



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DEISY CATHERINE PUENTES ESPITIA**

**EFEITO DO TIPO DE SECAGEM NO TEOR DE CAROTENOIDES TOTAIS EM  
AMOSTRAS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*) PROVENIENTES DA REGIÃO DO  
BAIXO SUL DA BAHIA**

**ILHÉUS - BAHIA**

**2018**

**DEISY CATHERINE PUENTES ESPITIA**

**EFEITO DO TIPO DE SECAGEM NO TEOR DE CAROTENOIDES TOTAIS EM AMOSTRAS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*) PROVENIENTES DA REGIÃO DO BAIXO SUL DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, como parte dos requisitos para obtenção de grau de **Mestre em Química**. Área de concentração: Química Analítica Aplicada. Linha de pesquisa: Análise de alimentos e bebidas.

Orientador: Prof. Dr. Janclei Pereira Coutinho  
Co-orientador: Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus

**ILHÉUS - BAHIA**  
**2018**

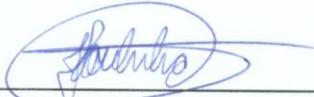
- E77 Espitia, Deisy Catherine Puentes.  
Efeito do tipo de secagem no teor de carotenoides totais em amostras de guaraná (Paullinia cupana) provenientes da região do Baixo Sul da Bahia / Deisy Catherine Puentes Espitia. – Ilhéus: UESC, 2018.  
63f. : il.  
Orientador : Janclei Pereira Coutinho.  
Co-orientador : Raildo Mota de Jesus.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.
- Inclui referências
1. Guaraná – Cultivo – Bahia, Sul. 2. Carotenóides. 3. Corantes naturais. 4. Sementes – Secagem. I. Coutinho, Janclei Pereira. II. Jesus, Raildo Mota de. III. Título.
- CDD – 633.88

DEISY CATHERINE PUENTES ESPITIA

EFEITO DO TIPO DE DE SECAGEM NO TEOR DE CAROTENOIDES  
TOTAIS EM AMOSTRAS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*)  
PROVENIENTES DA REGIÃO DO BAIXO SUL DA BAHIA

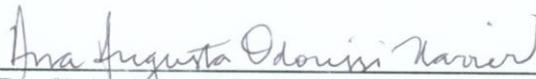
Ilhéus, 26 de fevereiro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA:



---

Prof(a). Dr. Jancleí Pereira Coutinho  
Doutor em Ciência de Alimentos (UNICAMP)  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC  
Orientador(a)



---

Prof(a). Dra. Ana Augusta Odorissi Xavier  
Doutora em Ciências de Alimentos (UNICAMP)  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP



---

Prof(a). Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva  
Doutor em Química (UFBA)  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

*Aos meus pais María del Transito e Jorge,  
pelo amor e a entrega apesar da minha ausência.*

*Amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me colocar sempre no lugar certo, por sempre me dar força e sabedoria para alcançar meus objetivos.

À minha família, especialmente aos meus pais, María de Transito e Jorge por ser meu porto seguro, por acreditar sempre em mim e me acompanhar nesse processo no Brasil. Ao meu avô Pedro, os meus irmãos, Andrés, Ricardo e Diego, as minhas sobrinhas, Izabella e Juliana e as minhas cunhadas Patrícia e Carolina pelo carinho, credibilidade e apoio em todas as etapas da minha vida. Obrigada todos vocês por compreenderem minha ausência durante esses dois anos. A força e amor que me deram na distância foi indispensável, essa conquista é de todos nós. Amo vocês!

Ao meu querido Jhon Freddy pelo amor, amizade, apoio e cumplicidade. Obrigada por ser o melhor companheiro nessa viagem e por, mesmo de longe, tornar meus dias muito mais felizes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Janclei Pereira Coutinho, pela confiança, ensinamentos e oportuna orientação ao longo desses dois anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus, pelos ensinamentos nas disciplinas, co-orientação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À todo o quadro de professores do PPGQUIM, em especial aos professores Dr. Ivon Pinheiro Lôbo, Dra. Rosilene Aparecida de Oliveira, Dr. Fábio Alan Carqueija, Dr. Erik Galvão pelos ensinamentos nas disciplinas de Química Analítica.

Ao professor Dr. Marcelo Franco, pela disponibilidade do Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica para o desenvolvimento de algumas etapas deste trabalho.

À banca examinadora pelas contribuições e correções realizadas.

Ao coordenador da Câmara Setorial do Guaraná do Baixo Sul, Gerval Teófilo Brito, e demais produtores e técnicos agrícolas da região, pelo apoio, disponibilidade e grande mobilização para a coleta das amostras.

À todos os amigos e colegas da turma 2016.1, Fernanda, Glêydson, Pedro, Sêmele, Marina, Caroline, Cayo e Adriana, por ter me acolhido de uma maneira muito especial, pela amizade e por todos os momentos de estudo e diversão.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Analítica e do Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica: André, Clissiane, Stephanie, Polyanne, Nadabe, Edvan e as estagiárias Flavia e Fabiane, pela constante ajuda no laboratório, pelas conversas e momentos de resenha.

Aos meus caros Jennifer, Yenny, Daniel, Martha e Leidy, obrigada pelo carinho, credibilidade, apoio e pela força que me deram na distância. Adoro vocês!

Aos meus “gringos” queridos, obrigada pelo apoio, companheirismo, carinho e pelos momentos de incrível diversão, somente posso me orgulhar por tê-los conhecido como amigos e pesquisadores, só a gente compreende a nossa luta. Especialmente aos amigos Heriberto e Vanesa pelo apoio constante, ensinamentos e resenhas, obrigada pela grande amizade.

Ao secretário do PPGQUIM, Maurício Dezidério, pela disposição de ajuda sempre.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela estrutura oferecida para execução do trabalho.

À OEA, Grupo COIMBRA de Universidades Brasileiras e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESB e ao Projeto DCR 003/2015, pelo financiamento do projeto.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.  
Muito Obrigada!

## **Viajar es regresar**

*«Viajar es marcharse de casa  
es dejar los amigos  
es intentar volar.  
Volar conociendo otras ramas  
recorriendo caminos  
es intentar cambiar.*

*Viajar es vestirse de loco  
es decir “no me importa”  
es querer regresar.  
Regresar valorando lo poco  
saboreando una copa  
es desear empezar.*

*Viajar es sentirse poeta  
escribir una carta  
es querer abrazar.  
Abrazar al llegar a una puerta  
añorando la calma  
es dejarse besar.*

*Viajar es volverse mundano  
es conocer otra gente  
es volver a empezar.  
Empezar extendiendo la mano  
aprendiendo del fuerte  
es sentir soledad.*

*Viajar es marcharse de casa  
es vestirse de loco  
diciendo todo y nada con una  
postal.  
Es dormir en otra cama  
sentir que el tiempo es corto  
viajar es regresar».*

**Gabriel García Márquez**

## RESUMO

### EFEITO DO TIPO DE SECAGEM NO TEOR DE CAROTENOIDES TOTAIS EM AMOSTRAS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*) PROVENIENTES DA REGIÃO DO BAIXO SUL DA BAHIA

