; Controle negativo: só o veículo (0,9% NaCl; 2% Tween 80)	PEA: 4, 8, ou 16 mg kg ⁻¹ PEA tem 34,95% cafeína e 17,53% taninos	PEA é ativo por via oral; produziu um efeito panicolítico em ratos no teste de ETM; e os sistemas de neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica estão envolvidos neste efeito. É sugerido que PEA pode ser um fármaco útil no tratamento de distúrbios de humor	(RONCON et al., 2011)
29. Efeito ansiolítico e panicolítico	Fração aquosa (FAQ) de guaraná (RONCON et al., 2011). Extração patenteada (Patente N. PI 0006638-9)	<i>In vivo</i> : ratos machos Wistar	Avaliar o efeito ansiolítico e panicolítico da FAQ em ratos (teste ETM) e se os neurotransmissores, serotoninérgicos, dopaminérgicos e glutamatérgicos estão envolvidos neste efeitos	Controle positivo: paroxetina	8 mg kg ⁻¹	A FAQ é efetiva oralmente, produz atividade ansiolítica e panicolítica sobre ratos no teste ETM. Os neurotransmissores, serotoninérgicos, dopaminérgicos e glutamatérgicos estão envolvidos no efeito ansiolítico e os serotoninérgicos e dopaminérgicos, no efeito panicolítico	(RANGEL, MELLO e AUDI, 2013)
30. Bem-estar psicológico, ansiedade e humor	Produto comercial contendo guaraná com 2,5% (m/m) de cafeína	<i>In vivo</i> : humanos	Avaliar os efeitos sobre o bem-estar psicológico (PWB), ansiedade e humor de uma preparação guaraná disponível comercialmente	Placebo (amido de milho)	Cápsulas de 360 mg por 3X ao dia por 5 dias consecutivos	Não houve diferenças significativas entre o placebo e guaraná em qualquer das 6 áreas do PWB, em SAS (escala de estado de ansiedade) ou em qualquer uma das 16 escalas de humor. Portanto, estes resultados não evidenciaram quaisquer efeitos importantes sobre bem-estar psicológico, ansiedade ou humor	(SILVESTRINI, MARINO e COSENTINO, 2013)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
31.Efeito antidepressivo	Catuama® (formulação comercial já citada)(ANTUNES et al., 2001). O extrato seco contém 40,31% guaraná, 28,23% <i>T. catigua</i> , 28,23% <i>P. alcaloides</i> e 3,26% <i>Z. officinalis</i>	<i>In vivo</i> : camundongos e ratos <i>In vitro</i> : membranas inapto-somal	Avaliar os possíveis efeitos, semelhantes a antidepressivos, deste produto, por meio de procedimentos farmacológicos e neuroquímicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Controle negativo para todos os testes: salina (10 mL kg ⁻¹ v.o.); Testes <i>in vivo</i> : controle positivo, imipramina (10 ou 15 mg kg ⁻¹ i.v., 6 h), d) <i>In vitro</i> : Fluoxetina, cocaína, ou desipramina (35, 3,4; 30 µg mL ⁻¹), respectivamente	Nado forçado: (150 a 300 mg kg ⁻¹ v.o.), 6 h ou (200 mg kg ⁻¹) por 7 dias. Teste da suspensão pela cauda: Catuama® (150 a 300 mg kg ⁻¹ v.o.), 6 h. Teste de campo aberto: Catuama®, (300 mg kg ⁻¹). <i>In vitro</i> : Catuama® (10–1000 ou 200 mg kg ⁻¹ v.o.) 1X ao dia por 42 dias	Os resultados mostram evidências farmacológicas e neuroquímicas das ações antidepressivas da Catuama®	(CAMPOS et al., 2004)
32.Efeito antidepressivo	Não há relatos. É uma “ <i>short communication</i> ”	<i>In vivo</i> : camundongos	Analisar os efeitos do extrato de guaraná em comparação com a cafeína no comportamento do rato no nado forçado e testes de campo aberto	Água destilada (veículo): 10 mL kg ⁻¹ . Cafeína (10, 20 e 30 mg kg ⁻¹)	25, 50 e 100 mg kg ⁻¹	Os resultados sugerem possíveis efeitos antidepressivos	(CAMPOS et al., 2005)
33.Efeito antidepressivo	EBPC, EPA e EPB.(RONCON et al., 2011) Extração patenteada (Patente N. PI 0006638-9)	<i>In vivo</i> : ratos Wistar	Investigar as propriedades farmacológicas de EBPC de guaraná e suas frações EPA e EPB, depois de administração aguda e crônica por via oral em ratos	Controle NaCl (0,9% contendo 0,2% de Tween 80	EBPC (3,0; 30,0; ou 60,0 mg kg ⁻¹). EPA (2,0 ou 4,0 mg kg ⁻¹). EPB (2,0 ou 4,0 mg kg ⁻¹) 1X ao dia por 40 dias	Resultados sugerem que o extrato EBPC e o extrato EPA produziram um efeito antidepressivo após a administração em longo prazo	(OTOBONE et al., 2007)
34.Alteração na fadiga relacionada à quimioterapia	Cápsulas de extrato de guaraná (não há informações quanto à forma de preparo do extrato)	<i>In vivo</i> : pacientes	Avaliar o efeito do extrato de guaraná nos sintomas de fadiga e de depressão induzidos pela quimioterapia em pacientes com tumores sólidos	Comprimido de placebo	75 mg v.o. por 21 dias	Neste estudo piloto, guaraná não foi eficaz para prevenir os sintomas da depressão e a fadiga relacionada à quimioterapia	(MIRANDA et al., 2008)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
35. Alteração da fadiga e depressão pós-irradiação	Cápsulas de extrato de guaraná (não há informações quanto à forma de preparo do extrato)	<i>In vivo</i> : pacientes	Avaliar a eficácia do guaraná no tratamento da fadiga e depressão pós-irradiação	Comprimido de placebo	75 mg v.o. diariamente	Este estudo não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre o guaraná e o grupo tratado com placebo. Não diminuiu estatisticamente os efeitos da fadiga e depressão pós-irradiação	(MIRANDA et al., 2009)
36. Melhora da fadiga em pacientes com câncer de mama	Cápsulas de extrato seco padronizado (50 mg) de guaraná. A preparação guaraná tinha um pH de 4,83 (solução a 10% em água), um teor de água 3,9%, 1,7% taninos e 6,46% cafeína	<i>In vivo</i> : paciente com câncer de mama	Avaliar a eficácia do extrato de guaraná sobre a fadiga, a qualidade do sono, ansiedade, sintomas de depressão e a menopausa em um grupo de pacientes de quimioterapia com câncer de mama	Cápsulas de placebo: celulose e eram idênticas às cápsulas de guaraná 50 mg	50 mg por via oral duas vezes por dia durante 21 dias	Guaraná mostrou ser uma alternativa não-tóxica, efetiva, de baixo custo para o tratamento a curto prazo da fadiga em pacientes com câncer de mama recebendo quimioterapia sistêmica	(CAMPOS et al., 2011)
37. Tratamento da fadiga relacionada à quimioterapia	Extração etanólica 70%. Extrato padronizado (PC-18) (0,096% teobromina)	<i>In vivo</i> : pacientes com tumores sólidos	Avaliar a eficácia de um extrato de guaraná em pacientes com diferentes tumores sólidos tratados com quimioterapia	Placebo	37,5 mg v.o. 2X por dia começando depois de 7 dias de quimioterapia, por 3 semanas	O extrato de guaraná pode ser eficaz para o tratamento de fadiga relacionado à quimioterapia em pacientes com uma variedade de tumores sólidos com toxicidade aceitável	(DEL GIGLIO et al., 2013a)
38. Atividade antioxidante	O pó padronizado de guaraná tinha 8,80% de umidade, 1,51% cinzas, 2,10% cafeína e 16% de taninos. Um extrato etanólico a 50% foi preparado para o ensaio <i>in vitro</i>	<i>In vitro</i> : reação de lipoperoxidação	Investigar a atividade antioxidante <i>in vitro</i> de pó de guaraná por medida da inibição da lipoperoxidação espontânea de homogenatos de cérebro de ratos	Sem guaraná (água e Tween 80)	0,8; 1,6; 3,3 e 6,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração final no meio de reação	Um aumento na inibição da lipoperoxidação espontânea pode ser observado que é proporcional à concentração. A inibição de 50% do processo sendo calculada a 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	(MATTEI et al., 1998)
39. Atividade antioxidante	Extrato etanólico (extração sólido-líquida dinâmica: 8h a 8 atm, temperatura ambiente)	<i>In vitro</i> : células 3T3-L1	Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico de guaraná sobre células 3T3-L1 depois de dano celular induzido, usando o citrato férrico de amônio	Indutor: citrato férrico de amônio	0,5; 1,0; 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	A redução da peroxidação lipídica foi de 62,5%, utilizando o extrato de guaraná a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este efeito foi dose-dependente	(BASILE et al., 2005)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
40. Atividade antioxidante	Os diferentes extratos foram preparados com estes solventes: água destilada, metanol, 35% de acetona e 60% etanol. Principais substâncias do extrato foram quantificadas	<i>In vitro</i> : DPPH	Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de guaraná usando 2 métodos: emulsão de ácido linoleico/ β -caroteno e inibição do radical livre 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH)	Tempo zero de reação	Emulsão de ácido linoleico/ β -caroteno: 10^{-3} M; DPPH: $1\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol	O tipo de solvente de extração teve uma grande influência sobre as propriedades antioxidantes destes extratos, enquanto a temperatura de extração não foi significativa. O extrato alcoólico apresentou maior atividade antioxidante, enquanto o aquoso, menor atividade	(MAJHENIC, SKERGET e KNEZ, 2007)
41. Atividade antioxidante	Extrato aquoso (AqE); acetona-água EBPC (extrato bruto). A partir do EBPC foi preparado 2 subfrações: EPB e EPA (Patente No. PI 0006638-9)	<i>In vitro</i> : complexo fosfomolibdênio (CAR) e DPPH	Determinar a atividade antioxidante de diferentes extratos de guaraná (EBPC, AqE, EPA, e EPB) pelo do método RAC (atividade antioxidante relativa) e DPPH	DPPH: DPPH + metanol (controle). BHT + DPPH + metanol (branco); (CAR): ácido ascórbico (padrão)	RAC: 0,3mL da amostra para 3mL do reagente DPPH: 2,0 a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	A fração semipurificada (EPA) apresentou o maior teor de polifenóis no total, refletindo a análise de antioxidante, com um baixo IC_{50} e um maior RAC mais elevada em relação aos outros extratos	(YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)
42. Atividade antioxidante	As sementes foram desengorduras com tolueno:etanol (2:1, v/v) em um extrator Soxhlet (48 h). O material seco foi tratado com metanol:água (4:1 v/v) sob refluxo. O resíduo foi seco e utilizado para extração dos polissacarídeos. Para isto, utilizou-se uma sequência de extração com os solventes: DMSO, água, NaOH	<i>In vitro</i> : DPPH	Investigar a atividade antioxidante do extrato metanólico e da fração pectínica das sementes de guaraná	butil hidroxianisol (BHA) e ácido ascórbico como controles positivos	0,1–10 mg mL^{-1}	O extrato metanólico exibiu uma forte capacidade de captura de radicais DPPH (90,9% a 10 mg mL^{-1}). Na mesma concentração, o polissacarídeo mostrou uma atividade antioxidante de 68,4%. Para uma concentração mais elevada, o extrato metanólico e o polissacarídeo exibiram efeitos de remoção de radicais hidroxil semelhantes (70%)	(DALONSO e PETKOWICZ, 2012)
43. Atividade antioxidante	Extrato hidroalcoólico de guaraná - álcool e água (70:30) (300 mg mL^{-1}). Cafeína = 12,240 mg g^{-1} , teobromina = 6,733 mg g^{-1} , catequinas totais = 4,336 mg g^{-1} , e taninos condensados = 22 mg g^{-1}	<i>In vitro</i> : amostras de LDL, soro humano e TRAP	Investigar <i>in vitro</i> os potenciais efeitos do guaraná sobre a oxidação de LDL e soro	Controle: sem guaraná	0,05; 0,1; 0,5; 1, e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. TRAP: 0,01-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Guaraná demonstrou uma alta atividade antioxidante <i>in vitro</i> , principalmente nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrado pela supressão dos dienos conjugados e produção TBARS, destruição de triptofano e alta atividade TRAP	(PORTELLA et al., 2013)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
44. Efeito protetor/ antioxidante	Extrato hidroalcoólico de guaraná álcool e água (70:30). (300 mg mL ⁻¹). O extrato liofilizado foi diluído em água destilada e preparado a concentração de 200 mg mL ⁻¹ . Após algumas etapas esta solução foi adicionada ao meio de cultura. Cafeína (12,240 mg g ⁻¹), teobromina (6,733 mg g ⁻¹), catequinas totais (4,336 mg g ⁻¹) e taninos condensados (16 mg g ⁻¹)	<i>In vitro</i> : cultura de fibroblas-tos embrionários (células NIH-3T3)	Testar o potencial protetor do guaraná sobre a citotoxicidade causada por nitroprussiato de sódio (SNP), que libera cianeto e/ou óxido nítrico (NO)	Controle negativo: cultura de célula sem SNP e guaraná. Controle positivo de toxicidade: amostra com 10 µM SNP	0,5; 1; 5; 10 e 20 mg mL ⁻¹ (solução aquosa)	Os autores concluem que o guaraná tem efeitos antioxidantes sobre o metabolismo de NO, principalmente em situações onde ocorre aumento dos níveis de NO	(BITTENCOURT et al., 2013)
45. Estresse oxidativo	Pó de guaraná extrafino. Realizado composição fitoquímica e de nutrientes do pó, como por exemplo: total fenólicos 151,8 mg g ⁻¹ ; catequina 30,0 mg g ⁻¹ ; proantocianidina B1 3,72 mg g ⁻¹ ; cafeína 39,8 mg g ⁻¹ , entre outros	<i>In vivo</i> : humanos com sobrepeso; Ex vivo: oxidação de LDL e capacidade antioxidante total do plasma	Avaliar os efeitos do guaraná sobre marcadores antioxidantes e atividades das enzimas antioxidantes fase II em indivíduos com sobrepeso saudáveis após ingestão individuais e diárias	Cada participante agiu como controle depois do 15º dia de interrupção do tratamento, por mais 15 dias	3g do pó diluído em 300mL de água antes do consumo , diariamente por 15 dias antes do café da manhã	O tratamento contribuiu para reduzir o stress oxidativo de indivíduos com excesso de peso clinicamente saudáveis, por meio da ação antioxidante direta das catequinas absorvidas e regulação crescente de enzimas antioxidantes/desintoxicantes	(YONEKURA et al., 2016)
46. Estresse oxidativo e desordens metabólicas (efeitos na oxidação do LDL)	Extrato hidroalcoólico de guaraná - álcool e água (70:30) (300 mg mL ⁻¹). Cafeína = 12,240 mg g ⁻¹ , teobromina = 6,733 mg g ⁻¹ , catequinas totais = 4,336 mg g ⁻¹ , e taninos condensados = 22 mg g ⁻¹ . Extrato obtido foi diluído em água destilada (200 mg mL ⁻¹), infusão por 7min e centrifugado	<i>In vivo</i> : Amostras sanguíneas humanas; <i>In vitro</i> : amostras de LDL isolado	Investigar os efeitos potenciais do guaraná em pessoas idosas na oxidação do soro	Controle: sem guaraná	0,05; 0,1; 0,5; 1 e 5 µg mL ⁻¹ ; 2 grupos: aqueles que ingerem guaraná (ao menos 5x por semana) e aqueles que nunca tinham ingerido	O consumo de guaraná regular ou sua eventual inclusão na dieta pode produzir determinados benefícios de saúde e potencial defesa contra o estresse oxidativo e alterações metabólicas. Redução de 27% da oxidação de LDL	(PORTELLA et al., 2013)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
47..Efeitos nas comorbidades metabólicas	Geralmente o pó de guaraná é misturado à água e açúcar	<i>In vivo</i> : humanos	Avaliar a associação de desordens metabólicas, antropometria, metabolismo oxidativo e a ingestão habitual de guaraná em idosos	Quem nunca consumiu guaraná	Variável: conforme o consumo antes do tratamento, pelo menos, 2x ou mais por semana	O grupo que consumiu guaraná mostrou uma menor prevalência de hipertensão, obesidade e síndrome metabólica do que o grupo controle. É sugerido um efeito protetor potencial do guaraná contra desordens metabólicas em idosos	(KREWER et al., 2011)
48. Efeitos hipercolesterolêmicos e anti-inflamatórios	Pó de guaraná. Cafeína =3,754 mg g ⁻¹ ; teobromina = 2,065 mg g ⁻¹ ; total catequinas totais=1,330 mg g ⁻¹ ; e taninos condensados=6,747 mg g ⁻¹ .	<i>In vivo</i> : ratos adultos machos Wistar	Avaliar os efeitos do guaraná sobre o metabolismo de nucleotídeos adenina em linfócitos e parâmetros bioquímicos de ratos com hipercolesterolemia induzida	Salina	Pó de guaraná 12,5; 25; ou 50mg kg ⁻¹ por dia. Concentração de cafeína equivalente à dose mais alta. Dose v. o. por 30 dias	Um aumento da hidrólise da adenosina trifosfato foi observado nos linfócitos de ratos com hipercolesterolemia e tratados com 25 ou 50 mg kg ⁻¹ por dia, quando comparada com os outros grupos. O grupo hipercolesterolêmico tratado com guaraná (50 mg kg ⁻¹) mostrou diminuição da atividade da ecto-adenosina deaminase, em comparação com os grupos de dieta normal.O guaraná foi capaz de reduzir o colesterol total e LDL a níveis basais em ratos com hipercolesterolemia. Altas concentrações de guaraná associada com uma dieta hipercolesterolêmica provavelmente contribuiu para a redução do processo inflamatório	(RUCHEL et al., 2016)
49.Alteração da marcação radioativa e morfologia de células	A partir do pó comercial seco de guaraná fez-se uma diluição com solução 0,9% de NaCl	<i>In vivo</i> : ratos Wistar <i>In vitro</i> : células vermelhas do sangue	Avaliar a influência do extracto de guaraná sobre o processo de marcação utilizando tecnécio-99m (Tc- ^{99m})	NaCl 0,9%	20,0; 30,0; 50,0; 100,0; e 200,0 mg mL ⁻¹	Os resultados mostraram uma significativa redução na captação de radioatividade para o RBC devido ao extrato de guaraná. Além disto, com a adição do extrato houve alteração na morfologia destas células	(DE OLIVEIRA et al., 2002)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
50. Alteração na ligação do radiofármaco de componentes de sangue	2 g do pó comercial de guaraná foi diluído com 10 mL 0,9% NaCl. Após centrifugação e descartado o sobrenadante, foi obtida solução salina de guaraná (200 mg mL ⁻¹), que foi utilizada em todas as diluições posteriores	<i>In vivo</i> : ratos Wistar. <i>In vitro</i> : células vermelhas do sangue (RBC)	Estudar a influência de extrato comercial de guaraná na ligação do radiofármaco tecnécio-99m-ácido dimercaptosuccínico (^{99m} Tc-DMSA) sobre os constituintes do sangue usando 2 agentes precipitantes: ácido tricloroacético (TCA) e sulfato de amônio (AS)	NaCl 0,9%	200 mg mL ⁻¹	O guaraná tem um efeito relevante sobre a ligação do ^{99m} Tc-DMSA com frações insolúveis das proteínas das células sanguíneas. É sugerido que este extrato pode afetar os sítios da ação de AS e TCA. A presença de metabólitos diferentes com propriedades redox específicas, devido à metabolização do extrato de guaraná, poderia estar competindo para os mesmos locais de ligação de ^{99m} Tc-DMSA em proteínas plasmáticas e celulares	(FREITAS et al., 2007)
51. Efeito citoprotetor/espermatogênico	Pó diluído em água na hora da administração	<i>In vivo</i> : ratos Wistar	Avaliar o efeito potencial do guaraná na prevenção ou atenuação dos danos testículos de ratos causados por exposição ao cádmio	Água	2 mg g ⁻¹ , PC (peso corporal) por 56 dias	O guaraná foi eficaz na atenuação de alterações morfológicas em células de Leydig, bem como a redução da resposta inflamatória. Os animais tratados apenas com guaraná apresentaram um aumento significativo nos níveis de testosterona no plasma e nas proporções volumétricas de túbulos seminíferos, os quais são indicativos da estimulação espermatogênica	(LEITE et al., 2011)
52. Efeito citoprotetor	Pó comercial da semente seca de guaraná foi preparado com adição de DMSO por 24 horas, centrifugado e seu sobrenadante filtrado	<i>In vitro</i> : células SH-SY5Y	Avaliar a possível proteção do sobre linhagem celular dopaminérgica humana SH-SY5Y, contra a citotoxicidade induzida por rotenona	Células controle foram tratadas somente com DMSO	9,7 a 625,0 g mL ⁻¹	A adição de guaraná aumentou significativamente a viabilidade celular das células SH-SY5Y tratadas com rotenona, de forma dose-dependente	(DE OLIVEIRA et al., 2011)
53. Efeito citoprotetor	Pó de guaraná diluído em água na hora da administração	<i>In vivo</i> : ratos Wistar	Avaliar se o guaraná é capaz de reduzir danos morfológicos induzidos por cádmio, em testículo de ratos	Água	Cádmio: 1,15 g ⁻¹ kg PC (peso corporal); Pó de guaraná: 2mg kg ⁻¹ (PC). 1X ao dia por 56 dias	Após a exposição ao cádmio, os animais suplementados com guaraná mostraram uma diminuição significativa na proporção de túbulos seminíferos danificados. Também, a suplementação de guaraná foi eficaz em manter o número de células de Leydig por testículos nos animais expostos ao cádmio	(LEITE et al., 2013)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
54. Atividade anticolinesterásica	Extrato etanólico (extração exaustiva)	<i>In vitro</i> : atividade anticolinesterásica	Avaliar extratos de várias plantas, incluindo guaraná, que poderiam inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase, pois os inibidores desta enzima demonstram a maior eficiência no tratamento clínico na doença de Alzheimer	Em microplacas: branco (10% metanol no tampão 50 mM Tris, HCl pH 8)	1,5 mg mL ⁻¹	O guaraná se mostrou bastante promissor para isolamento e caracterização de compostos inibidores da acetilcolinesterase, pois seu extrato inibiu a enzima em 65%	(TREVISAN e MACEDO, 2003)
55. Neuroprotetor (previne citotoxicidade celular)	Pó de guaraná. Cafeína (34,19 mg g ⁻¹), teobromina (0,14 mg g ⁻¹), catequinas (3,76 mg g ⁻¹) e epicatequina (4,05 mg g ⁻¹). Uma solução estoque de guaraná (10mg mL ⁻¹) é preparada para diluição posterior	<i>In vitro</i> : células tipo neuronais (SH-SY5Y)	Avaliar o potencial efeito do extrato de guaraná contra agregação β-amilóide 1-42, glicação de proteínas, bem como a citotoxicidade induzida por metilglioxal (MGO), glioxal (GO), e acroleína (ACR) em células SH-SY5Y	Células sem tratamento	10, 100, and 1000 µg mL ⁻¹	Os autores afirmam que o guaraná é capaz de inibir a glicação albumina mediada por glucose/frutose, MGO e GO	(BITTENCOURT et al., 2014)
56. Efeito protetor contra danos ao DNA	Pó da semente pulverizada de guaraná diluído em água na hora do uso. Controle de qualidade do pó: Taninos totais (13,0%, taninos condensados (5,72%))	<i>In vivo</i> : camundongos	Investigar as propriedades citotóxicas/anti-genotóxicas do guaraná em hepatócitos de ratos injetados com N-nitrosodietilamina (DEN)	Água	2,0 mg g ⁻¹ PC por 16 dias	O tratamento com guaraná apresentou uma redução 52,54% no comprimento da imagem do cometa de animais expostos ao DEN. Autores afirmam que o guaraná tem um efeito protetor contra danos ao DNA induzidos por DEN no fígado de ratos	(FUKUMASU et al., 2006a)
57. Efeito neuroprotetor	A solução administrada foi preparada no dia do uso pela diluição em água do pó de guaraná (12,240 mg g ⁻¹ cafeína, 6,733 mg g ⁻¹ teobromina, 4,336 mg g ⁻¹ catequinas totais e 16 mg g ⁻¹ taninos condensados	<i>In vivo</i> : Ratos machos Wistar	Avaliar os efeitos neuroprotetores de pó de sementes de guaraná sobre dano ao DNA induzida por CCl ₄ (tetracloreto de carbono) em ratos	CCl ₄ (1 mL kg ⁻¹ , 50% em azeite) para induzir dano ao DNA. Controle: água	100, 300 and 600 mg kg ⁻¹ , diariamente por um período de 14 dias	O guaraná previne a quebra do filamento o de DNA na lesão induzida por CCl ₄ em ratos	(KOBBER et al., 2015)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes <i>In vivo</i> / <i>In vitro</i> / <i>Ex vivo</i>	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
58. Efeito quimiopreventivo	Pó de guaraná (FUKUMASU et al., 2006a) foi misturado com alimento comercial em pó com a mesma granulação	<i>In vivo</i> : camundongos	Verificar os efeitos do guaraná na hepatocarcinogênese em camundongos	Grupo controle: somente alimento comercial	0,1; 1,0; ou 2,0 mg PC por 25 semanas	A incidência e multiplicidade de lesões macroscópicas foram reduzidas com o tratamento com guaraná. De acordo com estes resultados, guaraná apresentou efeitos inibitórios na hepatocarcinogênese causada por DEN em camundongos	(FUKUMASU et al., 2006b)
59. Efeito anticancerígeno	Pó de guaraná diluído em água	<i>In vivo</i> : camundongos	Avaliar o efeito de inibição do crescimento da administração diária de guaraná no modelo experimental de metástases de melanoma B16F10	Controle: não tratado com guaraná	2,0 mg g ⁻¹ PC diariamente até 21 dias	Neste modelo de rato, o tratamento de guaraná diminuiu a proliferação e aumentou a apoptose de células tumorais, consequentemente reduzindo a área do tumor (68,6%)	(FUKUMASU et al., 2008)
60. Efeito anticancerígeno	Pó de guaraná (FUKUMASU et al., 2006a) diluído em etanol	<i>In vivo</i> : camundongos	Relatar o efeito antiproliferativo do tratamento com guaraná em Carcinoma Ascítico de Ehrlich (EAC) em camundongos	Grupo controle recebeu somente água	100, 1000 e 2000 mg kg ⁻¹ PC por 28 dias	O tratamento com guaraná por 21 dias aumentou sobrevivência dos camundongos. O guaraná atua diretamente nas células cancerosas e o pré-tratamento realizado pelo modelo proposto neste trabalho não é necessário	(FUKUMASU, LATORRE e Z Aidan-DAGLI, 2011)
61. Efeito antiproliferativo	Extrato hidroalcoólico de guaraná álcool e água (70:30). (BITTENCOURT et al., 2013): Cafeína (12,240 mg g ⁻¹), teobromina (6,733 mg g ⁻¹), catequinas totais (4,336 mg g ⁻¹) e taninos condensados (16 mg g ⁻¹). O extrato liofilizado foi diluído em água (200 mg mL ⁻¹) para sua utilização, 7 min de fervura, centrifuga e filtrada para posterior diluição em água	<i>In vitro</i> : células de câncer de mama MCF-7	Avaliar os efeitos do guaraná na resposta das células de câncer de mama a 7 agentes quimioterápicos atualmente utilizados no tratamento de câncer de mama	Células não tratadas	1, 5 e 10 µg mL ⁻¹	Os principais resultados demonstraram um efeito antiproliferativo de guaraná em concentrações de 5 e 10 µg mL ⁻¹ e um efeito significativo sobre a ação do fármaco quimioterápico. Os resultados sugerem uma interação de guaraná com as drogas quimioterápicas	(HERTZ et al., 2015)

(continua)

QUADRO 3.5 (continuação)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
62. Efeito proliferativo (diminuição do processo de senescência)	Pó do guaraná (BITTENCOURT et al., 2013). Extrato hidroalcoólico de guaraná (70:30), álcool:água. Concentração da solução mãe: 300 mg mL ⁻¹ .	<i>In vitro</i> : adipócitos-mesenchimais senescentes (ASCs)	Avaliar se a suplementação com guaraná em meio de cultura de células senescentes ASCs pode ajudar a diminuir o processo de senescência, bem como reduzir o dano potencial causado pelo stress oxidativo	Células senescentes não tratadas	1, 5, 10, e 20 mg mL ⁻¹	Os resultados sugerem que a suplementação de guaraná poderia reverter os processos de senescência iniciais em ASCs. Estes resultados têm potencial de aplicação em medicina regenerativa	(MACHADO et al., 2015)
63. Interação entre drogas	Extrato contendo 12% cafeína obtido comercialmente. Não há relatos da forma de preparo do extrato	<i>In vitro</i> : ratos Wistar	Avaliar um potencial de interação extrato vegetal-medicamento entre um extrato padronizado de guaraná e amiodarona em ratos	Veículo: 0,5% solução aquosa de carboximetil-celulose	A. guaraná (821 mg kg ⁻¹) e amiodarona (50 mg kg ⁻¹); B. 14 dias com guaraná (821 mg kg ⁻¹ por dia) e amiodarona (50 mg kg ⁻¹) só no 15º dia	A diminuição das concentrações plasmáticas de amiodarona também foi acompanhada por uma redução significativa as concentrações teciduais de amiodarona e MDEA (metabólito da amiodarona), particularmente no coração. É sugerido não ser prudente tomar o extrato de guaraná com amiodarona	(RODRIGUES et al., 2012)
64. Contra doenças orais	Extração de guaraná, acetona/água (70:30, v/v), obtendo o EBPC (patente). EBPC foi particionado com acetato de etila, que resultou na fração aquosa e fração acetato de etila. Fração aquosa: 10 mg mL ⁻¹ (Patente N. PI 0006638-9)	<i>In vitro</i> : células epiteliais bucais	Avaliar o efeito de guaraná na hidrofobicidade da superfície celular (CSH), na formação biofilme, e na adesão de <i>C. albicans</i> ao poliestireno, às resinas compostas, e células epiteliais bucais (BEC)	Controle positivo: gluconato clorhexidina 2%; Controle negativo: tampão fosfato salino	10 mg mL ⁻¹	O extrato de guaraná não mostrou atividade antifúngica, nem a adesão reduzida de <i>C. albicans</i> para a superfície dos compósitos de nanopartículas. No entanto, reduziu a adesão de <i>C. albicans</i> para BEC e para poliestireno. Estes resultados indicam que este extrato tem potencial de uso na prevenção de doenças orais	(MATSUURA et al., 2015)
65. Controle da placa dental bacteriana	Extrato aquoso de guaraná produzido por turbolização. Taninos totais: 5,78%	<i>In vivo</i> : humanos	Testar extratos de guaraná em diferentes concentrações e na forma de bochecho na atividade antiplaca bacteriana dentária	Controle positivo: gluconato de clorexidina a 0,12%	Bochechos com 10 mL de extrato de guaraná a 5 e 7% por 1 min por 4 X ao dia	Os extratos de guaraná nas concentrações utilizadas mostraram-se eficientes em comparação ao controle positivo	(BARBOSA e MELLO, 2004)

(continua)

QUADRO 3.5 (conclusão)

Atividade farmacológica pesquisada	Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
66.Prevenção da placa dental bacteriana	EBPC AqE, EPA e EPB (Patente N. PI 0006638-9)	<i>In vitro</i> : Teste de adesão e MIC	Analisar de forma preliminar o potencial antibacteriano de diferentes extratos de guaraná (AqE, EBPC, EPA e EPB) contra <i>Streptococcus mutans</i>	Controle negativo: sem tratamento; Controle positivo: gluconato de clorexidina a 1,2 µg mL ⁻¹	Extratos com uma concentração de taninos de 750 µg mL ⁻¹ : AqE 4,64; EBPC 2,41; EPA 2,50; e EPB 4,39 mg mL ⁻¹	EBPC deu o melhor resultado; mesmo com uma concentração mais baixa, mostrou a melhor ação na aderência de <i>S. mutans</i> , com a inibição 79,69%. É sugerido que este extrato pode ser utilizado para a prevenção da placa dentária bacteriana	(YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)
67.Atividade antimicrobiana	Extrato etanólico (extração sólido-líquida dinâmica: 8h a 8 atm, temperatura ambiente)	<i>In vitro</i> : MIC	Avaliar a atividade antibacteriana do extrato de guaraná contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	Culturas controle contendo somente tampão. Controle positivo: antibióticos padrões	Concentrações entre 16 e 128 µg mL ⁻¹	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853) (MIC = 16 µg mL ⁻¹), <i>Proteus mirabilis</i> (7002) (MIC = 32 µg mL ⁻¹), <i>Proteus vulgaris</i> (12454) (MIC = 32 µg mL ⁻¹) e <i>Escherichia coli</i> (11229) (MIC = 32 µg mL ⁻¹) foram os mais inibidos	(BASILE et al., 2005)
68.Atividade antimicrobiana	EBPC, FAQ, EPA e subfrações da fração EPA (extrato de guaraná patenteado) e compostos isolados. Patente N. PI 0006638-9)	<i>In vitro</i> : MIC	Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e compostos isolados de guaraná contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Controle positivo: antibióticos padrões	2 mg mL ⁻¹	Mesmo em concentrações acima de 1000 µg mL ⁻¹ , o extrato de guaraná não apresentou atividade contra estes microrganismos: <i>Staphylococcus aureus</i> (25923), <i>Bacillus subtilis</i> (6623), <i>Escherichia coli</i> (25922) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (15442)	(ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2007)
69.Atividade antimicrobiana	Os diferentes extratos foram preparados com estes solventes: água destilada, metanol, 35% de acetona e 60% etanol. Principais substâncias do extrato foram quantificadas	<i>In vitro</i> : atividade antimicrobiana	Investigar as atividades antimicrobianas de extratos de guaraná contra três fungos de origem alimentar e três bactérias prejudiciais à saúde pelo ensaio de difusão em poço e diluição em caldo	Controle: etanol a 96%	0,2g mL ⁻¹ a 96% etanol	Os extractos de guaraná têm atividade significativa contra o crescimento de bactérias deteriorantes causadoras de intoxicação alimentar, tais como <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. fluorescens</i> e fungos deteriorantes, como <i>A. niger</i> , <i>T. viride</i> e <i>P. Cyclopium</i> . Extratos etanólicos exibem maior atividade antimicrobiana que os extratos aquosos	(MAJHENIC, SKERGET e KNEZ, 2007)

1160 Por outro lado, trabalhos de nosso grupo (AUDI et al., 2010; RANGEL, MELLO
1161 e AUDI, 2013; RONCON et al., 2011), demonstraram que o extrato semipurificado do
1162 guaraná possui tanto efeito ansiolítico como efeito panicolítico. Rangel e
1163 colaboradores (2013) concluem ainda que os neurotransmissores serotoninérgicos,
1164 dopaminérgicos e glutamatérgicos estão envolvidos no efeito ansiolítico, e os
1165 serotoninérgicos e dopaminérgicos estão envolvidos no efeito panicolítico.

1166 Entretanto, o guaraná tem sido utilizado há muito tempo pelos índios como
1167 estimulante. E este efeito está muito associado com a presença da grande
1168 quantidade de cafeína presente em suas sementes, como citado anteriormente. As
1169 propriedades psicoativas do extrato de guaraná foram inicialmente observadas por
1170 Kennedy e colaboradores (2004). Os resultados mostraram que doses sozinhas de
1171 guaraná (75 mg) e ginseng ou a união das duas plantas promoveram uma melhora
1172 no desempenho cognitivo em humanos. Outro estudo, fornecendo a primeira
1173 pesquisa de efeitos de diferentes doses de guaraná em humanos (37,5; 75; 150; ou
1174 300 mg) também obteve o mesmo resultado principalmente nas doses mais baixas
1175 (HASKELL et al., 2007). Estas doses mais baixas tinham um máximo de 4,5 a 8,4
1176 mg de cafeína. Estes resultados sugerem que a melhora no desempenho cognitivo
1177 promovido pelo guaraná não pode ser atribuído somente ao conteúdo de cafeína, já
1178 que estas doses contêm um nível considerado baixo de cafeína para produzir efeitos
1179 positivos.

1180 Em outro estudo foram obtidos resultados positivos também na menor dose
1181 ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$) que contém $6,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de cafeína (quantidade em torno de 16 vezes
1182 menor do que a cafeína, utilizada como droga de referência) (ESPINOLA et al.,
1183 1997). Resultados similares foram obtidos por Pomportes (2015) em que foram
1184 observados resultados melhores na capacidade cognitiva, inclusive uma estabilidade
1185 na modulação parassimpática no tratamento com complexo vitamínico contendo
1186 guaraná em relação à dose equivalente de cafeína isolada. Em resumo, evidências
1187 sugerem que diferentes componentes, tais como flavonoides (SCHOLEY e
1188 HASKELL, 2008), saponinas e taninos (ESPINOLA et al., 1997; MATTEI et al., 1998;
1189 OTOBONE et al., 2005) podem contribuir para este efeito psicoativo. Este efeito
1190 poder ser inclusive atribuído a interações sinérgicas entre estas várias substâncias
1191 psicoativas presentes no extrato de guaraná.

1192 Existe um grande interesse na substituição de antioxidantes sintéticos pelos
1193 naturais em alimentos, incentivando uma busca por fontes naturais para este fim. E

1194 isto não se limita à indústria alimentar, pois os antioxidantes são muito utilizados e
1195 necessários para prevenir a deterioração de outros bens perecíveis como
1196 cosméticos, farmacêuticos, e plásticos. Além disto, são relacionadas aos
1197 antioxidantes outras propriedades biológicas como anticarcinogenicidade,
1198 antimutagenicidade, antialergenicidade e atividade antienvhecimento (MOURE et
1199 al., 2001). Diversos trabalhos demonstram que o guaraná exibe interessantes
1200 atividades antioxidantes (BASILE et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2013;
1201 DALONSO e PETKOWICZ, 2012; MAJHENIC, SKERGET e KNEZ, 2007; MATTEI et
1202 al., 1998; PORTELLA et al., 2013; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Estes autores
1203 sugerem que os polifenóis (especificamente taninos) são os principais responsáveis
1204 por este efeito, além ainda da presença de polissacarídeos (DALONSO e
1205 PETKOWICZ, 2012) do guaraná. O efeito antioxidante foi sentido mesmo em baixas
1206 concentrações e também foi relatado que este efeito é dose-dependente (BASILE et
1207 al., 2005; MATTEI et al., 1998). Yamaguti-Sasaki e colaboradores (2007), testando
1208 extrato bruto e semipurificado, obtiveram maiores quantidades de polifenóis, menor
1209 valor no IC₅₀ e maior capacidade antioxidante relativa (CAR) para o extrato
1210 semipurificado de guaraná.

1211 Outra característica promissora do guaraná é sua atividade antimicrobiana
1212 podendo também ser usada na indústria na conservação de produtos ou, por
1213 exemplo, da prevenção de doenças causadas por microrganismos. O extrato aquoso
1214 de guaraná na forma de bochechos foi avaliado em humanos. A atividade antiplaca
1215 foi determinada segundo do método de Greene e Vermillion por meio do índice de
1216 higiene oral simplificado em indivíduos livres de cáries e doenças periodontais. O
1217 extrato de guaraná mostrou-se eficiente estatisticamente em comparação ao
1218 controle positivo, podendo ser empregado como alternativa no controle da placa
1219 bacteriana (BARBOSA e MELLO, 2004). Yamaguti-Sasaki e colaboradores (2007)
1220 avaliaram o extrato semipurificado de guaraná e este demonstrou atividade
1221 antibacteriana *in vitro* frente à *Streptococcus mutans*, espécie bacteriana associada
1222 à atividade cariogênica. A atividade antibacteriana frente à *S. mutans* demonstrada é
1223 diretamente proporcional à quantidade de polifenóis presentes no extrato.

1224 Os extratos de guaraná também apresentaram atividade frente a várias cepas
1225 de bactérias e fungos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*,
1226 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aspergillus niger*,
1227 *Trichoderma viride* e *Penicillium cyclopium*) (BASILE et al., 2005; MAJHENIC,

1228 SKERGET e KNEZ, 2007). Os resultados mostraram que extratos alcoólicos exibem
1229 maior atividade antimicrobiana, enquanto os extratos aquosos de semente de
1230 guaraná mostraram pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana contra
1231 microrganismos testados (MAJHENIC, SKERGET e KNEZ, 2007). Entretanto, outros
1232 autores utilizando extratos brutos, frações semipurificadas do guaraná contra cepas
1233 de *S.aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, e mesmo em concentrações
1234 de até 1000 mg mL⁻¹, demonstraram não haver atividade contra esses
1235 microrganismos (USHIROBIRA et al., 2007). Por outro lado, extratos de semente de
1236 guaraná obtidos por tecnologia supercrítica, utilizando 40% de cossolvente,
1237 obtiveram atividade antibacteriana contra cepa de *S. aureus* metilina resistente
1238 (MARQUES et al., 2016). Esta discordância de resultados pode ser em virtude da
1239 forma de preparação do extrato, modo de secagem das sementes, local de colheita,
1240 entre outros fatores, como será abordado posteriormente.

1241 Algumas interações medicamentosas têm sido atribuídas ao guaraná, como a
1242 potencialização da ação de drogas quimioterápicas, causando efeito antiproliferativo
1243 (HERTZ et al., 2015), quando administrado com anticoagulantes pode inibir a
1244 agregação de plaquetas aumentando o risco de sangramento (NICOLETTI et al.,
1245 2007). Por outro lado o uso do extrato de guaraná pode ser potencialmente útil na
1246 prevenção de doenças como trombose e outros problemas vasculares, já que há
1247 estudos (Bydlowski and others 1988, 1991) demonstrando que ele tem ação
1248 antiagregante sobre as plaquetas.

1249 Assim como em outras espécies, o guaraná tem sido utilizado pelo seu efeito
1250 adaptógeno e por isso muito útil em casos de dependência de drogas,
1251 particularmente para aliviar a ressaca do abuso de bebidas alcoólicas (CARLINI et
1252 al., 2006).

1253 Todos os trabalhos anteriormente citados utilizaram as sementes de guaraná
1254 para seus estudos. Entretanto, Lima e colaboradores (2015) demonstraram atividade
1255 antiplasmódica moderada a partir de extratos clorofórmicos de ramos e fruto de
1256 guaraná. Extratos metanólicos e aquosos das mesmas partes da planta e ainda
1257 extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos da folha, não apresentaram esta
1258 atividade.

1259 3.7 Toxicidade

1260 A planta medicinal, utilizada na preparação de medicamentos, é um produto
1261 estranho ao organismo humano, introduzido nele para fins terapêuticos. Portanto,
1262 como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação podem levar a
1263 reações por parte do organismo humano. Em virtude disto, o uso popular, e mesmo
1264 tradicional, não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos
1265 eficazes e seguros. A avaliação dessa segurança deve ser feita com estudos
1266 farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (LAPA et al., 2001). Os estudos
1267 toxicológicos pré-clínicos são realizados seguindo-se protocolos aceitos
1268 internacionalmente, ainda que, as exigências legais variem de país a país.

1269 Estudos têm sido realizados para avaliar a possível toxicidade dos extratos de
1270 guaraná ou sua associação com outras plantas em testes *in vivo* e *in vitro* (Quadro
1271 3.6). Extratos fluidos de guaraná foram utilizados em associações com outras
1272 plantas para testar a toxicidade destas formulações em testes *in vivo* (MELLO,
1273 MELLO e LANGELOH, 2010; OLIVEIRA et al., 2005). Nas dosagens testadas estes
1274 extratos mostraram-se seguros, não apresentando nenhum efeito tóxico perceptível
1275 com um tratamento de 28 ou 30 dias. Outros trabalhos (ESPINOLA et al., 1997;
1276 MATTEI et al., 1998) *in vivo* e *in vitro* descrevem nenhuma ou baixa toxicidade para
1277 extratos aquosos de guaraná, mesmo com 23 meses de tratamento. Em doses mais
1278 altas, Santa Maria e colaboradores (SANTA MARIA et al., 1998) investigaram a
1279 citotoxicidade de extrato aquoso de guaraná nas concentrações de 10; 20; 30; ou 40
1280 mg mL⁻¹ em células de ovário hamster chinês. Na menor dose testada o extrato
1281 mostrou-se inofensivo, mas os autores alertam que o uso prolongado ou em altas
1282 doses poderia ser prejudicial à saúde humana. Já uma fração semipurificada de
1283 guaraná apresentou um possível efeito tóxico para o fígado, com uma
1284 susceptibilidade biológica maior em ratos machos nas doses de 150 e 300 mg kg⁻¹,
1285 após 90 dias de tratamento (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010). Zeidán-Chuliá
1286 e colaboradores (2013) concluíram que as células neuronais humanas SH-SY5Y
1287 tratadas com guaraná desenvolveram sinais de degeneração de neurite e apoptose.
1288 Os autores sugerem que a remoção excessiva de espécies reativas de oxigênio
1289 intracelular, a níveis não fisiológicos poderia ser uma causa da toxicidade *in vitro*
1290 induzida por guaraná. Em outro estudo (DA FONSECA et al., 1994), os extratos de
1291 guaraná foram considerados genotóxicos como avaliado por indução lisogênica em
1292 *E. coli*. Estes extratos também foram capazes de induzir mutagênese em *Salmonella*

1293 Typhimurium. Esta genotoxicidade foi relacionada com a presença de um complexo
1294 molecular formado por cafeína e um flavonóide (catequina ou epicatequina) na
1295 presença de potássio.

1296 Portanto, em testes de toxicidade é importante determinar a dosagem utilizada
1297 da droga, tendo em vista a forma de preparação do seu extrato e especificar a
1298 quantidade administrada, principalmente em testes *in vitro*, que se leva em conta o
1299 peso do animal. A falta de padronização destes fatores remete a indagações quanto
1300 à definição de uma dose segura, tanto administrada de forma aguda quanto crônica.

1301

1302 **3.8 Controle de qualidade**

1303 A qualidade das plantas medicinais é determinada, principalmente, pelo teor
1304 de bioativos, responsáveis pelos efeitos terapêuticos e pela ausência de
1305 contaminantes. Cada etapa da produção, do cultivo até a extração da matéria-prima,
1306 tem impacto na qualidade e quantidade dos compostos ativos presentes nas plantas
1307 (CARVALHO, COSTA e CARNELOSSI, 2010). A má qualidade da matéria-prima
1308 vegetal é motivo de preocupação por parte dos profissionais da área de saúde e da
1309 comunidade científica, pois pode interferir na eficácia e segurança do produto.

1310 A análise de amostras comerciais demonstra que muitas vezes esses
1311 medicamentos estão fora das especificações farmacopeicas de qualidade. Isto
1312 demonstra a necessidade de implementação de técnicas quantitativas no controle de
1313 qualidade físico-químico de matérias-primas vegetais, além de reforçar a ideia de
1314 que empresas farmacêuticas que adquiram estes produtos devam ter maior critério
1315 para o uso das mesmas, armazenando-as e manipulando-as de forma adequada e
1316 realizando o controle de qualidade adequado (BARA et al., 2006).

1317 A planta medicinal, depois de colhida, pode perder qualidade nas etapas
1318 seguintes do processamento, o que torna o processo de secagem fundamental para
1319 a qualidade final do produto (BORGIO et al., 2010) As sementes do guaraná podem
1320 ser secas por diferentes métodos, e a escolha de um determinado método influencia
1321 fortemente na qualidade do produto. A secagem, se não realizada adequadamente,
1322 pode possibilitar a degradação de bioativos, permitir a infestação e crescimento de
1323 microrganismos e assim comprometer o teor dos princípios ativos (CARVALHO,
1324 COSTA e CARNELOSSI, 2010). Um estudo realizado por Ushirobira e
1325 colaboradores (2004) relata um maior teor de metilxantinas obtido, com as sementes
1326 secas em tacho metálico por 4 horas, com adição de água. Enquanto que o maior

1327 teor de taninos totais foi obtido nas mesmas condições, exceto sem adição de água.
1328 Outro cuidado que deve ser tomado, é em relação às temperaturas utilizadas nesses
1329 processos de secagem. Pagliarussi e colaboradores (2006) utilizaram uma técnica
1330 de secagem em leiteo fluidizado e relatam que a temperatura ótima de secagem de
1331 extratos nesse estudo foi de 120 °C.

1332 É bem conhecido que variáveis ambientais, tais como o pH do solo,
1333 disponibilidade de nutrientes e teor de umidade do solo, também influenciam a
1334 distribuição e atividade dos microrganismos do solo. Fungos micorrízicos
1335 arbusculares (FMA) são um importante componente da microflora em ecossistemas
1336 naturais, com funções importantes na mineralização e o ciclo de nutrientes da
1337 planta, aumentando a eficiência dos nutrientes e absorção de água. Estudo
1338 realizado por Oliveira e Oliveira (2005) relata a dinâmica sazonal de FMA em plantas
1339 de *P. cupana*. O percentual de colonização micorrízica atingiu valores máximos nos
1340 meses de fevereiro e maio de 2000 (estação chuvosa) e foram registrados os
1341 maiores números de esporos. A precipitação pluvial, o teor de umidade, e os teores
1342 de nutrientes no solo foram significativamente e positivamente correlacionados com
1343 a colonização e com o número de esporos. O teor de umidade do solo foi
1344 positivamente correlacionado com o número de esporos.

1345 Algumas das etapas de processamento de guaraná como o armazenamento,
1346 por exemplo, também são fundamentais no controle de qualidade final do produto. A
1347 armazenagem incorreta das sementes pode levar à perda de material, seja por
1348 motivos de ordem física ou biológica. Uma das preocupações com a qualidade dos
1349 produtos naturais é devido ao potencial de contaminação por outros fungos com
1350 risco da presença de micotoxinas, tornando o produto impróprio para consumo,
1351 mesmo quando em embalagens originais da indústria (CARVALHO, COSTA e
1352 CARNELOSSI, 2010). Considerando ainda o aumento do uso mundial de produtos à
1353 base de plantas como medicamentos alternativos, é necessário estabelecer normas
1354 para drogas vegetais a fim de reduzir os riscos para a saúde dos consumidores.

1355 Além do armazenamento, a contaminação fúngica pode ocorrer nos processos
1356 de plantio e colheita, bem como na manipulação das sementes, realizada de forma
1357 inadequada (KNEIFEL, CZECH e KOPP, 2001). Esta contaminação pode levar à
1358 deterioração e afetar as características organolépticas. Além disso, alguns fungos
1359 podem afetar a segurança do produto, como por exemplo, o *Aspergillus* sp., devido
1360 algumas espécies serem produtores de micotoxinas.

Quadro 3.6 Toxicologia das sementes de *P. cupana* ou suas associações descritas na literatura.

Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes <i>In vivo</i> / <i>In vitro</i> / <i>Ex vivo</i>	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
a.Associação: Catuama®. Mistura de extratos hidroalcoólicos de 4 plantas: 5% guaraná, 1% <i>Zingiber officinalis</i> (ginger), 5% <i>Trichilia catigua</i> (catuaba), e 5% <i>Ptychopetalum olacoides</i> (muirapuama)	<i>In vivo</i> : humanos, 18 a 45 anos, IMC 19 a 27	Investigar se a administração crônica (28 dias) de Catuama® exibe qualquer efeito tóxico perceptível em voluntários humanos saudáveis de ambos os sexos	Não usou controle	25 mL Catuama®, 2X ao dia, durante 28 dias	A administração de extrato Catuaba® não causou nenhum efeito tóxico perceptível em voluntários humanos saudáveis de ambos os sexos	(OLIVEIRA et al., 2005)
b.Associação: extratos fluidos de <i>Anemopaegma mirandum</i> (catuaba), <i>Cola nitida</i> (nóz de cola), <i>Passiflora alata</i> (maracujá), <i>Paullinia cupana</i> (guaraná) (1%), <i>Ptychopetalum olacoides</i> (marapuama), e thiamin chlorhydrate (Nerviton®)	<i>In vivo</i> : Coelho adultos Nova Zelândia	Avaliar o potencial efeito toxicológico do produto fitomedicinal, quando administrado por via oral durante 30 dias em coelhos da Nova Zelândia (macho e fêmeas) em uma dose diária oral equivalente a dez vezes o prescrito para seres humanos	Controle: Os dados obtidos de cada animal imediatamente antes do tratamento	4,3 mL kg ⁻¹ do produto fitomedicinal	Os resultados confirmam a relativa segurança deste produto, baseado nos aspectos da análise toxicológica	(MELLO, MELLO e LANGELOH, 2010)
c.O pó padronizado de guaraná tinha 8,80% de umidade, 1,51% cinzas, 2,10% cafeína e 16% taninos. Um extrato etanólico a 50% foi preparado para o ensaio <i>in vitro</i> .	<i>In vivo</i> : Camundongos machos Swiss e ratos machos Wistar	Avaliar os possíveis efeitos tóxicos do guaraná. Experimentos <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (agudos e crônicos) foram realizados em animais de laboratório e foram comparados com os produzidos por <i>Panax ginseng</i>	Sem guaraná (água e Tween 80)	Triagem de observação: 2000 mg kg ⁻¹ (v.o.), 1000 e 2000 mg kg ⁻¹ (i.v.). Potencialização do tempo de sono e efeitos crônicos: 0,3 e 3,0 mg mL ⁻¹ . Anatomia patológica: 3,0 mg mL ⁻¹	O guaraná, da mesma forma que o ginseng, não exerce efeitos tóxicos. Isto foi demonstrada após a administração aguda de doses elevadas destes produtos, bem como no tratamento crônico com doses menores. Não foram encontradas alterações nos animais de peso corporal, mortalidade, ou mesmo a nível histopatológico	(MATTEI et al., 1998)
d.Suspensão do pó da semente de <i>P. cupana</i> em água: Tween-80. O pó continha 2,1% de cafeína e 16% de taninos	<i>In vivo</i> : camundongos Swiss e ratos Wistar	Avaliar possível toxicidade do guaraná em camundongos e ratos	Controle: água/Tween 80. Droga de referência: cafeína 0,1 mg mL ⁻¹	0,3 e 3,0 mg mL ⁻¹	Os animais tiveram o mesmo tempo de vida médio, indicando uma baixa toxicidade do guaraná, mesmo após 23 meses de tratamento	(ESPINOLA et al., 1997)

QUADRO 3.6 (conclusão)

Detalhes do extrato ou forma farmacêutica	Testes In vivo/ In vitro/ Ex vivo	Objetivo	Controle usado	Dose testada da droga	Resultados obtidos	Ref.
e.Extrato semipurificado de guaraná (EPA). Acetona:água (7:3; v/v), e então particionado com acetato de etila (10x, 5 L) (EPA)	<i>In vivo</i> : camundongos machos Swiss e ratos Wistar de ambos os sexos	Avaliar a toxicidade de fração EPA (contendo cafeína e vários flavan-3-óis e proantocianidinas) de guaraná em roedores	Controle: água	Avaliação da toxicologia aguda. Uma dose única de EPA: v.o., 5,0; 2,5; ou 1,0 g kg ⁻¹ ; v.i., 2,5; 1,5; 1,0; 0,5; ou 0,1 g kg ⁻¹ . Avaliação da toxicologia sub-crônica. 1X dia por 90 dias, v.o.: 30; 150; ou 300 mg kg ⁻¹	A DL ₅₀ foi de 1,769g kg ⁻¹ (v.o.) e 0,593 g kg ⁻¹ (v. i.). Após 90 dias, os animais apresentaram alterações bioquímicas que indicam que o fígado é o órgão alvo, em caso de eventual toxicidade da fração EPA, especialmente nos machos, em doses de 150 e 300 mg kg ⁻¹	(ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010)
f.Extrato aquoso foi preparado na concentração de 200 mg mL ⁻¹ (infusão por 7 min e centrifugação)	<i>In vitro</i> : células de ovário de hamster chinês (CHO) e células bacterianas de <i>Photobacterium phosphoreum</i>	Avaliar a citotoxicidade de extratos aquosos de guaraná	Controle: absorvância determinada antes da adição do extrato	Extratos adicionados ao meio de cultura em 4 concentrações: 10, 20, 30 e 40 mg mL ⁻¹	Os resultados indicam que baixas concentrações de guaraná são seguras, enquanto que maiores doses deste produto podem ter efeitos citotóxicos	(SANTA MARIA et al., 1998)
g.Pó de guaraná (4% de cafeína) diluído	<i>In vitro</i> : células neuronais humanas SH-SY5Y	Elucidar os efeitos morfológicos e bioquímicos exercidos pela cafeína, taurina, e guaraná, sozinhos ou em combinação, uma vez que são os componentes principais em bebidas energéticas	Controle: células não tratadas	3,125; 12,5; e 50 mg mL ⁻¹	Células tratadas com 12,5 a 50 mg mL ⁻¹ de guaraná desenvolveram sinais de degeneração de neurites na forma de inchaços em vários segmentos. Células tratadas também mostraram sinais qualitativos de apoptose, incluindo formação de vesículas na membrana, retração celular e positividade de caspase-3 clivada	(ZEIDAN-CHULIA et al., 2013)

1361 Não há limites de contaminação fúngica de guaraná especificamente na
1362 legislação brasileira, tampouco existe qualquer menção à forma como deve ser a
1363 comercialização ou acondicionamento. A legislação brasileira (BRASIL, 2001)
1364 somente estabelece limites máximos para Coliformes a 45°C (10 UFC g⁻¹),
1365 *Estafilococos* coagulase positiva (500 UFC g⁻¹) e *Salmonella* sp. (ausência em 25g)
1366 para guaraná (em pó, cápsulas, drágeas ou similares) sozinho, ou em associação
1367 com outros fármacos.

1368 Além do armazenamento, a composição química do guaraná (Quadro 3.3)
1369 demonstra suas propriedades energéticas. Desta forma, sugere a possibilidade de
1370 contaminação por cepas fúngicas devido ao alto conteúdo de lipídeo e carboidrato
1371 de suas sementes. Fatores adicionais como atividade de água, umidade,
1372 composição do substrato, danos causados por insetos também influenciam o
1373 crescimento fúngico e produção de micotoxinas (AQUINO et al., 2007).

1374 Estudo realizado por Martins e colaboradores (2014) relata a presença de
1375 cepas toxigênicas em 2% das amostras analisadas e identificadas como *Aspergillus*
1376 sp e *Penicillium* sp, ambas produtoras de micotoxinas, as quais afetam a segurança
1377 dos alimentos. A presença de cepas micotoxigênicas em amostras de guaraná
1378 também foi relatada por Bugno e colaboradores (BUGNOI et al., 2006).

1379 Uma maneira de diminuir tal problema seria a ionização (raios gama) desses
1380 materiais vegetais evitando o risco de contaminação de consumidores e fabricantes,
1381 sendo útil na comprovação da qualidade sanitária do produto (AQUINO et al., 2007).
1382 Neste estudo, a análise microbiológica mostrou que 90% das amostras em pó de
1383 guaraná, obtidas de mercados ao ar livre, apresentaram crescimento fúngico acima
1384 do limite estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1998).
1385 Este limite é de 10³ colônias fúngicas por grama para contaminação de matérias-
1386 primas de plantas de uso interno. A flora predominante era de *Aspergillus* (82%) e
1387 *Penicillium* (15%). Das amostras retiradas de indústrias e farmácias, 70% excederam
1388 este limite. O tratamento destas com 5 kGy de irradiação reduziu em 85% a
1389 contaminação, ficando dentro do limite estabelecido. Com a maior dose, 10 kGy, a
1390 irradiação gama eliminou completamente a contaminação do guaraná.

1391 Outro tipo de contaminação produzida no processamento da semente de
1392 guaraná pode afetar sua qualidade. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)
1393 constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais
1394 anéis aromáticos condensados (Figura 3.2). Representam uma importante classe de

1395 carcinógenos químicos formados durante a combustão incompleta de material
 1396 orgânico. Ocorrem como contaminantes em diferentes tipos de alimentos, devido
 1397 principalmente à poluição ambiental e alguns tipos de processamentos como a
 1398 defumação, a secagem e a torrefação. Durante o processamento das sementes de
 1399 guaraná, estas substâncias podem ser formadas como contaminantes químicos.

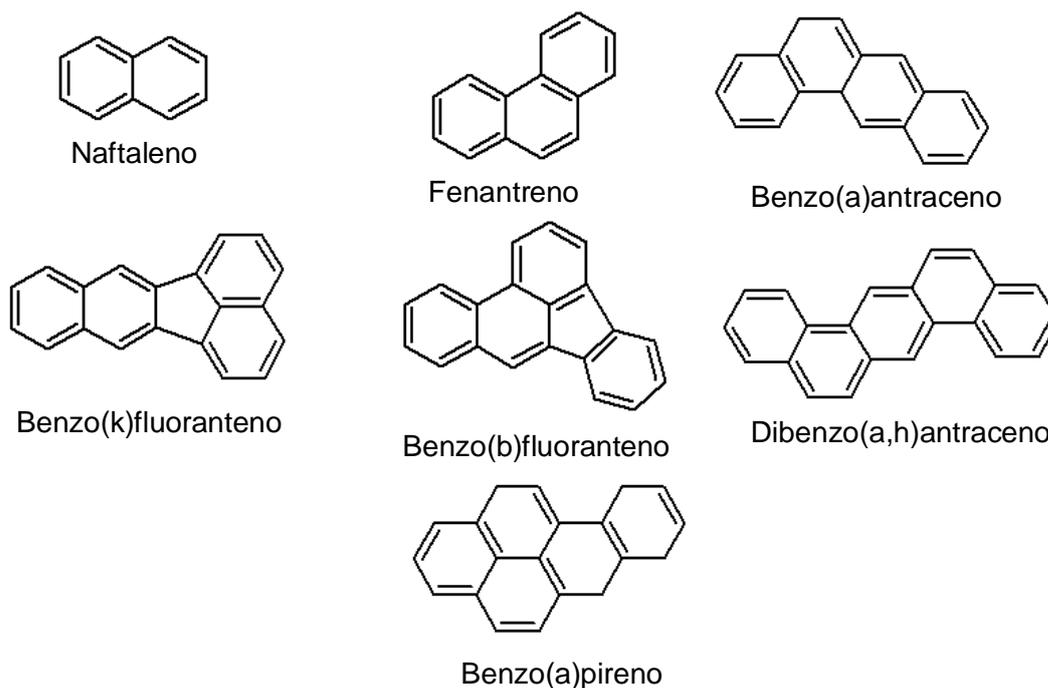


Figura 3.2 Estruturas químicas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que podem estar presentes como contaminantes das sementes de guaraná.

1400 Treze marcas de guaraná em pó foram selecionadas para análise quanto à
 1401 presença de cinco HPAs, considerados carcinogênicos e genotóxicos. Em 81% das
 1402 amostras, pelo menos um dos cinco contaminantes analisados estava presente,
 1403 sendo que em 35% das amostras, todos os HPAs foram detectados (CAMARGO et
 1404 al., 2006). É possível observar neste estudo uma ampla faixa de variação nos níveis
 1405 médios de HPAs entre as diferentes marcas avaliadas, de 0,05 a 13,95 $\mu\text{g kg}^{-1}$.
 1406 Outro estudo realizado por Veiga e colaboradores (2014) relata a concentração de
 1407 HPAs encontradas em diferentes marcas de guaraná em pó, e observam variações
 1408 de 0,39 a 1,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esses resultados indicam que essa ampla faixa de
 1409 concentração encontrada resulta, provavelmente, das diferentes formas de
 1410 processamento a que o guaraná é submetido e pode resultar na presença desses

1411 contaminantes no produto final. Entretanto, as quantidades de HPAs encontradas
1412 nesta pesquisa foram abaixo dos valores estabelecidos pela legislação europeia
1413 para outros tipos de alimentos, já que no Brasil não há legislação específica para o
1414 limite seguro destes compostos no guaraná.

1415 Há uma preocupação na realização de testes analíticos de controle de
1416 qualidade que sejam precisos, sensíveis, reprodutíveis, de fácil execução e baixo
1417 custo, tanto para a análise da droga vegetal, quanto para a análise de extratos e
1418 derivados. Diversos são os testes analíticos farmacopeicos utilizados para
1419 caracterizar uma droga vegetal, como por exemplo, perda por dessecação, teor de
1420 extrativos, teor de resíduo seco, teor de metilxantinas, taninos totais, umidade e
1421 cinzas, entre outros. A análise térmica, como por exemplo, termogravimetria, mostra-
1422 se como uma ferramenta potencial para a obtenção de parâmetros tecnológicos, em
1423 controle de qualidade, na análise do teor de umidade e cinzas (ARAÚJO et al.,
1424 2006). Métodos espectrofotométricos são utilizados em amostras de sementes de
1425 guaraná para determinação de metilxantinas e taninos totais (SOUSA et al., 2011;
1426 USHIROBIRA et al., 2004; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

1427 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), análises cromatográficas por
1428 cromatografia de camada delgada (CCD), CLAE (KLEIN, LONGUINI e MELLO,
1429 2012; MARX e MAIA, 1990), a eletroforese capilar (KOFINK,
1430 PAPAGIANNOPOULOS e GALENSA, 2007; SOMBRA et al., 2005) e cromatografia
1431 eletrocínética micelar (MELLO e ITO, 2012) são técnicas utilizadas na separação de
1432 substâncias presentes no extrato de guaraná. Esta é uma importante etapa para
1433 estabelecer um perfil cromatográfico de extratos vegetais e conseqüentemente, sua
1434 padronização.

1435

1436 **3.9 Preparação de extratos, padronização e formas farmacêuticas**

1437 A escolha do método de extração é a parte mais importante do processo de
1438 extração, pois a composição dos bioativos será fortemente dependente desta etapa,
1439 e conseqüentemente irá impactar na ação farmacológica esperada. Isto pode ocorrer
1440 tanto em extrações alternativas (“verdes”) - extrações supercríticas, por micro-ondas
1441 ou ultrassom-, como em extrações convencionais, isto é, extrações líquidas
1442 baseadas em solventes orgânicos ou prensa mecânica. A extração supercrítica, por
1443 exemplo, pode ser seletiva, com a obtenção de compostos mais ou menos polares,
1444 conforme o cossolvente adicionado ao sistema ou ainda com a definição de outras

1445 condições de extração como a temperatura (MARQUES et al., 2016).
1446 Adicionalmente, extratos supercríticos de uma mesma planta, podem mostrar maior
1447 concentração de compostos fenólicos e atividade antirradicais do que aqueles
1448 provenientes de uma extração sólido-líquida (PINELO et al., 2007), ou ainda serem
1449 mais efetivos na extração de substâncias com atividade antimicrobiana em relação
1450 aos oriundos de uma extração metanólica (LIU et al., 2007). Da mesma forma ocorre
1451 em extrações convencionais, que podem apresentar atividades biológicas mais ou
1452 menos pronunciadas ou até mesmo ausência destas, conforme as condições de
1453 extrações empregadas para uma mesma planta (BEKTAS et al., 2016; CHISTE,
1454 BENASSI e MERCADANTE, 2014; KALIA et al., 2008; MURUGAN e
1455 PARIMELAZHAGAN, 2014; NGUYEN et al., 2016).

1456 Portanto, apesar de notório, ainda causa estranheza o fato de que muitos
1457 estudos preocupam-se de forma insuficiente com a realização do controle da droga
1458 vegetal bem como em fornecer dados necessários para o esclarecimento da forma
1459 de preparação do respectivo extrato.

1460 Alguns autores indicam a dose de tratamento a partir de sementes de guaraná:
1461 em pó (BULKU et al., 2010; FUKUMASU et al., 2006b; GALDURÓZ e CARLINI,
1462 1994; GALDURÓZ e CARLINI, 1996), muitas vezes comprado comercialmente já
1463 moído; na forma de cápsulas ou comprimidos do pó (CAMPOS et al., 2011;
1464 SILVESTRINI, MARINO e COSENTINO, 2013); ou como a simples diluição do pó
1465 em água ou outro solvente (DE OLIVEIRA et al., 2002; ESPINOLA et al., 1997;
1466 FREITAS et al., 2007; FUKUMASU et al., 2006a; FUKUMASU et al., 2008;
1467 FUKUMASU, LATORRE e Z Aidan-DAGLI, 2011; KOBER et al., 2015; KREWER et
1468 al., 2011; LEITE et al., 2013; LEITE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; YONEKURA
1469 et al., 2016), da semente torrada e moída sozinha. Ainda, as sementes moídas de
1470 guaraná ou seus extratos podem ser utilizados em associação com outras drogas
1471 vegetais, normalmente formulações comercialmente disponíveis (ANTUNES et al.,
1472 2001; BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005; BOOZER et al., 2001; BULKU et al., 2010;
1473 CAMPOS et al., 2004; KENNEDY et al., 2008; OPALA et al., 2006; POMPORTES,
1474 LAURA et al., 2015; RUXTON et al., 2007).

1475 Diversos trabalhos relatam a realização de uma extração propriamente dita,
1476 com temperatura controlada, tempo de extração definido e quantidade de solvente
1477 padronizada (BARBOSA e MELLO, 2004; BASILE et al., 2005; BYDLOWSKI,
1478 D'AMICO e CHAMONE, 1991; BYDLOWSKI, YUNKER e SUBBIAH, 1988; HASKELL

1479 et al., 2007; JIPPO et al., 2009; LIMA et al., 2005; MACHADO et al., 2015; MIURA et
1480 al., 1998; PORTELLA et al., 2013). Outros autores fazem a moagem da semente
1481 intacta e posterior extração com solventes orgânicos e seguida de semipurificação
1482 destes extratos, comumente por meio de partições com diferentes solventes
1483 (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2007; DALONSO e PETKOWICZ, 2012;
1484 MATSUURA et al., 2015; OTOBONE et al., 2005; OTOBONE et al., 2007; RANGEL,
1485 MELLO e AUDI, 2013; RONCON et al., 2011; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007) ou
1486 ainda outros tipos de extração como a extração supercrítica (MARQUES et al., 2016;
1487 MEHR, BISWAL e COLLINS, 1996; SALDAÑA et al., 2002).

1488 Todos estes métodos de extração ou preparo da amostra citados são válidos,
1489 desde que seja realizado controle de qualidade da droga vegetal e padronização do
1490 extrato por meio de técnicas cromatográficas ou espectroscópicas, como discutido
1491 anteriormente (EDWARDS et al., 2005; KLEIN, LONGUINI e MELLO, 2012; KOFINK,
1492 PAPAGIANNPOULOS e GALENSA, 2007; PELOZO, CARDOSO e MELLO, 2008;
1493 ROGGIA et al., 2016; SOMBRA et al., 2005; USHIROBIRA et al., 2004). Entretanto,
1494 na maioria dos trabalhos não é citado se foi realizado o controle de qualidade da
1495 droga e muitas vezes ainda faltam informações fundamentais para o processo, como
1496 por exemplo, do tipo de extração realizada, solvente utilizado, temperatura, tempo
1497 de extração ou outras informações pertinentes e importantes ao estabelecimento da
1498 padronização citada anteriormente.

1499 Uma forma eficiente que alguns autores encontraram para dar maior
1500 confiabilidade a seus resultados, além de fornecer informações específicas sobre as
1501 etapas da extração, é a padronização de métodos analíticos que avalie e quantifique
1502 os componentes principais de seus extratos (BITTENCOURT et al., 2014;
1503 BITTENCOURT et al., 2013; CAMPOS et al., 2011; FUKUMASU, LATORRE e
1504 Z Aidan-DAGLI, 2011; HASKELL et al., 2007; HERTZ et al., 2015; KENNEDY et al.,
1505 2004; KOBBER et al., 2015; MAJHENIC, SKERGET e KNEZ, 2007; PORTELLA et al.,
1506 2013; RONCON et al., 2011; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), como por exemplo,
1507 por meio da utilização de metodologias como CLAE (KLEIN, LONGUINI e MELLO,
1508 2012), eletroforese capilar (KOFINK, PAPAGIANNPOULOS e GALENSA, 2007) e
1509 ressonância magnética nuclear (RMN) (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Estas
1510 principais substâncias presentes no guaraná podem ser utilizadas como marcadores
1511 químicos também em preparações cosméticas contendo guaraná (FUNASAKI et al.,
1512 2016).

1513 Yonekura e colaboradores (2016) utilizaram a ingestão do pó de guaraná
1514 ultrafino em humanos com sobrepeso, diluindo este pó no momento do consumo.
1515 Eles realizaram a pesquisa dos nutrientes do pó (proteínas, lipídeos, carboidratos,
1516 cinzas, umidade e calorias) e composição fitoquímica das sementes guaraná (total
1517 de polifenóis, catequinas, proantocianidinas e metilxantinas) a partir de uma
1518 extração, investigando flavonoides individuais por CLAE com detector eletroquímico.

1519 Outros estudos vão além, fazendo a preparação de formas farmacêuticas
1520 destes extratos fracionados e padronizados. O desenvolvimento de uma forma
1521 farmacêutica engloba várias etapas, entre elas, estudos de pré-formulação e
1522 formulação propriamente ditos, os quais consistem na caracterização física, química,
1523 físico-química e biológica de todas as matérias-primas, incluindo o fármaco, usado
1524 na elaboração do produto, assim como nas características anatômicas e fisiológicas
1525 da via de administração e absorção e finalmente, a elaboração da forma
1526 farmacêutica (WANCZINSKI et al., 2002).

1527 Do ponto de vista da tecnologia farmacêutica, a secagem dos extratos de
1528 plantas é um passo fundamental para desenvolver um produto adequado para
1529 utilização industrial e aplicação terapêutica (COUTO et al., 2013). A secagem por
1530 aspersão (*spray dryer*) é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de
1531 produtos fitofarmacêuticos intermediários (BRUSCHI et al., 2003; BRUSCHI et al.,
1532 2006). Entre os métodos de preparação de micropartículas, a secagem por aspersão
1533 é largamente utilizada em campos farmacêuticos e bioquímicos e na indústria
1534 alimentar devido à grande disponibilidade de equipamentos e facilidade de
1535 industrialização. Pellozo e colaboradores (2008) utilizaram a forma granulada de
1536 extrato sementes de guaraná, e desenvolveram método de validação para
1537 quantificação de cafeína e polifenóis totais. Este método teve um bom desempenho
1538 na quantificação de cafeína e polifenóis totais. No estudo de Klein e colaboradores
1539 (2015), micropartículas contendo extrato semipurificado de guaraná foram obtidas
1540 utilizando a técnica de *spray-drying*, utilizando a combinação de maltodextrina e
1541 goma arábica, o qual proporcionou uma eficiência satisfatória de encapsulação (80-
1542 110%) e o rendimento do produto (55-60%), demonstrando a viabilidade de
1543 produção destas micropartículas utilizando secagem por pulverização.

1544 Em outro trabalho, este mesmo grupo de pesquisa avaliou a viabilidade
1545 tecnológica de produzir um extrato semipurificado de guaraná em forma de
1546 comprimido, usando um processo de compressão direta. Utilizando metodologias

1547 previstas em Farmacopeias, foram realizados ensaios tecnológicos e físico-químicos
1548 e foram obtidos comprimidos com características de qualidade que atendem as
1549 especificações farmacopeicas, adequados e seguros (ANTONELLI-USHIROBIRA et
1550 al., 2010) para administração e utilização por via oral (KLEIN et al., 2013).

1551 Mesmo com a preocupação de vários autores em padronizar o extrato para
1552 pesquisar sua atividade biológica ou efeito farmacológico, ainda existem lacunas a
1553 serem preenchidas no que diz respeito à forma de preparação da droga vegetal, em
1554 inúmeros trabalhos em que se empregam as sementes de guaraná.

1555 Souza e colaboradores (2011) avaliaram o comportamento de dissolução de
1556 vários fitoterápicos na forma de cápsulas e comprimidos contendo guaraná, obtidos
1557 de diferentes locais. Verificaram que 100% dos fitoterápicos analisados estavam em
1558 desacordo quanto à presença dos quatro marcadores, sendo que 60% apresentaram
1559 três marcadores (cafeína, catequina e epicatequina) e 40% apresentaram somente a
1560 cafeína. Somente as cápsulas apresentaram pelo menos 80% dos marcadores. O
1561 quarto marcador, a teofilina, não foi encontrado em nenhum destes fitoterápicos.
1562 Esses resultados evidenciam a necessidade de um rigoroso controle de qualidade,
1563 desde a droga vegetal, que contribua para assegurar a ação terapêutica desses
1564 medicamentos.

1565 Portanto, quando há uma falta de padronização e mesmo de preocupação
1566 quanto à forma de obtenção do extrato, surgem questionamentos quanto à
1567 confiabilidade dos resultados. Na pesquisa de um mesmo efeito farmacológico,
1568 autores utilizando o extrato de guaraná, podem ter resultados distintos por várias
1569 razões, como da própria metodologia ou teste empregado para medir aquele efeito.
1570 Adicionalmente, a comparação dos estudos se torna frequentemente muito difícil já
1571 que são utilizadas formas tão diferentes de preparação do extrato ou muitas vezes
1572 até desconhecidas.

1573 Alguns autores preocupam-se em relatar a realização do controle de qualidade
1574 da droga, entretanto valores de cafeína e taninos totais do guaraná são discrepantes
1575 daqueles já relatados na literatura sobre a composição química desta droga vegetal
1576 (Quadro 3.3) ou fora dos padrões farmacopeicos estabelecidos (ESPINOLA et al.,
1577 1997; GALDURÓZ e CARLINI, 1994; GALDURÓZ e CARLINI, 1996; MATTEI et al.,
1578 1998; OLIVEIRA et al., 2013).

1579 Esta discussão evidencia que os trabalhos realizados demonstram-se focar nos
1580 resultados da pesquisa, no entanto, é fundamental que cuidados anteriores sejam

1581 tomados. A forma de preparar o extrato pode selecionar um grupo específico de
1582 compostos, e que muitas vezes, podem fornecer resultados conflitantes para a
1583 mesma ação farmacológica investigada. Muitos fatores ambientais impactam na
1584 síntese de metabólitos secundários tanto no conteúdo total quanto em proporções
1585 relativas. Alguns destes incluem a radiação UV, disponibilidade hídrica,
1586 sazonalidade, composição atmosférica, altitude, temperatura e composição do solo
1587 (GOBBO-NETO e LOPES, 2007) Estes fatores aliados ao fator genético e a forma
1588 de extração aumentam a chance de um extrato ser único.

1589

1590 **3.10 Conclusões**

1591 Apesar de o guaraná ter sido foco de muitos estudos científicos, ainda existiam
1592 lacunas a serem preenchidas. Este artigo de revisão reuniu características
1593 botânicas, trouxe dados recentes de cultura e produção do guaraná, e mostrou todas
1594 as substâncias já identificadas desta planta. Esta revisão abrangeu estudos que
1595 evidenciaram toda a gama de ações farmacológicas já pesquisadas a partir de
1596 sementes de guaraná. Além disto, tornou evidente a importância do controle de
1597 qualidade da droga vegetal seguido da imprescindível padronização do seu extrato,
1598 com consequente impacto na sua ação farmacológica.

1599 Sabidamente, as atividades farmacológicas das plantas são decorrentes dos
1600 diferentes compostos existentes em sua composição e sua proporção pode ser
1601 alterada pela forma de preparo do extrato. Estas diferenças podem ser dirimidas por
1602 meio do controle da qualidade da droga vegetal e a padronização do seu extrato. O
1603 controle de qualidade da droga vegetal é essencial para garantir o padrão
1604 farmacopeico de qualidade do guaraná por meio das análises exigidas para esta
1605 planta. Fundamental ainda é a padronização do extrato que será empregado, tanto
1606 para testes *in vivo* quanto *in vitro*, por meio da identificação e quantificação dos
1607 principais compostos presentes nas sementes de guaraná. Com este conjunto de
1608 dados e ainda conhecendo o baixo potencial de toxicidade do extrato é possível dar
1609 maior confiabilidade aos resultados e conclusões no que diz respeito ao guaraná e
1610 direcionar novos estudos científicos.

1611

1612 **Agradecimentos**

1613 Os autores agradecem Capes, Finep, INCT_if e CNPq pelo suporte financeiro e Admir
1614 Arantes pelo apoio técnico.

1615 **3.11 Referências**

1616 ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a
1617 South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of human
1618 nutrition and dietetics**, v. 14, p. 243-250, 2001.

1619
1620 ANDRADE, L.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M. Estudo da metodologia de
1621 análise de cafeína em sementes de guaraná (*Paullinia cupana*) (in Portuguese).
1622 **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, n. 1/2, p. 7-9, 1999.

1623
1624 ANGELUCCI, E.; TOCCHINI, R. P.; LAZARINE, V. B.; PRADO, M. A. F.
1625 Caracterização química da semente de guaraná (*Paullinia cupana* var. sorbilis
1626 Ducke) (in Portuguese). **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 56,
1627 p. 183-192, 1978.

1628
1629 ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; KANESHIMA, E. N.; GABRIEL, M.; AUDI, E. A.;
1630 MARQUES, L. C.; MELLO, J. C. P. Acute and subchronic toxicological evaluation of
1631 the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and
1632 Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1817-1820, 2010.

1633
1634 ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C.
1635 V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of
1636 extract from seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. sorbilis). **Latin American
1637 Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 5-9, 2007.

1638
1639 ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; DE OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.;
1640 DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal
1641 medicine Catuama and its constituents. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 5, p. 416-
1642 21, Aug 2001. ISSN 0951-418X (Print)
1643 0951-418X (Linking). Disponível em: <
1644 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11507734> >.

1645
1646 ANVISA. **Farmacopeia brasileira. vol. 2**. Brasília: Agência nacional de vigilância
1647 sanitária 2010.

1648
1649 AQUINO, S.; GONÇALEZ, E.; REIS, T. A.; SABUNDJIAN, I. T.; TRINDADE, R. A.;
1650 ROSSI, M. H.; CORRÊA, B.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Effect of γ -irradiation on
1651 mycoflora of guarana (*Paullinia cupana*). **Radiation Physics and Chemistry**, v.
1652 1470-1473, 2007.

1653
1654 ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.
1655 D. R. Determination of humidity and ash content of guarana commercial samples
1656 using conventional method and thermal analysis (in Portuguese). **Revista de
1657 Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.

1658
1659 ARMSTRONG, W. F., JOHNSON, P., DUHME, S. The effect of commercial
1660 thermogenic weight loss supplement on body composition and energy expenditure in
1661 obese adults. **Journal of Exercise Physiology Online**, v. 4, n. 2, p. 28-35, 2001.

1662

- 1663 AUDI, E. A.; MELLO, J. C. P. **Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal**
 1664 **guaraná (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis* (Martius) Ducke), PI 0006638-9 (Patent).**
 1665 Brasil: Universidade Estadual de Maringá. PI 0006638-9 2000.
 1666
- 1667 AUDI, E. A.; RONCON, C. M.; ALMEIDA, C. B.; MELLO, J. C. P. P.1.d.002 Effect of
 1668 semi-purified constituent from guaraná seeds on performance of rats in elevated T
 1669 maze. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 3, p. S274–S275, 2010.
 1670
- 1671 AVATO, P.; PESANTE, M. A.; FANIZZI, F. P.; SANTOS, C. A. Seed oil composition
 1672 of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Lipids**, v. 38, n. 7, p. 773-80, Jul
 1673 2003. ISSN 0024-4201 (Print)
 1674 0024-4201 (Linking). Disponível em: <
 1675 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506841> >.
 1676
- 1677 BABU, K. M.; CHURCH, R. J.; LEWANDER, W. Energy drinks: the new eye-opener
 1678 for adolescents. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, v. 9, p. 35-42, 2008.
 1679
- 1680 BAGHKHANI, L.; JAFARI, M. Cardiovascular adverse reactions associated with
 1681 guarana: is there a causal effect? **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 2, n. 1, p.
 1682 57-61, 2002.
 1683
- 1684 BARA, M. T. F.; RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C. B.; AMORIM, L. L. S. S.;
 1685 PAULA, J. R. Determinação do teor do princípios ativos em matéria-primas vegetais
 1686 (in Portuguese). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 211-215,
 1687 2006.
 1688
- 1689 BARBOSA, G. D. A.; MELLO, J. C. P. Clinical evaluation of the guarana extract on
 1690 the dental plaque control (in Portuguese). **Revista Paulista de Odontologia**, v. 26,
 1691 n. 4, p. 28-30, 2004.
 1692
- 1693 BASILE, A.; FERRAR, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.;
 1694 MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from
 1695 *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.
 1696
- 1697 BAUMANN, T. W.; SCHULTHESS, B. H.; HÄNNI, K. Guaraná (*Paullinia cupana*)
 1698 rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. **Phytochemistry**, v.
 1699 39, n. 5, p. 1063-1070, 1995.
 1700
- 1701 BECK, H. T. **Caffeine, alcohol, and sweeteners.** In: Prance G.T., editor. **The**
 1702 **Cultural History of Plants.** New York: Routledge, 2005. 173–190
 1703
- 1704 BEKTAS, E.; DAFERERA, D.; SOKMEN, M.; SERDAR, G.; ERTURK, M.;
 1705 POLISSIOU, M. G.; SOKMEN, A. In vitro antimicrobial, antioxidant, and antiviral
 1706 activities of the essential oil and various extracts from *Thymus nummularis* M. Bieb.
 1707 **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 15, n. 3, p. 403-410, Jul 2016. ISSN
 1708 0972-5938. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000379195200007 >.
 1709
- 1710 BENTES, J. L. D. S.; NETO, P. Q. C. Variabilidade genética de *Colletotrichum*
 1711 *guaranicola* usando marcadores AFLP (in Portuguese). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2,
 1712 p. 251-256, 2011.