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma espécie nativa da Amazônia brasileira e bastante importante na economia do Brasil, especialmente na região sul da Bahia, visto que este estado é o maior produtor de guaraná há mais de uma década. O guaraná é tradicionalmente consumido por causa de suas propriedades antioxidantes, estimulantes, energéticas e diuréticas, atribuídas à sua alta concentração de metilxantinas e flavonoides. No entanto, estudos sobre a presença de carotenoides no guaraná ainda não foram encontrados. Esses compostos contribuem na prevenção do câncer, de doenças cardiovasculares e oculares, associadas à sua atividade pro-vitáminica A, antioxidante e imunomoduladora. Assim, o presente trabalho demonstra a presença de carotenoides no guaraná e avalia o efeito dos métodos de secagem no conteúdo de carotenoides de amostras de sementes de guaraná. A extração dos carotenoides foi feita com auxílio do banho ultrassônico usando acetona como solvente extrator. A otimização das condições de extração foi realizada utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>), onde os parâmetros avaliados foram: “tempo”, “temperatura” e “potência”, e a resposta utilizada foi teor de carotenoides totais, determinada por espectrofotometria com absorvância medida em 450 nm. A melhor condição experimental de extração foi definida utilizando tempo de 13,4 minutos, temperatura de 40 °C e 70% da potência total do equipamento, com uma razão massa de amostra/volume de solvente de 0,016 g mL<sup>-1</sup>. Foram avaliadas 38 amostras de sementes de guaraná provenientes da região do Baixo Sul da Bahia, e submetidos às diferentes condições de secagem. A análise de comparações múltiplas de Tukey mostrou não haver diferença entre os resultados da média das amostras dos diferentes municípios. Com relação aos métodos de secagem, as amostras secas ao sol (166,39 ± 25,52 µg g<sup>-1</sup>) apresentaram maiores teores que as amostras secas em estufa natural (132,87 ± 25,59 µg g<sup>-1</sup>), que por sua vez não diferenciou das secas em aguidá rotativo (111,14 ± 57,39 µg g<sup>-1</sup>). A influência da temperatura de secagem mostrou que secagem a altas temperaturas e tempos curtos favorecem a manutenção de carotenoides. O processo de liofilização mostrou-se não favorável, pois a concentração de carotenoides obtida foi inferior (29,133 ± 2,65 µg g<sup>-1</sup>). Com esses resultados, foi demonstrado que embora o guaraná seja comercializado e consumido por seu alto conteúdo de cafeína, esse fruto representa uma fonte de carotenoides para o organismo humano, bem como as melhores condições de secagem para minimizar a degradação dos mesmos. Este trabalho apresenta, pela primeira vez na literatura, a presença de carotenoides em amostras de sementes de guaraná.

**Palavras-chave:** Guaraná (*Paullinia cupana*), carotenoides, secagem.

## ABSTRACT

### EFFECT OF TYPE OF DRYING IN THE CONTENT OF TOTAL CAROTENOIDS IN SAMPLES OF GUARANÁ (*Paullinia cupana*) FROM THE BAHIA SOUTHERN LOWLANDS REGION

Guarana (*Paullinia cupana*) is a plant native from the Brazilian Amazon and it is quite important for the Brazilian economy, especially in the Bahia Southern Lowlands region, since this state is the largest producer of guarana for more than a decade. Guarana is traditionally consumed due to its antioxidant, stimulating, energetic and diuretic properties, all of them, attributed to its high methylxanthines and flavonoids. However, studies on the characterization of carotenoids in guarana have not yet been found. These compounds contribute to the prevention of cancer, cardiovascular and ocular diseases associated with their pro-vitamin A, antioxidant and immunomodulatory activity. Thus, the present work demonstrates the presence of carotenoids in guarana and evaluate the effect of drying methods on the carotenoid content of guarana seeds samples. The extraction of carotenoids was done using ultrasonic bath and acetone as the extraction solvent. To optimize the operating conditions of the ultrasonic equipment the following parameters were evaluated: "time", "temperature" and "power", which were applied in a rotatable central composite design (DCCR 2<sup>3</sup>) and measured by spectrophotometry with measured absorbance at 450 nm. The best experimental extraction condition was defined using a time of 13.4 min, temperature of 40°C and 70% of the total power of the equipment, with a sample mass/solvent ratio of 0.016 g mL<sup>-1</sup>. Thirty-eight samples of guarana seeds from the Bahia Southern Lowlands region were evaluated and submitted to different drying conditions. The analysis of Tukey's multiple comparisons showed that there was not difference between the mean results of samples collected from different cities. In relation to the drying methods, the samples dried in the sun (166,39 ± 25,52 µg g<sup>-1</sup>) had higher contents than the dry samples in a natural greenhouse (132,87 ± 25,59 µg g<sup>-1</sup>), which did not differentiate between droughts in rotating agudá (111,14 ± 57,39 µg g<sup>-1</sup>). The influence of the drying temperature showed that drying at high temperatures and short times favors the maintenance of carotenoids. The lyophilization process was not favorable, because the concentration of carotenoids obtained was lower in comparison with the other samples (29,133 ± 2,65 µg g<sup>-1</sup>). With these results, it was demonstrated that although guarana is commercialized and consumed for its high caffeine content, this fruit represents a source of carotenoids for the human organism, as well as, the best drying conditions to minimize their degradation. This paper presents, for the first time in the literature, the presence of carotenoids in guarana seed samples.

**Key words:** Guarana (*Paullinia cupana*), carotenoids, drying.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1— Fontes naturais dos principais carotenoides .....   | 27 |
| Tabela 2 — Relação das amostras de guaraná coletadas nos municípios de Camamu, Nilo Peçanha, Taperoá e Valença.....   | 35 |
| Tabela 3 — Temperatura e tempo de secagem de amostras de sementes de guaraná.....   | 36 |
| Tabela 4 — Delineamento composto central rotacional (DCCR 2 <sup>3</sup> ) com as combinações dos fatores de operação do equipamento de ultrassom e seus respectivos valores de carotenoides extraídos em fração de $\beta$ -caroteno ..... | 39 |
| Tabela 5 — Resumo da análise de variância ANOVA para as respostas avaliadas.....  | 40 |
| Tabela 6 — Resumo da análise de variância ANOVA para as respostas dos 16 experimentos avaliados.....  | 42 |
| Tabela 7 — ANOVA para o modelo cúbico reduzido .....  | 45 |
| Tabela 8 — Concentração de carotenoides totais em amostras de sementes de guaraná submetidas aos métodos de secagem em aguidá, estufa natural e ao sol .....  | 50 |
| Tabela 9 — Valores médios de concentração de carotenoides totais para cada amostra .....  | 52 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1— Cacho de frutos de guaraná, mostrando o fruto com suas sementes (pardo-negra) entre o arilo (branca). .....   | 19 |
| Figura 2— Municípios da Região do Baixo Sul da Bahia .....  | 21 |
| Figura 3—Maquina artesanal despoldadora de guaraná.....   | 22 |
| Figura 4— Métodos de secagem de sementes de guaraná da região do Baixo Sul da Bahia (A) secagem em estufa. (B) secagem ao sol. (C) secagem em aguidá convencional. (D) secagem em aguidá rotativo .....       | 24 |
| Figura 5— Estrutura molecular de alguns carotenoides.....   | 25 |
| Figura 6 — Representação gráfica do planejamento composto central de três níveis. ....  | 32 |
| Figura 7 — Gráfico de “outlier T” versus número do experimento para a concentração de carotenoides em fração de $\beta$ -caroteno. (A) antes do tratamento do resíduo; (B) após o tratamento do resíduo ..... | 41 |
| Figura 8 — Gráfico de valores observados x preditos (A) e Gráfico de resíduos (B) para o modelo cúbico reduzido para o planejamento composto central .....  | 43 |
| Figura 9 — Gráfico de contorno (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para o modelo cúbico reduzido para o delineamento composto central rotacional .....  | 46 |
| Figura 11 — Gráfico de concentração de carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) vs. condições de secagem ....  | 54 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                |   |
|----------------|---|
| <b>ANOVA</b>   | Análise de variância (do inglês <i>Analysis of Variance</i> )                                       |
| <b>CONAB</b>   | Companhia Nacional de Abastecimento   |
| <b>DCCR</b>    | Delineamento Composto Central Rotacional  |
| <b>DO</b>      | Denominação de Origem   |
| <b>HPLC</b>    | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ) |
| <b>IP</b>      | Indicação de Procedência  |
| <b>OCC</b>     | Cromatografia em Coluna Aberta (do inglês <i>Open Column Chromatography</i> )                       |
| <b>RSM</b>     | Metodologia de Superfície de Resposta (do inglês <i>Response Surface Methodology</i> )              |
| <b>TLC</b>     | Cromatografia em Camada Delgada (do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i> )                       |
| <b>UAE</b>     | Extração Assistida por Ultrassom (do inglês <i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> )                 |
| <b>UV- Vis</b> | Ultravioleta Visível  |