- 1713
1714 BENTES, J. L. S.; MATSUOKA, K. Histology of *Colletotrichum guaranicola* and
1715 *Paullinia cupana* var. *sorbilis* on resistant and susceptible clones. **Fitopatologia**
1716 **brasileira**, v. 27, n. 1, p. 71-77, 2002.
1717
- 1718 BÉRUBÉ-PARENT, S.; PELLETIER, C.; DORÉ, J.; TREMBLAY, A. Effects of
1719 encapsulated green tea and guarana extracts containing a mixture of
1720 epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation
1721 in men. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 432-436, 2005.
1722
- 1723 BITTENCOURT, L. D. S.; ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; YATSU, F. K. J.; SCHNORR, C. E.;
1724 MORESCO, K. S.; KOLLING, E. A.; GELAIN, D. P.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J.
1725 C. F. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) Prevents β - Amyloid Aggregation, Generation
1726 of Advanced Glycation-end Products (AGEs), and Acrolein-Induced Cytotoxicity on
1727 Human Neuronal-Like Cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 1615–1624, 2014.
1728
- 1729 BITTENCOURT, L. S.; MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; DOS SANTOS, G. F.;
1730 ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, D. R.; RIBEIRO, E. E.; SOARES, F. A.; BARBISAN,
1731 F.; ATHAYDE, M. L.; CRUZ, I. B. The protective effects of guarana extract (*Paullinia*
1732 *cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and**
1733 **Chemical Toxicology**, v. 53, p. 119-25, Mar 2013. ISSN 1873-6351 (Electronic)
1734 0278-6915 (Linking). Disponível em: <
1735 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220610> >.
1736
- 1737 BOGAS, A. C.; FERREIRA, A. J.; ARAUJO, W. L.; ASTOLFI, S.; KITAJIMA, E. W.;
1738 LACAVAL, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of
1739 Amazon *Paullinia cupana* associated with asymptomatic and symptomatic
1740 anthracnose. **Springerplus**, v. 4, Jun 2015. ISSN 2193-1801. Disponível em: <<Go
1741 to ISI>://WOS:000359260700002 >.
1742
- 1743 BOOZER, C. N.; NASSER, J. A.; HEYMSFIELD, S. B.; WANG, V.; CHEN, G.;
1744 SOLOMON, J. L. An herbal supplement containing Ma Huang-guarana for weight
1745 loss:a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity**, v. 25, p.
1746 316-324, 2001.
1747
- 1748 BORGIO, J.; XAVIER, C. A. G.; MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; SUYENAGA, E. S.
1749 The Influence of drying processes on flavonoid level and the antioxidant activity of
1750 *Baccharis articulata* (Lam.) extracts (in Portuguese). **Brazilian Journal of**
1751 **Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 12-17, 2010.
1752
- 1753 BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 3. São Paulo: Editora Atheneu, 1977.
1754
- 1755 _____. **RDC 12- Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para**
1756 **alimentos (in Portuguese)**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Diário Oficial
1757 da União 2001.
1758
- 1759 BRENELLI, E. C. S. Caffeine extraction from stimulating beverages: a new approach
1760 for a classic organic chemistry experiment (in Portuguese). **Química Nova**, v. 26, n.
1761 1, p. 136-138, 2003.
1762

- 1763 BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L.; LUCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. D. Gelatin
1764 microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation
1765 and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 45-55,
1766 2003.
- 1767
- 1768 BRUSCHI, M. L.; MARTINS, C. H.; VINHOLIS, A. H.; CASEMIRO, L. A.; PANZERI,
1769 H.; GREMIÃO, M. P.; LARA, E. H. Preparation and antimicrobial activity of gelatin
1770 microparticles containing propolis against oral pathogens. **Drug Development and**
1771 **Industrial Pharmacy**, v. 32, p. 229-238, 2006.
- 1772
- 1773 BUGNOI, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRAI, T. C.; PINTO, T. D. J. A.; SABINO,
1774 M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. **Brazilian Journal of**
1775 **Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 47-51, 2006. ISSN 1678-4405.
- 1776
- 1777 BULKU, E.; ZINKOVSKY, D.; PATEL, P.; JAVIA, V.; LAHOTI, T.; KHODOS, I.;
1778 STOHS, S. J.; RAY, S. D. A novel dietary supplement containing multiple
1779 phytochemicals and vitamins elevates hepatorenal and cardiac antioxidant enzymes
1780 in the absence of significant serum chemistry and genomic changes. **Oxidative**
1781 **Medicine Cellular Longevity**, v. 3, n. 2, p. 129-44, Mar-Apr 2010. ISSN 1942-0994
1782 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716937> >.
- 1783
- 1784 BYDLOWSKI, S. P.; D'AMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. F. An aqueous extract of
1785 guarana (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian**
1786 **Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 4, p. 421-4, 1991. ISSN
1787 0100-879X (Print)
1788 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1823256>
1789 >.
- 1790
- 1791 BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. A novel property of an
1792 aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation in vitro
1793 and in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 3, p.
1794 535-8, 1988. ISSN 0100-879X (Print)
1795 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3228635>
1796 >.
- 1797
- 1798 CAMARGO, M. C. R.; TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H. P.; MENEGÁRIO, T. F.;
1799 TOLEDO, M. C. F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in
1800 guaraná powder (*Paullinia cupana*) (in portuguese). **Ciencia e Tecnologia de**
1801 **Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 230-234, 2006.
- 1802
- 1803 CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; LEAL, L. K. A. M.;
1804 RAO, V. S. N. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour
1805 in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 441-445,
1806 2005.
- 1807
- 1808 CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Guarana
1809 (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol
1810 and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1199-1202, 2003.
- 1811

- 1812 CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; BORTOLANZA, L. B.;
1813 SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Pharmacological and neurochemical evidence for
1814 antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. **Pharmacology**
1815 **Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 757-64, Aug 2004. ISSN 0091-3057
1816 (Print)
1817 0091-3057 (Linking). Disponível em: <
1818 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15301932> >.
1819
- 1820 CAMPOS, M. P. D. O.; RIECHELMANN, R.; CASA, L. B. A.; HASSAN, B. J.; CASA,
1821 F. B. A.; GIGLIO, A. D. Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer
1822 patients undergoing systemic chemotherapy. **The Journal of Alternative and**
1823 **Complementary Medicine**, v. 17, n. 6, p. 505-512, 2011.
1824
- 1825 CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology**
1826 **Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501-512, 2003.
1827
- 1828 CARLINI, E. A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B.
1829 Treatment of drug dependence with brazilian herbal medicines. **Brazilian Journal of**
1830 **Pharmacognosy**, v. 16, p. 690-695, 2006.
1831
- 1832 CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of
1833 methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **Journal**
1834 **of AOAC International**, v. 81, n. 4, p. 691-701, 1998.
1835
- 1836 CARVALHO, L. M. D.; COSTA, J. A. M. D.; CARNELOSSI, M. A. G. **Qualidade em**
1837 **plantas medicinais (in Portuguese)**. Aracaju: Embrapa 2010.
1838
- 1839 CHISTE, R. C.; BENASSI, M. D.; MERCADANTE, A. Z. Efficiency of different
1840 solvents on the extraction of bioactive compounds from the Amazonian fruit *Caryocar*
1841 *villosum* and the effect on its antioxidant and colour properties. **Phytochemical**
1842 **Analysis**, v. 25, n. 4, p. 364-372, Jul-Aug 2014. ISSN 0958-0344. Disponível em: <
1843 <Go to ISI>://WOS:000337730800009 >.
1844
- 1845 CHORILLI, M.; RIBEIRO, M. C. A. P.; PIRES-DE-CAMPOS, M. S. M.; LEONARDI,
1846 G. R.; POLACOW, M. L. O. Emulsion effect containing dry extract of guarana over
1847 the blood vessels of the papillary dermis of rats (in Portuguese). **Revista de Saúde**
1848 **Pública**, v. 6, n. 14, p. 7-12, 2004.
1849
- 1850 CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**
1851 **(in Portuguese)**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de
1852 Desenvolvimento Florestal 1984. 545-555
1853
- 1854 COUTO, R. O.; MARTINS, F. S.; CHAUL, L. T.; CONCEIÇÃO, E. C.; FREITAS, L. A.
1855 P.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Spray drying of *Eugenia dysenterica* extract: effects
1856 of in-process parameters on product quality. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**,
1857 v. 23, n. 1, p. 115-123, 2013.
1858
- 1859 DA FONSECA, C. A.; LEAL, J.; COSTA, S. S.; LEITAO, A. C. Genotoxic and
1860 mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation**
1861 **research**, v. 321, n. 3, p. 165-73, May 1994. ISSN 0027-5107 (Print)

- 1862 0027-5107 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513067>
1863 >.
1864
- 1865 DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Guarana powder
1866 polysaccharides:characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic
1867 fraction. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1804-1812, 2012.
1868
- 1869 DE AQUINO, J. C.; SOUZA, C. F. C.; SANTOS, J. R. D.; JOACHIM-BRAVO, I. S.
1870 Adding guarana powder to medfly diets: an alternative for improving the sterile insect
1871 technique. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 3, p. 294-298, May-Jun 2016. ISSN 0103-
1872 9016. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000376520400012 >.
1873
- 1874 DE GOIS, J. S.; ALMEIDA, T. S.; DE ANDRADE, R. M.; TOALDO, I. M.;
1875 BORDIGNON-LUIZ, M. T.; BORGES, D. L. G. Direct solid analysis for the
1876 determination of Mn, Ni, Rb and Sr in powdered stimulant plants using high-
1877 resolution continuum source atomic absorption spectrometry followed by
1878 chemometric classification based on elemental composition, polyphenol content and
1879 antioxidant activity. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 283-289, Jan 2016. ISSN
1880 0026-265X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000367755600043 >.
1881
- 1882 DE MENEZES-JÚNIOR, J. B. F. Do exame microscópico do guaraná em
1883 bromatologia (in Portuguese). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, n. 1, p. 45-68,
1884 1942.
1885
- 1886 DE OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; GALEANO, P.; ROMERO, J. I.; HOLUBIEC, M.
1887 I.; BADORREY, M. S.; CAPANI, F.; ALVAREZ, L. D. G. *Paullinia cupana* Mart. var.
1888 *sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against
1889 rotenone-induced cytotoxicity. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, p. 1382–
1890 1391, 2011.
1891
- 1892 DE OLIVEIRA, J. F.; AVILA, A. S.; BRAGA, A. C.; DE OLIVEIRA, M. B.;
1893 BOASQUEVISQUE, E. M.; JALES, R. L.; CARDOSO, V. N.; BERNARDO-FILHO, M.
1894 Effect of extract of medicinal plants on the labeling of blood elements with
1895 Technetium-99m and on the morphology of red blood cells: I--a study with *Paullinia*
1896 *cupana*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 305-12, Jul 2002. ISSN 0367-326X (Print)
1897 0367-326X (Linking). Disponível em: <
1898 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234573> >.
1899
- 1900 DEL GIGLIO, A. B.; CUBERO, D. I. G.; LERNER, T. G.; GUARIENTO, R. T.; DE
1901 AZEVEDO, R. G.; PAIVA, H.; GOLDMAN, C.; CARELLI, B.; CRUZ, F. M.;
1902 SCHINDLER, F.; PIANOWSKI, L.; DE MATOS, L. L.; DEL GIGLIO, A. Purified dry
1903 extract of *Paullinia cupana* (guarana) (PC-18) for chemotherapy-related fatigue in
1904 patients with solid tumors: an early discontinuation study. **Journal of Dietary**
1905 **Supplements**, v. 10, n. 4, p. 325-34, Dec 2013a. ISSN 1939-022X (Electronic)
1906 1939-0211 (Linking). Disponível em: <
1907 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237188> >.
1908
- 1909 DEL GIGLIO, A. B.; I., C. D. D.; LERNER, T. G.; GUARIENTO, R. T. G.; DE
1910 AZEVEDO, R. G. S.; PAIVA, H.; GOLDMAN, C.; CARELLI, B.; CRUZ, F. M.;
1911 SCHINDLER, F.; PIANOWSKI, L.; DE MATOS, L. L.; DEL GIGLIO, A. Purified dry

- 1912 extract of *Paullinia cupana* (guarana) (PC-18) for chemotherapy-related fatigue in
 1913 patients with solid tumors: an early discontinuation study. **Journal of Dietary**
 1914 **Supplements**, v. 10, n. 4, p. 325-34, Dec 2013b. ISSN 1939-022X (Electronic)
 1915 1939-0211 (Linking). Disponível em: <
 1916 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237188> >.
 1917
 1918 DONADIO, V.; BONSI, P.; ZELE, I.; MONARI, L.; LIGUORI, R.; VETRUGNO, R.;
 1919 ALBANI, F.; MONTAGNA, P. Myoglobinuria after ingestion of extracts of guarana,
 1920 *Ginkgo biloba* and kava. **Neurological Sciences**, v. 21, n. 2, p. 124, Apr 2000. ISSN
 1921 1590-1874 (Print)
 1922 1590-1874 (Linking). Disponível em: <
 1923 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938194> >.
 1924
 1925 DUARTE, M. D. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. D.; CORRÊA, M. P. F. Variações
 1926 morfológicas e fisiológicas em isolamentos de *Colletotrichum guaranicola* (in
 1927 Portuguese). **Fitopatologia brasileira**, v. 20, n. 2, p. 141-144, 1995.
 1928
 1929 DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. 2. Florida: CRC Press LLC, 1987. 333
 1930
 1931 EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; OLIVEIRA, L. F. C. D.; ALIA, J.-M.;
 1932 HYARIC, M. L.; AMEIDA, M. V. D. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and
 1933 some extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 532, p. 177-186, 2005.
 1934
 1935 ESCOBAR, J. R.; CORREA, M. P. F.; AGUILERA, F. J. P. Estruturas florais, floração
 1936 e técnicas para a polinização controlada do guaranzeiro (in Portuguese). I
 1937 **Simpósio Brasileiro do Guaraná – Anais. Manaus, Embrapa- UEPAE. pp. 222,**
 1938 **1984.**
 1939
 1940 ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity
 1941 of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of**
 1942 **Ethnopharmacology**, v. 55, p. 223-229, 1997.
 1943
 1944 FORZZA, R. C. Lista de espécies Flora do Brasil. Rio de Janeiro, 2010.
 1945
 1946 FREITAS, R. S.; MORENO, S. R. F.; LIMA-FILHO, G. L.; FONSECA, A. S.;
 1947 BERNARDO-FILHO, M. Effect of a commercial extract of *Paullinia cupana* (guarana)
 1948 on the binding of 99mTc-DMSA on blood constituents: An in vivo study. **Applied**
 1949 **Radiation and Isotopes**, v. 65, p. 528-533, 2007.
 1950
 1951 FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; HEIDOR, R.; SILVA, T. C.; ATROCH, A.;
 1952 MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana*
 1953 Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and**
 1954 **Chemical Toxicology**, v. 44, p. 862-867, 2006a.
 1955
 1956 FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.;
 1957 DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation
 1958 and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice **Brazilian**
 1959 **Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 305-310, 2008.
 1960

- 1961 FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; Z Aidan-DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart. var.
1962 *sorbilis*, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice
1963 by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC
1964 cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 11-16, 2011.
- 1965
1966 FUKUMASU, H.; SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; LIMA, C. E.; MACKWIAK, I. I.;
1967 ATROCH, A.; SPINOSA, H. S.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive
1968 effects of *Paullinia cupana* Mart. Var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse
1969 hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, p. 158-164, 2006b.
- 1970
1971 FUNASAKI, M.; BARROSO, H. D.; FERNANDES, V. L. A.; MENEZES, I. S. Amazon
1972 rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. **Química Nova**, v. 39, n.
1973 2, p. 194-209, Feb 2016. ISSN 0100-4042. Disponível em: <Go to
1974 ISI>://WOS:000373993400012 >.
- 1975
1976 FUNK, V. A.; BERRY, P. E.; ALEXANDER, S. N.; HOLLOWELL, T. H.; KELLOFF, C.
1977 L. Checklist of the plants of the Guiana shield (Venezuela: Amazonas, Bolivar, Delta
1978 Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana). **Contributions from the United
1979 States National Herbarium**, v. 55, p. 1-584, 2007.
- 1980
1981 GALDURÓZ, J. C. F.; CARLINI, E. D. A. Acute effects of the *Paullinia cupana*,
1982 "guaraná" on the cognition of normal volunteers. **São Paulo Med. J.**, v. 112, n. 3, p.
1983 607-611, 1994.
- 1984
1985 GALDURÓZ, J. C. F.; CARLINI, E. D. A. The effects of long-term administration of
1986 guarana on the cognition of normal, elderly volunteers. **São Paulo Med. J.**, v. 114,
1987 n. 1, p. 1073-1078, 1996.
- 1988
1989 GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the
1990 content of secondary metabolites (in Portuguese). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-
1991 381, 2007.
- 1992
1993 GOUVEIA, V. F.; ROSSII, A. P.; ROSSI, A. P.; ROCHA, V. D. F.; RIBEIRO, L. F. C.
1994 Profile of the producers of guaraná (*Paullinia cupana*) of Alta Floresta- MT (in
1995 Portuguese). **Revista Conexão UEPG**, v. 8, n. 2, p. 300-312, 2012.
- 1996
1997 HALLER, C. A.; JACOB, P.; BENOWITZ, N. L. Short-term metabolic and
1998 hemodynamic effects of ephedra and guarana combinations. **Clinical
1999 Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 6, p. 560-571, 2005.
- 2000
2001 HAMERSKI, L.; SOMNER, G. V.; TAMAIO, N. *Paullinia cupana* Kunth
2002 (Sapindaceae): A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and
2003 pharmacology. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 30, p. 2221-2229,
2004 2013.
- 2005
2006 HASKELL, C. F.; KENNEDY, D. O.; WESNES, K. A.; MILNE, A. L.; SCHOLEY, A. B.
2007 A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural
2008 effects of guarana in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 65-
2009 70, Jan 2007. ISSN 0269-8811 (Print)

- 2010 0269-8811 (Linking). Disponível em: <
 2011 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533867> >.
 2012
- 2013 HEARD, C. M.; JOHNSON, S.; MOSS, G.; THOMAS, C. P. In vitro transdermal
 2014 delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana,
 2015 *Paullinia Cupana*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, p. 26-31, 2006.
 2016
- 2017 HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social
 2018 perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **J.**
 2019 **Ethnopharmacol.**, v. 6, p. 311-338, 1982.
 2020
- 2021 HERTZ, E.; CADONÁ, F. C.; MACHADO, A. K.; AZZOLIN, V.; HOLMRICH, S.;
 2022 ASSMANN, C.; LEDUR, P.; RIBEIRO, E. E.; FILHO, O. C. D. S.; MÂNICA-CATTANI,
 2023 M. F.; CRUZ, I. B. M. D. Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell
 2024 response to chemotherapeutic drugs. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, p. 37-
 2025 43, 2015.
 2026
- 2027 HIGGINS, J. P.; TUTTLE, T. D.; HIGGINS, C. L. Energy beverages: content and
 2028 safety. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, n. 11, p. 1033-41, Nov 2010. ISSN 1942-
 2029 5546 (Electronic)
 2030 0025-6196 (Linking). Disponível em: <
 2031 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037046> >.
 2032
- 2033 HOMMA, A. K. O. **Guaraná: passado, presente e futuro** Extrativismo vegetal na
 2034 Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação (in Portuguese). HOMMA, A.
 2035 K. O. Brasília: Embrapa: 472 p. 2014.
 2036
- 2037 IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola (in Portuguese)**.
 2038 COAGRO. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE: 1-113
 2039 p. 2016.
 2040
- 2041 IYADURAI, S. J.; CHUNG, S. S. New-onset seizures in adults: possible association
 2042 with consumption of popular energy drinks. **Epilepsy & Behavior**, v. 10, n. 3, p. 504-
 2043 508, 2007.
 2044
- 2045 JIPPO, T.; KOBAYASHI, Y.; SATO, H.; HATTORI, A.; TAKEUCHI, H.; SUGIMOTO,
 2046 K.; SHIGEKAWA, M. Inhibitory effects of guarana seed extract on passive cutaneous
 2047 anaphylaxis and mast cell degranulation. **Bioscience, Biotechnology, and**
 2048 **Biochemistry**, v. 73, n. 9, p. 2110-2, Sep 2009. ISSN 1347-6947 (Electronic)
 2049 0916-8451 (Linking). Disponível em: <
 2050 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734657> >.
 2051
- 2052 KALIA, K.; SHARMA, K.; SINGH, H. P.; SINGH, B. Effects of extraction methods on
 2053 phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atosanguinea*
 2054 Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of**
 2055 **Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10129-10134, Nov 2008. ISSN
 2056 0021-8561. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260675600058 >.
 2057
- 2058 KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-
 2059 MAUND, J. C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARA, A.; SCHOLEY,

- 2060 A. B. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin
2061 and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite**, v. 50, p.
2062 506-513, 2008.
- 2063
2064 KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; WESNES, K. A.; SCHOLEY, A. B. Improved
2065 cognitive performance in human volunteers following administration of guaraná
2066 (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*.
2067 **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 401--411, 2004.
- 2068
2069 KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Development of tablets
2070 containing semipurified extract of guaraná (*Paullinia cupana*). **Brazilian Journal of**
2071 **Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 186-193, 2013.
- 2072
2073 KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Microparticles
2074 containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and
2075 characterization. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, 2015.
- 2076
2077 KLEIN, T.; LONGUINI, R.; MELLO, J. C. P. Development of an analytical method
2078 using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var.
2079 *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p. 502-506, 2012.
- 2080
2081 KNEIFEL, W.; CZECH, E.; KOPP, B. Microbial contamination of medicinal plants – a
2082 review. **Planta Medica**, v. 68, p. 5-15, 2001.
- 2083
2084 KOBER, H.; TATSCH, E.; TORBITZ, V. D.; CARGNIN, L. P.; SANGOI, M. B.;
2085 BOCHI, G. V.; DA SILVA, A. R. H.; BARBISAN, F.; RIBEIRO, E. E.; DA CRUZ, I. B.
2086 M.; MORESCO, R. N. Genoprotective and hepatoprotective effects of guarana
2087 (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Drug and**
2088 **Chemical Toxicology**, v. 20, p. 1-5, 2015.
- 2089
2090 KOFINK, M.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; GALENSA, R. Enantioseparation of
2091 catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. **European**
2092 **Food Research and Technology**, v. 225, n. 3-4, p. 569-577, Jul 2007. ISSN 1438-
2093 2377. Disponível em: <<Go to ISI>://000247502000032 >.
- 2094
2095 KREWER, C. D. C.; RIBEIRO, E. E.; RIBEIRO, E. A. M.; MORESCO, R. N.; DA
2096 ROCHA, M. I. D. U. M.; MONTAGNER, G. F. F. D. S.; MACHADO, M. M.; VIEGAS,
2097 K.; BRITO, E.; DA CRUZ, I. B. M. Habitual intake of guarana and metabolic
2098 morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population.
2099 **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 9, p. 1367-74, Sep 2011. ISSN 1099-1573
2100 (Electronic)
2101 0951-418X (Linking). Disponível em: <
2102 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21341338> >.
- 2103
2104 KURI, C. M. B. The guaraná industry in Brazil. **International Business &**
2105 **Economics Research Journal**, v. 7, n. 5, p. 87-98, 2008.
- 2106
2107 LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C.
2108 M. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais (in Portuguese)**. In: **Simões**
2109 **CMO; Schenkel EP; Gosmann G; Mello JCP; Mentz LA; Petrovick PR,**

- 2110 **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre; Florianópolis: Ed.
2111 Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, 2001.
2112
- 2113 LEITE, R. P.; PREDES, F. S.; MONTEIRO, J. C.; FREITAS, K. M.; WADA, R. S.;
2114 DOLDER, H. Advantage of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation on
2115 cadmium-induced damages in testis of adult wistar rats. **Toxicologic Pathology**, v.
2116 41, p. 73-79, 2013.
2117
- 2118 LEITE, R. P.; WADA, R. S.; MONTEIRO, J. C.; PREDES, F. S.; DOLDER, H.
2119 Protective effect of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on
2120 cadmium-induced damages in adult Wistar testis. **Biological Trace Element**
2121 **Research**, v. 141, p. 262–274, 2011.
2122
- 2123 LIMA, R. B. S.; SILVA, L.; MELO, M. R. S.; COSTA, J. S.; PICANCO, N. S.; LIMA, E.
2124 S.; VASCONCELLOS, M. C.; BOLETI, A. P. A.; SANTOS, J. M. P.; AMORIM, R. C.
2125 N.; CHAVES, F. C. M.; COUTINHO, J. P.; TADEI, W. P.; KRETTLI, A. U.; POHLIT,
2126 A. M. In vitro and in vivo anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon.
2127 **Malaria Journal**, v. 14, Dec 2015. ISSN 1475-2875. Disponível em: < <Go to
2128 ISI>://WOS:000367146900002 >.
2129
- 2130 LIMA, W. P.; CARNEVALI, J. R. L. C.; EDER, R.; ROSA, L. F. B. P. C.; BACCHI, E.
2131 M.; SEELAENDERA, M. C. L. Lipid metabolism in trained rats: effect of guaraná
2132 (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 1019-1028,
2133 2005.
2134
- 2135 LIU, X.; ZHAO, M.; WANG, J.; LUO, W. Antimicrobial and antioxidant activity of
2136 emblica extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction and methanol
2137 extraction. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 307-330, 2007.
2138
- 2139 LUDE, S.; VECCHIO, S.; SINNO-TELLIER, S.; DOPTER, A.; MUSTONEN, H.;
2140 VUCINIC, S.; JONSSON, B.; MULLER, D.; FRUCHTENGARTEN, L. V.; HRUBY, K.;
2141 NASCIMENTO, E. D.; DI LORENZO, C.; RESTANI, P.; KUPFERSCHMIDT, H.;
2142 CESCHI, A. Adverse effects of plant food supplements and plants consumed as
2143 food: results from the poisons centres-based plantLIBRA study. **Phytotherapy**
2144 **Research**, v. 30, n. 6, p. 988-996, Jun 2016. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <Go
2145 to ISI>://WOS:000377261100013 >.
2146
- 2147 LUNGUINHO, L. G. **Florescimento em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var.**
2148 **sorbilis) (in Portuguese). Published on the**
2149 **internet:**<http://200.129.163.131:8080/handle/tede/2244> / (accessed 19st
2150 **January/2016).** 2007. 86 (Master's in Biotechnology). Universidade Federal do
2151 Amazonas, Manaus.
2152
- 2153 MACHADO, A. K.; CANODÁ, F., C.; AZZOLIN, V. F.; DORNELLES, E. B.;
2154 BARBISAN, F.; RIBEIRO, E. E.; MÂNICA-CATTANI, M. F.; DUARTE, M. M. M. F.;
2155 SALDANHA, J. R. P.; CRUZ, I. B. M. D. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the
2156 proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from
2157 human lipoaspirates. **Food Research International**, v. 67, p. 426-433, 2015.
2158

- 2159 MACHADO, O. Contribuição ao estudo das plantas medicinais do Brasil - o guaraná
2160 (in Portuguese). **Rodriguesia**, v. 9, n. 20, p. 89-110, 1946.
2161
- 2162 MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of
2163 guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1258-1268, 2007.
2164
- 2165 MARQUES, L. L. M.; PANIZZON, G. P.; AGUIAR, B. A. A.; SIMIONATO, A. S.;
2166 CARDOZO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; OLIVEIRA, A. G. D.; GUEDES, T. A.; MELLO,
2167 J. C. P. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: selective supercritical extraction of
2168 phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 212, n. 1, p. 703-711, 2016.
2169
- 2170 MARTINS, M.; KLUCZKOVSKI, A. M.; SANTOS, A. C. S. D.; FERNANDES, O. C. C.;
2171 SCUSSEL, V. M. Evaluation of ochratoxin A and fungi in powdered guarana
2172 (*Paullinia cupana* Kunth), a caffeine rich product from Amazon forest. **African**
2173 **Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 6, p. 545-550, 2014.
2174
- 2175 MARX, F. Analysis of guarana seeds. II. Studies on the composition of the tannin
2176 fraction **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 190, p.
2177 429-431, 1990.
2178
- 2179 MARX, F.; MAIA, J. G. Analysis of guaraná (*Paullinia cupana* var, *sorbilis*). III.
2180 Identification and determination of guaraná beverages by HPLC analysis of caffeine
2181 and theophylline. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 285-286, 1990.
2182
- 2183 MATSUURA, E.; GODOY, J. S. R.; BONFIM-MENDONÇA, P. D. S.; MELLO, J. C. P.
2184 D.; SVIDZINSKI, T. I. E.; GASPARETTO, A.; MACIEL, S. M. In vitro effect of
2185 *Paullinia cupana* (guaraná) on hydrophobicity, biofilm formation, and adhesion of
2186 *Candida albicans* to polystyrene, composites, and buccal epithelial cells. **Archives of**
2187 **Oral Biology**, v. 60, p. 471-478, 2015.
2188
- 2189 MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPINOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M.
2190 Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and
2191 antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-116,
2192 1998.
2193
- 2194 MCGUIRE, S. Institute of Medicine. 2014. Caffeine in food and dietary supplements:
2195 examining safety-workshop summary. Washington, DC: The National Academies
2196 Press, 2014. **Advances in Nutrition**, v. 5, n. 5, p. 585-586, Sep 2014. ISSN 2161-
2197 8313. Disponível em: <<Go to ISI>://000342972200022 >.
2198
- 2199 MEHR, C. B.; BISWAL, R. N.; COLLINS, J. L. Supercritical carbon dioxide extraction
2200 of caffeine from guaraná. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 9, p. 185-191
2201 1996.
2202
- 2203 MELLO, J. C. P.; ITO, L. A. **Aplicação da eletroforese capilar na análise de**
2204 **produtos naturais (in Portuguese)**. In: Souza, G. H. Bianco; Mello, J. C. P.;
2205 Lopes, N. P., editors. **Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de**
2206 **Isolamento e Determinação Estrutural Ativos de Plantas Medicinais**. Ouro
2207 Preto: UFOP, 2012. 312
2208

- 2209 MELLO, J. R. B. D.; MELLO, F. B.; LANGELOH, A. Pre-clinic toxicity of a
2210 phytoterapic containing *Anemopaegma mirandum*, *Cola nitida*, *Passiflora alata*,
2211 *Paullinia cupana*, *Ptychopetalum olacoides* and thiamin chlorhydrate. **Latin**
2212 **American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 8, p. 1431-1435, 2010.
2213
- 2214 MEURER-GRIMES, B.; BERKOV, A.; BECK, H. Theobromine, theophylline, and
2215 caffeine in 42 samples and products of Guaraná (*Paullinia cupana*, Sapindaceae).
2216 **Economic Botany**, v. 52, p. 293-301, 1998.
2217
- 2218 MIRANDA, V. C.; TRUFELLI, D. C.; FÊDE, A. B. S.; MARTINS, F. D.; SAAD, L. S.;
2219 OLIVEIRA, V. T., T. Z. C.; RIECHELMANN, R.; GIGLIO, A. D. Guarana (*Paullinia*
2220 *cupana*) for chemotherapy-related fatigue. **Einstein**, v. 6, n. 2, p. 195-199, 2008.
2221
- 2222 MIRANDA, V. D. C.; TRUFELLI, D. C.; SANTOS, J.; CAMPOS, M. P.; NOBUO, M.;
2223 MIRANDA, M. D. C.; SCHLINDER, F.; RIECHELMANN, R.; GIGLIO, A. D.
2224 Effectiveness of guaraná (*Paullinia cupana*) for postradiation fatigue and depression:
2225 results of a pilot double-blind randomized study. **The Journal of Alternative and**
2226 **Complementary Medicine**, v. 15, n. 4, p. 431-433, 2009.
2227
- 2228 MIURA, T.; TATARA, M.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, I. Effect of guarana on exercise
2229 in normal and epinephrine-induced glycogenolytic mice. **Biological and**
2230 **Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 6, p. 646-8, Jun 1998. ISSN 0918-6158 (Print)
2231 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657057>
2232 >.
2233
- 2234 MOADDEB, J.; TOFADE, T. S.; BEVINS, M. B. Hypertensive urgency associated
2235 with Xenadrine EFX use. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 24, p. 400-403, 2011.
2236
- 2237 MORAES, M. L. L.; MICKE, G. A.; FUJYIA, N. M.; TAVARES, M. F. M. Separação e
2238 análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar
2239 (in Portuguese). **Revista Analytica**, v. 5, p. 44-50, 2003.
2240
- 2241 MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.;
2242 DOMÍNGUEZ, H.; NÚNEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual
2243 sources- review. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.
2244
- 2245 MURUGAN, R.; PARIMELAZHAGAN, T. Comparative evaluation of different
2246 extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia*
2247 *parvifolia* Arn. – An in vitro approach **Journal of King Saud University - Science**, v.
2248 26, n. 4, p. 267–275, 2014.
2249
- 2250 NAWROT, P.; JORDAN, S.; EASTWOOD, J.; ROTSTEIN, J.; HUGENHOLTZ, A.;
2251 FEELEY, M. Effects of caffeine on human health. **Food Additives and**
2252 **Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk**
2253 **Assessment**, v. 20, n. 1, p. 1-30, 2003. ISSN 1944-0049. Disponível em: < <Go to
2254 ISI>://000180292400001 >.
2255
- 2256 NAZARÉ, R. F. R. D. **Processamento de guaraná em pó solúvel (in Portuguese)**.
2257 Belém, PA, Brazil: EMBRAPA: 24p p. 1998.
2258

- 2259 NAZARÉ, R. F. R. D.; FIGUEIREDO, F. J. C. **Contribuição ao estudo do guaraná**
2260 **(in Portuguese)**. Embrapa Amazônia Oriental Belém: EMBRAPA 1982.
2261
- 2262 NGUYEN, V. T.; PHAM, H. N. T.; BOWYER, M. C.; VAN ALTENA, I. A.; SCARLETT,
2263 C. J. Influence of solvents and novel extraction methods on bioactive compounds
2264 and antioxidant capacity of *Phyllanthus amarus*. **Chemical Papers**, v. 70, n. 5, p.
2265 556-566, May 2016. ISSN 0366-6352. Disponível em: < <Go to
2266 ISI>://WOS:000376512000005 >.
2267
- 2268 NICOLETTI, M. A.; OLIVEIRA-JUNIOR, M. A.; BERTASSO, C. C.; COPOROSI, P.
2269 Y.; TAVARES, A. P. L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos.
2270 **Infarma**, v. 19, n. 1/2, p. 32-40, 2007.
2271
- 2272 NYSKA, A.; MURPHY, E.; FOLEY, J. F.; COLLINS, B. J.; PETRANKA, J.; HOWDEN,
2273 R.; HANLON, P.; DUNNICK, J. K. Acute hemorrhagic myocardial necrosis and
2274 sudden death of rats exposed to a combination of ephedrine and caffeine.
2275 **Toxicological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 388-96, Feb 2005. ISSN 1096-6080 (Print)
2276 1096-0929 (Linking). Disponível em: <
2277 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537744> >.
2278
- 2279 OLIVEIRA, A. N. D.; OLIVEIRA, L. A. D. Seasonal dynamics of arbuscular
2280 mycorrhizal fungi in plants of *Theobroma grandiflorum* Schum and *Paullinia cupana*
2281 Mart. of an agroforestry system in Central Amazonia, Amazonas State, Brazil.
2282 **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 262-270, 2005.
2283
- 2284 OLIVEIRA, C. H.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A. F.; ABIB,
2285 E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia*
2286 *cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale*
2287 (Catuama®) in healthy volunteers. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 54-57, 2005.
2288
- 2289 OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; GALEANO, P.; ROMERO, J. I.; HOLUBIEC, M. I.;
2290 BADORREY, M. S.; CAPANI, F.; ALVAREZ, L. D. G. *Paullinia cupana* Mart. var.
2291 *sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against
2292 rotenone-induced cytotoxicity. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, p. 1382–
2293 1391, 2011.
2294
- 2295 OLIVEIRA, S. S.; GIGLIO, A. B. D.; LERNER, T. G.; ZANELATO, R. M.; TIEMI, L.;
2296 REIFUR, L.; SANTI, P. X.; GIGLIO, A. D. *Paullinia cupana* for control of hot flashes in
2297 breast cancer patients: a pilot study. **Einstein**, v. 11, n. 4, p. 435-438, 2013.
2298
- 2299 ONAKPOYA, I.; ERNST, E. Safety of guarana-containing weight loss supplements: a
2300 mini-review. **Journal of Naturology and Complementary Therapies**, v. 1, n. 1, p.
2301 45-50, 2012.
2302
- 2303 OPALA, T.; RZYMSKI, P.; PISCHEL, I.; WILCZAK, M.; WOZNIAK, J. Efficacy of 12
2304 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body
2305 weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects--a
2306 randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. **European Journal of**
2307 **Medical Research**, v. 11, n. 8, p. 343-50, Aug 30 2006. ISSN 0949-2321 (Print)

- 2308 0949-2321 (Linking). Disponível em: <
 2309 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052970> >.
 2310
- 2311 OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; OBICI, S.;
 2312 MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purified constituents
 2313 from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)) Lucke on cognitive
 2314 performance in morris water maze in rats. **Brazilian Archives of Biology and
 2315 Technology**, v. 48, p. 723-728, 2005.
 2316
- 2317 OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V.
 2318 R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds
 2319 [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats.
 2320 **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 531-535, 2007.
 2321
- 2322 PAGLIARUSSI, R. S.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Fluid bed drying of guarana
 2323 (*Paullinia cupana* HBK) extract: effect of process factors on caffeine content. **AAPS
 2324 PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E1-E7, 2006.
 2325
- 2326 PAGLIARUSSI, R. S.; FREITAS, L. A. P.; BASTOS, J. K. A quantitative method for
 2327 the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column
 2328 gas chromatography. **Journal of separation science**, v. 25, p. 1-6, 2002.
 2329
- 2330 PELOZO, M. I. G.; CARDOSO, M. L. C.; MELLO, J. C. P. Spectrophotometric
 2331 determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var.
 2332 *sorbilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 447-451,
 2333 2008.
 2334
- 2335 PINELO, M.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; SINEIRO, J.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO,
 2336 G.; NÚÑEZ, M. J. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic
 2337 antioxidants from grape pomace: a comparative study. **European Food Research
 2338 and Technology**, v. 226, p. 199-205, 2007.
 2339
- 2340 PITTLER, M. H.; SCHIMIDT, K.; ERNST, E. Adverse events of herbal food
 2341 supplements for body weight reduction: systematic review. **Obesity Reviews**, v. 6, p.
 2342 93-111, 2005.
 2343
- 2344 The Plant List. **Paullinia cupana** Kunth 2013.
 2345
- 2346 POMPORTES, L.; DAVRANCHE, K.; BRISWALTER, I.; HAYS, A.; BRISWALTER,
 2347 J. Heart rate variability and cognitive function following a multi-vitamin and mineral
 2348 supplementation with added guarana (*Paullinia cupana*). **Nutrients**, v. 7, p. 196-208,
 2349 2015.
 2350
- 2351 POMPORTES, L.; DAVRANCHE, K.; HAYS, A.; BRISWALTER, J. Effect of a
 2352 creatine-guarana complex on muscular power and cognitive performance in high-
 2353 level athletes (in French). **Science & Sports**, v. 30, n. 4, p. 188-195, Sep 2015. ISSN
 2354 0765-1597. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000359889600002 >.
 2355
- 2356 PORTELLA, R. D. L.; BARCELOS, R. P.; ROSA, E. J. F. D.; RIBEIROS, E. E.;
 2357 CRUZ, I. B. M. D.; SULEIMAN, L.; SOARES, F. A. A. Guaraná (*Paullinia cupana*

- 2358 Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids**
2359 **in Health and Disease**, v. 12, p. 1-9, 2013.
- 2360
- 2361 PRANCE, G. T.; NESBITT, M. **The cultural history of plants**. New York ; London:
2362 Routledge, 2005. ISBN 0415927463 : No price.
- 2363
- 2364 RANGEL, M. P.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Evaluation of neurotransmitters
2365 involved in the anxiolytic and panicolytic effect of the aqueous fraction of *Paullinia*
2366 *cupana* (guaraná) in elevated T maze. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23,
2367 n. 2, p. 358-365, 2013.
- 2368
- 2369 RAVI SUBBIAH, M. T. Guarana consumption: a review of health benefits and risks.
2370 **Alternative & Complementary Therapies**, v. 11, n. 4, p. 212-213, 2005.
- 2371
- 2372 RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Production of caffeine-rich guarana extracts
2373 using (in Portuguese). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 261-
2374 270, 2012.
- 2375
- 2376 RICHARDSON, W. H.; SLONE, C. M.; MICHELS, J. E. Herbal drugs of abuse: an
2377 emerging problem. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 25, p. 435-
2378 457, 2007.
- 2379
- 2380 RODRIGUES, M.; ALVES, G.; LOURENCO, N.; FALCAO, A. Herb-drug interaction of
2381 *Paullinia cupana* (guarana) seed extract on the pharmacokinetics of amiodarone in
2382 rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p.
2383 428560, 2012. ISSN 1741-4288 (Electronic)
2384 1741-427X (Linking). Disponível em: <
2385 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23304200> >.
- 2386
- 2387 ROGGIA, I.; ZIEGLER, S.; CRUZ, I. B. M.; OURIQUE, A. F.; GOMES, P. A derivative
2388 UV spectrophotometric method for the determination of methylxanthines and tannins
2389 in guarana bulk (*Paullinia cupana*) **International Journal of Pharmaceutical**
2390 **Sciences and Research**, v. 7, n. 6, p. 2334-2342, 2016.
- 2391
- 2392 RONCON, C. M.; DE ALMEIDA, C. B.; KLEIN, T.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A.
2393 Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the
2394 elevated T-maze test. **Planta Medica**, v. 77, p. 236-241, 2011.
- 2395
- 2396 RUCHEL, J. B.; REZER, J. F. P.; THORSTENBERG, M. L.; DOS SANTOS, C. B.;
2397 CABRAL, F. L.; LOPES, S. T. A.; DA SILVA, C. B.; MACHADO, A. K.; DA CRUZ, I.
2398 B. M.; SCHETINGER, M. R. C.; GONCALVES, J. F.; LEAL, D. B. R.
2399 Hypercholesterolemia and ecto-enzymes of purinergic system: effects of *Paullinia*
2400 *cupana*. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 1, p. 49-57, Jan 2016. ISSN 0951-418X.
2401 Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000367919300007 >.
- 2402
- 2403 RUXTON, C. H. S.; KIRKWOOD, L.; MCMILLAN, B.; JOHN, D. S.; EVANS, C. E. L.
2404 Effectiveness of a herbal supplement (Zotrim™) for weight management. **British**
2405 **Food Journal**, v. 109, n. 6, p. 416-428, 2007.
- 2406

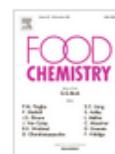
- 2407 SALDAÑA, M. D. A.; ZETZL, C.; MOHAMED, R. S.; BRUNNER, G. Extraction of
2408 methylxanthines from guaraná seeds, mate leaves, and cocoa beans using
2409 supercritical carbon dioxide and ethanol. **Journal of Agricultural and Food**
2410 **Chemistry**, v. 50, p. 4820–4826, 2002.
- 2411
- 2412 SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M. M.; MUNHOZ-MINGARRO, D.; POZULEO,
2413 J. M. Evaluation of the toxicity of guarana with in vitro bioassays. **Ecotoxicology and**
2414 **environmental safety**, v. 39, p. 164-167, 1998.
- 2415
- 2416 SANTOS, L. P. **Sistema mecanizado de procesamiento pós-colheita de**
2417 **guaraná: nova tecnologia (in Portuguese)**. Comunicado Técnico. Manaus:
2418 Embrapa: 12 p. 2014.
- 2419
- 2420 SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONCALVES, J. F.; MAZZAFERA, P. Guarana:
2421 revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of**
2422 **Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, Oct 28 2013. ISSN 1872-7573
2423 (Electronic)
2424 0378-8741 (Linking). Disponível em: <
2425 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981847> >.
- 2426
- 2427 SCHIMPL, F. C.; KIYOTA, E.; MAYER, J. L.; GONCALVES, J. F.; DA SILVA, J. F.;
2428 MAZZAFERA, P. Molecular and biochemical characterization of caffeine synthase
2429 and purine alkaloid concentration in guarana fruit. **Phytochemistry**, v. 105, p. 25-36,
2430 Sep 2014. ISSN 1873-3700 (Electronic)
2431 0031-9422 (Linking). Disponível em: <
2432 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856135> >.
- 2433
- 2434 SCHOLEY, A.; BAUER, I.; NEALE, C.; SAVAGE, K.; CAMFIELD, D.; WHITE, D.;
2435 MAGGINI, S.; PIPINGAS, A.; STOUGH, C.; HUGHES, M. Acute effects of different
2436 multivitamin mineral preparations with and without guaraná on mood, cognitive
2437 performance and functional brain activation. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3589, 2013.
2438 ISSN 2072-6643. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/9/3589> >.
- 2439
- 2440 SCHOLEY, A.; HASKELL, C. Neurocognitive effects of guaraná plant extract. **Drugs**
2441 **of the Future**, v. 33, n. 10, p. 869, 2008.
- 2442
- 2443 SHARPE, P. A.; GRANNER, M. L.; CONWAY, J. M. Availability of weight-loss
2444 supplements: results of an audit of retail outlets in a southeastern city. **Journal of the**
2445 **American Dietetic Association**, v. 106, n. 12, p. 2045-2051, 2006.
- 2446
- 2447 SILVA, M.; POLONIO, J. C.; QUECINE, M. C.; DE ALMEIDA, T. T.; BOGAS, A. C.;
2448 PAMPHILE, J. A.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic
2449 cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas
2450 and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum*
2451 *gloeosporioides*. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p. 16-22, Sep 2016. ISSN 0882-
2452 4010. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000382422400003 >.
- 2453
- 2454 SILVESTRINI, G. I.; MARINO, F.; COSENTINO, M. Effects of a commercial product
2455 containing guarana on psychological well-being, anxiety and mood: a single-blind,

- 2456 placebo-controlled study in healthy subjects. **Journal of Negative Results in**
2457 **Biomedicine**, v. 12, p. 9, 2013. ISSN 1477-5751 (Electronic)
2458 1477-5751 (Linking). Disponível em: <
2459 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706111> >.
2460
- 2461 SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's journey from regional tonic to aphrodisiac and
2462 global energy drink. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative**, v.
2463 7, n. 3, p. 279-282, 2007.
2464
- 2465 SOMBRA, L. L.; GÓMEZ, M. R.; OLSINA, R.; LUIS, D.; MARTÍNEZ, L. D.; SILVA, M.
2466 F. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid
2467 chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. **Journal of**
2468 **pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, p. 989-994, 2005.
2469
- 2470 SOUSA, S. A.; ALVES, S. F.; PAULA, J. A. M. D.; FIUZA, T. S.; PAULA, J. R.;
2471 BARA, M. T. F. Determination of tannins and methylxanthines in powdered guarana
2472 (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) by high performance liquid chromatography
2473 (in Portuguese). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 866-870,
2474 2010.
2475
- 2476 SOUSA, S. A. D.; PASCOA, H.; CONCEIÇÃO, E. C. D.; ALVES, S. F.; DINIZ, D. G.
2477 A.; PAULA, J. R. D.; BARA, M. T. F. Dissolution test of herbal medicines containing
2478 *Paullinia cupana*: validation of methods for quantification and assessment of
2479 dissolution. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 269-277,
2480 2011.
2481
- 2482 SPINELLA, M. Herbal medicines and epilepsy: the potential for benefit and adverse
2483 effects. **Epilepsy & Behavior**, v. 2, n. 6, p. 524-532, Dec 2001. ISSN 1525-5069
2484 (Electronic)
2485 1525-5050 (Linking). Disponível em: <
2486 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12609386> >.
2487
- 2488 SPOLADORE, D. S.; BOAVENTURA, M. A. M.; SÁES, L. A. Teor de cafeína em
2489 sementes matrizes do guaranazeiro. **Bragantia**, v. 46, n. 2, p. 425-429, 1987.
2490
- 2491 SUFRAMA. **Potencialidades estudo de viabilidade econômica: guaraná (in**
2492 **Portuguese)**. Manaus, Brasil: Superintendência da zona franca de Manaus -
2493 Suframa. Instituto superior de administração e economia ISAE/Fundação Getúlio
2494 Vargas (FGV): 1-34 p. 2003.
2495
- 2496 TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P.; MENEGÁRIO, T. F.;
2497 TOLEDO, M. C. F. Contribution of guaraná powder (*Paullinia cupana*) as a source of
2498 caffeine in the diet (in Portuguese). **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 63-68, 2007.
2499
- 2500 TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Screening for acetylcholinesterase inhibitors
2501 from plants to treat alzheimer's disease (in Portuguese). **Química Nova**, v. 26, n. 3,
2502 p. 301-304, 2003.
2503

- 2504 USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; AUDI, E. A.; P., M. J. C.
2505 Avaliação físico-química de sementes de guaraná secas por diferentes métodos (in
2506 português). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2004.
2507
- 2508 USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS
2509 FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from
2510 seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Acta Farmacéutica Bonaerense**,
2511 v. 26, p. 5-9, 2007.
2512
- 2513 VEIGA, L. L. A.; AMORIM, H.; MORAES, J.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.;
2514 QUITERIO, S. L. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted
2515 guaraná (*Paullinia cupana*) by high-performance liquid chromatography with a
2516 fluorescence detector. **Food Chemistry**, v. 152, p. 612-618, 2014.
2517
- 2518 WANCZINSKI, B. J.; FELIPE, D. F.; CARDOSO, M. L. C.; CAVALCANTI, O. A.
2519 Development of AAS 500 mg tablets influenced by direct compression (CD) process
2520 (in Portuguese). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 3, p. 649-655, 2002.
2521
- 2522 WECKERLE, C. S.; STUTZ, M. A.; BAUMANN, T. W. Purine alkaloids in *Paullinia*.
2523 **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 735-42, Oct 2003. ISSN 0031-9422 (Print)
2524 0031-9422 (Linking). Disponível em: <
2525 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679096> >.
2526
- 2527 WHO. **World Health Organization - Quality control methods for medicinal plant**
2528 **materials**. Geneva 1998.
2529
- 2530 YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.;
2531 UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P.
2532 Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts
2533 and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.
2534
- 2535 YONEKURA, L.; MARTINS, C. A.; SAMPAIO, G. R.; MONTEIRO, M. P.; CESAR, L.
2536 A. M.; MIOTO, B. M.; MORI, C. S.; MENDES, T. M. N.; RIBEIRO, M. L.; ARCARI, D.
2537 P.; TORRES, E. Bioavailability of catechins from guarana (*Paullinia cupana*) and its
2538 effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human
2539 subjects. **Food & Function**, v. 7, n. 7, p. 2970-2978, 2016. ISSN 2042-6496.
2540 Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000380098900004 >.
2541
- 2542 YODIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain:
2543 interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central
2544 nervous system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1683-93, Dec 1
2545 2004. ISSN 0891-5849 (Print)
2546 0891-5849 (Linking). Disponível em: <
2547 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528027> >.
2548
- 2549 ZEIDAN-CHULIA, F.; GELAIN, D. P.; KOLLING, E. A.; RYBARCZYK-FILHO, J. L.;
2550 AMBROSI, P.; TERRA, S. R.; PIRES, A. S.; DA ROCHA, J. B.; BEHR, G. A.;
2551 MOREIRA, J. C. F. Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and
2552 guarana) exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing
2553 reactive oxygen species production. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v.

2554 2013, p. 1-22, 2013. ISSN 1942-0994 (Electronic). Disponível em: <
2555 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23766861>>.

**4. CAPÍTULO 2: Sementes de guaraná
(*Paullinia cupana*): extração supercrítica
seletiva de compostos fenólicos**



Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds

Leila Larisa Medeiros Marques^a, Gean Pier Panizzon^a, Bruna Aparecida Alves Aguiar^a, Ane Stéfano Simionato^b, Lucio Cardozo-Filho^c, Galdino Andrade^b, Admilton Gonçalves de Oliveira^b, Terezinha Aparecida Guedes^d, João Carlos Palazzo de Mello^a.  

2556 ^aDepartamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790,
2557 BR-87020-900, Maringá, Paraná, Brasil *Autor para correspondência. Tel.: +55 44
2558 3011 4816; Fax: +55 44 3011 5050. E-mail: mello@uem.br (J. C. P. de Mello)

2559 ^bDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
2560 Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid Km 380, BR-86057-970, Londrina,
2561 Paraná, Brasil

2562 ^cDepartamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Av.
2563 Colombo 5790, BR-87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

2564 ^dDepartamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo
2565 5790, BR-87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

2566 **Resumo**

2567 Aproximadamente 70% da produção brasileira de sementes de guaraná (*Paullinia*
2568 *cupana*) são absorvidas pelas indústrias de bebidas. O guaraná tem várias
2569 propriedades farmacológicas, como: estimulante, antimicrobiano, quimioprolático,
2570 antígenotóxico, antidepressivo e antiamnésico. A extração com dióxido de carbono
2571 supercrítico de compostos bioativos das sementes de guaraná foi realizada e
2572 otimizada por um planejamento estatístico de matriz ortogonal ($OA_9(3^4)$). Os fatores
2573 /níveis estudados foram: modificador (es) (etanol e/ou metanol), tempo de extração
2574 (20, 40 e 60 min), temperatura (40, 50 e 60 °C) e pressão (100, 200 e 300 bar). O
2575 delineamento estatístico foi repetido proporções crescentes de modificadores. A
2576 percentagem de modificador utilizada foi proporcional à quantidade de compostos
2577 polares extraídos. A melhor condição para a extração supercrítica, baseado no
2578 conteúdo em polifenóis, quantificação de catequina e epicatequina, rendimento e
2579 custo operacional, mostrou ser: 40% etanol:metanol durante 40 min sob 40 °C e 100
2580 bar. A temperatura teve um efeito significativo no total de conteúdo de polifenóis
2581 totais.

2582

2583 **Palavras-chave:** *Paullinia cupana*, guaraná, polifenóis, extração supercrítica, matriz
2584 ortogonal, modificador.

2585

2586 Compostos químicos estudados neste artigo:

2587 Cafeína (PubChem CID: 2519); Catequina(PubChem CID: 9064); Epicatequina
2588 (PubChem CID: 72276); Pirogalol (PubChem CID:1057).

2589 Mais informações estão disponíveis em: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

2590

2591 **Abreviações e siglas**

2592 (AMH): ágar Mueller Hinton

2593 (Anvisa): Agência Nacional de Vigilância Sanitária

2594 (ATCC): *American type culture collection*

2595 (CIM): concentração inibitória mínima

2596 (CMH): caldo Mueller Hinton

2597 (CPT): conteúdo em polifenóis totais

2598 (DMO): delineamento de matriz ortogonal

2599 (EFS): extração com fluido supercrítica

2600 (mg EP g sementes⁻¹): miligramas de equivalente em pirogalol por grama de
2601 semente2602 (OA₉(3⁴)): um total de nove corridas por experimento com quatro variáveis a três
2603 níveis2604 (SAMR): *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

2605 (UFC): unidades formadoras de colônia

2606 (MEV): microscopia eletrônica de varredura

2607

2608 4.1. Introdução

2609 O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) é uma planta brasileira
2610 originalmente da região amazônica. Suas sementes torradas têm sido utilizadas por
2611 tribos indígenas, em razão de suas propriedades estimulantes, afrodisíacas e para
2612 dores de cabeça (HENMAN, 1982). Devido ao alto potencial desta planta, bem como
2613 suas características medicinais e rentabilidade, o guaraná tem se tornado uma
2614 matéria prima importante para as indústrias de cosméticos e de refrigerantes. O
2615 Brasil é o maior produtor de guaraná no mundo, com uma área plantada de 15.182
2616 ha e uma produção de 3.658 t em 2015 (ANDERSEN e FOGH, 2001; IBGE, 2016;
2617 SCHIMPL et al., 2013). Aproximadamente 70% da produção é utilizada na indústria
2618 de refrigerantes e bebidas energéticas (SUFRAMA, 2013).

2619 O guaraná tem uma ampla variedade de propriedades farmacológicas,
2620 incluindo atividades anticarcinogênica (FUKUMASU et al., 2008) antiproliferativa
2621 (HERTZ et al., 2015), antimicrobiana, antioxidante (BASILE et al., 2005; YAMAGUTI-
2622 SASAKI et al., 2007), citoprotetora (SCHIMPL, DA SILVA, GONCALVES, 2013),
2623 estimulante, termogênica (ANDERSEN e FOGH, 2001), antidepressiva (AUDI e
2624 MELLO, 2000) e ansiolítica (RANGEL, MELLO e AUDI, 2013). O guaraná também é
2625 usado na prevenção de doenças orais (Yamaguti-Sasaki et al., 2007), redução de
2626 efeitos oxidativos e desordens metabólicas (PORTELLA et al., 2013), além de outros
2627 propósitos (SCHIMPL, DA SILVA, GONCALVES, 2013).

2628 Além da alta percentagem (2,5–6%) de cafeína (1,3,7-tri-metilxantina)
2629 (HECKMAN, WEIL e MEJIA, 2010), as sementes de guaraná contém menores
2630 proporções de alcaloides purínicos, teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-
2631 dimetilxantina) (ANVISA, 2010). As sementes também contém uma alta
2632 concentração de polifenóis, particularmente de proantocianidinas (USHIROBIRA et
2633 al., 2007; Yamaguti-Sasaki et al., 2007). Os extratos obtidos por Ushirobira e
2634 colaboradores (2007) e Yamaguti-Sasaki e colaboradores (2007) foram
2635 padronizados por Klein, Longhini e Mello (2012), bem como a produção de
2636 comprimidos (KLEIN et al., 2015).

2637 Vários estudos (CASTRO-VARGAS et al., 2010; WANG et al., 2011) têm
2638 utilizado a extração supercrítica para obter compostos bioativos de produtos
2639 naturais. Entretanto, não há relatos na literatura sobre a extração supercrítica de
2640 polifenóis a partir de sementes de guaraná.

2641 A extração supercrítica (EFS) pode ser uma alternativa ambientalmente correta
2642 à extração convencional com solventes orgânicos, que utiliza grande quantidade de
2643 solvente, maior tempo consumido e considerável tratamentos de resíduos. Os
2644 processos SFE são rápidos, seletivos e os produtos livres de solventes residuais
2645 (LANG e WAI, 2001). Uma das principais características de um fluido supercrítico é a
2646 possibilidade de modificar a densidade do fluido, alterando sua pressão e/ou sua
2647 temperatura, e assim também alterando sua solubilidade (HERRERO, CIFUENTES
2648 e IBÁÑEZ, 2006). O CO₂ utilizado como fluido supercrítico é considerado seguro,
2649 não tóxico, não carcinogênico, não inflamável, inerte, facilmente disponível em alta
2650 pureza, de baixo custo, tem baixa tensão superficial e baixa viscosidade com alta
2651 difusividade e ainda possui condições críticas moderadas (31,1 °C; 7,38 MPa)
2652 (HUANG, SHI e JIANG, 2012). Ainda, para melhorar a extração de compostos
2653 polares devido à característica não polar do CO₂, adicionam-se ao sistema,
2654 modificadores como álcoois (metanol e etanol), por exemplo, para aumentar o seu
2655 poder de solvatação (HUANG, SHI e JIANG, 2012). A adição destes modificadores
2656 frequentemente melhora à extração de materiais sólidos pela quebra de ligação
2657 entre o soluto e matriz da planta, diminuindo a resistência de transferência de massa
2658 nas extrações (LANG e WAI, 2001).

2659 O delineamento de matriz ortogonal (DMO) é um planejamento fatorial
2660 fracionário com uma série de ensaios atribuídos em uma matriz ortogonal. Este
2661 planejamento pode reduzir consideravelmente o número de experimentos porque
2662 quando o efeito de um fator é calculado, a influência dos outros é removida da
2663 consideração. Várias aplicações deste método têm sido relatadas (LIU et al., 2013;
2664 Wang et al., 2011).

2665 A bactéria *Staphylococcus* spp. faz parte da microflora normal da pele, mas
2666 pode comportar-se como um patógeno oportunista que pode causar infecções
2667 graves. O *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SAMR) é um das
2668 preocupações mais importantes em saúde pública. A resistência a antimicrobianos
2669 tem se tornado um problema mundial, impulsionando esforços para identificar novas
2670 fontes de compostos antimicrobianos, como os metabólitos secundários de plantas
2671 (BARRECA et al., 2014).

2672 O objetivo deste trabalho foi obter extratos supercríticos de sementes de *P.*
2673 *cupana* por meio de DMO, e investigar os efeitos de temperatura, pressão, tempo de
2674 extração e modificadores a fim de desenvolver condições ótimas de extração. Para

2675 isto, foi avaliado o rendimento, composição em termos de conteúdo fenólico e a
2676 quantificação dos principais compostos destes extratos por CLAE.

2677

2678 **4.2. Material e métodos**

2679 *4.2.1 Matéria-prima, amostragem e controle de qualidade*

2680 As sementes torradas de *P. cupana* foram adquiridas do Sr. José Augusto de
2681 Souza, do Estado de Mato Grosso, região de Alta Floresta, Sítio Nossa Senhora
2682 Aparecida, Rodovia MT 325, km 8 (9°58'06.3"S 56°06'46.9"W), Brasil. Uma excisata
2683 (HUEM N. 9065) foi depositada no Herbário, Departamento de Biologia,
2684 Universidade Estadual de Maringá. A professora Dra. Cássia Mônica Sakuragui fez a
2685 identificação da planta. Estas sementes foram moídas em moinho de martelos
2686 (Tigre, ASN5). As partículas foram medidas e seu diâmetro calculado. O teor de
2687 umidade foi determinado por gravimetria usando uma balança analítica (Ohaus,
2688 MB35) equipada com um sistema de secagem por infravermelho. As análises de
2689 controle de qualidade das sementes incluem o teor de extrativos, perda por
2690 dessecação, cinzas totais, teor de metilxantinas e teor de polifenóis totais (ANVISA,
2691 2010). Todas as análises foram efetuadas em quintuplicata.

2692

2693 *4.2.2 Procedimento de extração*

2694 As extrações foram efetuadas partindo-se de 17 g de sementes moídas e
2695 tamisadas ao seu diâmetro médio ($0,47 \pm 0,02$ mm). As amostras foram pesadas e
2696 colocadas em vasos de extração em aço inox, de 25 mL de volume total. A extração
2697 automatizada foi realizada no extrator supercrítico MV-10 ASFE System, Waters,
2698 equipado com o Software ChromScope. CO₂ supercrítico foi utilizado com adição de
2699 modificadores na vazão total de 6 mL min⁻¹. Os modificadores utilizados para
2700 extração foram o etanol (Merck) e metanol, (JTBaker), ambos de grau
2701 cromatográfico. A temperatura selecionada foi mantida constante e o produto da
2702 separação foi alcançado por despressurização. Após a extração, os extratos foram
2703 liofilizados (Christ, Alpha 1-4LD) e mantidos sob refrigeração a -4°C.

2704 Também foi realizada uma extração convencional com o mesmo lote de
2705 sementes de guaraná de acordo com Klein, Longhini e Mello (2012).

2706

2707 4.2.3 Delineamento experimental

2708 As razões para a escolha dos níveis no planejamento estatístico utilizado para
2709 este estudo (Tabela 4.1) foram baseadas principalmente em: 1) informação
2710 disponível na literatura (CASTRO-VARGAS, VARELA, FERREIRA, 2010; Liu et al.,
2711 2013; Wang et al., 2011); 2) análises de condições de operação do equipamento de
2712 extração; e 3) considerações quanto à segurança da extração. Três experimentos
2713 (X, Y e Z) foram conduzidos, cada um contendo quatro variáveis em três níveis, num
2714 total de nove corridas por experimento ($OA_9(3^4)$). As variáveis independentes
2715 (fatores) foram: modificador (etanol e/ou metanol), tempo de extração (20, 40 e 60
2716 min), temperatura (40, 50 e 60 °C) e pressão (100, 200 e 300 bar). O teor de
2717 polifenóis totais (CPT) e rendimento foram investigados em três níveis para cada
2718 fator nos experimentos X, Y e Z. Os experimentos diferiram somente na
2719 percentagem do modificador utilizada, que foi de 10, 20 e 40%, para os
2720 experimentos X, Y e Z, respectivamente. Estas percentagens foram fixadas pelo CO₂
2721 supercrítico por meio do ajuste da vazão do sistema. A mistura de modificadores foi
2722 constantemente usada em uma proporção de 1:1 (metanol: etanol; v/v). Todos os
2723 experimentos foram realizados em triplicata.

2724 Todas as combinações dos fatores temperatura e pressão foram escolhidas
2725 para garantir que as extrações ocorressem em níveis acima das curvas (TOCHIGI et
2726 al., 2010) de equilíbrio líquido vapor para o sistema binário (CO₂:etanol ou
2727 CO₂:metanol) ou para o sistema terciário (CO₂:metanol:etanol). As condições de
2728 temperatura e pressão escolhidas para os solventes de extração consideraram
2729 apenas os valores de pressão de saturação para a temperatura de interesse.

2730 2731 4.2.4 Determinação do teor de polifenóis totais (CPT) dos extratos

2732 O CPT dos extratos obtidos no item 4.2.2 foi realizado utilizando o reagente de
2733 Folin-Ciocalteu, de acordo com procedimentos de Singleton, Orthofer e Lamuela-
2734 Raventós (1999), com poucas modificações. Em resumo, 240 µL da amostra diluída
2735 foram misturadas a 120 µL de reagente de Folin Ciocalteu. A solução foi diluída até
2736 um volume total de 1560 µL usando água ultrapura (Milli-Q, Millipore). Depois de 5
2737 min à temperatura ambiente foram misturados 1440 µL de solução a 10,75%
2738 Na₂CO₃, seguida por incubação por 30 min à temperatura ambiente. A absorvância
2739 foi lida a 760 nm usando um espectrofotômetro (USB 2000+, Ocean Optics). Como
2740 recomendado pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010), o pirogalol foi utilizado

2741 como padrão. O intervalo de 1,6–4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi usado para obter a curva de
2742 calibração. Todas as etapas foram realizadas ao abrigo da luz. O CPT dos extratos
2743 foi expresso em miligramas de equivalente em pirogalol por grama de sementes de
2744 guaraná ($\text{mg EP g sementes}^{-1}$).

2745

2746 4.2.5 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência

2747 Os principais componentes dos extratos obtidos no Item 2.2 foram analisados
2748 usando CLAE. Para esta análise, os extratos liofilizados foram previamente
2749 desengordurados. Primeiramente, as amostras foram pesadas (Shimadzu AUW
2750 220D) e lavadas com 1 mL de *n*-hexane (Synth), centrifugadas (Eppendorf 5415R)
2751 por 15 min a 15,710 g, e após, o sobrenadante foi descartado. O procedimento de
2752 lavagem e centrifugação foi repetido três vezes. Depois da secagem à temperatura
2753 ambiente em estufa a vácuo (Binder), as amostras foram pesadas novamente.

2754 Utilizou-se o sistema HPLC Waters Alliance 2695 (Milford, MA), equipado com
2755 controle de temperatura da coluna, desgaseificador em linha, bomba quaternária,
2756 amostrador automático e detector de arranjo de diodos (PDA) (Waters 2998). A
2757 aquisição de dados, análise e relatórios foram realizados utilizando software
2758 Empower 3 (Milford, MA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada como
2759 proposto por Klein, Longhini e Mello (2012) com algumas modificações. Utilizou-se
2760 uma coluna Gemini C18 (Phenomenex[®], 4,6 mm x 250 mm, 5 μm) equipada com
2761 coluna de guarda (Phenomenex C18 column, 4,6 mm x 3 mm, 4 μm) mantidas a
2762 25°C. A fase móvel usada foi composta por 0,05% de TFA em água ultrapurificada
2763 (Fase A) e 0,05% TFA em acetonitrila (fase B) desgaseificada, utilizando um banho
2764 ultrassônico até dissolução completa. O fluxo empregado foi de 0,8 mL min^{-1} . O
2765 sistema gradiente empregado para a separação dos compostos foi: fase de lavagem
2766 (100% A por 5 min); 5,01 min-20 min – 85% da fase A e 15% da fase B. O volume
2767 de injeção foi de 25 μL . As amostras desengorduradas foram diluídas em metanol
2768 30%. Os cromatogramas da cafeína foram obtidos no comprimento de onda de 280
2769 nm e os cromatogramas da catequina e epicatequina em 210 nm.

2770 Para avaliação da linearidade foram obtidas curvas analíticas de soluções de
2771 trabalho mistas, na faixa de 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cafeína, catequina e
2772 epicatequina (Sigma) ($n = 5$). A precisão foi determinada por meio de análises de
2773 recuperação, adicionando quantidades de cafeína (9, 27 e 46 $\mu\text{g mL}^{-1}$), catequina

2774 (18, 27 e 53 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e epicatequina (15, 32, e 54 $\mu\text{g mL}^{-1}$) às amostras da solução
2775 de extração. O coeficiente de variação foi sempre menor que 5%.

2776 O método analítico para quantificação da cafeína, catequina e epicatequina
2777 relatado neste estudo foi validado de acordo com as diretrizes estabelecidas pela
2778 Conferência Internacional sobre a Harmonização dos Requisitos Técnicos para o
2779 Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH, 2005) e pela
2780 regulamentação brasileira (ANVISA, 2003).

2781 Resumidamente, as medições intra- e interdía mostraram que o método é
2782 preciso. A seletividade foi investigada por meio da análise do espectro de UV (200 a
2783 500 nm) das amostras e os padrões de referência, adquiridos pelo PDA. Os
2784 espectros no UV das amostras não diferiram significativamente dos valores das
2785 normas de referência, indicando a especificidade do método. Os limites de
2786 quantificação e detecção para cafeína, catequina e epicatequina foram: 2,25 e 0,68
2787 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,55 e 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,52 e 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

2788

2789 4.2.6 *Cepa bacteriana e condições de cultivo*

2790 As linhagens *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (SAMR) N315
2791 (KURODA et al., 2001) e *Staphylococcus aureus* ATCC 29123 utilizadas nos
2792 experimentos de atividade antibacteriana foram depositas na Coleção de Cultura
2793 Microbiana do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de
2794 Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. A
2795 cepa foi estocada em Caldo Mueller Hinton cátion-ajustado (CMH) estéril a -20 °C,
2796 com 30% de glicerol estéril. A bacteria foi rotineiramente mantida a 4 °C em placas
2797 de ágar Mueller Hinton (AMH) e subcultivadas em ágar Mueller Hinton a 37 °C antes
2798 de cada ensaio.

2799

2800 4.2.7 *Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)*

2801 Os nove extratos supercríticos do experimento Z foram avaliados quanto à
2802 atividade antimicrobiana. Como um controle, o extrato bruto de sementes de
2803 guaraná obtido por extração convencional, de acordo com Klein, Longhini e Mello
2804 (2012), foi avaliado.

2805 A CIM das frações foi determinada de acordo com o procedimento de CLSI
2806 (CLSI, 2011) a um inóculo final de 5×10^4 unidades formadoras de colônias (UFC)
2807 mL^{-1} . Foram realizadas diluições 2X seriadas das frações numa placa de

2808 microdiluição (96 poços), contendo 100 mL de CMH estéril cátion-ajustado. Em
2809 seguida, o inóculo foi adicionado a cada poço. As microplacas foram incubadas a 37
2810 °C durante 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração que resultou na
2811 inibição do crescimento. O experimento foi realizado em triplicata e repetido três
2812 vezes. Soluções estoques das frações foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO;
2813 Sigma-Aldrich®, St. Louis, Mo., U.S.A.) e testados em concentrações de 125 a 0,24
2814 µg mL⁻¹. A solução foi esterilizada com um filtro de membrana 0,22 µm (Millipore). O
2815 DMSO foi avaliado e não afetou a atividade antibacteriana.

2816

2817 4.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

2818 O extrato supercrítico de sementes de guaraná que originou a partir do
2819 tratamento 3 do experimento Z foi escolhido para esta análise. A MEV foi utilizada
2820 para observar a morfologia celular. Culturas de colônias de SAMR N315 crescidas
2821 em AMH (24 h, 37 °C) foram transferidas para o CMH e a densidade da célula foi
2822 ajustada a 10⁸ UFC mL⁻¹. Um mililitro de suspensão celular foi distribuído em dois
2823 tubos. No primeiro, o extrato de guaraná foi adicionado na CIM. O segundo tubo foi
2824 considerado como controle, isto é, a cultura não tinha o extrato de guaraná. As
2825 culturas foram incubadas a 37 °C, 150 rpm por 3 h. Depois da incubação, 10 µL de
2826 cada cultura e 10 µL da solução fixadora (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em
2827 0,1 M tampão cacodilato de sódio, pH 7,2) foram adicionados em lâminas de vidro
2828 revestidas com poli-L-lisina. Depois de 30 min, cada lâmina recebeu 500 µL de
2829 solução fixadora por 4 h, seguido de pós-fixação em 1% OsO₄ por 1 h. As amostras
2830 fixadas foram desidratadas em gradiente de etanol (70, 80, 90 e 100 °GL). As
2831 amostras foram secas ao ponto crítico com CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point
2832 Dryer), revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas ao
2833 microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

2834

2835 4.2.9 Análise estatística

2836 Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos dos
2837 experimentos foram expressos como média ± DP (desvio padrão). A análise
2838 estatística foi realizada pelo *Statistical Analysis System* (SAS, versão 9.3).
2839 Posteriormente, o teste de Tukey foi utilizado para análise de variância, para
2840 comparar as médias de CPT, rendimento e os principais compostos presentes nos
2841 extratos. As diferenças entre as médias de diferentes níveis foram analisadas

2842 utilizando o teste de Tukey, e os valores médios foram considerados
2843 significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Estes resultados foram ainda utilizados
2844 na análise de superfície de resposta.

2845

2846 **4.3. Resultados e discussão**

2847 *4.3.1 Controle de qualidade da droga*

2848 O controle de qualidade das sementes do guaraná foi realizado para assegurar
2849 que elas estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, já que a
2850 composição química pode variar com o clima, genética, solo e condições de
2851 estocagem, entre outros fatores.

2852 Os resultados obtidos das análises de controle de qualidade foram: umidade
2853 ($8,84 \pm 0,37\%$), diâmetro médio da partícula ($0,47 \pm 0,02$ mm), teor de extrativos
2854 ($29,71 \pm 0,89\%$), cinzas totais ($1,42 \pm 0,05\%$), teor de metilxantinas ($5,13 \pm 0,27\%$) e
2855 conteúdo em polifenóis totais ($9,25 \pm 0,15\%$). Todas as análises de controle de
2856 qualidade da droga vegetal confirmaram que as sementes torradas estão dentro das
2857 especificações estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010).

2858

2859 *4.3.2 Rendimento*

2860 O rendimento (massa do extrato dividido pela massa de matéria prima,
2861 multiplicado por 100) obtido nos experimentos X, Y e Z são relatados na Tabela 4.1.
2862 Os resultados demonstraram que aumentando a percentagem de modificador
2863 produziu maior rendimento, como evidenciado no experimento Z, em que quatro
2864 tratamentos (dois, três, seis e nove) alcançaram valores máximos, permanecendo
2865 estatisticamente similares.

2866

2867 *4.3.3 Conteúdo em polifenóis totais (CPT)*

2868 Neste estudo, três percentagens de modificadores (etanol e/ou metanol) – 10,
2869 20 e 40% – foram escolhidos para os experimentos X, Y e Z, respectivamente. As
2870 percentagens de modificadores, combinado com os níveis escolhidos para os
2871 fatores, alcançaram áreas acima da pressão e temperatura críticas da mistura
2872 (modificador e CO_2).

Tabela 4.1. Resultados obtidos utilizando o delineamento $OA_9(3^4)$.

Corrida	Fatores/Níveis				Experimento X*		Experimento Y*		Experimento Z*	
	Modifica dor (%)	Tempo de extração (min)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rendimento (%) **	CPT (mg EP g sementes ⁻¹) ***	Rendimento (%) **	CPT (mg EP g sementes ⁻¹) ***	Rendimento (%) **	CPT (mg EP g sementes ⁻¹) ***
1	etanol	20	40	100	1,15±0,02 ^e	6,00±0,09 ^g	1,35±0,05 ^e	20,27±0,08 ^h	1,76±0,06 ^e	86,13±0,24 ^c
2	metanol	60	40	200	2,31±0,04 ^{abc}	8,64±0,04 ^d	3,42±0,14 ^a	47,91±0,19 ^b	3,59±0,16 ^a	78,29±0,41 ^d
3	etanol: metanol	40	40	300	2,14±0,12 ^{bc}	8,15±0,08 ^e	2,49±0,14 ^{bc}	36,46±0,37 ^e	3,93±0,20 ^a	105,76±1,09 ^a
4	etanol	40	50	200	2,35±0,05 ^{ab}	16,99±0,05 ^a	2,29±0,03 ^c	36,30±0,10 ^e	3,14±0,16 ^c	84,63±0,88 ^c
5	metanol	20	50	300	2,12±0,10 ^c	5,81±0,17 ^g	2,38±0,09 ^c	44,03±0,46 ^c	2,86±0,12 ^b	67,70±1,03 ^f
6	etanol: metanol	60	50	100	1,53±0,09 ^d	9,65±0,17 ^c	2,73±0,11 ^b	32,13±0,47 ^g	3,93±0,11 ^a	88,90±0,03 ^b
7	etanol	60	60	300	2,17±0,10 ^{bc}	10,90±0,11 ^b	1,73±0,08 ^d	58,04±0,05 ^a	2,47±0,13 ^d	68,64±0,90 ^{ef}
8	metanol	40	60	100	1,47±0,02 ^d	7,09±0,08 ^f	1,39±0,07 ^e	37,92±0,51 ^d	3,03±0,11 ^b	69,88±0,88 ^e
9	etanol: metanol	20	60	200	2,46±0,12 ^a	7,28±0,09 ^f	3,61±0,15 ^a	33,91±0,07 ^f	3,78±0,02 ^a	66,92±0,28 ^f

Valores na **mesma coluna** seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

*Três percentagens de modificadores foram escolhidas para os experimentos X, Y e Z: 10, 20 e 40%, respectivamente

**Rendimento do extrato (razão entre a massa do extrato e a massa da matéria prima, multiplicado por 100) em percentagem de extrato seco obtido a partir de 17 g de sementes de guaraná por EFS

***O teor de polifenóis totais (CPT) foi expresso em miligramas de equivalente de pirogalol por grama de sementes de guaraná (mg EP g sementes⁻¹).

2873 Com o objetivo de extrair compostos fenólicos, muitos autores optaram pela
2874 adição de modificadores como etanol, metanol ou sua mistura para facilitar a
2875 extração destes compostos de diversas plantas. Nestes estudos, as percentagens
2876 de modificadores utilizadas foram 2% (MURGA et al., 2000), 10% (CASTRO-
2877 VARGAS, VARELA, FERREIRA, 2010), 70% e até 99,8% (CHANG et al., 2000).
2878 Marostica-Junior, Leite e Dragano (2010) afirmam que tanto metanol quanto etanol
2879 mostraram resultados qualitativamente semelhantes.

2880 Recentemente, Hsieh, Windmann e Vrabec (2013) estudaram o comportamento
2881 de fase a altas pressões de cinco misturas de CO₂ + álcoois (metanol, etanol, 1-
2882 propanol, 1-butanol e 1-pentanol) e concluíram que as linhas de saturação dos
2883 líquidos são próximos um dos outros. Portanto, a escolha para adicionar um
2884 segundo solvente para a fase supercrítica é baseada principalmente na afinidade
2885 ajustável entre solutos e solventes. Ting, Macnaughton, Tomasko e Foster (1993)
2886 determinaram a variação das propriedades críticas de uma mistura de CO₂
2887 supercrítico com vários modificadores. Eles verificaram que a adição de álcoois
2888 aumentou gradualmente a temperatura crítica da mistura, isto também ocorreu com
2889 o aumento da percentagem destes modificadores.

2890 Os valores de CPT aumentaram significativamente nos experimentos X, Y e Z,
2891 de 5,81 a 16,99; 20,27 a 58,04; e 66,92 a 105,76 mg EP g sementes⁻¹,
2892 respectivamente (Tabela 4.1). Similarmente, o valor de CPT foi mais alto quando se
2893 utilizou o modificador a 40%. Os valores foram estatisticamente significantes, e os
2894 valores absolutos diferiram em até 18 vezes entre os experimentos Z e X, e em até 5
2895 vezes entre Z e Y. Estes resultados confirmam a importância do modificador
2896 utilizado. Os dados da tabela 4.1 indicam que o tratamento 3 no experimento Z
2897 forneceu o maior valor absoluto para CPT (mg EP g sementes⁻¹). O tratamento 3
2898 utilizou a seguinte combinação: etanol:metanol, 40 min, 40 °C e 300 bar.

2899 Os valores de CPTs dos extratos obtidos neste trabalho e aqueles obtidos por
2900 Basile e colaboradores (2005) são diferentes e não comparáveis porque eles são
2901 lotes de matérias-primas distintos. Outra dificuldade em comparação dos resultados
2902 obtidos por este trabalho é que a extração de polifenóis a partir de sementes de
2903 guaraná por tecnologia supercrítica é inédita.

2904 Outras análises importantes foram as médias de valores de CPT nos três níveis
2905 para cada fator, nos três experimentos, e a análise de Tukey, como mostrado na

2906 Tabela 4.2. Nesta análise, um fator foi escolhido e os outros anulados para que se
2907 tenha comparação dos três níveis sem a interferência dos outros fatores.

Tabela 4.2. Valores médios de CPT (mg EP g sementes⁻¹) em níveis por fator (modificador, tempo de extração, temperatura, e pressão), nos experimentos X, Y e Z.

Experimentos	Fatores	Níveis		
		1	2	3
X		11,29±4,77 ^a	7,18±1,23 ^c	8,36±1,05 ^b
Y	Modificador	38,20±16,42 ^b	43,28±4,38 ^a	34,17±1,91 ^c
Z		79,80±8,42 ^b	71,96±4,89 ^c	87,19±16,87^a
X	Tempo de	6,36±0,70 ^c	10,74±4,70 ^a	9,73±0,99 ^b
Y	Extração	32,76±10,33 ^c	36,89±0,83 ^b	46,02±11,31 ^a
Z		73,58±9,43 ^c	86,76±15,64^a	78,61±8,79 ^b
X	Temperatura	7,59±1,22 ^c	10,81±4,92 ^a	8,42±1,86 ^b
Y		34,88±12,03 ^c	37,48±5,23 ^b	43,29±11,20 ^a
Z		90,06±12,27^a	80,41±9,73 ^b	68,48±1,44 ^c
X	Pressão	7,58±1,63 ^c	10,97±4,55 ^a	8,29±2,21 ^b
Y		30,11±7,80 ^c	39,37±6,49 ^b	46,18±9,49 ^a
Z		81,64±8,91^a	76,61±7,78 ^c	80,70±18,82 ^b

*Valores na **mesma linha** seguidos de letras diferentes são significantemente diferentes ($p < 0,05$).
Valores mais altos estão mostrados em negrito.

2908 Os experimentos X, Y e Z (Tabela 4.2) variaram de acordo com o melhor
2909 modificador, em virtude da percentagem de modificador empregada. Na menor
2910 percentagem, o etanol (10%) forneceu os melhores resultados do que o metanol e a
2911 mistura 1:1 (etanol:metanol) na mesma percentagem. Por outro dado, o metanol foi
2912 o melhor quando utilizado a percentagem de 20% (experimento Y). Entretanto, a
2913 mistura de ambos (etanol e metanol) a 40% alcançou a melhor média de CPT
2914 comparado ao etanol ou metanol, usado separadamente e nas mesmas
2915 percentagens (experimento Z).

2916 Nos experimentos X, Y e Z, variando somente o tempo de extração, a média de
 2917 CPT foi sempre menor quando o menor o tempo de extração foi utilizado. Isto
 2918 indicou que é necessário um tempo de extração de pelo menos 40 min para um
 2919 maior valor de CPT no delineamento estatístico utilizado neste trabalho.

2920 No experimento Z, maiores valores de CPT foram alcançados com a menor
 2921 temperatura (40 °C). Esta baixa temperatura diminui a probabilidade de inativação
 2922 de substância no extrato (DAI e MUMPER, 2010). Da mesma forma, o experimento
 2923 Z, com a menor pressão (100 bar), foi a escolha para a melhor condição de
 2924 extração, por razões de segurança, custo operacional e em função do valor de CPT.

2925 As análises listadas na Tabela 4.2 também estão mostradas na Figura 4.1. A
 2926 análise de superfície de resposta fixou dois fatores (temperatura e tempo de
 2927 extração) a níveis que alcançaram o maior valor de CPT e examinou os resultados
 2928 de mudanças em outros dois fatores (pressão e modificador).

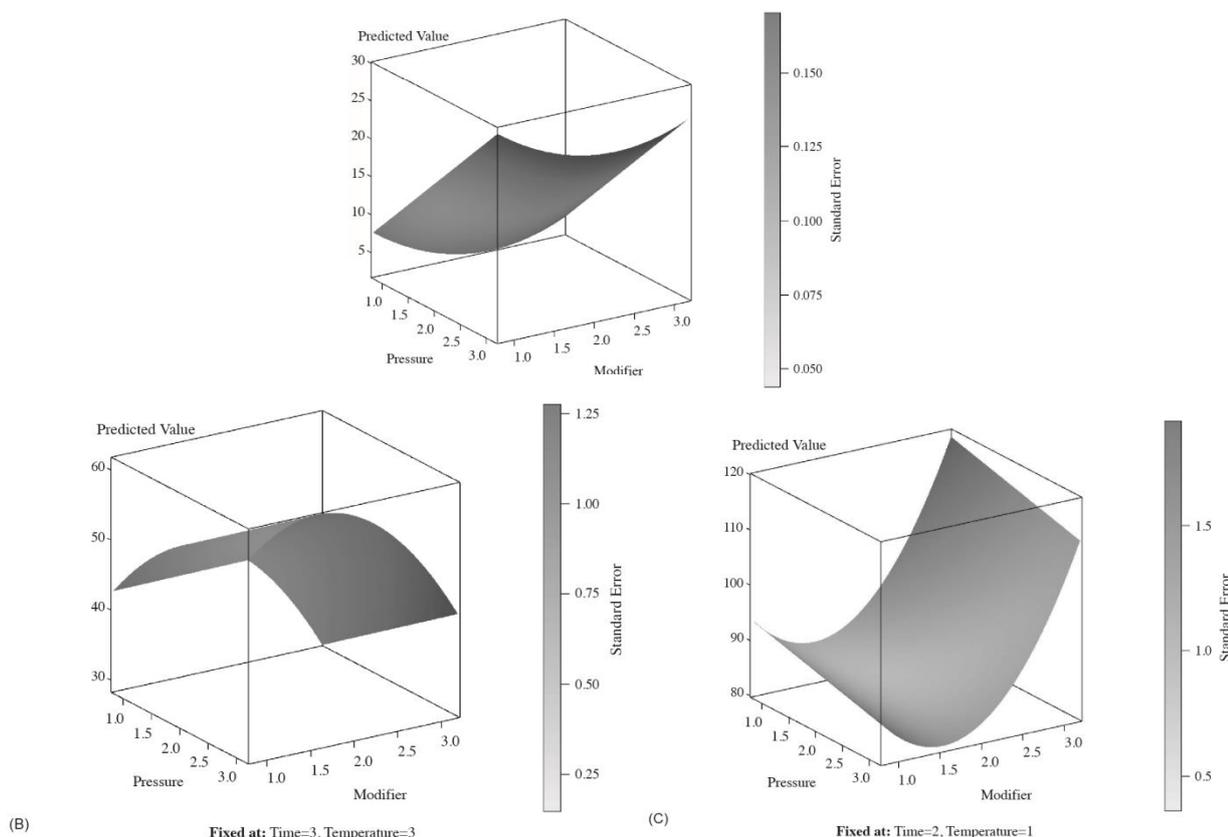


Figura 4.1. Análise de superfície de resposta para a extração supercrítica de polifenóis totais de sementes de guaraná (mg EP g sementes⁻¹), definindo os seguintes fatores: **(A) Experimento X.** Tempo de Extração = 2 (40 min) e Temperatura = 2 (50°C); **(B) Experimento Y.** Tempo de Extração = 3 (60 min) e Temperatura = 3 (60°C); **(C) Experimento Z.** Tempo de Extração = 2 (40 min) e Temperatura = 1 (40°C).