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....  | 15 |
| 2     | OBJETIVOS.....  | 17 |
| 2.1   | Objetivo geral .....  | 17 |
| 2.2   | Objetivos específicos .....   | 17 |
| 3     | REVISÃO DE LITERATURA .....   | 18 |
| 3.1   | Guaraná ( <i>Paullinia Cupana</i> ).....                                | 18 |
| 3.1.1 | O guaraná na Bahia.....   | 20 |
| 3.1.2 | Beneficiamento pós-colheita do guaraná: fermentação e secagem .....     | 22 |
| 3.2   | Carotenoides .....  | 24 |
| 3.2.1 | Carotenoides em alimentos.....  | 26 |
| 3.2.2 | Importância dos carotenoides para a saúde humana.....                   | 27 |
| 3.3   | Extração, identificação e quantificação de carotenoides .....           | 28 |
| 3.4   | Técnicas de otimização multivariada para extração .....                 | 31 |
| 3.4.1 | Delineamento composto central .....                                     | 31 |
| 4     | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....  | 34 |
| 4.1   | Equipamentos e material.....  | 34 |
| 4.2   | Reagentes .....   | 34 |
| 4.3   | Amostragem.....   | 34 |
| 4.4   | Pré-tratamento das amostras .....                                       | 35 |
| 4.5   | Otimização da extração de carotenoides assistida por ultrassom .....    | 36 |
| 4.6   | Determinação de carotenoides totais por espectrofotometria UV-Vis ..... | 37 |
| 4.7   | Validação .....   | 38 |
| 5     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 39 |
| 5.1   | Otimização da extração assistida por ultrassom .....                    | 39 |
| 5.1.1 | Validação.....  | 47 |
| 5.2   | Determinação de carotenoides totais por espectrometria UV-Vis.....      | 47 |
| 5.2.1 | Avaliação dos métodos de secagem .....                                  | 47 |
| 5.2.2 | Avaliação influência da temperatura de secagem.....                     | 51 |
| 6     | CONCLUSÕES.....   | 56 |
|       | PERSPECTIVAS FUTURAS .....  | 58 |
|       | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 59 |

## 1 INTRODUÇÃO

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta nativa da Floresta amazônica brasileira, onde é cultivada, processada e consumida pelos indígenas da tribo Sateré-Mawé como produto alimentício e medicinal. Até os anos 80, a cidade de Maués, no estado do Amazonas, era líder absoluta na produção do guaraná, com 90% da produção brasileira. A ampliação do uso comercial da semente estimulou a expansão do cultivo de guaraná para os estados do Acre, Rondônia, Pará e Mato Grosso, chegando até a região cacaueteira no sul da Bahia, onde o guaraná encontrou condições edafoclimáticas ideais para seu desenvolvimento. Há mais de uma década o estado da Bahia é considerado o maior produtor de guaraná do Brasil, registrando em 2017 cerca de 71% da produção nacional (CONAB, 2017). Assim, a cultura do guaraná se constitui como uma das bases socioeconômicas do Baixo Sul baiano, uma vez que a cultura é explorada basicamente pela agricultura familiar em propriedades rurais nos municípios da região (EBDA, 2013).

O Brasil é considerado o maior produtor de guaraná do mundo, não tendo concorrência com a produção comercial de pequenas áreas plantadas na região amazônica peruana e venezuelana (CONAB, 2017). Para a comercialização das sementes secas, os frutos *in natura* passam por um processo de beneficiamento pós-colheita que inclui as etapas de fermentação, despulpamento, lavagem com água e secagem. No Baixo Sul da Bahia, esses processos são desenvolvidos de forma artesanal, sendo que os frutos são submetidos a fermentação por 2 a 8 dias e despolpados por maceração para separar as frações de casca, arilo e semente, em seguida as sementes são lavadas e por último os grãos são dispostos para secagem ao sol, em estufas solares cobertas com lona plástica incolor ou em aguidá, equipamento artesanal desenvolvido pelos produtores de guaraná

O guaraná é amplamente conhecido em nível mundial por suas propriedades medicinais tais como antioxidante, antimicrobiano, na prevenção de doenças cardiovasculares associadas ao seu conteúdo de taninos (catequina e epicatequina), polifenóis, aminoácidos, (MORAES et al., 2003), procianidinas B2, B3 e B4 (dímeros compostos por unidades flavan-3-ol, ligados a polissacarídeos) (USHIROBIRA et al., 2007) e principalmente metilxantinas (teofilina, cafeína e teobromina) (ARAÚJO et al., 2006) às quais se atribui a ação estimulante do sistema nervoso central (KUSKOSKI et al., 2005). Não obstante, não há nenhum estudo até o presente momento que descreva a composição de carotenoides da semente do guaraná.