2929 Deste modo, ao fixar a temperatura mais baixa (40 °C) e um tempo de extração
 2930 de 40 min, a melhor condição de extração foi a mistura de etanol:metanol a 40% e
 2931 100 bar. Esta condição foi definida pela combinação dos resultados experimentais,
 2932 com a análise estatística baseada no planejamento de matriz ortogonal empregado.

2933 A resposta da análise de superfície de resposta confirmou os resultados da
 2934 Tabela 4.3. Esta tabela analisa os dados brutos da Tabela 4.1, definido para cada
 2935 fator. E é por meio da Tabela 4.3 que é possível identificar a ordem de importância
 2936 ou a eficácia dos quatro fatores, baseados no valor de R. A temperatura foi
 2937 considerada o fator mais importante, seguido pelo modificador e tempo de extração,
 2938 e por último a pressão.

Tabela 4.3. Análise dos resultados do delineamento estatístico $OA_9(3^4)$.

	CPT (mg EP g sementes⁻¹)			
	Modificador (A)	Tempo de Extração (B)	Temperatura (C)	Pressão (D)
K_1	239,40 ^a	220,75	270,18	244,91
K_2	145,99	260,27	241,23	229,84
K_3	261,18	235,83	205,44	242,10
k_1	79,80 ^b	73,58	90,06	81,64
k_2	71,96	86,76	80,41	76,61
k_3	87,06	78,61	68,48	80,70
R	15,10 ^c	13,18	21,58	5,03
Nível Ótimo ^d	3	2	1	1
Sequência ^e	2	3	1	4

^a $K_i^A = \sum$ a quantidade de compostos alvo em A_i ; ^b $k_i^A = K_i^A/3$; ^c $R_i^A = \max \{ k_i^A \} - \min \{ k_i^A \}$; ^d O nível em que a média de TPF foi mais alta; ^e A ordem de importância ou eficácia dos quatro fatores sobre CPT, de acordo com o valor de R.

2939 *4.3.4 Análise dos extratos por CLAE*

2940 Na análise dos principais compostos presentes no extrato de guaraná usando CLAE
2941 (Tabela 4.4), a quantidade de cafeína progressivamente diminuiu do experimento X
2942 para o experimento Z. Portanto, a quantidade de cafeína extraída é inversamente
2943 proporcional à percentagem do modificador empregada. Assim, o tratamento 7 (60
2944 min, 60 C e 300 bar) do experimento X, que utilizou 10% de etanol, parece ser uma
2945 alternativa razoável para a extração de cafeína. Estes resultados são semelhantes
2946 aos outros que mostraram que a solubilidade de cafeína aumenta com o aumento
2947 das temperaturas a pressões mais elevadas.

2948 No entanto, o resultado oposto ocorreu quando as quantidades de catequina e
2949 epicatequina foram gradualmente aumentadas, comparando os experimentos X, Y e
2950 Z, nesta ordem. No experimento de Z, os tratamentos que resultaram em níveis mais
2951 elevados de catequina e epicatequina combinadas foram: 1 (etanol 40%, 20 min, 40
2952 °C e 100 bar) seguida por 3 (etanol:metanol a 40%, 40 min, 40 °C e 300 bar), que
2953 forneceu o maior teor de fenólicos totais (Tabela 4.1).

2954 No entanto, quando cada fator (modificador, tempo de extração, temperatura
2955 ou pressão) foi examinado de forma independente (Tabelas 4.2 e 4.3), isto é,
2956 anulando os efeitos de outros fatores, outro cenário foi observado. A análise de
2957 superfície de resposta de catequina e epicatequina dos extratos (dados mostrados
2958 no Apêndice), fixando o tempo de extração em 40 min e a temperatura a 40 ° C
2959 indicou que o conteúdo fenólico foi maior a uma baixa pressão, usando a
2960 combinação de modificadores.

2961 Finalmente, este conjunto indicou que a seguinte combinação (etanol:metanol a
2962 40%, 40 min, 40 °C e 100 bar) foi a melhor condição de extração. Portanto, a partir
2963 desta perspectiva, resultados mais consistentes e com menor variabilidade foram
2964 alcançados, melhorando a confiabilidade desta análise.

2965 Outro trabalho de nosso grupo (KLEIN, LONGHINI e MELLO, 2012) extraiu
2966 catequina e epicatequina a partir de sementes de guaraná de um lote similar. Apesar
2967 de ter utilizado um método de extração diferente, os resultados foram semelhantes.

Tabela 4.4. Quantificação de cafeína, catequina e epicatequina em cada experimento (X, Y e Z) utilizando CLAE.

Extrato	Experimento X			Experimento Y			Experimento Z		
	Cafeína*	Catequina*	Epicatequina*	Cafeína*	Catequina*	Epicatequina*	Cafeína*	Catequina*	Epicatequina*
1	63,96±0,54 ^{bcd}	1,03±0,04 ^a	0,75±0,03 ^a	53,49±2,58 ^{abc}	5,02±0,16 ^{ab}	4,08±0,11 ^d	44,28±1,48 ^{ab}	9,09±0,18 ^a	7,93±0,36 ^a
2	60,07±1,30 ^d	0,84±0,02 ^b	0,62±0,02 ^b	46,36±0,94 ^d	5,25±0,09 ^a	4,23±0,18 ^{ab}	40,09±1,28 ^{bc}	8,21±0,05 ^b	7,23±0,20 ^{abc}
3	62,55±1,17 ^{cd}	0,62±0,03 ^c	0,51±0,02 ^c	51,29±2,12 ^c	5,19±0,22 ^a	4,54±0,22 ^{ab}	45,08±1,03 ^{ab}	8,24±0,30 ^b	7,76±0,38 ^{ab}
4	66,68±3,17 ^{abc}	0,33±0,02 ^f	0,25±0,01 ^f	51,95±0,44 ^{bc}	5,05±0,23 ^{ab}	4,07±0,19 ^d	44,47±1,37 ^{ab}	8,04±0,19 ^{bc}	7,11±0,33 ^{bc}
5	67,88±1,72 ^{ab}	0,24±0,01 ^g	0,20±0,01 ^g	50,02±0,41 ^{cd}	4,63±0,12 ^b	3,90±0,15 ^b	41,43±2,02 ^{ab}	7,86±0,18 ^{bc}	6,91±0,19 ^c
6	66,63±0,92 ^{abc}	0,42±0,02 ^e	0,32±0,01 ^e	51,00±0,33 ^{cd}	5,25±0,17 ^a	3,98±0,15 ^b	44,68±1,44 ^{ab}	7,59±0,31 ^c	6,61±0,24 ^c
7	68,49±0,03 ^a	0,21±0,01 ^g	0,22±0,01 ^g	56,44±2,14 ^{ab}	2,47±0,12 ^c	2,15±0,09 ^c	45,90±0,69 ^a	8,09±0,19 ^{bc}	7,07±0,31 ^{bc}
8	66,46±0,40 ^{abc}	0,53±0,03 ^d	0,38±0,01 ^d	49,39±0,46 ^{cd}	4,90±0,23 ^{ab}	3,90±0,01 ^b	35,66±3,73 ^c	8,00±0,28 ^{bc}	6,63±0,11 ^c
9	66,33±1,63 ^{abc}	0,22±0,01 ^g	0,21±0,01 ^g	58,03±2,83 ^a	2,21±0,07 ^c	2,15±0,07 ^c	42,80±0,44 ^{ab}	8,99±0,02 ^a	6,87±0,05 ^c

Valores na **mesma coluna** seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,05$); * Percentagem de amostra desengordurada (μg da substância ($100 \mu\text{g}$ extrato de guaraná)⁻¹). A quantidade de óleo fixo das amostras nos experimentos X e Y variou 65-71%, e no experimento Z variou 56-64%.

2968 4.3.5 Extração supercrítica

2969 Na extração supercrítica, o solvente flui através de um leito de partículas de
2970 sementes, extraíndo substâncias solúveis a partir de uma matriz insolúvel. A taxa de
2971 transferência de massa interna é diretamente proporcional à efetiva difusividade
2972 interna e inversamente proporcional ao quadrado da dimensão da partícula,
2973 dependendo da forma da partícula (SOVOVÁ, 2012). O delineamento dos processos
2974 utilizando solventes supercríticos é fortemente dependente do equilíbrio de fases, o
2975 que é altamente sensível a alterações nas condições operacionais.

2976 A solubilidade é uma das propriedades termofísicas necessárias para a
2977 concepção do processo de extração. A solubilidade de substâncias polares, tais
2978 como polifenóis, em fluido supercrítico não polar (CO₂) é muito baixa. No entanto, a
2979 adição de modificadores pode aumentar a polaridade do fluido supercrítico. Assim,
2980 existe uma elevada solubilidade devido à maior interação de forças com o soluto
2981 e/ou pelo aumento da densidade, e conseqüentemente o poder de solvatação.
2982 Conseqüentemente, a extração de catequina e epicatequina a partir de sementes de
2983 guaraná é facilitada porque estas substâncias são mais polares em comparação
2984 com cafeína. Além disso, o etanol e o metanol são capazes de fazer pontes de
2985 hidrogênio, ligações dipolo-dipolo e outras interações com polifenóis, e assim,
2986 podem aumentar a extração destes compostos (LANG e WAI, 2001; MARÓSTICA-
2987 JUNIOR, LEITE e DRAGANO, 2010; MURGA, RUIZ, BELTRÁN, 2000). A catequina
2988 e epicatequina têm grupos hidroxilas que estão disponíveis para a formação de
2989 pontes de hidrogênio, mas isto não ocorre com a cafeína. Assim, a adição de
2990 maiores quantidades de modificadores ao sistema irá promover a extração de
2991 moléculas polares. A comparação da quantidade de catequina e epicatequina
2992 extraídas, nos experimentos X, Y e Z, sugeriu que a solubilidade destes solutos
2993 aumentou proporcionalmente com a quantidade de modificador empregado. Este
2994 fato é evidenciado pela maior quantidade destas substâncias extraídas com o
2995 aumento da adição de um modificador.

2996 A extração de compostos fenólicos por fluidos supercríticos a partir de
2997 sementes de guaraná é uma tecnologia verde que reduz substancialmente o
2998 consumo de solventes nas operações de extração e *downstream*, e, ainda, é mais
2999 rápida do que a extração convencional de sementes de guaraná. Além destas
3000 vantagens, as substâncias extraídas podem ser diferentes em quantidade e
3001 qualidade do que os obtidos a partir da extração convencional, tal como indicado por

3002 Herrero, Cifuentes e Ibañez (2006). Este fato abre um leque de possibilidades para
3003 potenciais atividades biológicas.

3004

3005 4.3.6 Atividade antimicrobiana

3006 A melhor condição de extração e os fatores mais importantes para alcançar
3007 este resultado foram determinados neste estudo, e pode-se subsequentemente
3008 investigar a atividade biológica potencial desses extratos. Nosso grupo (Ushirobira et
3009 al., 2007) testou extratos de sementes de guaraná obtidos por extração
3010 convencional contra várias cepas microbianas. Tanto os extratos brutos quanto as
3011 frações semipurificadas não apresentaram atividade antimicrobiana contra nenhuma
3012 cepa testada, mesmo frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3013 Os extratos de sementes de guaraná a partir da EFS, do experimento Z,
3014 apresentaram maior CPT do que àqueles dos experimentos X e Y. Desta forma, foi
3015 realizado um teste de atividade antimicrobiana com os nove extratos provenientes
3016 do experimento Z contra cepas de *S. aureus* ATCC 29123 e SAMR N315. Os
3017 resultados foram promissores e devem ser objeto de estudo de estudos futuros para
3018 o isolamento e identificação dos compostos ativos responsáveis por esta atividade.

3019 Outros autores também afirmam que o EFS provou ser mais efetivo na
3020 extração de substâncias com atividade antimicrobiana, em comparação com a
3021 extração convencional (LIU et al., 2007; MICHIELIN et al., 2009).

3022 A concentração inibitória mínima (CIM) de todos os extratos supercríticos de
3023 guaraná provenientes do experimento Z contra *S. aureus* ATCC 29123 foi $>125,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.
3024 Entretanto, a CIM contra SAMR N315 foi de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os
3025 tratamentos exceto o tratamento 4 (CIM = $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Não houve atividade
3026 antimicrobiana significativa ($> 2.500 \mu\text{g mL}^{-1}$) para o extrato obtido a partir da
3027 extração convencional. Este resultado sugere que compostos com atividade
3028 antimicrobiana estão presentes nos extratos supercríticos, e provável estarem
3029 ausentes no extrato bruto de extração convencional.

3030 A maior atividade antimicrobiana de extratos supercríticos de guaraná contra a
3031 cepa N315 pode ser explicada pelo efeito da sensibilidade colateral em cepas
3032 bacterianas resistentes. Redes de drogas com sensibilidade colateral podem ainda
3033 servir para planejar tratamento em que vários antibióticos são usados em ciclo ao
3034 longo do tempo. Imamovic e Sommer (2013) propuseram um novo tratamento—ciclo
3035 sensibilidade colateral— em que as drogas com perfis de sensibilidade colateral

3036 compatível são usadas sequencialmente para tratar a infecção e evitar o
3037 desenvolvimento de resistência. Os autores preveem que este tratamento deverá
3038 contribuir para o uso sustentável de drogas para o tratamento de doenças em que a
3039 resistência a medicamentos é uma preocupação.

3040

3041 *4.3.7 Microscopia eletrônica de varredura*

3042 O extrato supercrítico de sementes de guaraná do tratamento 3
3043 (etanol:metanol, 40 min, 40 °C e 300 bar) proveniente do experimento Z teve o maior
3044 CPT dos extratos avaliados neste estudo. Assim, este extrato foi escolhido para
3045 avaliar a morfologia das células bacterianas por microscopia eletrônica de varredura
3046 (MEV). Na avaliação do MEV, a cepa SAMR N315 não tratada, preparada em meio
3047 padrão CMH exibiu um grande número de células lisas, esféricas em formato de
3048 cachos de uva e o seu tamanho médio inalterado (Figura 4.2A). Em maior
3049 ampliação, a superfície intacta de SAMR N315 foi observada (Figura 4.2B). Para
3050 SAMR N315 tratados com extrato de sementes de guaraná, foi possível identificar
3051 uma redução no número de células, protuberâncias na superfície celular, massa
3052 amorfa e detritos celulares (Figura 4.2C). Em maior ampliação, a morfologia das
3053 células mudou completamente, como a introdução de pequenas bolhas (Figura
3054 4.2D). Estes resultados sugerem que as células foram lisadas pela ação do extrato
3055 de sementes de guaraná.

3056

3057 **4.4. Conclusões**

3058 A pressurização de modificadores melhorou os rendimentos e concentrações
3059 dos extratos em comparação com outros métodos de extração convencionais. O teor
3060 de cafeína no extrato foi semelhante a outros estudos publicados, mas o CPT foi
3061 maior em comparação com o nível obtido utilizando a extração etanólica. Assim, a
3062 inclusão de modificadores no processo de extração supercrítica é um fator
3063 importante a considerar.

3064 A estratégia estatística DMO provou ser um método eficiente que forneceu
3065 dados elucidativos, utilizando recursos mínimos. No experimento Z, as condições de
3066 extração de etanol: metanol a 40%, por 40 min, 40 ° C e 100 bar provou ser a
3067 condição de escolha, com base na combinação de vários fatores, incluindo o custo
3068 de operação, a segurança, o rendimento e o valor de CPT obtido.

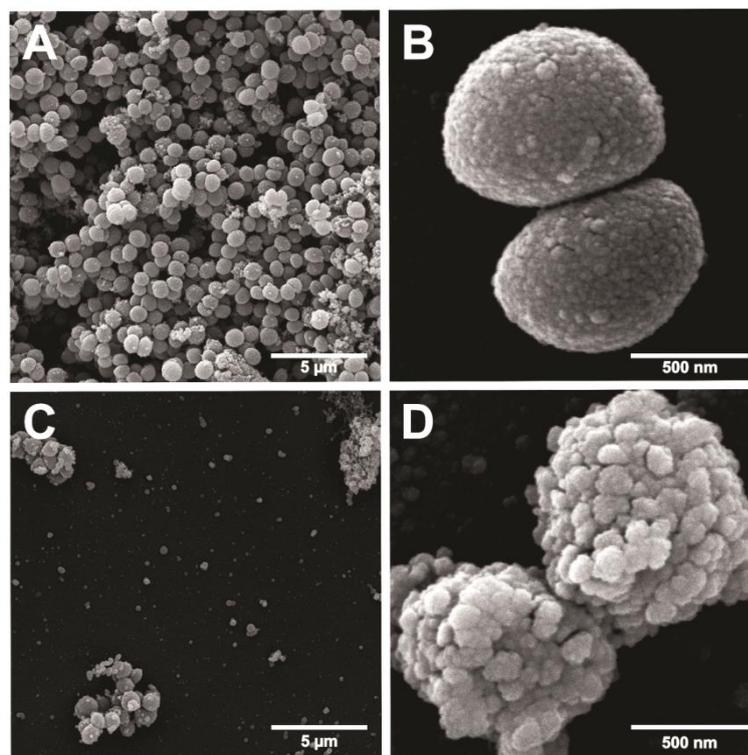


Figura 4.2. Microscopia eletrônica de varredura de linhagens de *Staphylococcus aureus* N315 metilicina resistentes (SAMR) tratadas com extratos supercríticos de sementes de *P. cupana*. O Tratamento 3 utilizado para este ensaio teve a seguinte combinação: etanol:metanol, 40 min, 40 °C e 300 bar. **A:** SAMR N315 não tratado (controle) a 10,000x ampliação; **B:** SAMR N315 não tratado (controle) a 80,000x de ampliação; **C:** SAMR N315 tratado com extrato de guaraná a 10,000x de ampliação; **D:** SAMR N315 tratado com guaraná a 80,000x de ampliação.

3069 De modo geral, o experimento Z mostrou ser promissor comparado aos
 3070 experimentos X e Y, relativo à quantidade de compostos bioativos. Fato este
 3071 confirmado pela análise por CLAE. A porcentagem de modificador utilizada é
 3072 proporcional à polaridade das substâncias extraídas.

3073 Os extratos supercríticos de sementes de guaraná de experimento Z
 3074 mostraram uma promissora atividade antimicrobiana contra SAMR N315. Assim,
 3075 este extrato tem o potencial para o tratamento de infecções nosocomiais ou como
 3076 adjuvante, neste caso.

3077 **Conflito de Interesse**

3078 Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

3079

3080 **Agradecimentos**

3081 Nós estendemos nossos sinceros agradecimentos a Empresa Waters, que
3082 forneceu o extractor supercrítico MV-10 AEFSTM System para este estudo. Nós
3083 também agradecemos ao CNPq, Capes, INCT_if e Finep pelo suporte financeiro, e
3084 Admir Arantes pelo apoio técnico.

3085 **4.5. Referências**

- 3086 ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a
3087 South American herbal preparation in overweight patients. **Journal Of Human**
3088 **Nutrition And Dietetics**, v. 14, p. 243-250, 2001.
- 3089
3090 ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de**
3091 **Métodos Analíticos e Bioanalíticos (in Portuguese)**. RE No. 899, 29/05/2003.
3092 Brasília, Brazil: Ministério da Saúde 2003.
- 3093
3094 _____. **Farmacopeia brasileira. vol. 2**. Brasília: Agência nacional de vigilância
3095 sanitária 2010.
- 3096
3097 AUDI, E. A.; MELLO, J. C. P. **Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal**
3098 **guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke)**. NITPAR. UEM. Brasil.
3099 PI 0006638-9 2000.
- 3100
3101 BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; LAGANÀ, G.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, C.
3102 Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives
3103 present in apple and kumquat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 292-297, 2014.
- 3104
3105 BASILE, A.; FERRAR, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.;
3106 MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from
3107 *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.
- 3108
3109 CASTRO-VARGAS, H. I.; VARELA, L. I. R.; FERREIRA, S. R. S.; ALFONSO, F. P.
3110 Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using
3111 supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.
3112 51, p. 319-324, 2010.
- 3113
3114 CHANG, C. J.; CHIU, K.; CHEN, Y.; CHANG, C. Y. Separation of catechins from
3115 green tea using carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 68, p. 109-113,
3116 2000.
- 3117
3118 CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that**
3119 **grow aerobically**. Approved Standard. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory
3120 Standards Institute. (M07-A8 2011).
- 3121
3122 DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant
3123 and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.
- 3124
3125 FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.;
3126 DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation
3127 and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian**
3128 **Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 305-310, 2008.
- 3129
3130 HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; MEJIA, E. G. D. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in
3131 foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory
3132 matters. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 77-87, 2010.
- 3133

- 3134 HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social
3135 perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **Journal of**
3136 **Ethnopharmacology**, v. 6, p. 311-338, 1982.
- 3137
3138 HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction
3139 of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products,
3140 algae and microalgae. A review. **Food Chemistry**, v. 98, p. 136-148, 2006.
- 3141
3142 HERTZ, E.; CADONÁ, F. C.; MACHADO, A. K.; AZZOLIN, V.; HOLMRICH, S.;
3143 ASSMANN, C.; LEDUR, P.; RIBEIRO, E. E.; FILHO, O. C. D. S.; MÂNICA-CATTANI,
3144 M. F.; CRUZ, I. B. M. D. Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell
3145 response to chemotherapeutic drugs. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, p. 37-
3146 43, 2015.
- 3147
3148 HSIEH, C.-M.; WINDMANN, T.; VRABEC, J. Vapor–Liquid Equilibria of CO₂ + C₁–C₅
3149 Alcohols from the Experiment and the COSMO-SAC Model. **Journal of Chemical**
3150 **and Engineering Data**, v. 58, n. 12, p. 3420–3429, 2013.
- 3151
3152 HUANG, Z.; SHI, X.-H.; JIANG, W.-J. Theoretical models for supercritical fluid
3153 extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 2-26, 2012.
- 3154
3155 **IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola (in Portuguese).**
3156 **COAGRO.** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE: 1-113
3157 p. 2016.
- 3158
3159 **ICH. International conference on harmonization. International conference on**
3160 **harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for**
3161 **human use.** Q2B(R1). Brussels, Belgium: ICH Steering Committee, 2005. p.
- 3162
3163 **IMAMOVIC, L.; SOMMER, M. O. A.** Use of collateral sensitivity networks to design
3164 drug cycling protocols that avoid resistance development. **Science Translational**
3165 **Medicine**, v. 5, n. 204, p. 1-12, 2013.
- 3166
3167 **KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. D.** Microparticles
3168 containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and
3169 characterization. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, 2015.
- 3170
3171 **KLEIN, T.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C. P. D.** Development of an analytical method
3172 using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var.
3173 *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p. 502-506, 2012.
- 3174
3175 **KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.;**
3176 **CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.;**
3177 **MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-**
3178 **UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.;**
3179 **HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.;**
3180 **YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI,**
3181 **M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K.** Whole genome sequencing of
3182 methicillinresistant *Staphylococcus aureus*, the major hospital pathogen. **The**
3183 **Lancet**, v. 357, p. 1225–1240, 2001.

- 3184
3185 LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product
3186 studies - a practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771 - 782, 2001.
3187
- 3188 LIU, H.; JIAO, Z.; LIU, J.; ZHANG, C.; ZHENG, X.; LAI, S.; CHENG, F.; YANG, H.
3189 Optimization of supercritical fluid extraction of phenolics from date seeds and
3190 characterization of its antioxidant activity. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 781-
3191 788, 2013.
3192
- 3193 LIU, X.; ZHAO, M.; WANG, J.; LUO, W. Antimicrobial and antioxidant activity of
3194 emblica extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction and methanol
3195 extraction. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 307-330, 2007.
3196
- 3197 MARÓSTICA-JUNIOR, M. R.; LEITE, A. V.; DRAGANO, N. R. V. Supercritical fluid
3198 extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources- review. **The**
3199 **Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 51-60, 2010.
3200
- 3201 MICHIELIN, E. M.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A.; SMANIA, A., JR.; SMANIA, E.
3202 F.; FERREIRA, S. R. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia*
3203 *verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v.
3204 100, n. 24, p. 6615-23, Dec 2009. ISSN 1873-2976 (Electronic)
3205 0960-8524 (Linking). Disponível em: <
3206 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683436> >.
3207
- 3208 MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of natural complex
3209 phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon
3210 dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3408-
3211 3412, 2000.
3212
- 3213 PORTELLA, R. D. L.; BARCELOS, R. P.; ROSA, E. J. F. D.; RIBEIROS, E. E.;
3214 CRUZ, I. B. M. D.; SULEIMAN, L.; SOARES, F. A. A. Guaraná (*Paullinia cupana*
3215 Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids**
3216 **in Health and Disease**, v. 12, p. 1-9, 2013.
3217
- 3218 RANGEL, M. P.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Evaluation of neurotransmitters
3219 involved in the anxiolytic and panicolytic effect of the aqueous fraction of *Paullinia*
3220 *cupana* (guaraná) in elevated T maze. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23,
3221 n. 2, p. 358-365, 2013.
3222
- 3223 SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONCALVES, J. F.; MAZZAFERA, P. Guarana:
3224 revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of**
3225 **Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, Oct 28 2013. ISSN 1872-7573
3226 (Electronic)
3227 0378-8741 (Linking). Disponível em: <
3228 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981847> >.
3229
- 3230 SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total
3231 phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu
3232 reagent. **Methods in Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
3233

- 3234 SOVOVÁ, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their
3235 characteristic times. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 73-79, 2012.
3236
- 3237 SUFRAMA. **Potencialidades estudo de viabilidade econômica: guaraná (in**
3238 **Portuguese)**. Manaus, Brasil: Superintendência da zona franca de Manaus -
3239 Suframa. Instituto superior de administração e economia ISAE/Fundação Getúlio
3240 Vargas (FGV): 1-34 p. 2013.
3241
- 3242 TING, S. S. T.; MACNAUGHTON, S. J.; TOMASKO, D. L.; FOSTER, N. R. Solubility
3243 of Naproxen in Supercritical Carbon Dioxide with and without Cosolvents. **Industrial**
3244 **and Engineering Chemistry Research**, v. 32, p. 1471-1481, 1993.
3245
- 3246 TOCHIGI, K.; NAMAIE, T.; SUGA, T.; MATSUDA, H.; KURIHARA, K.; RAMOS, M. C.
3247 D.; MCCABE, C. Measurement and prediction of high-pressure vapor-liquid
3248 equilibria for binary mixtures of carbon dioxide + n-octane, methanol, ethanol, and
3249 perfluorohexane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 682-689, 2010.
3250
- 3251 USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS
3252 FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from
3253 seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Acta Farmacéutica Bonaerense**,
3254 v. 26, p. 5-9, 2007.
3255
- 3256 WANG, Y.; YING, L.; SUN, D.; ZHANG, S.; ZHU, Y.; XU, P. Supercritical carbon
3257 dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems:
3258 process optimization and antioxidant activity. **International Journal of Molecular**
3259 **Sciences**, v. 12, n. 10, p. 6856-6870, 2011.
3260
- 3261 YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.;
3262 UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P.
3263 Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts
3264 and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.

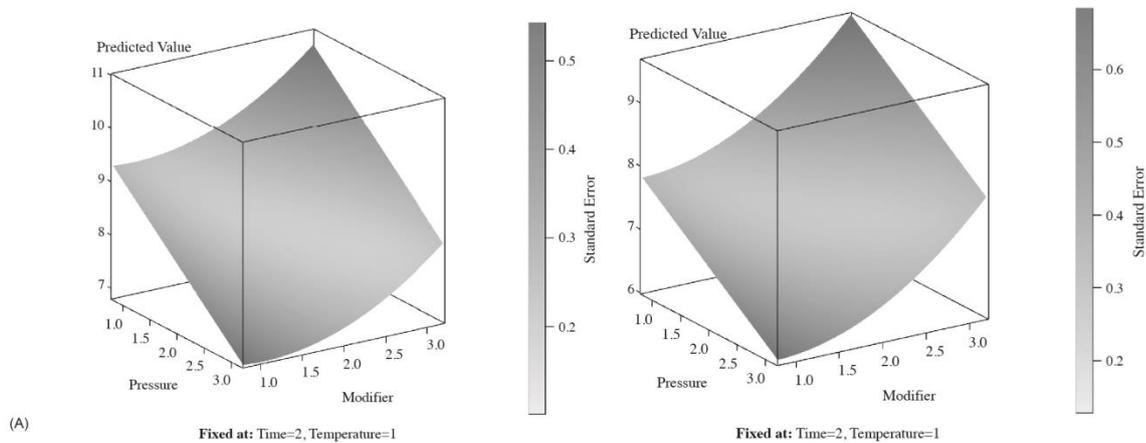


Figura suplementar 4.1. Análise de superfície de resposta para quantificar a resposta de (A) catequina e (B) epicatequina (μg de substância $(100 \mu\text{g}$ de extrato de guaraná) $^{-1}$) no experimento Z, selecionando os seguintes fatores: tempo de extração = 2 (40 min) e temperatura = 1 (40 °C).

5. CAPÍTULO 3: Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos supercríticos de guaraná (*Paullinia cupana*)

3265 **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos supercríticos**
3266 **de guaraná (*Paullinia cupana*)**

3267

3268 Leila Larisa Medeiros Marques^a, Fabianne Martins Ribeiro^a, Celso Vataru
3269 Nakamura^a, Ane Stefano Simionato^b, Galdino Andrade^b, Acácio Antonio Ferreira
3270 Zielinski^c, Carlos Alexandre Carollo^d, Denise Brentan Silva^d, Admilton Gonçalves de
3271 Oliveira^b, João Carlos Palazzo de Mello^a

3272

3273 ^aDepartamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790,
3274 BR-87020-900, Maringá, Paraná, Brasil *Autor para correspondência. Tel.:
3275 +55443011 4816; Fax +55443011 5050. E-mail: mello@uem.br (J. C. P. de Mello)

3276 ^bDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
3277 Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid Km 380, BR-86057-970, Londrina,
3278 Paraná, Brasil

3279 ^cPrograma de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos e Tecnologia, Universidade
3280 Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti 4748, Campus Uvaranas, BR-
3281 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

3282 ^dLaboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Centro
3283 de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de Mato Grosso
3284 do Sul (UFMS), Av. Costa e Silva, s/n, Cidade Universitária, BR-79070-900, Campo
3285 Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

3286 **Resumo**

3287

3288 A partir de otimização prévia de extração supercrítica de sementes de guaraná
3289 (*Paullinia cupana*), com matriz ortogonal ($OA_9(3^4)$), investigou-se a atividade
3290 antioxidante, antimicrobiana e o perfil químico destes extratos. Os extratos 1 (40%
3291 etanol; 20 min; 40 °C e 100 bar), 2 (40%metanol; 60 min; 40 °C e 200 bar) e 8
3292 (40%metanol; 40 min; 60 °C e 100 bar) apresentaram maiores valores combinados
3293 de atividade antioxidante pelos métodos DPPH, Frap, ABTS e sistema xantina
3294 oxidase, e, foram identificados por meio de análise quimiométrica. A fração hexânica
3295 do extrato 3 (etanol:metanol-40%; 40 min; 40 °C e 300 bar) apresentou atividade
3296 antimicrobiana qualitativa frente às cepas *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus*
3297 e *Lactobacillus fermentum*. Perfis similares dos extratos foram obtidos pela análise
3298 química, avaliada por CLAE-DAD-EM. Além de cafeína, principal composto extraído,
3299 os extratos apresentam epicatequina, catequina, teofilina, teobromina e dímeros e
3300 trímeros de proantocianidinas tipo A e B. A análise do mapa de calor verificou
3301 correlação positiva entre os métodos antioxidantes DPPH, Frap e ABTS e com
3302 metabólitos catequina, epicatequina e procianidina do tipo B.

3303

3304 Keywords – *Paullinia cupana*, extração supercrítica, perfil químico, atividade
3305 antioxidante, atividade antimicrobiana.

3306

3307 Abreviaturas e Siglas

3308

3309 (Abs) Absorvância

3310 (ABTS) 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)

3311 (PCA) Análise de Componentes Principais

3312 (ATCC) Coleção Americana de Cepas de Referência

3313 (BM) banho-maria

3314 (CCT) Coleção de culturas tropicais

3315 (CLAE-DAD-EM) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de

3316 arranjo de diodos e espectrometria de massas

3317 (CPT) Conteúdo de polifenóis totais

3318 (DMSO) Dimetilsulfóxido

3319 (DPPH) 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

3320 (EDTA) ácido etilenodiamino tetra-acético

3321 (EFS) extração por fluido supercrítico

3322 (FA) fração aquosa

3323 (FH) fração hexânica

3324 (Frap) *Poder Antioxidante* de Redução do Ferro

3325 (ICM) inibição do crescimento micelial

3326 (MIC) concentração mínima inibitória

3327 (OA₉(3⁴)) um total de nove corridas, com quatro variáveis em três níveis

3328 (OAD) Design de matriz ortogonal

3329 (RSC) captura de radicais livres

3330 (Teac) capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

3331 (TPTZ) (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina)

3332 5.1 Introdução

3333 A extração por fluido supercrítico (EFS) tem inúmeras vantagens sobre a
3334 extração convencional. A EFS permite a reutilização dos solventes, maior facilidade
3335 nas etapas de recuperação, geralmente mais rápida, mais ecológica, emprega
3336 baixas temperaturas para extração do produto e proporciona produtos de alto valor
3337 agregado, pois esses são livres de resíduos indesejáveis e sem o risco de
3338 degradação térmica.(RAMSEY et al., 2009) Diversos estudos têm utilizado a
3339 extração supercrítica para extrair compostos bioativos a partir de produtos
3340 naturais.(GHAFOOR, AL-JUHAIMI e CHOI, 2012; MARQUES et al., 2016; VARGAS
3341 et al., 2010) A adição de cossolventes à extração (1-10%), que emprega como fluido
3342 supercrítico o dióxido de carbono, expande a possibilidade de extração de
3343 compostos mais polares. Os cossolventes mais empregados com esta finalidade são
3344 etanol e metanol.(MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014)

3345 O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) é uma planta amazônica,
3346 que possui uma variedade de propriedades farmacológicas descritas na literatura. É
3347 atribuído às suas sementes atividades antimicrobianas,(DALONSO e PETKOWICZ,
3348 2012) antioxidantes,(PORTELLA et al., 2013) anticancerígenas,(FUKUMASU,
3349 LATORRE e ZAIDAN-DAGLI, 2011) gastroprotetoras,(CAMPOS et al., 2003)
3350 antidepressivas,(OTOBONE et al., 2007) emagrecedoras,(RUXTON et al., 2007)
3351 entre outras.(SCHIMPL et al., 2013) As sementes de guaraná são quimicamente
3352 ricas em cafeína (2,41 a 5,07%), e em taninos (5,0 a 14,1%), principalmente os
3353 condensados como proantocianidinas (10,7%) e catequina (5,98%) e epicatequina
3354 (3,78%).(MARX, 1990; PAGLIARUSSI, FREITAS e BASTOS, 2002)Alguns autores
3355 sugerem que os polifenóis, especificamente taninos, são os principais responsáveis
3356 pelos efeitos antioxidante e antimicrobiano apresentados pelo guaraná. (PORTELLA
3357 et al., 2013; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007)

3358 Os radicais livres podem ser gerados a partir de vias metabólicas dentro dos
3359 tecidos do corpo e também pelos alimentos, fármacos ou ainda pela poluição
3360 ambiental, entre outros. O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o
3361 balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo
3362 dano potencial.(MORAIS et al., 2009) Este dano oxidativo que as biomoléculas
3363 sofrem está relacionado com as patologias de um grande número de doenças
3364 crônicas, incluindo doenças cardiovasculares,(ROBERT e ROBERT, 2014) câncer

3365 (SINGH et al., 2016) e doenças neurodegenerativas.(BOLNER et al., 2016) Os
3366 antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a
3367 oxidação de substratos oxidáveis. O consumo de antioxidantes naturais, como os
3368 compostos fenólicos presentes em muitas plantas, inibe a formação de radicais
3369 livres, o que tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas
3370 com o estresse oxidativo.(DROGE, 2002) A utilização de antioxidantes naturais,
3371 como aditivos alimentares para inativar radicais livres tem recebido um papel de
3372 destaque, não só pela sua propriedade de captura destes radicais, mas também
3373 porque eles são naturais, produtos não sintéticos, e sua apreciação por parte dos
3374 consumidores é muito favorável.(MILIAUSKAS, VENSKUTONIS e BEEK, 2004)
3375 Vários métodos têm sido desenvolvidos para medir a capacidade de captura de
3376 radicais livres (RSC), independentemente dos compostos individuais que contribuem
3377 para a capacidade total de uma planta promover esta ação. Os métodos baseiam-se
3378 tipicamente na inibição do acúmulo de produtos oxidados, uma vez que a geração
3379 de espécies de radicais livres é inibida pela adição de antioxidantes.(CHOI et al.,
3380 2002)

3381 Há uma crescente busca por novos antimicrobianos extraídos de plantas,
3382 principalmente em virtude da disseminação de cepas bacterianas resistentes, para
3383 que possam ser utilizados em produtos farmacêuticos, cosméticos e na indústria
3384 alimentícia, já que essas plantas podem apresentar baixa toxicidade, baixo custo, e
3385 serem de fácil acesso.(COSTA et al., 2008) Diversos estudos têm demonstrado a
3386 atividade antimicrobiana de extrato de semente de guaraná. Assim, este pode ser
3387 empregado como alternativa ao controle da placa dental,(BARBOSA e MELLO,
3388 2004) atividade frente à bactéria cariogênica *Streptococcus mutans*(YAMAGUTI-
3389 SASAKI et al., 2007) e bactéria antibiótico-resistente, como é o caso do
3390 *Staphylococcus aureus* meticilina resistente,(MARQUES et al., 2016) além de
3391 apresentar esta ação frente a várias outras cepas de bactéria e fungos.(MAJHENIC,
3392 SKERGET e KNEZ, 2007)

3393 O objetivo deste trabalho foi investigar características antioxidantes e
3394 antimicrobianas de extratos de guaraná obtidos por extração supercrítica. As
3395 análises antioxidantes foram realizadas por quatro métodos e analisadas por meio
3396 de análise quimiométrica. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a
3397 microrganismos de interesse alimentício, clínico e industrial. Adicionalmente, este
3398 trabalho analisou o perfil químico desses extratos por meio de CLAE-DAD-EM.

3399

3400 5.2 Materiais e Métodos

3401

3402 5.2.1 Matéria-prima

3403 Sementes torradas de *P. cupana* foram adquiridas do Sr. José Augusto de
3404 Souza, do Estado de Mato Grosso, região de Alta Floresta, Sítio Nossa Senhora
3405 Aparecida, Rodovia MT 325, km 8 (9°58'06.3"S 56°06'46.9"W), Brasil. Uma exsicata
3406 (HUEM#9065) foi depositada no Herbário, Departamento de Biologia da
3407 Universidade Estadual de Maringá. A planta foi identificada pela professora Dra.
3408 Cássia Mônica Sakuragui. As sementes foram moídas no moinho de martelos (Tigre,
3409 ASN5). O controle de qualidade destas sementes foi realizado e previamente
3410 publicado.(MARQUES et al., 2016) O tamanho das partículas de sementes de
3411 guaraná utilizadas foi padronizado em $0,47 \pm 0,02$ mm.

3412

3413 5.2.2 Extração

3414 A extração com CO₂ supercrítico foi realizada em trabalho prévio,(MARQUES
3415 et al., 2016) a partir de sementes de guaraná torradas e moídas, por meio de
3416 planejamento experimental de matriz ortogonal (OA₉(3⁴). Foram pesados 17 g das
3417 sementes e acondicionadas em vaso de extração de aço inoxidável com um volume
3418 total de 25 mL. A EFS foi realizada de forma automatizada em equipamento extrator
3419 MV-10 ASFE System, Waters®. O extrator foi programado e controlado pelo
3420 Software ChromScope, que utilizou a vazão fixa de 6 mL min⁻¹, temperatura
3421 constante e o produto da separação foi obtido por despressurização do sistema. Os
3422 nove extratos obtidos foram rotaevaporados (Büchi R-200), liofilizados (Christ Alpha
3423 1-4LD) e armazenados sob refrigeração, a -4°C.

3424

3425 5.2.3 Análises antioxidantes

3426 Foram escolhidos diferentes métodos antioxidantes para avaliação dos nove
3427 extratos obtidos por tecnologia supercrítica: DPPH, Frap, ABTS e sistema xantina
3428 oxidase. Todas as análises foram realizadas no mínimo em triplicata, em
3429 microplacas de 96 poços e lidas em espectrofotômetro (Bio-tek Power Wave XS) ou
3430 luminômetro (Spectra max L1- Channel – Molecular Devices). Para comparação com
3431 a atividade antioxidante foram utilizados os dados dos teores de polifenóis (CPT)
3432 dos extratos obtidos em trabalho previamente publicado (MARQUES et al., 2016).

3433 Foi avaliada a atividade antioxidante do padrão cafeína (Sigma) em todos os
 3434 ensaios antioxidantes. A cafeína foi testada nas mesmas concentrações em que
 3435 esta foi quantificada previamente nos nove extratos supercríticos.

3436

3437 5.2.3.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

3438 A atividade antioxidante dos extratos foi testada em relação à redução do
 3439 radical DPPH, método descrito por Brand-Williams.(1995) Os extratos supercríticos
 3440 de sementes de guaraná foram diluídos em metanol e preparados nas
 3441 concentrações finais de 3,1 a 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um total de 100 μL de DPPH a 130 μM
 3442 recém-preparada foram adicionados a 100 μL da amostra nas diferentes
 3443 concentrações. As microplacas foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo
 3444 da luz, para que ocorresse a reação. Depois de 30 min, as absorvâncias foram
 3445 medidas a 517 nm, em espectrofotômetro de microplacas (Bio-tek Power Wave XS).
 3446 Controle negativo (metanol adicionado ao DPPH), branco (somente metanol), além
 3447 do controle positivo (padrão quercetina e trolox) foram utilizados. A determinação do
 3448 IC_{50} foi feita por meio da fórmula (1):

3449

3450 **Atividade antioxidante (%)**: $\frac{(\text{abs CN} - \text{abs amostra})}{(\text{Abs CN}) - 1} \times 100$ (1)

3451

3452 Onde: abs CN= absorvância do controle negativo; Abs amostra= absorvância
 3453 da solução do extrato.

3454

3455 Com os valores obtidos foi construído um gráfico de percentagem da atividade
 3456 antioxidante versus concentração dos extratos de guaraná testados, em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por
 3457 meio da regressão linear foi calculado o IC_{50} , que é a concentração do extrato com
 3458 capacidade de reduzir 50% do DPPH.