Este tema se mostra promissor, visto que em geral o consumo de alimentos ricos nestes compostos proporcionam benefícios para a saúde, pois, contribuem na prevenção do câncer, das doenças cardiovasculares e nos olhos, associadas a sua atividade pro-vitamínica A. Além disso, apresentam alta capacidade antioxidante e atividade imunomoduladora, entre outros benefícios (HORST; MORENO, 2009; OLMEDILLA-ALONSO; GRANADO-LORENCIO; BLANCO, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Na análise de carotenoides em alimentos, se deve considerar que a composição qualitativa e quantitativa dos mesmos varia consideravelmente. Assim, tanto em diferentes alimentos quanto em um mesmo alimento, haverá variação no teor e tipos de carotenoides por causa de fatores como variedade/cultivar, estado de maturação, clima/origem geográfica, parte analisada, manuseio e processamento pós-colheita e condições de estocagem (KIMURA et al., 2007; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Nas etapas de pós-colheita e estocagem, os carotenoides apresentam menor estabilidade, gerando alguns efeitos na composição e teor dos carotenoides nos alimentos, tais como: perda de carotenoides por oxidação enzimática causada por cortes ou trituração; perdas por cocção; destruição de carotenoides por causa da secagem ao sol; desintegração dos tecidos e diminuição da retenção de carotenoides por exposição a altas temperaturas e tempos prolongados; alterações nas atividades biológicas e a cor por isomerização dos *cis-trans*-carotenoides (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Em razão da estreita ligação entre os métodos de processamento pós-colheita e a composição de carotenoides em alimentos, e a carência de informações sobre a presença desses compostos em sementes de guaraná, surge à importância pela otimização dos métodos de secagem do fruto que permitam a obtenção de um produto de maior qualidade nutricional, visando outorgar-lhe um maior valor comercial e ampliar o campo de produção do guaraná do Baixo Sul da Bahia. Essa dissertação faz parte de um projeto de pesquisa com o título “Avaliação da composição de amostras de guaraná (*Paullinia cupana*) por técnicas espectroanalíticas visando à indicação de origem”, financiado pelo PRONEM, FAPESB/CNPq, termo de outorga PNE 011/2014, no qual se tem desenvolvido pesquisas sobre o conteúdo de macro e microelementos, taninos e metilxantinas, visando contribuir com informações que sirvam de suporte no processo de obtenção da indicação de origem do “Guaraná da Mata Atlântica”.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos métodos de secagem nos teores de carotenoides em amostras de guaraná provenientes da região do Baixo Sul da Bahia.

### 2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a extração de carotenoides assistido por ultrassom utilizando ferramentas estatísticas multivariadas;
- Quantificar os carotenoides presentes nas sementes de guaraná a partir das técnicas: espectrometria UV- Vis;
- Avaliar a influência de diferentes formas e temperaturas de secagem nos teores de carotenoides em amostras de sementes de guaraná.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Guaraná (*Paullinia Cupana*)

O cultivo de guaraná se inicia antes mesmo da conquista do continente americano, por indígenas das tribos do Baixo Amazonas: os Sateré-Mawé, da região leste do Amazonas, e os Andiras do Alto do Rio Negro, próximo as fronteiras com a Colômbia e Venezuela. A primeira descrição do guaraná foi em 1669, época em que ocorreu o primeiro contato entre a tribo Sateré-Mawé e os portugueses. O Padre Jesuíta João Felipe Bettendorf, relatou a maneira como os indígenas processavam o guaraná e o consumiam em forma de pó suspenso em água. Essa bebida sagrada era eficaz para combater a febre, caibras, dores de cabeça, além de apresentar propriedades antidiarréicas, diuréticas e estimulantes (MUSEU DA PESSOA, 2007).

O guaranazeiro, como conhecida no Brasil, é a planta que produz o guaraná, pertence à família *sapindaceae*. O gênero dessa planta foi chamado de *Paullinia*, em homenagem ao médico e botânico alemão Christian Franz Paullini. Assim, para esta espécie foi adotado o nome de “*cupana*” como é conhecido na Colômbia e Venezuela, por essas razões recebeu o nome científico de *Paullinia cupana* (GONÇALVES, 1971).

Por volta de 1897, o botânico Theodor Martius encontrou no Baixo Amazonas uma variedade da planta que chamou de *Paullinia sorbilis* (sorvível), este guaraná apresenta semelhanças com o guaraná já identificado como *Paullinia cupana*. Em 1937, o botânico Adolfo Ducke descreveu diferenças morfológicas entre as duas espécies e sugeriu classificá-las em duas variedades geográficas: *Paullinia cupana* variedade *Typica* para a encontrada no Alto do Rio Negro na Venezuela e *Paullinia cupana* Kunth variedade *sorbilis* (Martius) Ducke para o guaraná brasileiro comercialmente explorado (GONÇALVES, 1971; SCHIMPL et al., 2013).

O guaraná é uma planta arbustiva semi-ereta, trepadeira e lenhosa que em seu habitat e dependendo das condições de luz pode-se apoiar nas árvores da floresta e atingir altura entre 9 e 10 metros. Por outro lado, quando cultivada em local aberto e ensolarado o guaraná apresenta em média 2 metros de altura e um diâmetro duas vezes superior. Frutifica em cachos e seus frutos são redondos, assumindo a forma de uma cápsula que pode conter até três sementes cada uma. Quando maduros, tornam-se vermelho-alaranjado, abrindo sua estrutura

externa que faz surgir às sementes de cor castanha escura com um arilo -cobertura carnuda da semente- branco e espesso, fazendo com que o guaraná tenha uma forma semelhante ao olho humano, como mostrado na Figura 1 (DALONSO, 2010; MUSEU DA PESSOA, 2007; SUFRAMA; MDICE, 2003).

Figura 1— Cacho de frutos de guaraná, mostrando o fruto com suas sementes (pardo-negra) entre o arilo (branca).



A parte comercial do guaraná são as sementes, que passam por um processo de beneficiamento pós-colheita que inclui a fermentação do fruto *in natura* por um período de dois a oito dias, para facilitar a remoção da casca e o arilo, podendo ser manual ou com equipamento apropriado, seguindo-se da lavagem com água. Posteriormente, as sementes são submetidas ao processo de secagem para reduzir o teor de umidade para um intervalo de 5 a 7%, que é a faixa exigida pela indústria de refrigerantes, e entre 8 a 12% pelos produtores de bastão de guaraná (TAVARES; PEREIRA, 2005).

O Brasil é o maior produtor de guaraná do mundo, não sendo concorrência comercial expressiva algumas pequenas áreas plantadas na Amazônia venezuelana e peruana onde os cultivos também têm fins comerciais (CONAB, 2017). O IBGE reportou no início de 2017 que a safra de guaraná para o ano 2016 foi de 3.686 toneladas, quantidade superior em 3,28% à produção de 2015 que foi de 3.569 toneladas (CONAB, 2017). Para 2017 a safra de guaraná *in natura* é estimada pela CONAB em 3.280 toneladas, valor que foi divulgado pela conjuntura mensal em janeiro de 2017.

Estima-se que 70% da produção nacional de guaraná é comercializada para indústria de bebidas refrigerantes gaseificadas e energéticas. Os 30% restantes são destinados para sua industrialização em quatro formas diferentes: em rama, em bastão, em pó e na forma de xaropes e essências. Adicionalmente, devido às suas propriedades estimulantes, suas propriedades lipolítica e vasodilatadora o tornam adequado para o preparo de cosméticos e fármacos (MORAES et al., 2003; SUFRAMA; MDICE, 2003; TAVARES; PEREIRA, 2005).

A sua composição química mostra uma semente rica em xantinas (teofilina, cafeína e teobromina) (ARAÚJO et al., 2006), catequina e epicatequina, polifenóis e saponinas (MORAES et al., 2003), razão pela qual lhe são atribuídos benefícios para a saúde como atividade antimicrobiana e antioxidante, prevenção de doenças cardiovasculares e ações estimulantes do sistema nervoso central (KUSKOSKI et al., 2005). Podem ser identificadas também as procianidinas B2, B3 e B4, que são dímeros compostos por unidades flavan-3-ol (USHIROBIRA et al., 2007). As sementes são utilizadas principalmente por seu alto conteúdo de cafeína, que varia de 3,2 a 7%, sendo cerca de seis vezes superior ao encontrado nas sementes do café (KURI, 2008). Não sendo encontrados dados ao respeito da caracterização dos carotenoides.

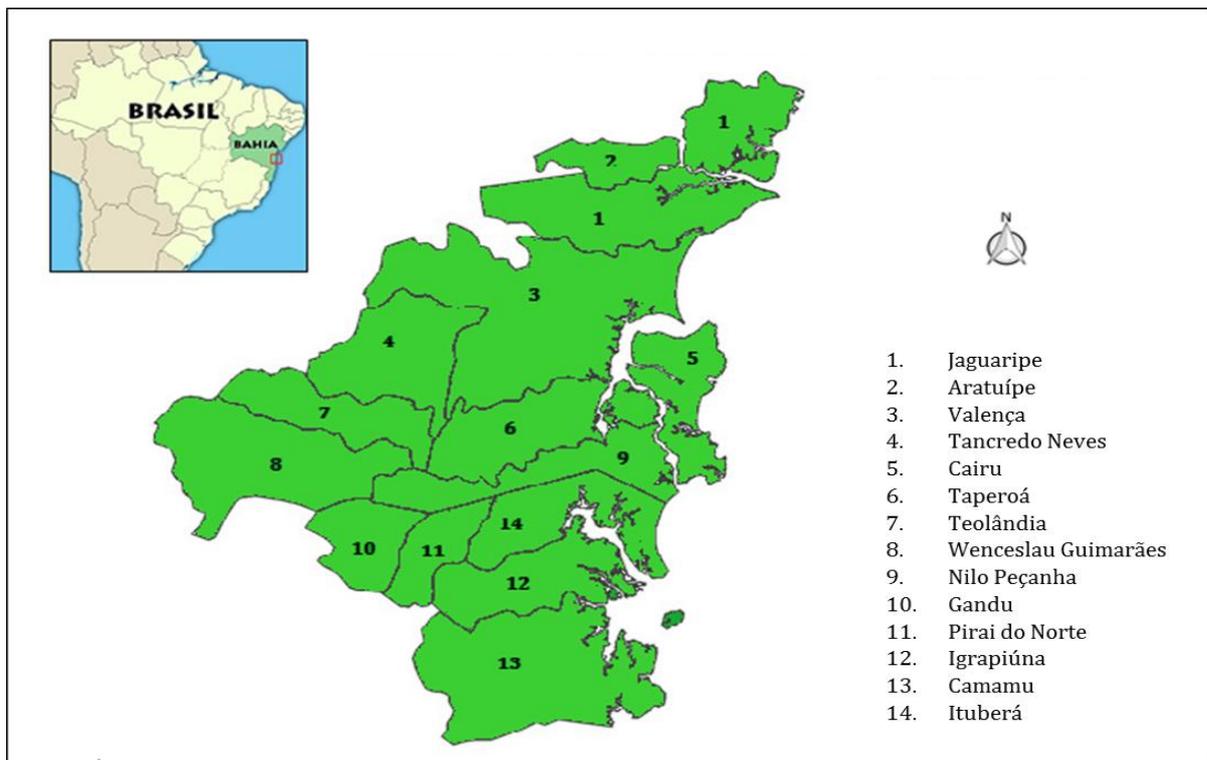
### 3.1.1 O guaraná na Bahia

Segundo relatos de moradores do município de Taperoá, localizado a 277 km ao sul de Salvador e a 193 km ao norte de Ilhéus, o cultivo de guaraná se iniciou nesta região na década de 1970, quando um agricultor japonês trouxe do Amazonas as primeiras mudas da planta, (SEAGRI, 2011). Na região baiana a planta teve um processo de adaptação ao solo e ao climática bastante satisfatório, devido à similaridade das condições de seu habitat natural (alta temperatura, precipitação média anual entre 1500 e 2000 mm e solo bem drenado) (SCHIMPL et al., 2013), favorecendo sua rápida expansão pelo território do Baixo Sul da Bahia (Figura 2), região composta por 15 municípios e localizada no longo da Costa do Dendê, litoral baiano, e tornando-a uma das principais culturas da região.

Apesar de problemas como o beneficiamento inadequado, os baixos preços de compra da semente e o desestímulo dos agricultores apresentado na década de 1990, foi graças as diferentes atividades de capacitação sobre técnicas de cultivo e beneficiamento do guaraná, feitas em parceria da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) e o Sindicato de

Trabalhadores Rurais de Taperoá (SEAGRI, 2011), que esta cultura tem recuperado consideravelmente seu valor na região. Atualmente este território concentra praticamente toda a produção na Bahia, posicionando o estado como o maior produtor de guaraná no Brasil com média de 2700 toneladas de semente por ano, correspondendo aproximadamente a 71% da produção nacional (CONAB, 2017). Assim, o guaraná constitui uma das bases socioeconômicas do Baixo Sul da Bahia, uma vez que a cultura é explorada basicamente pela agricultura familiar, que perfaz aproximadamente 11000 famílias distribuídas em propriedades rurais nos municípios da região que têm como fonte de renda o guaraná (EBDA, 2013).

Figura 2— Municípios da Região do Baixo Sul da Bahia



Fonte: Adaptado de Ramos, 2013.

Com o intuito de conferir maior valor comercial ao produto baiano, alguns produtores em conjunto com associações de agricultores vêm trabalhando para lograr a consolidação do “Guaraná da Mata Atlântica” a partir da obtenção do Selo de Indicação Geográfica, que inclui o certificado da Indicação de Procedência (IP) e Denominação de Origem (DO) no INPI (SANTOS, H., 2017). Portanto, faz-se necessário desenvolver pesquisas sobre a

caracterização química do guaraná que permitam evidenciar a qualidade do produto baiano, incluindo o estudo do seu conteúdo de carotenoides.

### 3.1.2 Beneficiamento pós-colheita do guaraná: fermentação e secagem

O processo de beneficiamento pós-colheita de guaraná é o segmento da fase produtiva que demanda atenção especial, por ter influência no rendimento e na qualidade do produto final (SANTOS, L., 2014). Após a colheita, os frutos são acondicionados em sacos ou amontoados em um local limpo durante dois a oito dias para serem fermentados e assim facilitar o despulpamento (separação das frações de casca, arilo e semente). Alguns produtores possuem equipamentos mecanizados, construídos artesanalmente, para o despulpamento (Figura 3), e nesse caso, os frutos frescos não são submetidos ao processo de fermentação.