3459

3460 5.2.3.2 Frap (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

3461 O etanol foi utilizado para diluição do padrão Trolox e para o preparo das
 3462 concentrações dos extratos de guaraná (40 a 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para o preparo de
 3463 reagente Frap, foi misturado 2,5 mL da solução de TPTZ (TPTZ 10mM em HCl
 3464 40mM), 2,5 mL da solução de cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM e
 3465 25 mL de tampão acetato 0,3 mM. Incubou-se esta solução a 37 °C em banho-maria
 3466 (BM) por 30 min. Em seguida, foi adicionada a 150 μL do reagente Frap, uma
 3467 alíquota de 30 μL de diferentes concentrações do padrão Trolox ou dos extratos de
 3468 guaraná. Esta mistura foi homogeneizada e lida em espectrofotômetro de

3469 microplacas (Bio-tek Power Wave XS) a 595 nm, após incubação por 30 min em BM
3470 a 37 °C. O equipamento foi zerado com um branco da amostra para descontar uma
3471 possível turbidez. Para isto, foram utilizados 150 µL do veículo Frap (solução igual
3472 ao reagente Frap exceto pela solução de TPTZ) e 30 µL da amostra.

3473 Para determinação da atividade antioxidante total(RUFINO, 2006) dos nove
3474 extratos foi realizada curva de calibração do Trolox (20 µM a 600 µM; $y = 0,0027x +$
3475 $0,0359$; $R^2 = 0,9981$) e equação da reta obtida a partir das absorvâncias das
3476 diferentes diluições dos extratos. Os resultados foram expressos em capacidade
3477 antioxidante dos extratos de guaraná equivalente ao Trolox (Teac).

3478

3479 5.2.3.3 ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico))

3480 A solução estoque de ABTS 8 mmol L⁻¹ foi obtida por meio da dissolução de 10
3481 mg por comprimido de ABTS, em 2,43 mL de água destilada. Um volume de 2,27 mL
3482 da solução estoque de ABTS foi adicionado a 11,5 mL de uma solução de persulfato
3483 de potássio 3 mmol L⁻¹. A mistura foi protegida da luz e armazenada em temperatura
3484 ambiente por 12 a 16 h, para formação do radical ABTS, e posteriormente avaliada
3485 pela adição de álcool etílico, até obter uma absorvância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734
3486 nm.(RUFINO, 2007)

3487 Em seguida, adicionaram-se 7 µL dos extratos nas concentrações de 200 a
3488 1000 µg mL⁻¹ (em etanol) ou do padrão Trolox à 200 µL da solução de ABTS•⁺
3489 diluída. Após 6 min de reação, foi realizada leitura em espectrofotômetro de
3490 microplacas (Bio-tek Power Wave XS) a 734 nm. O equipamento foi zerado com um
3491 branco para descontar uma possível turbidez da amostra (7 µL de amostra e 200 µL
3492 de álcool etílico).

3493 Para determinação da atividade antioxidante total(RUFINO, 2007) dos extratos
3494 realizou-se curva de calibração do Trolox (40 µM a 1000 µM; $y = -0,0005x + 0,6467$;
3495 $R^2 = 0,9961$) e equação da reta obtida a partir das absorvâncias das diferentes
3496 diluições dos extratos. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante
3497 dos extratos de guaraná equivalente ao Trolox (Teac).

3498

3499 5.2.3.4 Sistema xantina oxidase

3500 Os extratos de guaraná foram diluídos em etanol 50% de forma seriada, nas
3501 concentrações finais de 8,47 a 0,13 µg mL⁻¹, utilizando-se um total de seis
3502 concentrações.

3503 Para o preparo de 560 μL de volume de reação utilizou-se: 400 μL de tampão
3504 glicina (750,7 mg de glicina, 37,224 mg EDTA, q.s.p. 100 mL), 150 μL de xantina
3505 (11,4 mg de xantina, 12 mL de tampão glicina) e 10 μL luminol (2,65 mg de luminol,
3506 5 mL de DMSO).

3507 Adicionaram-se 10 μL de cada concentração dos extratos de guaraná,
3508 previamente preparada de forma seriada, a 560 μL de volume de reação em tubos
3509 eppendorf. Desta solução 80 μL foram adicionados em microplacas, para adição
3510 posterior de 20 μL da solução de xantina oxidase (11 μL de xantina oxidase e 5 mL
3511 de tampão glicina).

3512 A adição de enzima, mantida sempre resfriada, foi realizada de forma
3513 automática pelo equipamento luminômetro (Spectra max L1- Channel – Molecular
3514 Devices). Foram utilizados: branco (etanol 50%), controle negativo e controle
3515 positivo (quercetina e trolox).

3516 A determinação do IC_{50} foi feita por meio da fórmula (1), assim como para a
3517 determinação do IC_{50} para o método do DPPH. Com os valores obtidos foi
3518 construído um gráfico de percentagem da atividade antioxidante, versus
3519 concentração dos extratos de guaraná testados, em $\mu\text{g mL}^{-1}$. O IC_{50} foi calculado por
3520 meio da regressão linear.

3521

3522 5.2.4 Desengorduramento dos extratos preparados por EFS

3523 O desengorduramento dos nove extratos supercríticos de guaraná foi realizado
3524 para o *screening* de atividade antimicrobiana e análise do perfil químico. Para isto,
3525 foram realizadas partições líquido-líquido com solvente orgânico (hexano) gelado.
3526 Foram diluídos 34,75 mg do extrato em 1,5 mL de água destilada, adicionados 3 mL
3527 de hexano, homogeneizado e deixado a 5 °C por 10 min. Após a separação, as
3528 fases hexânica (FH) e aquosa (FA) foram retiradas, secas e liofilizadas.

3529

3530 5.2.5 Avaliação antimicrobiana

3531 5.2.5.1 Cepas utilizadas

3532 As cepas avaliadas para as análises antimicrobianas estão identificadas no
3533 quadro 5.1.

Quadro 5.1. Cepas avaliadas nas análises antimicrobianas segundo sua importância.

Fungos de importância ambiental e alimentícia	Levedura de importância médica	Bactérias de importância clínica	Bactérias de importância industrial
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 2870	<i>Klebsiella pneumoniae</i> isolado clínico 97	<i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1629
<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CCT 0848
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123	
		<i>Staphylococcus aureus</i> N315 metilina resistente (SAMR)	
		<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 29123	
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
		<i>Acinetobacter baumannii</i> OXA23	

CCT= Coleção de culturas tropicais (Fundação André Tosello). <http://fat.org.br/>

3534 5.2.5.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

3535 A CCD foi realizada em cromatofolhas de alumínio (sílica-gel 60 F254,
3536 Macherey-Nagel) com 0,200 mm de espessura. Como fase móvel, foi utilizado
3537 ciclohexano:clorofórmio:metanol (45:45:05, v/v). As bandas foram visualizadas em
3538 luz ultravioleta (UV) a 254 e 366 nm. Esta técnica foi utilizada para monitoramento
3539 das FH e FA do extrato 3 (etanol:metanol; 40 min; 40 °C e 300 bar), o qual
3540 apresentou o maior rendimento de extração em trabalho anterior(MARQUES et al.,
3541 2016).

3542

3543 5.2.5.4 Técnica de bioautografia

3544 A fim de determinar qualitativamente a atividade antibiótica do extrato 3 e suas
3545 frações (FA e FH), foi utilizado o método de bioautografia.(RAHALISON et al., 1991)
3546 Para tanto, foram utilizadas placas de CCD para estas amostras, na concentração
3547 de 500 µg por aplicação. Após o desenvolvimento da CCD, as placas foram
3548 depositadas em placas de Petri inoculadas com suspensões de cada isolado
3549 microbiano separadamente (10^8 UFC mL⁻¹), pelo método de *pour plate*. As placas
3550 foram incubadas em temperatura e tempo ideal de crescimento para cada
3551 microrganismo testado. A leitura foi realizada por meio da presença ou ausência do
3552 halo de inibição, reveladas em solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) a
3553 1% para bactérias Gram-negativas, e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil
3554 brometo tetrazólico (MTT) a 0,2% para Gram-positivas e fungos. Os resultados

3555 foram considerados como (-) para ausência de zona de inibição e (+) para presença
3556 de zona de inibição.

3557

3558 *5.2.5.5 Concentrações: Inibitória (CIM), Bactericida (CBM) e Fungicida (CFM)*
3559 *mínimas*

3560 A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por método de
3561 microdiluição em caldo conforme metodologia modificada preconizada pelo
3562 CLSI.(2011) Este teste foi realizado com os microrganismos que apresentaram
3563 inibição qualitativa na técnica de bioautografia frente ao extrato 3 e suas frações. As
3564 placas foram incubadas em temperatura e tempo ideal de crescimento para cada
3565 microrganismo testado. A CIM foi determinada quando houve 100% de inibição de
3566 crescimento bacteriano quando comparado com o controle, sem adição do extrato.
3567 As concentrações referentes às placas com ausência de crescimento
3568 bacteriano/fúngico foram consideradas bactericidas (CBM)/fungicida (CFM).

3569

3570 *5.2.5.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM) para fungos filamentosos*

3571 Os valores de CIM para fungos filamentosos foram determinados utilizando
3572 método de diluição em ágar. Foram vertidos 10 mL de BDA com adição de
3573 diferentes concentrações dos extratos supercríticos de guaraná em placas de Petri.
3574 Plugs, de 6 mm de micélios do fungo avaliado, foram inoculados no centro da placa
3575 e incubado a temperatura ideal para a cada cepa. O crescimento fúngico foi
3576 registrado até o fungo tomar por completo as placas de controle (sem adição dos
3577 extratos de guaraná). Cada tratamento foi realizado em triplicata. A porcentagem de
3578 inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada de acordo com a fórmula
3579 (2).(YAHYAZADEH et al., 2008)

3580
$$ICM(\%) = \left[\frac{d_c - d_t}{d_c} \right] \times 100 \quad (2)$$

3581 Onde: d_c (mm) é a média do diâmetro de crescimento do micélio do controle e
3582 d_t (mm) é a média do diâmetro de crescimento do micélio do tratamento.

3583 A dose eficaz de 50% e 80% (DE50 e DE80) foi determinada por análise de
3584 regressão, quando o crescimento for reduzido para 50% ou 80% com relação ao
3585 controle, respectivamente. A menor concentração que inibiu completamente o
3586 crescimento do fungo foi considerada a concentração inibidora mínima (MIC).

3587

3588 5.2.6 Análises dos extratos por CLAE-DAD-EM

3589 As FAs dos extratos foram analisadas por CLAE-DAD-EM. Estas análises
3590 foram realizadas em um cromatógrafo UFLC LC-20AD (Shimadzu) acoplado a um
3591 detector de arranjo de diodos (DAD) e a um espectrômetro de massas ESI-qTOF
3592 microTOF-Q III (Bruker Daltonics). As análises foram monitoradas no comprimento
3593 de onda de 220-800 nm e no espectrômetro de massas em ambos os modos de
3594 ionização, positivo e negativo (m/z 120-1200). A coluna cromatográfica usada foi
3595 uma Kinetex C18 (2,6 μm , 150 x 2,2 mm, Phenomenex), a qual foi protegida com
3596 uma pré-coluna com o mesmo material. A fase móvel utilizada foi água deionizada
3597 (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v). O gradiente de
3598 eluição foi o seguinte: 0-2 min- 3% de B, 2-25 min de 3-25% de B, 25-40 min de 25-
3599 80% de B, seguido da lavagem e recondicionamento da coluna (8 min). A vazão foi
3600 de 0,3 mL min^{-1} , volume de injeção foi de 1 μL e durante as análises a coluna
3601 cromatográfica foi mantida a 50 $^{\circ}\text{C}$. Todas as amostras foram preparadas na
3602 concentração de 1 mg mL^{-1} . O controle de qualidade consistiu de um *pool* produzido
3603 a partir da adição de 50 μL de cada amostra.

3604

3605 5.2.6.1 Processamento dos dados

3606 Os dados obtidos por CLAE-DAD-EM foram analisados e processados no
3607 software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics). Subsequentemente, os dados foram
3608 alinhados usando o software Metalign,(LOMMEN, 2009) submetidos à redução dos
3609 dados no MSclust,(TIKUNOV et al., 2012) sendo que foram listados vinte e dois
3610 compostos. As replicatas do *pool* foram comparadas para avaliar a reprodutibilidade
3611 do equipamento e para realizar o alinhamento das amostras. Então, os dados
3612 processados foram analisados na plataforma Metaboanalyst 3.0 platform(XIA et al.,
3613 2015) usando ferramentas de análise multivariada, sendo também aplicados para
3614 avaliar as variações das intensidades dos íons e as correlações significativas com as
3615 atividades biológicas ($p < 0,05$).

3616

3617 5.2.7 Análise estatística

3618 Os dados oriundos da atividade antioxidante dos extratos supercríticos de
3619 guaraná foram apresentados como a média \pm desvio padrão, de no mínimo três
3620 réplicas. A análise estatística foi realizada pelo *Statistical Analysis System* (SAS,
3621 versão 9.3). As diferenças entre as médias de diferentes níveis foram analisadas

3622 utilizando o teste de Tukey, e os valores médios foram considerados
3623 significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

3624 A Análise de Componentes Principais (ACP) foi implementada utilizando
3625 Statistica 7,0 software (Stat Soft Inc. América do Sul, Tulsa, OK, EUA). Em primeiro
3626 lugar, os dados foram auto-ajustados antes da aplicação quimiométrica (ZIELINSKI,
3627 ACÁCIO A.F. et al., 2014) e a PCA foi aplicada para distinguir as amostras de
3628 acordo com os níveis de CPT, DPPH, Frap, ABTS, e sistema xantina oxidase.

3629

3630 **5.3 Resultados e Discussão**

3631

3632 *5.3.1 Análise de dados da atividade antioxidante e CPT*

3633 Os métodos para medição da atividade antioxidante empregados neste
3634 trabalho são muito utilizados em extratos de plantas em diversos estudos
3635 (COMPAORE et al., 2011; EL EUCH, BOUJILA e BOUZOUITA, 2015; HWANG,
3636 HWANG e SONG, 2016). Os resultados das atividades antioxidantes dos quatro
3637 métodos (DPPH, Frap, ABTS e sistema xantina oxidase) são mostrados na Tabela
3638 5.1.

3639 Análises multivariadas são mais precisas do que as comparações
3640 univariadas (ZIELINSKI, ACÁCIO ANTONIO FERREIRA et al., 2014). Estas
3641 ferramentas quimiométricas são utilizadas para identificação, classificação e
3642 comparação de extratos e seus bioativos. Podem promover correlação entre as
3643 características pesquisadas como atividade antioxidante de diferentes espécies
3644 vegetais e suas partes. (ALVAREZ-ZAPATA et al., 2015; FARAG et al., 2016; SORA
3645 et al., 2015) Neste trabalho, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada
3646 a fim de avaliar em conjunto os dados de CPT e os resultados obtidos a partir da
3647 análise antioxidante dos seguintes métodos: DPPH, Frap, ABTS, e sistema oxidase
3648 xantina. O primeiro componente principal (CP1) explicou até 46,76% da variância
3649 total, e CP2, 23,32%; totalizando 69,78% da variância total (Figura 5.1). A CP1 foi
3650 responsável por separar as amostras por diferenças observadas a partir dos
3651 resultados de atividade antioxidante dos métodos Frap, ABTS e sistema xantina
3652 oxidase; enquanto a CP2, pelas diferenças observadas em DPPH e sistema xantina
3653 oxidase.

Tabela 5.1. Atividade antioxidante por quatro métodos e teor de polifenóis dos extratos supercríticos de *Paullinia cupana*.

Extratos	Cossolvente (40%)	Tempo de extração (min)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	CPT	DPPH	Frap	ABTS	Sistema xantina oxidase
					mg EP g /semente	IC ₅₀ (µg/mL)	µM de Trolox/ g de semente	µM de Trolox/g de semente	IC ₅₀ (µg/mL)
1	etanol	20	40	100	86,13±0,24 ^c	21,60±0,44 ^f	1540,31±50,02 ^b	1104,63±15,62 ^a	0,92±0,03 ^c
2	metanol	60	40	200	78,29±0,41 ^d	35,49±0,61 ^b	1507,47±45,63 ^b	999,56±12,99 ^b	0,36±0,01 ^f
3	etanol: metanol	40	40	300	105,76±1,09 ^a	34,60±0,90 ^b	733,51±32,79 ^f	632,12±7,33 ^{ef}	0,64±0,01 ^{de}
4	etanol	40	50	200	84,63±0,88 ^c	27,25±0,66 ^d	917,09±32,32 ^{de}	622,97±6,84 ^{ef}	0,73±0,01 ^d
5	metanol	20	50	300	67,70±1,03 ^f	29,60±1,10 ^c	907,36±18,78 ^e	655,19±18,71 ^e	0,73±0,02 ^d
6	etanol: metanol	60	50	100	88,90±0,03 ^b	25,07±1,03 ^{de}	872,40±26,00 ^e	581,52±7,33 ^g	1,31±0,06 ^b
7	etanol	60	60	300	68,64±0,90 ^{ef}	38,79±0,82 ^a	1057,36±28,48 ^c	768,03±12,43 ^d	1,31±0,04 ^b
8	metanol	40	60	100	69,88±0,88 ^e	24,28±0,06 ^e	1686,01±16,95 ^a	842,91±16,40 ^c	0,59±0,02 ^e
9	etanol: metanol	20	60	200	66,92±0,28 ^f	33,59±0,98 ^b	1001,88±11,95 ^{cd}	602,13±10,49 ^{fg}	1,52±0,06 ^a

Valores na mesma coluna seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$); IC₅₀ do padrão quercetina e trolox pelo método DPPH: 8,52±0,74 e 30,03±2,32 µg/mL, respectivamente; IC₅₀ do padrão quercetina e trolox pelo sistema xantina oxidase: 0,11±0,08 e 1,64±0,02 µg/mL, respectivamente;

*Os valores de atividade antioxidante pelos métodos DPPH e sistema xantina oxidase foram expressos IC₅₀, que é a concentração de extrato necessária para promover 50% da ação antioxidante;

**Os valores da atividade antioxidante pelos métodos Frap e ABTS foram expressos em micromol de equivalente de trolox por grama de semente (µM de trolox g de semente⁻¹);

***O conteúdo em polifenóis totais (CPT) foi expresso em miligramas de pirogalol por grama de sementes de guaraná (mg EP g semente⁻¹), publicado em trabalho anterior (MARQUES et al., 2016).

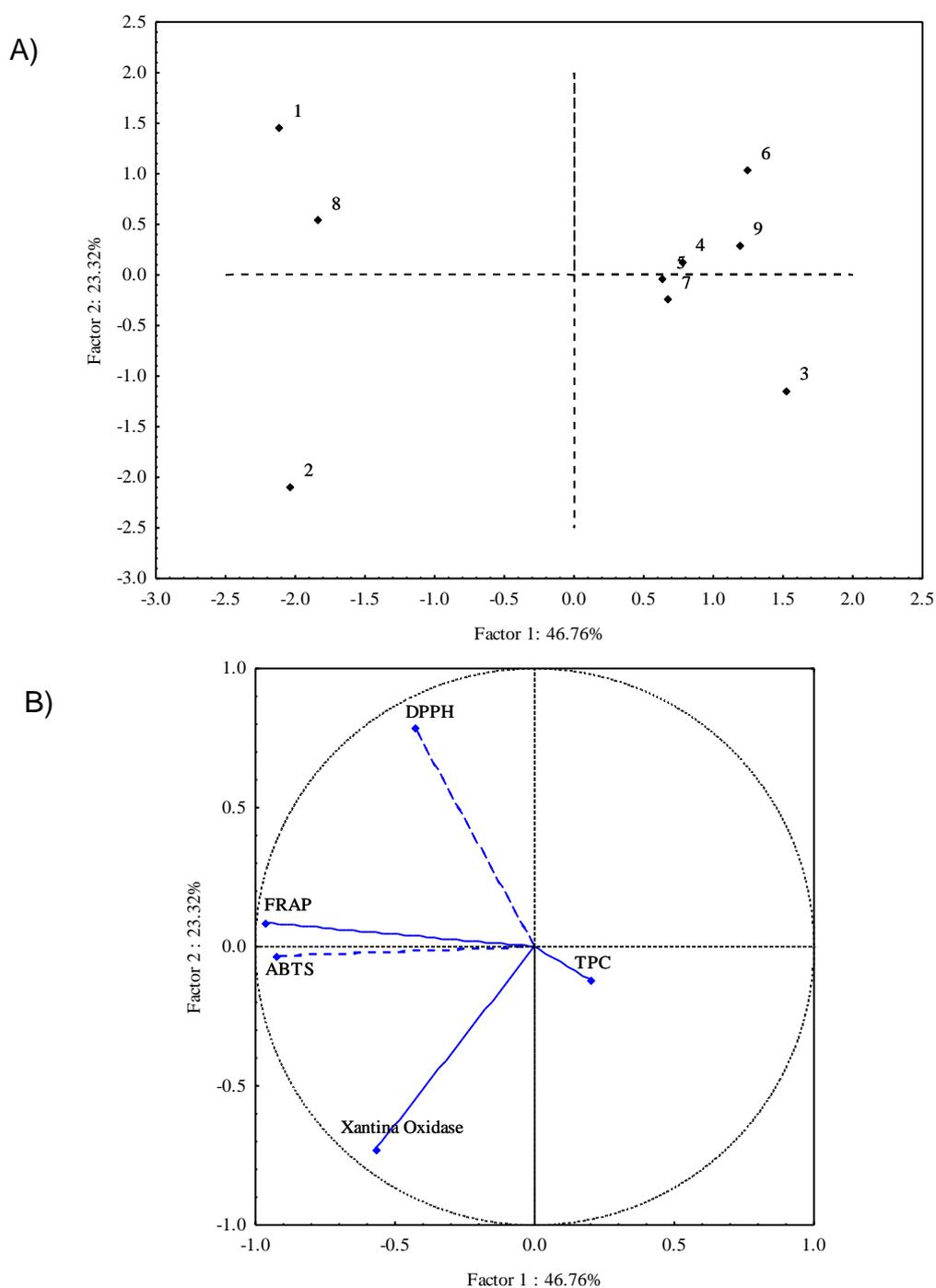


Figura 5.1 Gráfico de dispersão CP1 versus CP2 sobre as principais fontes de variabilidade de dados para atividade antioxidante e conteúdo em polifenóis totais em sementes supercríticas de guaraná. Escores (A) gráfico de pesos (B).

3654 Em associação com o gráfico de dispersão (escores e pesos) é possível saber
 3655 quais amostras foram relacionadas com os compostos fenólicos e atividade
 3656 antioxidante *in vitro*, sendo possível distinguir cada amostra ou amostras do grupo.

3657 Na Figura 5.1A, os extratos do lado esquerdo (1, 2 e 8) são caracterizados por
3658 maiores níveis de ensaios antioxidantes, enquanto que os demais extratos por níveis
3659 menores.

3660 Portanto, a partir da análise quimiométrica foi possível separar os extratos em
3661 dois grupos distintos. O grupo correspondente aos extratos 1 (etanol; 20 min; 40 °C
3662 e 100 bar), 2 (metanol; 60 min; 40 °C e 200 bar) e 8 (metanol; 40 min; 60 °C e 100
3663 bar), os quais apresentaram maiores valores combinado de atividade antioxidante
3664 pelos métodos DPPH, Frap, ABTS, e sistema xantina oxidase.

3665 O padrão cafeína, avaliado como controle nos métodos de detecção da
3666 atividade antioxidante, apresentou resultado negativo em todos os testes. Portanto,
3667 o efeito antioxidante não pode ser atribuído à cafeína isolada, apesar de todos os
3668 extratos apresentarem alto teor desta substância.

3669

3670 *5.3.2 Análises dos extratos por CLAE-DAD-EM*

3671 Os perfis químicos dos nove extratos provenientes da extração supercrítica de
3672 sementes de guaraná foram obtidos por CLAE-DAD-EM. Os perfis foram
3673 processados através de ferramentas estatísticas para a determinação da
3674 similaridade dos extratos e das correlações entre as composições químicas e as
3675 atividades antioxidantes. Os cromatogramas dos extratos, a 270 nm, encontram-se
3676 ilustrados na Figura 5.2, no qual foi possível visualizar grandes semelhanças
3677 químicas entre os extratos, sendo que o principal composto identificado foi a cafeína
3678 (Tabela 5.2, Figura 5.3). Outros constituintes com intensidades inferiores foram
3679 observados como, por exemplo, teobromina, teofilina, catequina, epicatequina,
3680 dímeros e trímeros de procianidinas tipo A e B.

3681 Os compostos foram identificados baseados nos dados espectrais de UV, da
3682 massa acurada e dos íons fragmento observados. Além disso, alguns metabólitos
3683 foram confirmados através da co-injeção de padrões autênticos.

3684 As intensidades dos íons para as metilxantinas (teobromina, teofilina e
3685 cafeína) tiveram apenas pequenas variações entre os extratos (Figura 5.4), assim
3686 como para os flavan-3-óis catequina e epicatequina.

3687

3688 *5.3.3 Correlações entre o perfil químico dos extratos e as atividades antioxidantes*

3689 Os coeficientes de correlação entre as atividades antioxidantes, os perfis
3690 químicos e CPT encontram-se ilustrados na Figura 5.5.

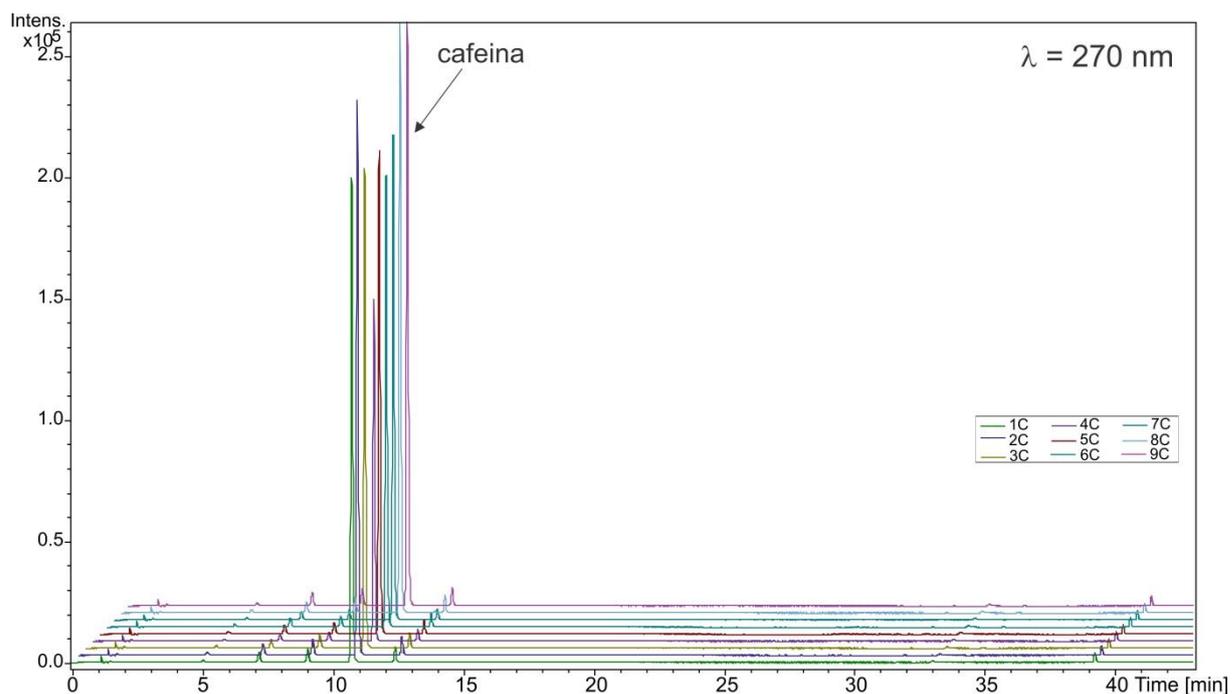


Figura 5.2. Cromatogramas a 270 nm dos extratos supercríticos de guaraná.

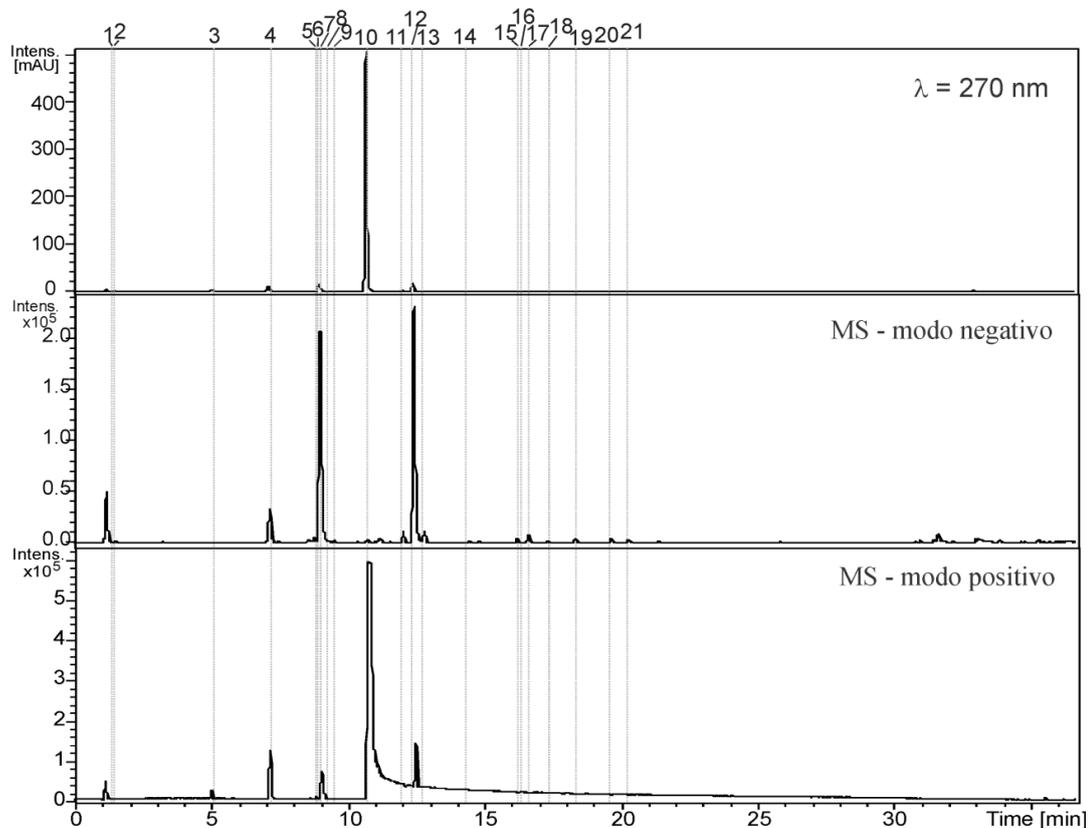


Figura 5.3. Cromatogramas do extrato 3 obtidos a 270 nm em modo de ionização negativa e positiva. A identificação dos picos encontra-se descrita na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Identificação dos constituintes dos extratos de *Paullinia cupana* por CLAE-DAD-EM.

Pico	RT (min)	Composto	UV (nm)	FM	Negativo (m/z) [*]		Positivo (m/z) [*]
					[M-H] ⁻	MS/MS	[M+H] ⁺
1	1,12	Aminoácido	-	C ₇ H ₁₃ NO ₃	158,0795	-	160,0977
2	1,15	di-O-hexosídeo	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1086	191	-
3	5,0	Teobromina	272	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	-	-	181,0704
4	7,10	Teofilina st	271	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	179,0575	164	181,0732
5	8,58	NI	275	C ₁₄ H ₁₆ O ₇	295,0823	165	297,0968
6	8,78	NI	275	C ₁₆ H ₁₀ N ₄ O ₄	321,0636	215, 175, 173, 161	323,0748
7	8,99	Catequina st	279	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0738	221, 203, 188, 175, 159	291,0871
8	9,04	PCY-PCY (tipo B)	278	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1388	289, 245, 221, 203, 179	579,1494
9	9,49	NI	278	C ₁₅ H ₁₄ O ₈	321,0621	173, 161	323,0786
10	10,70	Cafeína st	272	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₂	-	-	195,0879
11	12,02	PCY-PCY (tipo B)	278	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1375	407, 339, 289, 245, 179, 161	579,1518
12	12,41	Epicatequina	279	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0730	245, 221, 203, 187, 173, 161	291,0871
13	12,80	NI	278	C ₁₄ H ₁₄ O ₆	277,0721	233, 192, 191, 173	279,0857
14	14,46	PCY-PGU (tipo B)	278	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	561,1432	-	563,1562
15	16,21	PCY-PCY (tipo A)	278	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575,1210	285	577,1375
16	16,34	PCY-PCY-PCY (tipo A)	278	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	863,1832	-	865,2000
17	16,63	PCY-PCY (tipo A)	278	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575,1235	285	577,1372
18	17,35	PCY-PCY-PCY (tipo A)	278	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	863,1848	-	865,1993
19	18,40	PCY-PCY (tipo A)	278	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575,1224	285	577,1371
20	19,69	PCY-PCY (tipo A)	278	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575,1212	407, 285, 245, 217, 177, 163	577,1378
21	20,32	PCY-PCY (tipo A)	278	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575,1224	407, 299, 285, 271, 247	577,1365

*: erro menor do que 6 ppm; st: confirmado por co-injeção de padrão autênticos; PCY: procianidina, PGU: proguibourtinidina.

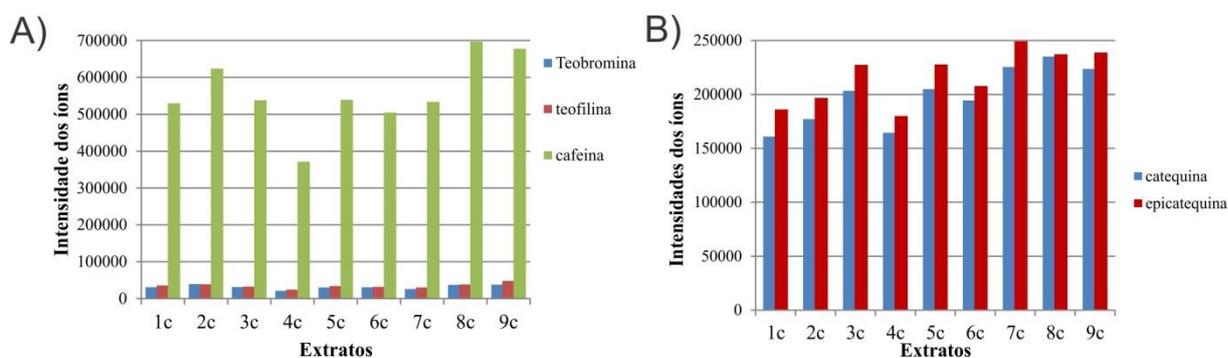


Figura 5.4 Intensidades dos íons observados nos diferentes extratos supercríticos de guaraná (1 a 9) relativos aos principais compostos: teobromina, teofilina e cafeína (A) e catequina e epicatequina (B).

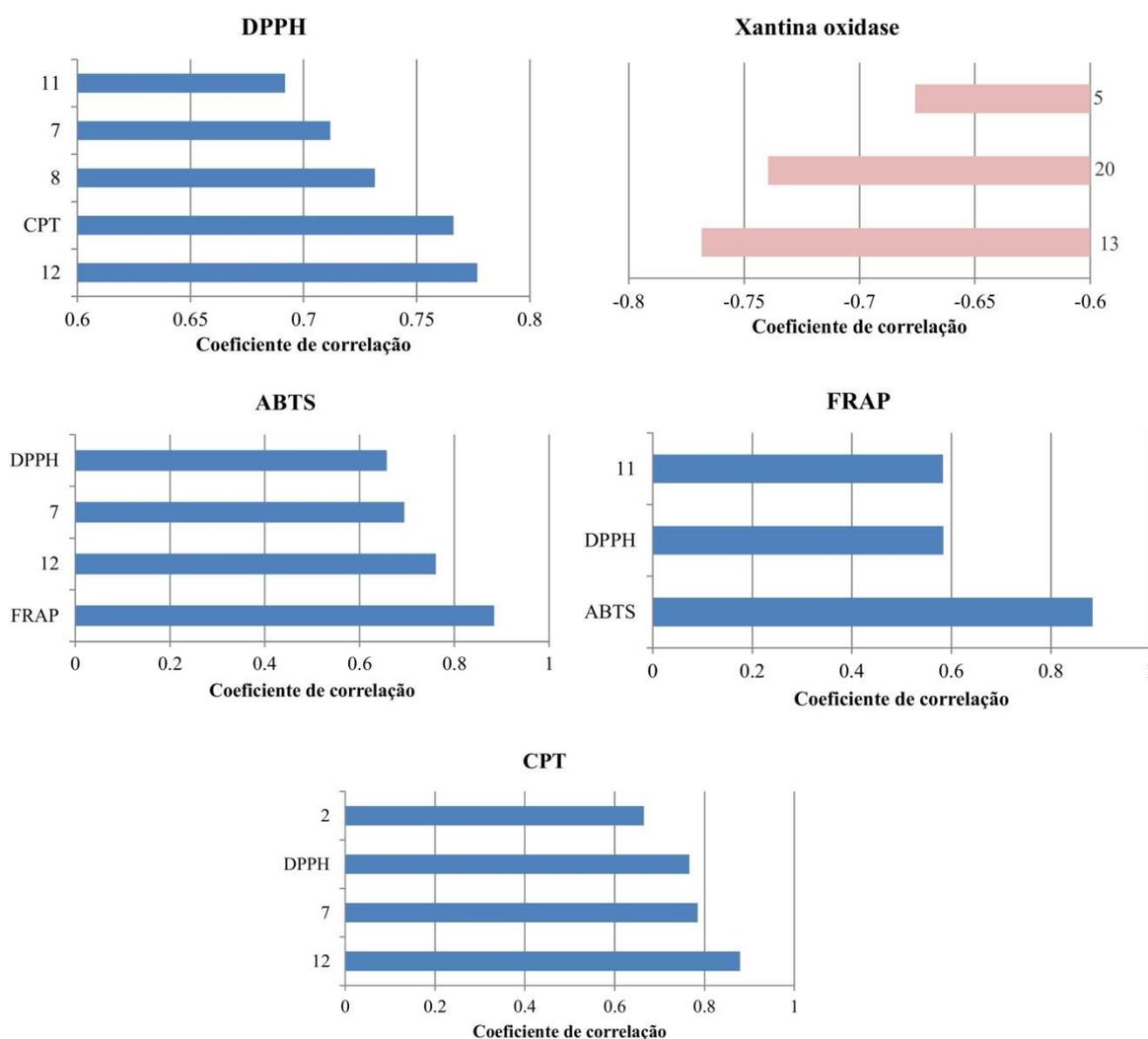


Figura 5.5. Coeficientes de correlação entre as atividades antioxidante, os perfis químicos e CPT (conteúdo em polifenóis totais). Azul: correlações positivas; Rosa: correlações negativas. Somente foram exibidas as correlações com $p < 0,05$. A identificação dos compostos encontra-se descrita na Tabela 5.2.

3691 Foi possível constatar uma correlação positiva entre CPT e DPPH, sendo que
 3692 foram mais significativas as correlações de CPT com os compostos di-O-hexosídeo
 3693 (2), catequina (7) e epicatequina (12). De maneira geral, as atividades antioxidantes
 3694 DPPH, Frap e ABTS apresentaram correlações positivas e significativas com os
 3695 metabólitos catequina (7), dois dímeros de procianidina do tipo B (8 e 11) e
 3696 epicatequina (12). Portanto, é sugerido que estes compostos tenham promovido o
 3697 efeito antioxidante identificado nos extratos.

3698 Entretanto para o sistema xantina oxidase, os coeficientes de correlações com
3699 maior nível de significância foram negativos, sendo estas correlações com os
3700 seguintes metabólitos: um dímero de procianidina tipo A (20) e dois metabólitos
3701 ainda não identificados até o presente momento (5 e 13). Além disso, convém
3702 destacar que as atividades antioxidantes DPPH, Frap e ABTS correlacionaram-se
3703 positivamente entre si, enquanto que nenhuma destas se correlacionou com o
3704 sistema xantina oxidase.

3705 A partir do mapa de calor (Figura 5.6), é possível observar que os metabólitos
3706 que se correlacionam com a atividade do sistema xantina oxidase são diferentes
3707 daqueles para as atividades antioxidantes de DPPH, Frap e ABTS. Alguns
3708 autores(POGACNIK e ULRIH, 2012) afirmam que a xantina oxidase tem vantagens
3709 sobre métodos espectrofotométricos, pois apresenta menor interferência para
3710 amostras coloridas. Adicionalmente, os ensaios quimioluminescentes são mais
3711 sensíveis que o DPPH e o ABTS, por exemplo. Entretanto, alguns compostos anti-
3712 radiculares podem ser instáveis em condições fortemente básicas utilizadas no
3713 ensaio de luminol.(DE OLIVEIRA et al., 2014)

3714

3715 5.3.4 Análises antimicrobianas

3716 O extrato 3 (etanol:metanol; 40 min; 40 °C e 300 bar) foi escolhido para os
3717 testes antimicrobianos por apresentar maior rendimento em trabalho
3718 anterior(MARQUES et al., 2016) e pelo perfil similar dos extratos obtidos por meio da
3719 análise química por CLAE-DAD-EM. A FA apresentou a característica de um pó
3720 solto, de cor creme e com rendimento de 20,47 mg (58,91%). Já a FH apresentou
3721 característica oleosa, após liofilização, de cor laranja escura e com rendimento de
3722 3,71 mg (10,68%). Em CCD, foi possível visualizar as diferenças presentes entre as
3723 amostras (Figura 5.7).

3724 Como mostrado na Tabela 5.3, foi possível observar que o processo de
3725 desengorduramento surtiu o efeito desejado, qual seja a de separar o(s)
3726 composto(s) com atividade antimicrobiana, observado por meio do Rf. A FA
3727 apresentou atividade frente a uma cepa bacteriana Gram-negativa (*Acinetobacter*
3728 *baumannii*). Adicionalmente, a FH apresentou atividade frente a bactérias Gram-
3729 positivas e em *Candida tropicalis*. A Figura 5.8 demonstra o resultado da
3730 bioautografia frente à *Staphylococcus aureus*.