Figura 3—Maquina artesanal despulpadora de guaraná



Após o despulpamento, as sementes são submetidas ao processo de secagem, possibilitando a uniformidade no processo e obtenção do produto e menor peso para transporte e maior segurança contra o crescimento de microrganismos. Na região do Baixo Sul da Bahia os pequenos produtores utilizam como método principal de secagem, a secagem natural, especificamente a secagem ao sol e secagem em estufa natural (Figuras 4A e 4B, respectivamente). Na secagem ao sol as sementes são expostas diretamente à radiação solar,

colocadas em piso apropriado sobre uma lona plástica, a qual é capaz de reter calor e fazer com que a semente perca água por aquecimento, tanto do piso quanto da superfície ligeiramente próxima às sementes, e pela ação do potencial de secagem do ar; o tempo de secagem relatado pelos produtores é de um período entre 5 e 8 dias até atingir a porcentagem de umidade exigida pelos compradores (5-7%). Outros produtores utilizam estufas naturais, que são estruturas artesanais, com piso de cimento ou madeira, cobertas com plástico incolor (Figura 4B). O funcionamento se baseia na transferência de energia, onde a radiação atravessa o plástico e é convertida em calor, o qual é retido pela estrutura, mantendo a temperatura interna superior à externa. Segundo relatos dos produtores, este processo permite a secagem das sementes de guaraná em cerca de 6 dias. Os dois métodos descritos apresentam como vantagem ser bastante econômicos, já que não empregam gasto de energia para equipamentos sofisticados de secagem. Porém, são métodos que requerem longos períodos de exposição ao processo, além da dependência das condições climáticas, que podem atrasar a secagem.

Alternativamente, alguns produtores usam o aguidá, uma estrutura também construída artesanalmente, que possui um tacho metálico onde a secagem é feita a fogo brando, mexendo-se as sementes constantemente de forma manual em aguidá convencional (Figura 4C) ou por um sistema mecânico de espátulas, em aguidá rotativo (Figura 4D), por apresentar melhor transferência de calor, este processo leva em torno de 2 a 3 horas. Embora seja um método que leva menor tempo de processamento, o aguidá tem como desvantagem a queima de madeira para geração de calor, que gera fumaça associada com a produção de contaminantes como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Além disso, este procedimento pode gerar alterações na qualidade do produto final, como por exemplo, na coloração, odor e gosto (aroma).

De acordo com Park e colaboradores (2007), as vantagens que se atribuem aos processos de secagem em geral são: o aumento da vida útil do produto, diminuição das ações microbiológicas, e facilidade no transporte e comercialização. Apesar da importância da secagem para o guaraná, esse método ainda representa ligeira desvantagens para os produtores do baixo sul, devido sua falta de controle, que podem causar perda de compostos voláteis (perda de aroma), reações de degradação enzimática, perdas de nutrientes, entre outros (CEBALLOS-ORTIZ; JIMENEZ-MUNGUÍA, 2012; SANTOS et al., 2015), resultando na diminuição da qualidade do produto.

Figura 4— Métodos de secagem de sementes de guaraná da região do Baixo Sul da Bahia (A) secagem em estufa. (B) secagem ao sol. (C) secagem em aguidá convencional. (D) secagem em aguidá rotativo



### 3.2 Carotenoides

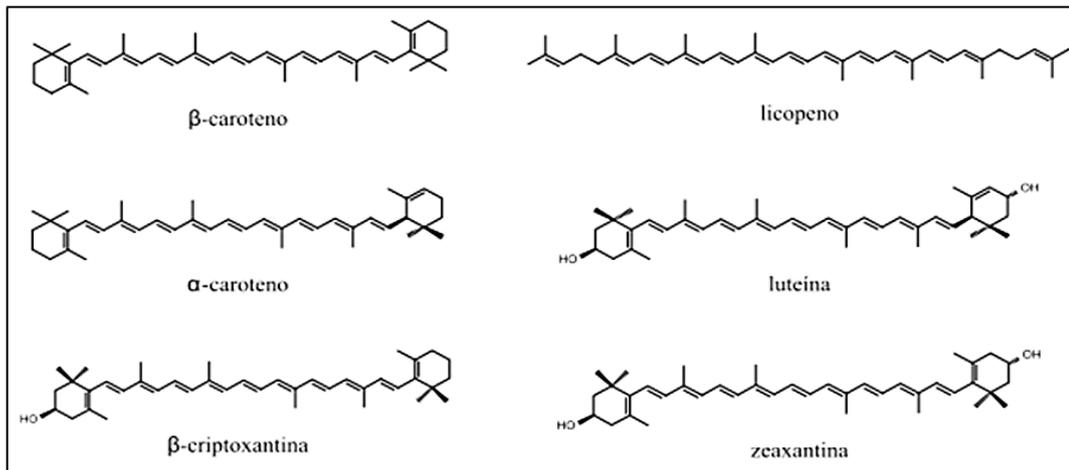
O termo caroteno foi designado pelo químico alemão Heinrich W.F. Wackenroder (1798-1854), que em 1831 cristalizou o pigmento hidrocarboneto de cor alaranjada, a partir da cenoura (*Daucus carota*). Em 1837, J. J. Berzelius deu o nome de xantofilas aos pigmentos amarelos mais polares extraídos de folhas de Outono. Posteriormente, em 1911 o botânico russo Mijaíl S. Tsvet conseguiu separar esses pigmentos através de cromatografia (OMENN, 1998).

Antigamente o interesse dos pesquisadores esteve focado na relação entre os carotenoides e o transporte de oxigênio pela planta, entretanto, foi reconhecida como função principal a capacidade de absorver luz juntamente com a clorofila no mecanismo da fotossíntese. Estes compostos também agem como filtros de radiação ultravioleta, protegendo

as plantas da foto-oxidação, prevenindo às células de danos provocados pelo oxigênio singleto, além de protegerem as plantas de infecções, danos causados por estresse oxidativo, exposição severa à luz ou fermentos (OLIVEIRA, 2005). O processo de maturação é acompanhado pela decomposição da clorofila enquanto os cloroplastos são transformados em cromoplastos. A simples transformação dessa organela dá lugar a um aumento expressivo na quantidade e variedade de carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Existem mais de 700 carotenoides já identificados que estão amplamente distribuídos na natureza. Os carotenoides são compostos formados a partir de oito unidades de isopreno ( $C_5$ ), sendo a maioria tetraterpenos ( $C_{40}$ ). Sua estrutura básica é simétrica, linear e invertida no centro. Podem ser classificados em carotenos, compostos formados unicamente por carbono e hidrogênio, por exemplo, o licopeno e  $\beta$ -caroteno; e, as xantofilas, que além de carbono e hidrogênio possuem oxigênio na sua estrutura, geralmente nos anéis terminais, como a luteína e capsantina. Estas estruturas são produto de modificações que incluem reações de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, introdução de funções de oxigênio, rearranjo, extensão ou redução de cadeia ou combinações delas (DE OLIVEIRA, 2005; OLMEDILLA; GRANADO; BLANCO, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Figura 5— Estrutura molecular de alguns carotenoides



Fonte: Adaptado de Rodriguez-Amaya et al., 2008.