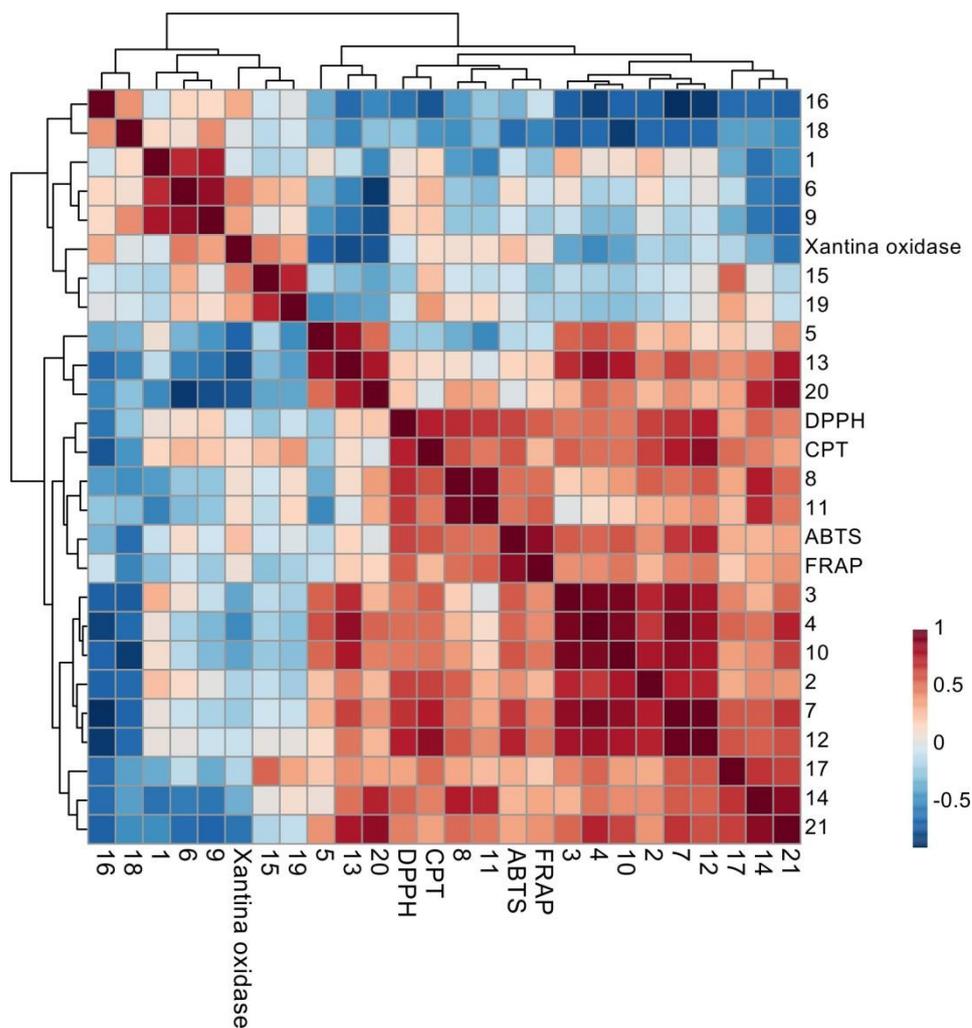


Figura 5.6. Mapa de calor dos compostos presentes nos extratos supercríticos de guaraná.

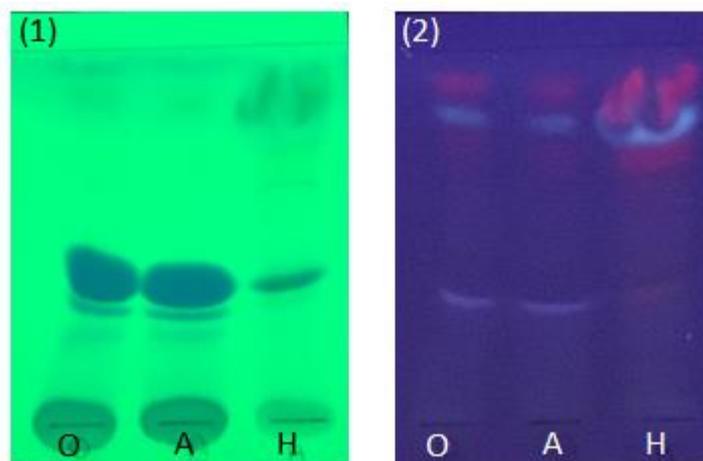


Figura 5.7. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos supercríticos de sementes de guaraná, reveladas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 nm (1) e 366 nm (2). “O”= extrato 3; “A”= fração aquosa; “H”= fração hexânica.

Tabela 5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos supercríticos de semente de guaraná antes (extrato 3), e depois do desgorduramento (fração aquosa, “FA”; e fração hexânica, “FH”) por meio do método de bioautografia.

Microrganismo	Atividade			Rf		
	Extrato 3	FA	FH	Extrato 3	FA	FH
Bactérias Gram-negativas						
<i>Klebsiella pneumoniae</i> isolado clínico 97	-	-	-			
<i>Acinetobacter baumannii</i> OXA-23	+	+	-	0,375/0,55	0,375/0,55	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	-	-	-			
Bactérias Gram-positivas						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29123	+	-	+	0,275		0,275
<i>Staphylococcus aureus</i> N315 (SAMR)	+	-	+	0,35		0,35
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	-	-	-			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-			
<i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1629	+		+	aplicação/0,275		aplicação/0,275
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CCT 0848	-	-	-			
Fungo leveduriforme						
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 2870	+	-	+	aplicação/0,275		aplicação/0,275
Fungos Filamentosos						
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-			
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-	-			
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	-	-			

+ Presença de atividade antimicrobiana; - Ausência de atividade antimicrobiana; Rf - Frente de retenção; (SAMR) *Staphylococcus aureus* N315 metilina resistente



Figura 5.8. Teste de bioautografia, revelado em solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) a 1%, dos extratos supercríticos de semente de guaraná antes (extrato 3, "O") e depois do desengorduramento (fração aquosa, "A" e fração hexânica, "H") frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29123.

3731 Diversos autores sugerem que os polifenóis presentes no guaraná são os
 3732 responsáveis por suas ações farmacológicas (BITTENCOURT et al., 2013;
 3733 OTOBONE et al., 2005; PORTELLA et al., 2013; SCHOLEY e HASKELL, 2008;
 3734 YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; YOUDIM, SHUKITT-HALE e JOSEPH, 2004).
 3735 Nenhum estudo publicado relaciona estas ações a compostos não polares ou
 3736 moderadamente polares presentes no guaraná. Como já demonstrado em
 3737 trabalho anterior do nosso grupo (MARQUES et al., 2016), a extração
 3738 supercrítica, com adição crescente de cossolventes (modificadores) pode
 3739 extrair, de forma seletiva, compostos fenólicos. Entretanto, esta extração, por
 3740 empregar CO₂ como fluido supercrítico além do modificador adicionado,
 3741 promove adicionalmente uma extração de compostos de baixo peso molecular
 3742 (<250) e polaridade ou fracamente polares.(RAVENTOS, DUARTE e
 3743 ALARCON, 2002) Estes compostos podem ser representativos no espectro de
 3744 atividade antimicrobiana apresentado neste estudo. Portanto, a fração hexânica
 3745 mostrou-se com promissora atividade antimicrobiana frente a microrganismos
 3746 Gram-positivos e *Candida tropicalis*.

3747 **Agradecimentos**

3748 Nós estendemos nossos agradecimentos ao Comcap (UEM), CNPq, Fundação
3749 Araucária, Capes, INCT_if e Finep pelo suporte financeiro, e Admir Arantes pelo
3750 apoio técnico.

3751 **5.4 Referências**

- 3752
3753 ALVAREZ-ZAPATA, R.; SANCHEZ-MEDINA, A.; CHAN-BACAB, M.; GARCIA-
3754 SOSA, K.; ESCALANTE-EROSA, F.; GARCIA-RODRIGUEZ, R. V.; PENA-
3755 RODRIGUEZ, L. M. Chemometrics-enhanced high performance liquid
3756 chromatography-ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically
3757 unknown plants. **Journal of Chromatography A**, v. 1422, p. 213-221, Nov 2015.
3758 ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365368300024 >.
3759
- 3760 BARBOSA, G. D. A.; MELLO, J. C. P. Clinical evaluation of the guarana extract on
3761 the dental plaque control (in Portuguese). **Revista Paulista de Odontologia**, v. 26,
3762 n. 4, p. 28-30, 2004.
3763
- 3764 BITTENCOURT, L. S.; MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; DOS SANTOS, G. F.;
3765 ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, D. R.; RIBEIRO, E. E.; SOARES, F. A.; BARBISAN,
3766 F.; ATHAYDE, M. L.; CRUZ, I. B. The protective effects of guarana extract (*Paullinia*
3767 *cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and**
3768 **Chemical Toxicology**, v. 53, p. 119-25, Mar 2013. ISSN 1873-6351 (Electronic)
3769 0278-6915 (Linking). Disponível em: <
3770 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220610> >.
3771
- 3772 BOLNER, A.; MICCIOLO, R.; BOSELLO, O.; NORDERA, G. A panel of oxidative
3773 stress markers in Parkinson's disease. **Clinical Laboratory**, v. 62, n. 1-2, p. 105-
3774 112, 2016. ISSN 1433-6510. Disponível em: <<Go to
3775 ISI>://WOS:000370463700013 >.
3776
- 3777 BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method
3778 to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.
3779 28, p. 25-30, 1995.
3780
- 3781 CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Guarana
3782 (*Paullinia cupana* Mart.) Offers Protection Against Gastric Lesions Induced by
3783 Ethanol and Indomethacin in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1199-1202,
3784 2003.
3785
- 3786 CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK,
3787 S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between
3788 Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**,
3789 v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.
3790
- 3791 CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that**
3792 **grow aerobically**. Approved Standard. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory
3793 Standards Institute. (M07-A8 2011).
3794
- 3795 COMPAORE, M.; LAMIEN-MEDA, A.; MOGOSAN, C.; LAMIEN, C. E.;
3796 KIENDREBEOGO, M.; VOSTINARU, O.; VLASE, L.; IONESCU, C.; NACOULMA, O.
3797 G. Antioxidant, diuretic activities and polyphenol content of *Stereospermum*
3798 *kunthianum* Cham. (Bignoniaceae). **Natural Product Research**, v. 25, n. 19, p.

- 3799 1777-1788, 2011. ISSN 1478-6419. Disponível em: < <Go to
3800 ISI>://WOS:000299692600001 >.
- 3801
- 3802 COSTA, J. G. M. D.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.;
3803 SOUZA, E. O. D.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.;
3804 SANTOS, P. F. D. Chemical composition and evaluation of the antibacterial activity
3805 and toxicity of the essential oil of *Croton zehntneri* (variety estragol) (in Portuguese).
3806 **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008. ISSN 0102-
3807 695X. Disponível em: <
3808 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-
3809 695X2008000400015&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400015&nrm=iso) >.
- 3810
- 3811 DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Guarana powder
3812 polysaccharides:characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic
3813 fraction. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1804-1812, 2012.
- 3814
- 3815 DE OLIVEIRA, S.; DE SOUZA, G. A.; ECKERT, C. R.; SILVA, T. A.; SOBRAL, E. S.;
3816 FAVERO, O. A.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; BAADER, W. J. Evaluation of
3817 antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds
3818 and plant extracts. **Quimica Nova**, v. 37, n. 3, p. 497-+, 2014. ISSN 0100-4042.
3819 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336256700019 >.
- 3820
- 3821 DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological**
3822 **Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- 3823
- 3824 EL EUCH, S. K.; BOUAJILA, J.; BOUZOUITA, N. Chemical composition, biological
3825 and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts.
3826 **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 1100-1105, Dec 2015. ISSN 0926-6690.
3827 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000364890600135 >.
- 3828
- 3829 FARAG, M. A.; HANDOUSSA, H.; FEKRY, M. I.; WESSJOHANN, L. A. Metabolite
3830 profiling in 18 Saudi date palm fruit cultivars and their antioxidant potential via UPLC-
3831 qTOF-MS and multivariate data analyses. **Food & Function**, v. 7, n. 2, p. 1077-1086,
3832 2016. ISSN 2042-6496. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000370692900045 >.
- 3833
- 3834 FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; Z Aidan-DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart. var.
3835 *sorbilis*, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice
3836 by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC
3837 cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 11-16, 2011.
- 3838
- 3839 GHAFOR, K.; AL-JUHAIMI, F. Y.; CHOI, Y. H. Supercritical Fluid Extraction of
3840 Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape (*Vitis labrusca* B.) Seeds. **Plant**
3841 **Foods for Human Nutrition**, v. 67, p. 407-414, 2012.
- 3842
- 3843 HWANG, K. A.; HWANG, Y. J.; SONG, J. Antioxidant activities and oxidative stress
3844 inhibitory effects of ethanol extracts from *Cornus officinalis* on raw 264.7 cells. **Bmc**
3845 **Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, Jul 2016. ISSN 1472-6882.
3846 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000379228400003 >.
- 3847

- 3848 LOMMEN, A. MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated
3849 full-scan mass spectrometry data preprocessing. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8,
3850 p. 3079-3086, Apr 2009. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to
3851 ISI>://WOS:000265158800033 >.
3852
- 3853 MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of
3854 guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1258-1268, 2007.
3855
- 3856 MARQUES, L. L. M.; PANIZZON, G. P.; AGUIAR, B. A. A.; SIMIONATO, A. S.;
3857 CARDOZO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; OLIVEIRA, A. G. D.; GUEDES, T. A.; MELLO,
3858 J. C. P. D. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: selective supercritical extraction of
3859 phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 212, n. 1, p. 703-711, 2016.
3860
- 3861 MARX, F. Analysis of guarana seeds. II. Studies on the composition of the tannin
3862 fraction **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 190, p.
3863 429-431, 1990.
3864
- 3865 MELO, M. M. R. D.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction
3866 of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing
3867 green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115-176, 2014.
3868
- 3869 MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; BEEK, T. A. V. Screening of radical
3870 scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**,
3871 v. 85, p. 231-237, 2004.
3872
- 3873 MORAIS, S. M. D.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A.
3874 Antioxidant action of teas and seasonings more consumed in Brazil (in Portuguese).
3875 **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, 2009.
3876
- 3877 OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; OBICI, S.;
3878 MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purified constituents
3879 from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)) Lucke on cognitive
3880 performance in morris water maze in rats. **Brazilian Archives of Biology and
3881 Technology**, v. 48, p. 723-728, 2005.
3882
- 3883 OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V.
3884 R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds
3885 [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. .
3886 **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 531-535, 2007.
3887
- 3888 PAGLIARUSSI, R. S.; FREITAS, L. A. P.; BASTOS, J. K. A quantitative method for
3889 the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column
3890 gas chromatography. **Journal of separation science**, v. 25, p. 1-6, 2002.
3891
- 3892 POGACNIK, L.; ULRIH, N. P. Application of optimized chemiluminescence assay for
3893 determination of the antioxidant capacity of herbal extracts. **Luminescence**, v. 27, n.
3894 6, p. 505-510, Nov-Dec 2012. ISSN 1522-7235. Disponível em: < <Go to
3895 ISI>://WOS:000314529400012 >.
3896

- 3897 PORTELLA, R. D. L.; BARCELOS, R. P.; ROSA, E. J. F. D.; RIBEIROS, E. E.;
3898 CRUZ, I. B. M. D.; SULEIMAN, L.; SOARES, F. A. A. Guaraná (*Paullinia cupana*
3899 Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids**
3900 **in Health and Disease**, v. 12, p. 1-9, 2013.
- 3901
3902 RAHALISON, L.; HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K.; MONOD, M.; FRENK, E.
3903 Bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from
3904 higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-203, 1991.
- 3905
3906 RAMSEY, E.; SUN, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.; GOU, W. Mini-review: green
3907 sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. **Journal of**
3908 **Environmental Sciences**, v. 21, p. 720-726, 2009.
- 3909
3910 RAVENTOS, M.; DUARTE, S.; ALARCON, R. Application and possibilities of
3911 supercritical CO₂ extraction in food processing industry: An overview. **Food Science**
3912 **and Technology International**, v. 8, n. 5, p. 269-284, Oct 2002. ISSN 1082-0132.
3913 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181048200002 >.
- 3914
3915 ROBERT, A. M.; ROBERT, L. Xanthine oxido-reductase, free radicals and
3916 cardiovascular disease. A critical review. **Pathology & Oncology Research**, v. 20,
3917 n. 1, p. 1-10, Jan 2014. ISSN 1219-4956. Disponível em: < <Go to
3918 ISI>://WOS:000329356600001 >.
- 3919
3920 RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M. SAMPAIO, C. G.,
3921 PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica:**
3922 **determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução**
3923 **do ferro (FRAP) (in Portuguese)**. Fortaleza: EMBRAPA 2006.
- 3924
3925 RUFINO, M. S. M. A., R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-
3926 JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da**
3927 **atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺ (in**
3928 **Portuguese)**. Fortaleza: EMBRAPA 2007.
- 3929
3930 RUXTON, C. H. S.; KIRKWOOD, L.; MCMILLAN, B.; JOHN, D. S.; EVANS, C. E. L.
3931 Effectiveness of a herbal supplement (ZotrimTM) for weight management. **British**
3932 **Food Journal**, v. 109, n. 6, p. 416-428, 2007.
- 3933
3934 SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONCALVES, J. F.; MAZZAFERA, P. Guarana:
3935 revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of**
3936 **Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, Oct 28 2013. ISSN 1872-7573
3937 (Electronic)
3938 0378-8741 (Linking). Disponível em: <
3939 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981847> >.
- 3940
3941 SCHOLEY, A.; HASKELL, C. Neurocognitive effects of guaraná plant extract. **Drugs**
3942 **of the Future**, v. 33, n. 10, p. 869, 2008.
- 3943
3944 SINGH, A. K.; PANDEY, P.; TEWARI, M.; PANDEY, H. P.; GAMBHIR, I. S.;
3945 SHUKLA, H. S. Free radicals hasten head and neck cancer risk: A study of total
3946 oxidant, total antioxidant, DNA damage, and histological grade. **Journal of**

- 3947 **Postgraduate Medicine**, v. 62, n. 2, p. 96-101, Apr-Jun 2016. ISSN 0022-3859.
3948 Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000375010300007 >.
3949
- 3950 SORA, G. T. S.; HAMINIUK, C. W. I.; DA SILVA, M. V.; ZIELINSKI, A. A. F.;
3951 GONCALVES, G. A.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. A comparative study of the
3952 capsaicinoid and phenolic contents and in vitro antioxidant activities of the peppers of
3953 the genus *Capsicum*: an application of chemometrics. **Journal of Food Science and**
3954 **Technology-Mysore**, v. 52, n. 12, p. 8086-8094, Dec 2015. ISSN 0022-1155.
3955 Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365094600048 >.
3956
- 3957 TIKUNOV, Y. M.; LAPTENOK, S.; HALL, R. D.; BOVY, A.; DE VOS, R. C. H.
3958 MScIust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass
3959 spectrometry ion-wise aligned data. **Metabolomics**, v. 8, n. 4, p. 714-718, Aug 2012.
3960 ISSN 1573-3882. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306549600016 >.
3961
- 3962 VARGAS, H. I. C.; VARELA, L. I. R.; FERREIRA, S. R. S.; ALFONSO, F. P.
3963 Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using
3964 supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.
3965 51, p. 319-324, 2010.
3966
- 3967 XIA, J. G.; SINELNIKOV, I. V.; HAN, B.; WISHART, D. S. MetaboAnalyst 3.0-making
3968 metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251-
3969 W257, Jul 2015. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to
3970 ISI>://WOS:000359772700039 >.
3971
- 3972 YAHYAZADEH, M.; OMIDBAIGI, R.; ZARE, R.; TAHERI, H. Effects of some essential
3973 oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **World Journal of**
3974 **Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1445-1450, 2008.
3975
- 3976 YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.;
3977 UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P.
3978 Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts
3979 and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.
3980
- 3981 YODIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain:
3982 interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central
3983 nervous system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1683-93, Dec 1
3984 2004. ISSN 0891-5849 (Print)
3985 0891-5849 (Linking). Disponível em: <
3986 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528027> >.
3987
- 3988 ZIELINSKI, A. A. F.; ÁVILA, S.; ITO, V.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.; HAMINIUK,
3989 C. W. I. The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and in vitro
3990 antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: an application of chemometrics.
3991 **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. C510-C516, 2014. ISSN 1750-3841.
3992 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12389> >.
3993
- 3994 ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; NUNES, C. A.; SCHNITZLER, E.; RUTH,
3995 S. M. V.; GRANATO, D. Chemical composition, sensory properties, provenance, and
3996 bioactivity of fruit juices as assessed by chemometrics: a critical review and

3997 guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p.
3998 300-316, 2014.

6. CONCLUSÕES

3999 A revisão sobre guaraná apresentou um amplo cenário de tudo o que já foi
4000 publicado a respeito desta planta. Isto inclui a impressionante versatilidade de suas
4001 funções farmacológicas, histórico desta planta, dados sobre suas características
4002 botânicas, aspectos químicos, cultura e processamento. Adicionalmente esta revisão
4003 abordou novos tópicos como toxicologia do guaraná, o fundamental controle de
4004 qualidade da droga vegetal e seus extratos e ainda uma detalhada discussão a
4005 respeito da importância da preparação e padronização do extrato para a posterior
4006 investigação de sua propriedade farmacológica.

4007 A tecnologia supercrítica utilizada neste trabalho para extração de sementes de
4008 guaraná (*Paullinia cupana*) mostrou-se eficiente na obtenção de compostos
4009 fenólicos. A utilização de delineamento de matriz ortogonal $OA_9(3^4)$ forneceu dados
4010 precisos, utilizando experimentos fracionários, o que facilitou a investigação de
4011 quatro fatores em três níveis que impactam na extração supercrítica. Além disso, o
4012 emprego de modificadores promoveu um aumento na extração de compostos
4013 polares (catequina e epicatequina) proporcionalmente a percentagem do modificador
4014 empregada. O experimento Z, que utilizou 40% de modificador, mostrou ser
4015 promissor em comparação aos experimentos X e Y, relativo à quantidade de
4016 compostos bioativos. Portanto, a condição de extração supercrítica que provou ser a
4017 condição de escolha baseada na combinação custo, segurança, rendimento e CPT
4018 foi: etanol:metanol a 40%, por 40 min, 40 °C e 100 bar.

4019 Adicionalmente, o extrato supercrítico de sementes de guaraná proveniente do
4020 experimento Z mostrou uma promissora atividade antimicrobiana contra SAMR
4021 N315. Desta forma, este extrato tem potencial para utilização no tratamento de
4022 infecções nosocomiais ou como adjuvante do tratamento. Além disso, a fração
4023 hexânica do extrato 3 (etanol:metanol; 40 min; 40 °C e 300 bar) mostrou
4024 interessante atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e *Candida*
4025 *tropicalis*.

4026 A análise do perfil químico por CLAE-DAD-EM, dos extratos supercríticos de
4027 sementes de guaraná do experimento Z, identificou grandes semelhanças químicas
4028 entre os nove extratos. Além da cafeína, outros constituintes com intensidades
4029 inferiores foram observados como, por exemplo, teobromina, teofilina, catequina,
4030 epicatequina, dímeros e trímeros de procianidinas tipo A e B.

4031 Os métodos DPPH, Frap e ABTS correlacionaram-se positivamente entre si e
4032 com os metabólitos catequina, epicatequina e procianidina do tipo B. Portanto, é
4033 sugerido que estes compostos tenham promovido o efeito antioxidante identificado
4034 nos extratos.

7. REFERÊNCIAS

- 4036 ABDULLAH, S. A. **Solubility in supercritical carbon dioxide**. 2007. 200p (Master
4037 of Science). Chemical Engineering, Faculty of New Jersey Newark.
4038
- 4039 AHSANUDDIN, S.; LAM, M.; BARON, E. D. Skin aging and oxidative stress. **Aims**
4040 **Molecular Science**, v. 3, n. 2, p. 187-195, 2016. ISSN 2372-0301. Disponível em: <
4041 <Go to ISI>://WOS:000378352500005 >.
4042
- 4043 ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro
4044 methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p.
4045 143-152, 2013.
4046
- 4047 ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a
4048 South American herbal preparation in overweight patients. **Journal Of Human**
4049 **Nutrition And Dietetics**, v. 14, p. 243-250, 2001.
4050
- 4051 ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – a brief review (in
4052 Portuguese). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
4053
- 4054 **Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations**.
4055 London: Review on Antimicrobial Resistance, 2014. 16p Disponível em: <
4056 [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)
4057 [%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)
4058 [nations_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf) >.
4059
- 4060 ARAÚJO, R. F. M.; ROLIM-NETO, P. J.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; AMARAL, F.
4061 M. M.; NUNES, L. C. C. Phytomedicines: legislation and market in Brazil. **Revista**
4062 **Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 331-341, 2013.
4063
- 4064 ASIMI, O. A.; SAHU, N. P.; PAL, A. K. Antioxidant capacity of crude water and ethyl
4065 acetate extracts of some Indian spices and their antimicrobial activity against *Vibrio*
4066 *vulnificus* and *Micrococcus luteus* **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n.
4067 26, p. 1907-1915, 2013.
4068
- 4069 AUDI, E. A.; MELLO, J. C. P. **Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal**
4070 **guaraná (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis* (Martius) Ducke, PI 0006638-9 (Patent)**.
4071 Brasil: Universidade Estadual de Maringá. PI 0006638-9 2000.
4072
- 4073 AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.;
4074 SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFLOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A.
4075 K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a
4076 review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436, 2013.
4077
- 4078 BADARINATH, A. V.; RAO, K. M.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, V.; RAJAN, T. V.
4079 S.; GNANAPRAKASH, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons,
4080 correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v.
4081 2, n. 2, p. 1276–1285, 2010.
4082
- 4083 BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants
4084 and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.
4085 **Food Chemistry**, v. 99, p. 191–203, 2006.

- 4086
4087 BARBOSA, G. D. A.; MELLO, J. C. P. Clinical evaluation of the guarana extract on
4088 the dental plaque control (in Portuguese). **Revista Paulista de Odontologia**, v. 26,
4089 n. 4, p. 28-30, 2004.
- 4090
4091 BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; LAGANÀ, G.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, C.
4092 Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives
4093 present in apple and kumquat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 292–297, 2014.
- 4094
4095 BASILE, A.; FERRAR, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.;
4096 MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from
4097 Paullinia cupana Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.
- 4098
4099 BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and
4100 periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in
4101 plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 101-110, 2000.
- 4102
4103 BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; RIO, J. A. D.
4104 Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food**
4105 **Chemistry**, v. 45, p. 4505–4515, 1997.
- 4106
4107 BIANCHI, F.; CARERI, M. Experimental design techniques for optimization of
4108 analytical methods. Part I: separation and sample preparation techniques. **Current**
4109 **Analytical Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 55-74, 2008.
- 4110
4111 BOLNER, A.; MICCIOLO, R.; BOSELLO, O.; NORDERA, G. A panel of oxidative
4112 stress markers in Parkinson's disease. **Clinical Laboratory**, v. 62, n. 1-2, p. 105-
4113 112, 2016. ISSN 1433-6510. Disponível em: < <Go to
4114 ISI>://WOS:000370463700013 >.
- 4115
4116 BONDA, D. J.; WANG, X. L.; LEE, H. G.; SMITH, M. A.; PERRY, G.; ZHU, X. W.
4117 Neuronal failure in Alzheimer's disease: a view through the oxidative stress looking-
4118 glass. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 243-252, Apr 2014. ISSN 1673-7067.
4119 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334513200009 >.
- 4120
4121 BONDA, D. J.; WANG, X. L.; PERRY, G.; NUNOMURA, A.; TABATON, M.; ZHU, X.
4122 W.; SMITH, M. A. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention.
4123 **Neuropharmacology**, v. 59, n. 4-5, p. 290-294, Sep-Oct 2010. ISSN 0028-3908.
4124 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282072000007 >.
- 4125
4126 BOOZER, C. N.; NASSER, J. A.; HEYMSFIELD, S. B.; WANG, V.; CHEN, G.;
4127 SOLOMON, J. L. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight
4128 loss:a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity**, v. 25, p.
4129 316-324, 2001.
- 4130
4131 BRAGA, L. C.; LEITE, A. A. M.; XAVIER, K. G. S.; TAKAHASHI, J. A.;
4132 BEMQUERER, M. P.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Synergic
4133 interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus*
4134 *aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 541-547, 2005/07/01

- 4135 2005. ISSN 0008-4166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/w05-022> >.
4136 Acesso em: 2016/09/06.
4137
- 4138 BRAVI, E.; PPERRETTI, G.; MOTANARI, L.; FAVATI, F.; FANTOZZI, P. Supercritical
4139 fluid extraction for quality control in beer industry. **Journal of Supercritical Fluids**,
4140 v. 42, p. 342-346, 2007.
4141
- 4142 BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing.
4143 **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21-23, 2005.
4144
- 4145 CHANDA, S.; DAVE, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some
4146 medicinal plants possessing antioxidant properties: an overview. **African Journal of**
4147 **Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 981-996, Dec 2009. ISSN 1996-0808.
4148 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275387400001 >.
4149
- 4150 CHANG, C. J.; CHIU, K.; CHEN, Y.; CHANG, C. Y. Separation of catechins from
4151 green tea using carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 68, p. 109-113,
4152 2000.
4153
- 4154 CHITEMERERE, T. A.; MUKANGANYAMA, S. In vitro antibacterial activity of
4155 selected medicinal plants from Zimbabwe. **African Journal of Plant Science**, v. 5, p.
4156 1-7, 2011.
4157
- 4158 CHUKWUJEKWU, J. C.; VAN STADEN, J. In vitro antibacterial activity of *Combretum*
4159 *edwardsii*, *Combretum krausii*, and *Maytenus nemorosa* and their synergistic effects
4160 in combination with antibiotics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, Jul 2016. ISSN
4161 1663-9812. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000379670500001 >.
4162
- 4163 COAST, J.; SMITH, R. D.; MILLAR, M. R. Superbugs: should antimicrobial resistance
4164 be included as a cost in economic evaluation? **Health Economics**, v. 5, p. 217–226,
4165 1996.
4166
- 4167 COSTA, J. G. M. D.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.;
4168 SOUZA, E. O. D.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.;
4169 SANTOS, P. F. D. Chemical composition and evaluation of the antibacterial activity
4170 and toxicity of the essential oil of *Croton zehntneri* (variety estragol) (in Portuguese).
4171 **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008. ISSN 0102-
4172 695X. Disponível em: <
4173 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-
4174 695X2008000400015&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400015&nrm=iso) >.
4175
- 4176 DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Guarana powder
4177 polysaccharides: characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic
4178 fraction. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1804-1812, 2012.
4179
- 4180 DHAWAN, A.; ANDERSON, D.; PASCUAL-TERESA, S. D.; SANTOS-BUELGA, C.;
4181 M. N. , C.; IOANNIDES, C. Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric
4182 and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced
4183 DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay. **Mutation Research**, v.
4184 515, n. 1-2, p. 39–56, 2002.

- 4185
4186 DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839,
4187 p. 843-847, 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
4188 <http://dx.doi.org/10.1038/35081178> >.
4189
- 4190 ETTEFAGH, K. A.; BURNS, J. T.; JUNIO, H. A.; KAATZ, G. W.; CECH, N. B.
4191 Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the
4192 antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. **Planta Medica**, v. 77, n.
4193 8, p. 835-840, 2011.
4194
- 4195 FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of
4196 porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n.
4197 4, p. 661-681, 2012.
4198
- 4199 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças
4200 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo (in Portuguese). **Revista da**
4201 **Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997. ISSN 0104-4230. Disponível
4202 em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&nrm=iso)
4203 [42301997000100014&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&nrm=iso) >.
4204
- 4205 FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in
4206 combination with chlorhexidine digluconate. **Oral microbiology and immunology**, v.
4207 20, n. 4, p. 221-225, 2005.
4208
- 4209 FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.;
4210 DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation
4211 and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice **Brazilian**
4212 **Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 305-310, 2008.
4213
- 4214 FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; ZAIDAN-DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart. var.
4215 *sorbilis*, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice
4216 by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC
4217 cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 11-16, 2011.
4218
- 4219 FUKUMASU, H.; SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; LIMA, C. E.; MACKWIAK, I. I.;
4220 ATROCH, A.; SPINOSA, H. S.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive
4221 effects of *Paullinia cupana* Mart. Var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse
4222 hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, p. 158-164, 2006.
4223
- 4224 GALDURÓZ, J. C. F.; CARLINI, E. D. A. The effects of long-term administration of
4225 guarana on the cognition of normal, elderly volunteers. **São Paulo Med. J.**, v. 114, n.
4226 1, p. 1073-1078, 1996.
4227
- 4228 GHAFLOOR, K.; AL-JUHAIMI, F. Y.; CHOI, Y. H. Supercritical fluid extraction of
4229 phenolic compounds and antioxidants from grape (*Vitis labrusca* B.) seeds. **Plant**
4230 **Foods for Human Nutrition**, v. 67, p. 407-414, 2012.
4231
- 4232 GOLI, A. H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic
4233 compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. **Food Chemistry**, v. 92, p.
4234 521-525, 2005.

- 4235
4236 HAMERSKI, L.; SOMNER, G. V.; TAMAIO, N. *Paullinia cupana* Kunth
4237 (Sapindaceae): A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and
4238 pharmacology. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 30, p. 2221-2229,
4239 2013.
- 4240
4241 HASLAM, E. **Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition**
4242 **and physiological action**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 440p
4243
- 4244 HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants:
4245 chemistry, metabolism and structure–activity relationships. **The Journal of**
4246 **Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.
- 4247
4248 HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinina cupana* var. *sorbilis*): ecological and social
4249 perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **Journal of**
4250 **Ethnopharmacology**, v. 6, p. 311-338, 1982.
- 4251
4252 HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid
4253 extraction: recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v.
4254 1217, p. 2495–2511, 2010.
- 4255
4256 HERTZ, E.; CADONÁ, F. C.; MACHADO, A. K.; AZZOLIN, V.; HOLMRICH, S.;
4257 ASSMANN, C.; LEDUR, P.; RIBEIRO, E. E.; FILHO, O. C. D. S.; MÂNICA-CATTANI,
4258 M. F.; CRUZ, I. B. M. D. Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell
4259 response to chemotherapeutic drugs. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, p. 37-
4260 43, 2015.
- 4261
4262 HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and
4263 bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-942, 1999.
- 4264
4265 HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity
4266 assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856,
4267 Mar 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227736100001
4268 >.
- 4269
4270 HUANG, Z.; SHI, X.-H.; JIANG, W.-J. Theoretical models for supercritical fluid
4271 extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 2-26, 2012.
- 4272
4273 IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola (in Portuguese)**.
4274 COAGRO. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE: 1-113
4275 p. 2016.
- 4276
4277 JESUS, N. Z. T. D.; FALCÃO, H. D. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. D. A.; LIMA, G. R.
4278 D. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S. D.; ATHAYDE-
4279 FILHO, P. F. D.; BATISTA, L. M. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms-
4280 review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3203-3228, 2012.
- 4281
4282 JUNIOR, M. R. M.; LEITE, A. V.; DRAGANO, N. R. V. Supercritical fluid extraction
4283 and stabilization of phenolic compounds from natural sources – review. **The Open**
4284 **Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 51-60, 2010.

- 4285
4286 JUNIOR, P. F. D. S.; MUNIZ, E. B.; PEREIRA, N. A.; OLIVEIRA, M. A. S. *In vitro*
4287 antimicrobial activity of aqueous extracts, hydroalcoholic and alcoholic species of
4288 *Anacardiaceae* family (in Portuguese). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**,
4289 v. 15, n. 1, p. 56-61, 2016.
- 4290
4291 KARALE, C. K.; DERE, P. J.; HONDE, B. S.; KOTHULE, S.; KOTE, A. P. A overview
4292 on supercritical fluid extraction for herbal drugs. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 575-
4293 596, 2011.
- 4294
4295 KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-
4296 MAUND, J. C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARA, A.; SCHOLEY,
4297 A. B. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin
4298 and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite**, v. 50, p.
4299 506-513, 2008.
- 4300
4301 KHAN, T. A.; HASSAN, I.; AHMAD, A.; PERVEEN, A.; AMAN, S.; QUDDUSI, S.;
4302 ALHAZZA, I. M.; ASHRAF, G. M.; ALIEV, G. Recent updates on the dynamic
4303 association between oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Cns &**
4304 **Neurological Disorders-Drug Targets**, v. 15, n. 3, p. 310-320, 2016. ISSN 1871-
4305 5273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000373801100006 >.
- 4306
4307 KIKUCHI, K.; TANCHAROEN, S.; TAKESHIGE, N.; YOSHITOMI, M.; MORIOKA, M.;
4308 MURAI, Y.; TANAKA, E. The efficacy of edaravone (radicut), a free radical
4309 scavenger, for cardiovascular disease. **International Journal of Molecular**
4310 **Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13909-13930, Jul 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: <
4311 <Go to ISI>://WOS:000322171700061 >.
- 4312
4313 KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.
4314 **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 213–218, 1999.
- 4315
4316 KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D. Superoxide dismutases in malignant cells and human
4317 tumors. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 6, p. 718-744, Mar 2004.
4318 ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000220243900004 >.
- 4319
4320 KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. **Extração de cafeína das sementes da planta do**
4321 **guaraná (*Paullinia cupana*) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes**
4322 **(in Portuguese)**. 2003. 222p (MSc. Thesis). Faculdade de Engenharia Química,
4323 Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 4324
4325 KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-
4326 solvent mixtures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34 p. 209–214, 2005.
- 4327
4328 KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and
4329 reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486–1513,
4330 2005.
- 4331
4332 KUREK, A.; NADKOWSKA, P.; PLISZKA, S.; WOLSKA, K. I. Modulation of antibiotic
4333 resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. **Phytomedicine**,
4334 v. 19, n. 6, p. 515-519, 2012.

- 4335
4336 LAMBERT, J. D.; YANG, C. S. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of
4337 tea and tea polyphenols. **Mutation Research**, v. 523–524, p. 201–208, 2003.
- 4338
4339 LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product
4340 studies - a practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771 - 782, 2001.
- 4341
4342 LI, J.; O, W. L. J.; LI, W.; JIANG, Z. G.; GHANBARI, H. A. Oxidative stress and
4343 neurodegenerative disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14,
4344 n. 12, p. 24438-24475, Dec 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <Go to
4345 ISI>://WOS:000330219800083 >.
- 4346
4347 LIAO, C. Y.; KENNEDY, B. K. SIRT6, oxidative stress, and aging. **Cell Research**, v.
4348 26, n. 2, p. 143-144, Feb 2016. ISSN 1001-0602. Disponível em: < <Go to
4349 ISI>://WOS:000372062300001 >.
- 4350
4351 LIU, B.; SHEN, B.; GUO, F.; CHANG, Y. Optimization of supercritical fluid extraction
4352 of dl-tetrahydropalmatine from rhizome of *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang with
4353 orthogonal array design. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 242–
4354 246, 2008.
- 4355
4356 LIU, H.; JIAO, Z.; LIU, J.; ZHANG, C.; ZHENG, X.; LAI, S.; CHENG, F.; YANG, H.
4357 Optimization of supercritical fluid extraction of phenolics from date seeds and
4358 characterization of its antioxidant activity. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 781-
4359 788, 2013.
- 4360
4361 LIU, X.; ZHAO, M.; WANG, J.; LUO, W. Antimicrobial and antioxidant activity of
4362 emblica extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction and methanol
4363 extraction. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 307-330, 2007.
- 4364
4365 LU, Y.; ZHAO, W. Z.; CHANG, Z.; CHEN, W. X.; LI, L. Procyanidins from grape
4366 seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic
4367 damage. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 8, p. 1083–1089, 2004.
- 4368
4369 MACHADO, A. K.; CANODÁ, F., C.; AZZOLIN, V. F.; DORNELLES, E. B.;
4370 BARBISAN, F.; RIBEIRO, E. E.; MÂNICA-CATTANI, M. F.; DUARTE, M. M. M. F.;
4371 SALDANHA, J. R. P.; CRUZ, I. B. M. D. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the
4372 proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from
4373 human lipoaspirates. **Food Research International**, v. 67, p. 426-433, 2015.
- 4374
4375 MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. Methodological aspects
4376 about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613,
4377 n. 1, p. 1-19, Apr 2008. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to
4378 ISI>://WOS:000255486900001 >.
- 4379
4380 MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of
4381 guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1258-1268, 2007.
- 4382
4383 MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of
4384 cardiovascular diseases. **Current Opinions in Lipidology**, v. 16, p. 77–84, 2005.