Como mostrado na Figura 5, os carotenoides possuem um sistema de ligações duplas conjugadas que constitui um grupo cromóforo, que proporciona aos carotenoides a cor característica (do amarelo ao vermelho) e a capacidade de absorção de luz no espectro visível, que serve de base para sua identificação e quantificação. Meléndez-Martínez et al. (2007),

indicam que há uma relação entre os espectros de absorção e o número de ligações duplas conjugadas, assim quanto mais longo o cromóforo, maior o comprimento de onda de máxima absorção. Por exemplo, o licopeno, carotenoide acíclico mais insaturado, com 11 ligações duplas conjugadas, responsável pela cor vermelha do tomate, tem comprimentos de onda de absorção longos (440, 478 e 504 nm). Em contraste, o fitoeno (três ligações duplas conjugadas), também presente no tomate, é incolor e apresenta um comprimento máximo de absorção de 276, 286 e 297 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A presença das instaurações traz como consequência sensibilidade: à luz, temperatura, acidez, enzimas e reações de oxidação. Estes fatores promovem a oxidação ou isomerização dos carotenoides que se encontram na forma *all-trans* (forma mais estável) para a configuração *cis* (forma menos estável), formando carotenoides epoxidados e apocarotenoides, resultando na perda da cor e da atividade pro-vitamínica A nos alimentos (AMBRÓSIO; CAMPOS; DE FARO, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Algumas propriedades químicas e físicas identificadas são: absorção de luz; captura do oxigênio singlete; interação com radicais livres; sofrem isomerização e oxidação facilmente; são substâncias lipofílicas praticamente insolúveis em água; são solúveis em solventes orgânicos como acetona, éter etílico, acetato de etila e clorofórmio. Os carotenos são facilmente solúveis em éter de petróleo e hexano, as xantofilas se solubilizam melhor em metanol e etanol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

### 3.2.1 Carotenoides em alimentos

Os carotenoides são os pigmentos responsáveis pelas cores de amarelo a laranja ou vermelho de muitos alimentos como frutas, hortaliças, peixes e frutos do mar (Tabela 1). A composição qualitativa e quantitativa de carotenoides nos alimentos varia consideravelmente. Num mesmo alimento, por exemplo, também haverá variação produto de fatores como variedade/cultivar, estado de maturação, clima/ estação e origem geográfica, parte analisada, condições de plantio, manuseio e processamento pós-colheita e condições de estocagem (KIMURA et al., 2007; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Os carotenoides são compostos que apresentam estabilidade na sua matriz natural, no entanto o processamento pós-colheita e a estocagem podem gerar alguns efeitos na composição de carotenoides como o aumento do teor de carotenoides após a colheita, se

preservado o sistema enzimático responsável da carotenogênese que forneça a continuidade do processo de biossíntese; perda ou destruição de carotenoides por oxidação enzimática causada por cortes ou trituração, resultando em perdas nas atividades biológicas e a cor por isomerização dos *trans*- carotenoides. Perdas por tipos de cocção na seguinte ordem: micro-ondas < cozido ao vapor < fervido < frito; a secagem tradicional ao sol que ocasiona uma importante destruição de carotenoides; exposição a altas temperaturas e tempos prolongados que gera desintegração dos tecidos e diminuição da retenção. Tratamentos a alta pressão, a alta temperatura e tempos reduzidos, com proteção da luz, o branqueamento e o congelamento são alternativas para diminuir as perdas de carotenoides nos processos pós-colheita (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Tabela 1— Fontes naturais dos principais carotenoides

| <b>Carotenoides</b>    | <b>Fontes</b>   |
|------------------------|---|
| $\alpha$ -caroteno     | Abóbora, cenoura, brócolis, espinafre, vagem                          |
| $\beta$ -caroteno      | Acerola, cenoura, buriti, batata-doce, mandioca, pimentão, melão      |
| $\beta$ -criptoxantina | Acerola, mamão, laranja, pêssego, tomate arbóreo, milho, ervilha      |
| Licopeno               | Tomate, melancia, goiaba vermelha, mamão vermelho                     |
| Luteína                | Abóbora, alface, brócolis, coentro, couve, rúcula, salsa, milho verde |
| Zeaxantina             | Laranja, camu-camu, manga, milho, morango, couve tomate arbóreo       |

Fonte: Adaptado de Silva, 2014.

Nas indústrias de alimentos, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes, a fim de repor a cor perdida durante o processo de armazenagem, colorir os alimentos incolores, uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios, promover a pigmentação adequada de alguns animais, como no caso do uso da astaxantina na criação de peixes como salmão e camarões, e enriquecedor de produtos alimentares devido a suas atividades biológicas (MALDONADE, 2003).

### 3.2.2 Importância dos carotenoides para a saúde humana

Os carotenoides são sintetizados somente por plantas e micro-organismos. Os animais são incapazes de biossintetizá-los e, portanto, dependem da alimentação para sua obtenção, nesse sentido, as principais fontes desses compostos na alimentação humana são frutas e vegetais. Embora sejam compostos presentes em níveis muito baixos (microgramas por grama), os carotenoides estão entre os constituintes alimentícios mais importantes (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008) e uns dos mais estudados por suas implicações na saúde humana.

Atribui-se como função principal de alguns carotenoides a atividade pro-vitáminica A, que é a capacidade de alguns carotenoides de se converter em vitamina A (retinol). Esta vitamina é importante nos processos normais de crescimento e desenvolvimento; na proteção da pele de danos foto-oxidativos gerados por exposição a raios solares ultravioleta (UV), bom funcionamento do sistema imune e a visão. Adicionalmente, os carotenoides apresentam ações biológicas como capacidade antioxidante, na qual espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas pelo metabolismo são inativadas resultando na proteção ou tratamento contra danos oxidativos relacionados com doenças crônicas não transmissíveis como oculares, câncer e doenças cardiovasculares; proteção da mácula lútea devido a sua ação como filtro da luz solar, especificamente na absorção de luz azul; prevenção de doenças carenciais, devido à deficiência de vitamina A; atividade imunomoduladora e capacidade de modulação da expressão gênica (HORST; MORENO, 2009; OLMEDILLA; GRANADO; BLANCO, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Por conseguinte, os nutricionistas recomendam incluir na dieta frutas e verduras como a cenoura e algumas variedades de abobrinha e abóbora por seu conteúdo de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno; o mamão, fonte de  $\beta$ -criptoxantina; vegetais folhosos de coloração verde escuro que são fontes de luteína; a manga, fonte de violaxantina; tomate, fonte de licopeno; pêssego, fonte de  $\delta$ -caroteno; entre outros. As fontes vegetais constituem o 95% do consumo de carotenoides na dieta, o 5% restante se associa com fontes animais como gema de ovos, moluscos, crustáceos, fígado, peixes e laticínios (OLMEDILLA; GRANADO; BLANCO, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)

### 3.3 Extração, identificação e quantificação de carotenoides

O processo de extração é um dos mais utilizados para o isolamento de compostos ativos em plantas. No caso dos carotenoides sua extração depende da solubilidade, pois são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como acetona, clorofórmio, acetato de etila, tetrahidrofurano, álcoois, entre outros.

Diversas técnicas podem ser empregadas na extração de carotenoides, como extração por maceração estática com almofariz e pistilo ou cinética utilizando homogeneizadores, estas técnicas foram usadas por Kimura et al., (2007) para extração de carotenoides em amostras de batata doce, mandioca e milho, as quais não apresentaram diferenças em função da concentração de carotenoides totais extraídos. Extrações assistida por ultrassom e extração por Soxhlet são bastante utilizadas para extrair carotenoides, no entanto, a extração assistida por ultrassom se mostra melhor em termos de eficiência, pois, apresenta vantagens como: alta reprodutibilidade, possibilidade de utilização para uma ampla faixa de tamanho da amostra oferecendo boa recuperação dos analitos, rapidez no processamento da amostra (cerca de 15 min) e baixo custo, todo isto por meio de um equipamento simples e de fácil operação, que permite a otimização dos parâmetros de extração por ultrassom, incluindo tipo de solvente ou composição do solvente (OLIVEIRA C.; OLIVEIRA R.; LANDGRAF, 2009; PLACIDINA, 1998).