- 4385
4386 MARÓSTICA-JUNIOR, M. R.; LEITE, A. V.; DRAGANO, N. R. V. Supercritical fluid
4387 extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources- review. **The**
4388 **Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 51-60, 2010.
- 4389
4390 MARQUES, L. L. M.; PANIZZON, G. P.; AGUIAR, B. A. A.; SIMIONATO, A. S.;
4391 CARDOZO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; OLIVEIRA, A. G. D.; GUEDES, T. A.; MELLO,
4392 J. C. P. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: selective supercritical extraction of
4393 phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 212, n. 1, p. 703-711, 2016.
- 4394
4395 MATSUURA, E.; GODOY, J. S. R.; BONFIM-MENDONÇA, P. D. S.; MELLO, J. C. P.
4396 D.; SVIDZINSKI, T. I. E.; GASPARETTO, A.; MACIEL, S. M. In vitro effect of
4397 *Paullinia cupana* (guaraná) on hydrophobicity, biofilm formation, and adhesion of
4398 *Candida albicans* to polystyrene, composites, and buccal epithelial cells. **Archives of**
4399 **Oral Biology**, v. 60, p. 471-478, 2015.
- 4400
4401 MAUL, A. A. Fluidos supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica (in
4402 Portuguese). **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p. 42-46,
4403 1999.
- 4404
4405 MAURYA, P. K.; NOTO, C.; RIZZO, L. B.; RIOS, A. C.; NUNES, S. O. V.; BARBOSA,
4406 D. S.; SETHI, S.; ZENI, M.; MANSUR, R. B.; MAES, M.; BRIETZKE, E. The role of
4407 oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder.
4408 **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 65, Feb
4409 2016. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000366709200015 >.
- 4410
4411 MELO, M. M. R. D.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction
4412 of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing
4413 green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115-176, 2014.
- 4414
4415 MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant
4416 flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and
4417 cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673–751, 2000.
- 4418
4419 MIGLIORE, L.; COPPEDE, F. Environmental-induced oxidative stress in
4420 neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research-Genetic Toxicology**
4421 **and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 73-84, Mar 2009. ISSN 1383-
4422 5718. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265133000009 >.
- 4423
4424 MIKULASOVA, M.; CHOVANOVA, R.; VAVERKOVA, S. Synergism between
4425 antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in
4426 coping with multidrug-resistant staphylococci. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 4,
4427 p. 651-662, Aug 2016. ISSN 1568-7767. Disponível em: < <Go to
4428 ISI>://WOS:000379618900007 >.
- 4429
4430 MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; BEEK, T. A. V. Screening of radical
4431 scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**,
4432 v. 85, p. 231–237, 2004.
- 4433

- 4434 MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Drug design based on natural products (in Portuguese). **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- 4436
- 4437 MÜHLEN, C. V.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada (in Portuguese). **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.
- 4439
- 4440 MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3408-3412, 2000.
- 4442
- 4443
- 4444
- 4445 NIKI, E. Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 3-7, Jan 2011. ISSN 0912-0009. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288981400002 >.
- 4446
- 4447
- 4448
- 4449
- 4450 NOGUCHI, N. N., E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: PAPAS, M. P. (Ed.). **Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health**. Florida: CRC Press, 1999. p.3-20.
- 4451
- 4452
- 4453
- 4454 OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; GALEANO, P.; ROMERO, J. I.; HOLUBIEC, M. I.; BADORREY, M. S.; CAPANI, F.; ALVAREZ, L. D. G. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, p. 1382–1391, 2011.
- 4455
- 4456
- 4457
- 4458
- 4459
- 4460 OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, Aug 2015. ISSN 0963-9969. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358971200002 >.
- 4461
- 4462
- 4463
- 4464 OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; OBICI, S.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Lucke) on cognitive performance in morris water maze in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 723-728, 2005.
- 4465
- 4466
- 4467
- 4468
- 4469
- 4470 OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V. R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 531-535, 2007.
- 4471
- 4472
- 4473
- 4474
- 4475 PALMA, M.; PIÑEIRO, Z.; BARROSO, C. G. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 169-174, 2001.
- 4476
- 4477
- 4478
- 4479 PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035–1042, 2000.
- 4480
- 4481
- 4482 PINELO, M.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; SINEIRO, J.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G.; NÚÑEZ, M. J. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic
- 4483

- 4484 antioxidants from grape pomace: a comparative study. **European Food Research**
4485 **and Technology**, v. 226, p. 199–205, 2007.
- 4486
4487 PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative
4488 stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.
4489 ISSN 0223-5234. Disponível em: <
4490 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415300039> >.
- 4491
4492 PORTELLA, R. D. L.; BARCELOS, R. P.; ROSA, E. J. F. D.; RIBEIROS, E. E.;
4493 CRUZ, I. B. M. D.; SULEIMAN, L.; SOARES, F. A. A. Guaraná (*Paullinia cupana*
4494 Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids**
4495 **in Health and Disease**, v. 12, p. 1-9, 2013.
- 4496
4497 RAMSEY, E.; SUN, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.; GOU, W. Mini-review: green
4498 sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. **Journal of**
4499 **Environmental Sciences**, v. 21, p. 720–726
4500 2009.
- 4501
4502 RANGEL, M. P.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Evaluation of neurotransmitters
4503 involved in the anxiolytic and panicolytic effect of the aqueous fraction of *Paullinia*
4504 *cupana* (guaraná) in elevated T maze. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23,
4505 n. 2, p. 358-365, 2013.
- 4506
4507 REVERCHON, E.; MARCO, I. D. Supercritical fluid extraction and fractionation of
4508 natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, p. 146–166
4509 2006.
- 4510
4511 RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity
4512 relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.
4513 20, p. 933–956, 1996.
- 4514
4515 ROBERT, A. M.; ROBERT, L. Xanthine oxido-reductase, free radicals and
4516 cardiovascular disease. A critical review. **Pathology & Oncology Research**, v. 20,
4517 n. 1, p. 1-10, Jan 2014. ISSN 1219-4956. Disponível em: < <Go to
4518 ISI>://WOS:000329356600001 >.
- 4519
4520 RONCON, C. M.; DE ALMEIDA, C. B.; KLEIN, T.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A.
4521 Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the
4522 elevated T-maze test. **Planta Medica**, v. 77, p. 236-241, 2011.
- 4523
4524 ROY, S. K.; KUMARI, N.; PAHWA, S.; AGRAHARI, U. C.; BHUTANI, K. K.; JACHAK,
4525 S. M.; NANDANWAR, H. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from
4526 *Mesua ferrea*. **Fitoterapia**, v. 90, p. 140-150, 2013. ISSN 0367-326X. Disponível
4527 em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X1300186X> >.
- 4528
4529 ROZZI, N. L.; SINGH, R. K. Supercritical fluids and the food industry.
4530 **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 1, p. 33-44,
4531 2002.
- 4532

- 4533 SARRAFCHI, A.; BAHMANI, M.; SHIRZAD, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative
4534 stress and Parkinson's disease: new hopes in treatment with herbal antioxidants.
4535 **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 2, p. 238-246, 2016. ISSN 1381-6128.
4536 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000372070400014 >.
4537
- 4538 SAS, K.; ROBOTKA, H.; TOLDI, J.; VECSEI, L. Mitochondria, metabolic
4539 disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on
4540 neurodegenerative disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 257, n. 1-2,
4541 p. 221-239, Jun 2007. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <Go to
4542 ISI>://WOS:000247646700036 >.
4543
- 4544 SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONCALVES, J. F.; MAZZAFERA, P. Guarana:
4545 revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of**
4546 **Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, Oct 28 2013. ISSN 1872-7573
4547 (Electronic)
4548 0378-8741 (Linking). Disponível em: <
4549 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981847> >.
4550
- 4551 SHARIF, K. M.; RAHMAN, M. M.; AZMIR, J.; MOHAMED, A.; JAHURUL, M. H. A.;
4552 SAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M. Experimental design of supercritical fluid extraction –
4553 a review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116
4554 2014.
4555
- 4556 SHEKHAR, H. U.; HOWLADER, Z. H.; KABIR, Y. **Exploring the nutrition and**
4557 **health benefits of functional foods**. Hershey, USA: IGI Global, 2016. 523
4558
- 4559 SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. D.; MENTZ,
4560 L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia- da planta ao medicamento (in**
4561 **Portuguese)**. 6th. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104p
4562
- 4563 SINGH, A. K.; PANDEY, P.; TEWARI, M.; PANDEY, H. P.; GAMBHIR, I. S.;
4564 SHUKLA, H. S. Free radicals hasten head and neck cancer risk: A study of total
4565 oxidant, total antioxidant, DNA damage, and histological grade. **Journal of**
4566 **Postgraduate Medicine**, v. 62, n. 2, p. 96-101, Apr-Jun 2016. ISSN 0022-3859.
4567 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000375010300007 >.
4568
- 4569 SINGH, R.; DEVI, S.; GOLLEN, R. Role of free radical in atherosclerosis, diabetes
4570 and dyslipidaemia: larger-than-life. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**,
4571 v. 31, n. 2, p. 113-126, Feb 2015. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <Go to
4572 ISI>://WOS:000349969600001 >.
4573
- 4574 SINGH, U.; JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. **Pathophysiology**, v. 13,
4575 n. 3, p. 129-142, 2006.
4576
- 4577 SMITH, M. A.; WANG, X. C.; SU, B.; PERRY, G.; ZHU, X. Metabolic, metallic and
4578 mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease. **Journal of**
4579 **Neurochemistry**, v. 108, p. 68-69, Mar 2009. ISSN 0022-3042. Disponível em: <
4580 <Go to ISI>://WOS:000263336800146 >.
4581

- 4582 SMITH, R.; COAST, J. The true cost of antimicrobial resistance. **Bmj-British**
4583 **Medical Journal**, v. 346, Mar 2013. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <Go to
4584 ISI>://WOS:000316324000002 >.
- 4585
4586 SOUZA, G. H. B. D.; MELLO, J. C. P. D.; LOPES, N. P., Eds. **Revisões em**
4587 **processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de**
4588 **ativos de plantas medicinais (in Portuguese)**. Ouro Preto: UFOP, p.312, 1 ed.
4589 2012.
- 4590
4591 SOVOVÁ, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their
4592 characteristic times. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 73-79, 2012.
- 4593
4594 SOVOVÁ, H.; STATEVA, R. P. Supercritical fluid extraction from vegetable materials.
4595 **Chemical Engineering Journal**, v. 27, p. 79–156
4596 2011.
- 4597
4598 SUFRAMA. **Potencialidades estudo de viabilidade econômica: guaraná (in**
4599 **Portuguese)**. Manaus, Brasil: Superintendência da zona franca de Manaus -
4600 Suframa. Instituto superior de administração e economia ISAE/Fundação Getúlio
4601 Vargas (FGV): 1-34 p. 2003.
- 4602
4603 SUGISAWA, A.; KIMURA, M.; FENECH, M.; UMEGAKI, K. Antigenotoxic effects of
4604 tea catechins against reactive oxygen species in humans lymphoblastoid cells.
4605 **Mutation Research**, v. 529, p. 97-103, 2004.
- 4606
4607 TAGUCHI, G. **Introduction to quality engineering: designing quality into**
4608 **products and processes**. Asian Productivity Organization (Distributed by American
4609 Supplier Institute Inc., Dearborn, MI). 1986.
- 4610
4611 TAGUCHI, G.; KONISHI, S. **Orthogonal arrays and linear graphs: tools for**
4612 **quality engineering**. American Supplier Institute Inc., Dearborn, MI., 1987.
- 4613
4614 USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS
4615 FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from
4616 seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 26, p.
4617 5-9, 2007.
- 4618
4619 VARGAS, H. I. C.; VARELA, L. I. R.; FERREIRA, S. R. S.; ALFONSO, F. P.
4620 Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using
4621 supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.
4622 51, p. 319-324, 2010.
- 4623
4624 VATAI, T.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Z. Extraction of phenolic compounds from elder
4625 berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical
4626 carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 246–254, 2009.
- 4627
4628 VICENTE, G.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Optimisation of integrated biodiesel
4629 production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. **Bioresource Technology**,
4630 v. 98, p. 1724–1733, 2007.
- 4631

- 4632 WANG, Y.; YING, L.; SUN, D.; ZHANG, S.; ZHU, Y.; XU, P. Supercritical carbon
4633 dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems:
4634 process optimization and antioxidant activity. **International Journal of Molecular**
4635 **Sciences**, v. 12, n. 10, p. 6856-6870, 2011.
- 4636
4637 YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.;
4638 UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P.
4639 Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts
4640 and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.
4641

- 4642 ABDULLAH, S. A. **Solubility in supercritical carbon dioxide**. 2007. 200p (Master
4643 of Science). Chemical Engineering, Faculty of New Jersey Newark.
4644
- 4645 AHSANUDDIN, S.; LAM, M.; BARON, E. D. Skin aging and oxidative stress. **Aims**
4646 **Molecular Science**, v. 3, n. 2, p. 187-195, 2016. ISSN 2372-0301. Disponível em: <
4647 <Go to ISI>://WOS:000378352500005 >.
4648
- 4649 ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro
4650 methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p.
4651 143-152, 2013.
4652
- 4653 ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a
4654 South American herbal preparation in overweight patients. **Journal Of Human**
4655 **Nutrition And Dietetics**, v. 14, p. 243-250, 2001.
4656
- 4657 ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – a brief review (in
4658 Portuguese). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
4659
- 4660 **Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations**.
4661 London: Review on Antimicrobial Resistance, 2014. 16p Disponível em: <
4662 [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)
4663 [%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)
4664 [nations_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf) >.
4665
- 4666 ARAÚJO, R. F. M.; ROLIM-NETO, P. J.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; AMARAL, F.
4667 M. M.; NUNES, L. C. C. Phytomedicines: legislation and market in Brazil. **Revista**
4668 **Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 331-341, 2013.
4669
- 4670 ASIMI, O. A.; SAHU, N. P.; PAL, A. K. Antioxidant capacity of crude water and ethyl
4671 acetate extracts of some Indian spices and their antimicrobial activity against *Vibrio*
4672 *vulnificus* and *Micrococcus luteus* **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n.
4673 26, p. 1907-1915, 2013.
4674
- 4675 AUDI, E. A.; MELLO, J. C. P. **Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal**
4676 **guaraná (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis* (Martius) Ducke, PI 0006638-9 (Patent)**.
4677 Brasil: Universidade Estadual de Maringá. PI 0006638-9 2000.
4678
- 4679 AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.;
4680 SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFLOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A.
4681 K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a
4682 review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436, 2013.
4683
- 4684 BADARINATH, A. V.; RAO, K. M.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, V.; RAJAN, T. V.
4685 S.; GNANAPRAKASH, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons,
4686 correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v.
4687 2, n. 2, p. 1276–1285, 2010.
4688
- 4689 BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants
4690 and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.
4691 **Food Chemistry**, v. 99, p. 191–203, 2006.

- 4692
4693 BARBOSA, G. D. A.; MELLO, J. C. P. Clinical evaluation of the guarana extract on
4694 the dental plaque control (in Portuguese). **Revista Paulista de Odontologia**, v. 26,
4695 n. 4, p. 28-30, 2004.
- 4696
4697 BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; LAGANÀ, G.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, C.
4698 Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives
4699 present in apple and kumquat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 292–297, 2014.
- 4700
4701 BASILE, A.; FERRAR, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.;
4702 MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from
4703 Paullinia cupana Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.
- 4704
4705 BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and
4706 periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in
4707 plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 101-110, 2000.
- 4708
4709 BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; RIO, J. A. D.
4710 Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food**
4711 **Chemistry**, v. 45, p. 4505–4515, 1997.
- 4712
4713 BIANCHI, F.; CARERI, M. Experimental design techniques for optimization of
4714 analytical methods. Part I: separation and sample preparation techniques. **Current**
4715 **Analytical Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 55-74, 2008.
- 4716
4717 BOLNER, A.; MICCIOLO, R.; BOSELLO, O.; NORDERA, G. A panel of oxidative
4718 stress markers in Parkinson's disease. **Clinical Laboratory**, v. 62, n. 1-2, p. 105-
4719 112, 2016. ISSN 1433-6510. Disponível em: < <Go to
4720 ISI>://WOS:000370463700013 >.
- 4721
4722 BONDA, D. J.; WANG, X. L.; LEE, H. G.; SMITH, M. A.; PERRY, G.; ZHU, X. W.
4723 Neuronal failure in Alzheimer's disease: a view through the oxidative stress looking-
4724 glass. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 243-252, Apr 2014. ISSN 1673-7067.
4725 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334513200009 >.
- 4726
4727 BONDA, D. J.; WANG, X. L.; PERRY, G.; NUNOMURA, A.; TABATON, M.; ZHU, X.
4728 W.; SMITH, M. A. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention.
4729 **Neuropharmacology**, v. 59, n. 4-5, p. 290-294, Sep-Oct 2010. ISSN 0028-3908.
4730 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282072000007 >.
- 4731
4732 BOOZER, C. N.; NASSER, J. A.; HEYMSFIELD, S. B.; WANG, V.; CHEN, G.;
4733 SOLOMON, J. L. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight
4734 loss:a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity**, v. 25, p.
4735 316-324, 2001.
- 4736
4737 BRAGA, L. C.; LEITE, A. A. M.; XAVIER, K. G. S.; TAKAHASHI, J. A.;
4738 BEMQUERER, M. P.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Synergic
4739 interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus*
4740 *aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 541-547, 2005/07/01

- 4741 2005. ISSN 0008-4166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/w05-022> >.
4742 Acesso em: 2016/09/06.
4743
- 4744 BRAVI, E.; PPERRETTI, G.; MOTANARI, L.; FAVATI, F.; FANTOZZI, P. Supercritical
4745 fluid extraction for quality control in beer industry. **Journal of Supercritical Fluids**,
4746 v. 42, p. 342-346, 2007.
4747
- 4748 BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing.
4749 **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21-23, 2005.
4750
- 4751 CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid in analytical
4752 chemistry. I. Supercritical fluid Chromatography: thermodynamic definitions (in
4753 Portuguese). **Química Nova**, v. 24, n. 4, 2001.
4754
- 4755 CHANDA, S.; DAVE, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some
4756 medicinal plants possessing antioxidant properties: an overview. **African Journal of**
4757 **Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 981-996, Dec 2009. ISSN 1996-0808.
4758 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275387400001 >.
4759
- 4760 CHANG, C. J.; CHIU, K.; CHEN, Y.; CHANG, C. Y. Separation of catechins from
4761 green tea using carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 68, p. 109-113,
4762 2000.
4763
- 4764 CHITEMERERE, T. A.; MUKANGANYAMA, S. In vitro antibacterial activity of
4765 selected medicinal plants from Zimbabwe. **African Journal of Plant Science**, v. 5, p.
4766 1-7, 2011.
4767
- 4768 CHUKWUJEKWU, J. C.; VAN STADEN, J. In vitro antibacterial activity of *Combretum*
4769 *edwardsii*, *Combretum krausii*, and *Maytenus nemorosa* and their synergistic effects
4770 in combination with antibiotics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, Jul 2016. ISSN
4771 1663-9812. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000379670500001 >.
4772
- 4773 COAST, J.; SMITH, R. D.; MILLAR, M. R. Superbugs: should antimicrobial resistance
4774 be included as a cost in economic evaluation? **Health Economics**, v. 5, p. 217–226,
4775 1996.
4776
- 4777 COSTA, J. G. M. D.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.;
4778 SOUZA, E. O. D.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.;
4779 SANTOS, P. F. D. Chemical composition and evaluation of the antibacterial activity
4780 and toxicity of the essential oil of *Croton zehntneri* (variety estragol) (in Portuguese).
4781 **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008. ISSN 0102-
4782 695X. Disponível em: <
4783 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-
4784 695X2008000400015&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400015&nrm=iso) >.
4785
- 4786 DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Guarana powder
4787 polysaccharides: characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic
4788 fraction. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1804-1812, 2012.
4789

- 4790 DHAWAN, A.; ANDERSON, D.; PASCUAL-TERESA, S. D.; SANTOS-BUELGA, C.;
4791 M. N. , C.; IOANNIDES, C. Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric
4792 and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced
4793 DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay. **Mutation Research**, v.
4794 515, n. 1-2, p. 39–56, 2002.
- 4795
4796 DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839,
4797 p. 843-847, 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
4798 <http://dx.doi.org/10.1038/35081178> >.
- 4799
4800 ETTEFAGH, K. A.; BURNS, J. T.; JUNIO, H. A.; KAATZ, G. W.; CECH, N. B.
4801 Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the
4802 antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. **Planta Medica**, v. 77, n.
4803 8, p. 835-840, 2011.
- 4804
4805 FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of
4806 porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n.
4807 4, p. 661-681, 2012.
- 4808
4809 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças
4810 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo (in Portuguese). **Revista da**
4811 **Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997. ISSN 0104-4230. Disponível
4812 em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&nrm=iso)
4813 [42301997000100014&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&nrm=iso) >.
- 4814
4815 FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in
4816 combination with chlorhexidine digluconate. **Oral microbiology and immunology**, v.
4817 20, n. 4, p. 221-225, 2005.
- 4818
4819 FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.;
4820 DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation
4821 and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice **Brazilian**
4822 **Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 305-310, 2008.
- 4823
4824 FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; Z Aidan-DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart. var.
4825 *sorbilis*, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice
4826 by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC
4827 cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 11-16, 2011.
- 4828
4829 FUKUMASU, H.; SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; LIMA, C. E.; MACKWIAK, I. I.;
4830 ATROCH, A.; SPINOSA, H. S.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive
4831 effects of *Paullinia cupana* Mart. Var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse
4832 hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, p. 158-164, 2006.
- 4833
4834 GALDURÓZ, J. C. F.; CARLINI, E. D. A. The effects of long-term administration of
4835 guarana on the cognition of normal, elderly volunteers. **São Paulo Med. J.**, v. 114, n.
4836 1, p. 1073-1078, 1996.
- 4837

- 4838 GHAFOOR, K.; AL-JUHAIMI, F. Y.; CHOI, Y. H. Supercritical fluid extraction of
4839 phenolic compounds and antioxidants from grape (*Vitis labrusca* B.) seeds. **Plant**
4840 **Foods for Human Nutrition**, v. 67, p. 407-414, 2012.
- 4841
4842 GOLI, A. H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic
4843 compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. **Food Chemistry**, v. 92, p.
4844 521-525, 2005.
- 4845
4846 HAMERSKI, L.; SOMNER, G. V.; TAMAIO, N. *Paullinia cupana* Kunth
4847 (Sapindaceae): A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and
4848 pharmacology. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 30, p. 2221-2229,
4849 2013.
- 4850
4851 HASLAM, E. **Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition**
4852 **and physiological action**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 440p
- 4853
4854 HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants:
4855 chemistry, metabolism and structure–activity relationships. **The Journal of**
4856 **Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.
- 4857
4858 HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social
4859 perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **Journal of**
4860 **Ethnopharmacology**, v. 6, p. 311-338, 1982.
- 4861
4862 HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid
4863 extraction: recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v.
4864 1217, p. 2495–2511, 2010.
- 4865
4866 HERTZ, E.; CADONÁ, F. C.; MACHADO, A. K.; AZZOLIN, V.; HOLMRICH, S.;
4867 ASSMANN, C.; LEDUR, P.; RIBEIRO, E. E.; FILHO, O. C. D. S.; MÂNICA-CATTANI,
4868 M. F.; CRUZ, I. B. M. D. Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell
4869 response to chemotherapeutic drugs. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, p. 37-
4870 43, 2015.
- 4871
4872 HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and
4873 bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-942, 1999.
- 4874
4875 HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity
4876 assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856,
4877 Mar 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227736100001
4878 >.
- 4879
4880 HUANG, Z.; SHI, X.-H.; JIANG, W.-J. Theoretical models for supercritical fluid
4881 extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 2-26, 2012.
- 4882
4883 IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola (in Portuguese)**.
4884 COAGRO. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE: 1-113
4885 p. 2016.
- 4886

- 4887 JESUS, N. Z. T. D.; FALCÃO, H. D. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. D. A.; LIMA, G. R.
4888 D. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S. D.; ATHAYDE-
4889 FILHO, P. F. D.; BATISTA, L. M. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms-
4890 review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3203-3228, 2012.
4891
- 4892 JUNIOR, M. R. M.; LEITE, A. V.; DRAGANO, N. R. V. Supercritical fluid extraction
4893 and stabilization of phenolic compounds from natural sources – review. **The Open
4894 Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 51-60, 2010.
4895
- 4896 JUNIOR, P. F. D. S.; MUNIZ, E. B.; PEREIRA, N. A.; OLIVEIRA, M. A. S. *In vitro*
4897 antimicrobial activity of aqueous extracts, hydroalcoholic and alcoholic species of
4898 *Anacardiaceae* family (in Portuguese). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**,
4899 v. 15, n. 1, p. 56-61, 2016.
4900
- 4901 KARALE, C. K.; DERE, P. J.; HONDE, B. S.; KOTHULE, S.; KOTE, A. P. A overview
4902 on supercritical fluid extraction for herbal drugs. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 575-
4903 596, 2011.
4904
- 4905 KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-
4906 MAUND, J. C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARA, A.; SCHOLEY,
4907 A. B. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin
4908 and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite**, v. 50, p.
4909 506-513, 2008.
4910
- 4911 KHAN, T. A.; HASSAN, I.; AHMAD, A.; PERVEEN, A.; AMAN, S.; QUDDUSI, S.;
4912 ALHAZZA, I. M.; ASHRAF, G. M.; ALIEV, G. Recent updates on the dynamic
4913 association between oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Cns &
4914 Neurological Disorders-Drug Targets**, v. 15, n. 3, p. 310-320, 2016. ISSN 1871-
4915 5273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000373801100006 >.
4916
- 4917 KIKUCHI, K.; TANCHAROEN, S.; TAKESHIGE, N.; YOSHITOMI, M.; MORIOKA, M.;
4918 MURAI, Y.; TANAKA, E. The efficacy of edaravone (radicut), a free radical
4919 scavenger, for cardiovascular disease. **International Journal of Molecular
4920 Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13909-13930, Jul 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: <
4921 <Go to ISI>://WOS:000322171700061 >.
4922
- 4923 KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.
4924 **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 213–218, 1999.
4925
- 4926 KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D. Superoxide dismutases in malignant cells and human
4927 tumors. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 6, p. 718-744, Mar 2004.
4928 ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220243900004 >.
4929
- 4930 KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. **Extração de cafeína das sementes da planta do
4931 guaraná (*Paullinia cupana*) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes
4932 (in Portuguese)**. 2003. 222p (MSc. Thesis). Faculdade de Engenharia Química,
4933 Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
4934
- 4935 KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-
4936 solvent mixtures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34 p. 209–214, 2005.

- 4937
4938 KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and
4939 reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486–1513,
4940 2005.
- 4941
4942 KUREK, A.; NADKOWSKA, P.; PLISZKA, S.; WOLSKA, K. I. Modulation of antibiotic
4943 resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. **Phytomedicine**,
4944 v. 19, n. 6, p. 515-519, 2012.
- 4945
4946 LAMBERT, J. D.; YANG, C. S. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of
4947 tea and tea polyphenols. **Mutation Research**, v. 523–524, p. 201–208, 2003.
- 4948
4949 LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product
4950 studies - a practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771 - 782, 2001.
- 4951
4952 LI, J.; O, W. L. J.; LI, W.; JIANG, Z. G.; GHANBARI, H. A. Oxidative stress and
4953 neurodegenerative disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14,
4954 n. 12, p. 24438-24475, Dec 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <Go to
4955 ISI>://WOS:000330219800083 >.
- 4956
4957 LIAO, C. Y.; KENNEDY, B. K. SIRT6, oxidative stress, and aging. **Cell Research**, v.
4958 26, n. 2, p. 143-144, Feb 2016. ISSN 1001-0602. Disponível em: < <Go to
4959 ISI>://WOS:000372062300001 >.
- 4960
4961 LIU, B.; SHEN, B.; GUO, F.; CHANG, Y. Optimization of supercritical fluid extraction
4962 of dl-tetrahydropalmatine from rhizome of *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang with
4963 orthogonal array design. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 242–
4964 246, 2008.
- 4965
4966 LIU, H.; JIAO, Z.; LIU, J.; ZHANG, C.; ZHENG, X.; LAI, S.; CHENG, F.; YANG, H.
4967 Optimization of supercritical fluid extraction of phenolics from date seeds and
4968 characterization of its antioxidant activity. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 781–
4969 788, 2013.
- 4970
4971 LIU, X.; ZHAO, M.; WANG, J.; LUO, W. Antimicrobial and antioxidant activity of
4972 emblica extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction and methanol
4973 extraction. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 307-330, 2007.
- 4974
4975 LU, Y.; ZHAO, W. Z.; CHANG, Z.; CHEN, W. X.; LI, L. Procyanidins from grape
4976 seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic
4977 damage. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 8, p. 1083–1089, 2004.
- 4978
4979 MACHADO, A. K.; CANODÁ, F., C.; AZZOLIN, V. F.; DORNELLES, E. B.;
4980 BARBISAN, F.; RIBEIRO, E. E.; MÂNICA-CATTANI, M. F.; DUARTE, M. M. M. F.;
4981 SALDANHA, J. R. P.; CRUZ, I. B. M. D. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the
4982 proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from
4983 human lipoaspirates. **Food Research International**, v. 67, p. 426-433, 2015.
- 4984
4985 MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. Methodological aspects
4986 about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613,

- 4987 n. 1, p. 1-19, Apr 2008. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to
4988 ISI>://WOS:000255486900001 >.
- 4989
- 4990 MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of
4991 guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1258-1268, 2007.
- 4992
- 4993 MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of
4994 cardiovascular diseases. **Current Opinions in Lipidology**, v. 16, p. 77–84, 2005.
- 4995
- 4996 MARÓSTICA-JUNIOR, M. R.; LEITE, A. V.; DRAGANO, N. R. V. Supercritical fluid
4997 extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources- review. **The**
4998 **Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 51-60, 2010.
- 4999
- 5000 MARQUES, L. L. M.; PANIZZON, G. P.; AGUIAR, B. A. A.; SIMIONATO, A. S.;
5001 CARDOZO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; OLIVEIRA, A. G. D.; GUEDES, T. A.; MELLO,
5002 J. C. P. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: selective supercritical extraction of
5003 phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 212, n. 1, p. 703-711, 2016.
- 5004
- 5005 MATSUURA, E.; GODOY, J. S. R.; BONFIM-MENDONÇA, P. D. S.; MELLO, J. C. P.
5006 D.; SVIDZINSKI, T. I. E.; GASPARETTO, A.; MACIEL, S. M. In vitro effect of
5007 *Paullinia cupana* (guaraná) on hydrophobicity, biofilm formation, and adhesion of
5008 *Candida albicans* to polystyrene, composites, and buccal epithelial cells. **Archives of**
5009 **Oral Biology**, v. 60, p. 471-478, 2015.
- 5010
- 5011 MAUL, A. A. Fluidos supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica (in
5012 Portuguese). **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p. 42-46,
5013 1999.
- 5014
- 5015 MAURYA, P. K.; NOTO, C.; RIZZO, L. B.; RIOS, A. C.; NUNES, S. O. V.; BARBOSA,
5016 D. S.; SETHI, S.; ZENI, M.; MANSUR, R. B.; MAES, M.; BRIETZKE, E. The role of
5017 oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder.
5018 **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 65, Feb
5019 2016. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000366709200015 >.
- 5020
- 5021 MELO, M. M. R. D.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction
5022 of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing
5023 green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115-176, 2014.
- 5024
- 5025 MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant
5026 flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and
5027 cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673–751, 2000.
- 5028
- 5029 MIGLIORE, L.; COPPEDE, F. Environmental-induced oxidative stress in
5030 neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research-Genetic Toxicology**
5031 **and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 73-84, Mar 2009. ISSN 1383-
5032 5718. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265133000009 >.
- 5033
- 5034 MIKULASOVA, M.; CHOVANOVA, R.; VAVERKOVA, S. Synergism between
5035 antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in
5036 coping with multidrug-resistant staphylococci. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 4,

- 5037 p. 651-662, Aug 2016. ISSN 1568-7767. Disponível em: < <Go to
5038 ISI>://WOS:000379618900007 >.
- 5039
- 5040 MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; BEEK, T. A. V. Screening of radical
5041 scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**,
5042 v. 85, p. 231–237, 2004.
- 5043
- 5044 MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Drug design based on natural products (in
5045 Portuguese). **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- 5046
- 5047 MÜHLEN, C. V.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada (in Portuguese). **Química**
5048 **Nova**, v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.
- 5049
- 5050 MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of natural complex
5051 phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon
5052 dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3408-
5053 3412, 2000.
- 5054
- 5055 NIKI, E. Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein
5056 oxidation and vitamin E revisited. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**,
5057 v. 48, n. 1, p. 3-7, Jan 2011. ISSN 0912-0009. Disponível em: < <Go to
5058 ISI>://WOS:000288981400002 >.
- 5059
- 5060 NOGUCHI, N. N., E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In:
5061 PAPAS, M. P. (Ed.). **Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health**. Florida: CRC
5062 Press, 1999. p.3-20.
- 5063
- 5064 OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; GALEANO, P.; ROMERO, J. I.; HOLUBIEC, M. I.;
5065 BADORREY, M. S.; CAPANI, F.; ALVAREZ, L. D. G. *Paullinia cupana* Mart. var.
5066 *sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against
5067 rotenone-induced cytotoxicity. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, p. 1382–
5068 1391, 2011.
- 5069
- 5070 OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources,
5071 extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, Aug 2015.
5072 ISSN 0963-9969. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000358971200002 >.
- 5073
- 5074 OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; OBICI, S.;
5075 MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purified constituents
5076 from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)) Lucke on cognitive
5077 performance in morris water maze in rats. **Brazilian Archives of Biology and**
5078 **Technology**, v. 48, p. 723-728, 2005.
- 5079
- 5080 OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V.
5081 R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds
5082 [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. .
5083 **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 531-535, 2007.
- 5084

- 5085 PALMA, M.; PIÑEIRO, Z.; BARROSO, C. G. Stability of phenolic compounds during
5086 extraction with superheated solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p.
5087 169-174, 2001.
- 5088
5089 PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.
5090 1035-1042, 2000.
- 5091
5092 PINELO, M.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; SINEIRO, J.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO,
5093 G.; NÚÑEZ, M. J. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic
5094 antioxidants from grape pomace: a comparative study. **European Food Research
5095 and Technology**, v. 226, p. 199-205, 2007.
- 5096
5097 PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative
5098 stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.
5099 ISSN 0223-5234. Disponível em: <
5100 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415300039> >.
- 5101
5102 PORTELLA, R. D. L.; BARCELOS, R. P.; ROSA, E. J. F. D.; RIBEIROS, E. E.;
5103 CRUZ, I. B. M. D.; SULEIMAN, L.; SOARES, F. A. A. Guaraná (*Paullinia cupana*
5104 Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids
5105 in Health and Disease**, v. 12, p. 1-9, 2013.
- 5106
5107 RAMSEY, E.; SUN, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.; GOU, W. Mini-review: green
5108 sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. **Journal of
5109 Environmental Sciences**, v. 21, p. 720-726
5110 2009.
- 5111
5112 RANGEL, M. P.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Evaluation of neurotransmitters
5113 involved in the anxiolytic and panicolytic effect of the aqueous fraction of *Paullinia*
5114 *cupana* (guaraná) in elevated T maze. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23,
5115 n. 2, p. 358-365, 2013.
- 5116
5117 REVERCHON, E.; MARCO, I. D. Supercritical fluid extraction and fractionation of
5118 natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, p. 146-166
5119 2006.
- 5120
5121 RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity
5122 relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.
5123 20, p. 933-956, 1996.
- 5124
5125 ROBERT, A. M.; ROBERT, L. Xanthine oxido-reductase, free radicals and
5126 cardiovascular disease. A critical review. **Pathology & Oncology Research**, v. 20,
5127 n. 1, p. 1-10, Jan 2014. ISSN 1219-4956. Disponível em: < <Go to
5128 ISI>://WOS:000329356600001 >.
- 5129
5130 RONCON, C. M.; DE ALMEIDA, C. B.; KLEIN, T.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A.
5131 Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the
5132 elevated T-maze test. **Planta Medica**, v. 77, p. 236-241, 2011.
- 5133

- 5134 ROY, S. K.; KUMARI, N.; PAHWA, S.; AGRAHARI, U. C.; BHUTANI, K. K.; JACHAK,
5135 S. M.; NANDANWAR, H. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from
5136 *Mesua ferrea*. **Fitoterapia**, v. 90, p. 140-150, 2013. ISSN 0367-326X. Disponível
5137 em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X1300186X> >.
5138
- 5139 ROZZI, N. L.; SINGH, R. K. Supercritical fluids and the food industry.
5140 **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 1, p. 33-44,
5141 2002.
5142
- 5143 SARRAFCHI, A.; BAHMANI, M.; SHIRZAD, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative
5144 stress and Parkinson's disease: new hopes in treatment with herbal antioxidants.
5145 **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 2, p. 238-246, 2016. ISSN 1381-6128.
5146 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000372070400014 >.
5147
- 5148 SAS, K.; ROBOTKA, H.; TOLDI, J.; VECSEI, L. Mitochondria, metabolic
5149 disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on
5150 neurodegenerative disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 257, n. 1-2,
5151 p. 221-239, Jun 2007. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <Go to
5152 ISI>://WOS:000247646700036 >.
5153
- 5154 SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONCALVES, J. F.; MAZZAFERA, P. Guarana:
5155 revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of**
5156 **Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, Oct 28 2013. ISSN 1872-7573
5157 (Electronic)
5158 0378-8741 (Linking). Disponível em: <
5159 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981847> >.
5160
- 5161 SHARIF, K. M.; RAHMAN, M. M.; AZMIR, J.; MOHAMED, A.; JAHURUL, M. H. A.;
5162 SAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M. Experimental design of supercritical fluid extraction –
5163 a review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116
5164 2014.
5165
- 5166 SHEKHAR, H. U.; HOWLADER, Z. H.; KABIR, Y. **Exploring the nutrition and**
5167 **health benefits of functional foods**. Hershey, USA: IGI Global, 2016. 523
5168
- 5169 SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. D.; MENTZ,
5170 L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia- da planta ao medicamento (in**
5171 **Portuguese)**. 6th. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104p
5172
- 5173 SINGH, A. K.; PANDEY, P.; TEWARI, M.; PANDEY, H. P.; GAMBHIR, I. S.;
5174 SHUKLA, H. S. Free radicals hasten head and neck cancer risk: A study of total
5175 oxidant, total antioxidant, DNA damage, and histological grade. **Journal of**
5176 **Postgraduate Medicine**, v. 62, n. 2, p. 96-101, Apr-Jun 2016. ISSN 0022-3859.
5177 Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000375010300007 >.
5178
- 5179 SINGH, R.; DEVI, S.; GOLLEN, R. Role of free radical in atherosclerosis, diabetes
5180 and dyslipidaemia: larger-than-life. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**,
5181 v. 31, n. 2, p. 113-126, Feb 2015. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <Go to
5182 ISI>://WOS:000349969600001 >.
5183

- 5184 SINGH, U.; JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. **Pathophysiology**, v. 13,
5185 n. 3, p. 129-142, 2006.
5186
- 5187 SMITH, M. A.; WANG, X. C.; SU, B.; PERRY, G.; ZHU, X. Metabolic, metallic and
5188 mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease. **Journal of**
5189 **Neurochemistry**, v. 108, p. 68-69, Mar 2009. ISSN 0022-3042. Disponível em: <
5190 <Go to ISI>://WOS:000263336800146 >.
5191
- 5192 SMITH, R.; COAST, J. The true cost of antimicrobial resistance. **Bmj-British**
5193 **Medical Journal**, v. 346, Mar 2013. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <Go to
5194 ISI>://WOS:000316324000002 >.
5195
- 5196 SOUZA, G. H. B. D.; MELLO, J. C. P. D.; LOPES, N. P., Eds. **Revisões em**
5197 **processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de**
5198 **ativos de plantas medicinais (in Portuguese)**. Ouro Preto: UFOP, p.312, 1 ed.
5199 2012.
5200
- 5201 SOVOVÁ, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their
5202 characteristic times. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 73-79, 2012.
5203
- 5204 SOVOVÁ, H.; STATEVA, R. P. Supercritical fluid extraction from vegetable materials.
5205 **Chemical Engineering Journal**, v. 27, p. 79-156
5206 2011.
5207
- 5208 SUFRAMA. **Potencialidades estudo de viabilidade econômica: guaraná (in**
5209 **Portuguese)**. Manaus, Brasil: Superintendência da zona franca de Manaus -
5210 Suframa. Instituto superior de administração e economia ISAE/Fundação Getúlio
5211 Vargas (FGV): 1-34 p. 2003.
5212
- 5213 SUGISAWA, A.; KIMURA, M.; FENECH, M.; UMEGAKI, K. Antigenotoxic effects of
5214 tea catechins against reactive oxygen species in humans lymphoblastoid cells.
5215 **Mutation Research**, v. 529, p. 97-103, 2004.
5216
- 5217 TAGUCHI, G. **Introduction to quality engineering: designing quality into**
5218 **products and processes**. Asian Productivity Organization (Distributed by American
5219 Supplier Institute Inc., Dearborn, MI). 1986.
5220
- 5221 TAGUCHI, G.; KONISHI, S. **Orthogonal arrays and linear graphs: tools for**
5222 **quality engineering**. American Supplier Institute Inc., Dearborn, MI., 1987.
5223
- 5224 USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS
5225 FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from
5226 seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 26, p.
5227 5-9, 2007.
5228
- 5229 VARGAS, H. I. C.; VARELA, L. I. R.; FERREIRA, S. R. S.; ALFONSO, F. P.
5230 Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using
5231 supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.
5232 51, p. 319-324, 2010.
5233

- 5234 VATAI, T.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Z. Extraction of phenolic compounds from elder
5235 berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical
5236 carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 246–254, 2009.
- 5237
5238 VICENTE, G.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Optimisation of integrated biodiesel
5239 production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. **Bioresource Technology**,
5240 v. 98, p. 1724–1733, 2007.
- 5241
5242 WANG, Y.; YING, L.; SUN, D.; ZHANG, S.; ZHU, Y.; XU, P. Supercritical carbon
5243 dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems:
5244 process optimization and antioxidant activity. **International Journal of Molecular
5245 Sciences**, v. 12, n. 10, p. 6856-6870, 2011.
- 5246
5247 YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.;
5248 UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P.
5249 Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts
5250 and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds



Leila Larisa Medeiros Marques^a, Gean Pier Panizzon^a, Bruna Aparecida Alves Aguiar^a, Ane Stéfano Simionato^b, Lucio Cardozo-Filho^c, Galdino Andrade^b, Admilton Gonçalves de Oliveira^b, Terezinha Aparecida Guedes^d, João Carlos Palazzo de Mello^{a,*}

^a Department of Pharmacy, State University of Maringá, Av. Colombo 5790, BR-87020-900 Maringá, Paraná, Brazil

^b Department of Microbiology, Centre of Biological Sciences, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, BR-86057-970 Londrina, Paraná, Brazil

^c Department of Chemical Engineering, State University of Maringá, Av. Colombo 5790, BR-87020-900 Maringá, Paraná, Brazil

^d Department of Statistics, State University of Maringá, Av. Colombo 5790, BR-87020-900 Maringá, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2015

Received in revised form 8 June 2016

Accepted 11 June 2016

Available online 15 June 2016

Chemical compounds studied in this article:

Caffeine (PubChem CID: 2519)

Catechin (PubChem CID: 9064)

Epicatechin (PubChem CID: 72276)

Pyrogallol (PubChem CID: 1057)

Keywords:

Paullinia cupana

Guaraná

Polyphenols

Supercritical extraction

Orthogonal array

Modifier

ABSTRACT

Approximately 70% of the Brazilian production of guaraná (*Paullinia cupana*) seeds is absorbed by the beverage industries. Guaraná has several pharmacological properties: energy stimulant, antimicrobial, chemoprophylactic, antigenotoxic, antidepressive, anxiolytic, and anti-amnesic effects. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from guaraná seeds was carried out and optimized by an orthogonal array design ($OA_9(3^4)$). The factors/levels studied were: modifier(s) (ethanol and/or methanol), extraction time (20, 40, and 60 min), temperature (40, 50, and 60 °C), and pressure (100, 200, and 300 bar). The statistical design was repeated with increasing proportions of modifiers. The percentage of modifier used was proportional to the amount of polar compounds extracted. The best conditions for the supercritical extraction, based on the content of polyphenols, epicatechin/catechin quantification, yield and operating cost, proved to be: 40% ethanol:methanol during 40 min, under 40 °C, and 100 bar. The temperature had a significant effect on the total phenolic content.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) is a Brazilian plant originally from the Amazon region, and its roasted seeds have long been used by indigenous tribes for their stimulant, aphrodisiac, and healing properties (headaches) (Henman, 1982). Due to the high potential of this plant, as well as its medicinal charac-

teristics and profitability, guaraná has become an important raw material for the cosmetics and soft drink industries. Brazil is the largest guaraná producer in the world, with a planted area of 15,182 ha and a production of 3658 t in 2015 (IBGE, 2016; Schimpl, da Silva, Goncalves, & Mazzafera, 2013). Approximately 70% of the production is used in the production of soft drinks and energy drinks (Suframa, 2013).

Guaraná has a wide variety of pharmacological properties, including anticarcinogenic (Fukumasu et al., 2008) antiproliferative (Hertz et al., 2015), antimicrobial, antioxidant (Basile et al., 2005; Yamaguti-Sasaki et al., 2007), cytoprotective (Schimpl et al., 2013), energetic, thermogenic (Andersen & Fogh, 2001), antidepressant (Audi & de Mello, 2000), and anxiolytic (Rangel, Mello, & Audi, 2013) qualities. It can also be used in the prevention of oral disease (Yamaguti-Sasaki et al., 2007), as well as in efforts to reduce oxidative effects and metabolic disorders (Portella et al., 2013), in addition to other purposes (Schimpl et al., 2013).

Abbreviations: SFE, supercritical fluid extraction; OAD, orthogonal array design; $OA_9(3^4)$, a total of nine runs per experiment, with four variables at three levels; TPC, total phenolic content; ANVISA (Portuguese acronym), National Health Surveillance Agency; mg EP g seeds⁻¹, milligrams pyrogallol equivalent per gram; MIC, minimum inhibitory concentration; ATCC, American type culture collection; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CFU, colony forming units; MHA, Mueller Hinton-Agar; MHB, Mueller Hinton Broth; SEM, scanning electron microscopy.

* Corresponding author.

E-mail address: mello@uem.br (J.C.P. Mello).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.028>

0308-8146/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.