Para o desenvolvimento do processo de extração, Rodriguez-Amaya (2001), faz as seguintes recomendações: executar as análises o mais rápido possível; não utilizar altas temperaturas; proteger as amostras contra a luz; usar solventes orgânicos de grau analítico e livres de impurezas destrutivas; no possível empregar agentes antioxidantes e neutralizantes. Amostras frescas cortadas ou picadas devem ser analisadas imediatamente, além disso, para aumentar a extração de alguns tecidos que apresentam resistência ao solvente, é conveniente coloca-las na geladeira por cerca de 20 minutos. Com o mesmo objetivo, as amostras secas devem ser ligeiramente reidratadas de maneira homogênea (KIMURA et al., 2007).

Os extratos brutos obtidos podem ser analisados diretamente no comprimento de onda de 450 nm pois nesta região são poucos os interferentes. Entretanto, se for necessário é possível aplicar métodos de purificação para eliminar interferentes não desejados.

Na ordem, a partição é o primeiro método de purificação, utilizado para remover a água que pode estar contida no extrato, usam-se solventes como hexano, éter dietílico, éter de petróleo e diclorometano ou misturas desses solventes. Etapa é necessária para a separação

dos componentes do extrato por Cromatografia de Coluna Aberta (*OCC em inglês*). Para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*HPLC em inglês*) o extrato às vezes é evaporado diretamente até à secura e depois dissolvido no solvente usado como fase móvel ou solvente compatível.

A saponificação é outra etapa de purificação do extrato, empregado para retirar compostos como clorofilas ou lipídeos que podem interferir na análise cromatográfica. Seu uso pode ser dispensado, só se não for absolutamente necessário, pois pode provocar degradação dos carotenoides, tal como descrito por Kimura et al. (1990), quem avaliaram a saponificação em amostras de tomate, couve e mamão. O método mostrou-se ineficiente para as duas primeiras matrizes, porém necessário para as amostras de mamão devido à presença de carotenoides esterificados, concluindo que há casos onde não é necessário realizar esta etapa.

Para análise de carotenoides totais a técnica utilizada é a espectrometria UV-Vis, a quantificação é feita medindo a absorção total da amostra com um comprimento de onda específico, sendo geralmente o  $\beta$ -caroteno o padrão analítico de referência, o comprimento de onda máximo desse padrão varia entre 425 a 485 nm dependendo do solvente (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A técnica mais utilizada para separação de carotenoides é, a HPLC em fase reversa com colunas  $C_{18}$  e  $C_{30}$ . As colunas  $C_{18}$  resultam ser mais eficientes na separação de estruturas poliméricas do que nas monoméricas. Colunas  $C_{30}$  oferecem a possibilidade de separar maior número de isômeros, além de ser a única coluna capaz de separar isômeros de carotenóides não-simétricos. As fases móveis mais comuns são as combinações de acetonitrila, metanol, diclorometano, tetrahidrofurano, clorofórmio e acetato de etila. A eluição em gradiente resulta ser mais eficiente em função da separação dos carotenoides, no entanto, a eluição isocrática oferece maior reprodutibilidade e menor tempo de separação para carotenoides pro-vitamina A. Para determinar a concentração de carotenoides é necessária a calibração por padronização interna ou externa, as curvas de calibração são construídas com padrões, a exatidão do método depende de sua pureza e o grau de exatidão com que são calculadas suas concentrações. Técnicas clássicas também podem ser utilizadas, como a separação por Cromatografia de Camada Delgada (*TLC em inglês*) utilizada em análises qualitativas e monitoramento de reações químicas. A OCC é utilizada tradicionalmente para a separação desses compostos e

quantificação e para sua utilização como padrões analíticos. (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Para a quantificação dos carotenoides totais em amostras de sementes de guaraná, as técnicas a serem utilizadas no presente estudo serão a extração assistida por ultrassom e análises por espectrofotometria UV-Vis.

### 3.4 Técnicas de otimização multivariada para extração

As técnicas de planejamento experimental são ferramentas estatísticas utilizadas para planejar e otimizar experimentos de forma multivariada, onde as variáveis que influenciam na resposta experimental são variadas simultaneamente. Esta técnica apresenta vantagens se comparada com técnicas de otimização tradicionais, onde apenas a variação de um fator é avaliada por vez. Assim o uso de planejamento de experimentos multivariado possibilita a redução de tempo, redução de consumo de reagentes e possibilidade de avaliar as interações das variáveis entre si (GALDÁMEZ, 2002; LEARDI, 2009).

A otimização multivariada envolve uma série de passos determinantes no sucesso dos resultados. O primeiro passo é realizar uma triagem de variáveis para identificar a significância estatística das mesmas sobre a resposta e as interações entre os fatores. Nesse caso um planejamento fatorial fracionário é utilizado quando se tem um grande número de fatores ou planejamento fatorial completo utilizando um mínimo de experimentos. Determinados os fatores que influenciam diretamente na resposta, pode ser executada a otimização a partir da metodologia de superfície de resposta (NETO; SCARMINIO; BURNS, 2010).

A metodologia de superfície de resposta (*RSM em inglês*) é uma ferramenta estatística que usa ajuste de modelos matemáticos e técnicas estatísticas para descrever o comportamento de uma combinação de níveis dos fatores dentro de uma região ótima (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). As metodologias de superfície de resposta mais empregadas para otimização de procedimentos analíticos utilizam o planejamento de misturas, planejamento Box-Behnken, matriz Doehlert e planejamento composto central (FERREIRA, 2015; NOVAES et al., 2016).

#### 3.4.1 Delineamento composto central

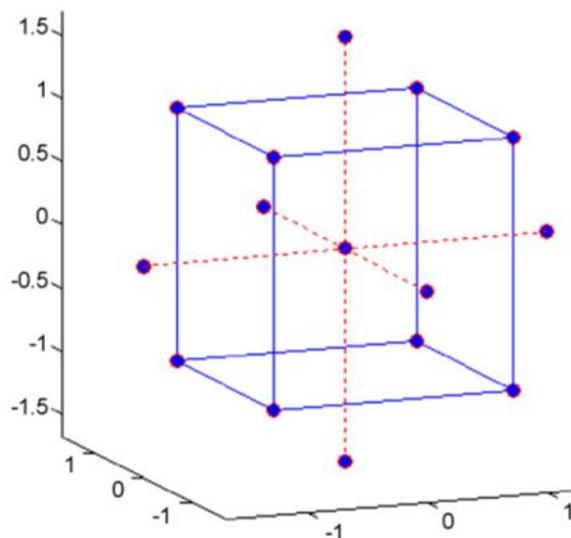
Em geral, um planejamento ou delineamento composto central (DCC) para  $k$  fatores é formado pela combinação de três partes: um planejamento fatorial fracionário ou completo, pontos axiais (em estrela), e um total de  $n$  ensaios realizados no ponto central. Este ponto é selecionado para obter várias propriedades, como rotatividade ou ortogonalidade, para obter os ajustes lineares de polinômios quadráticos, ou de ordem superior. As repetições nesse ponto têm como finalidade fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Este tipo de planejamento é uma melhor alternativa ao planejamento fatorial de três níveis, pois demanda uma menor quantidade de experimentos. O número de experimentos nesse planejamento está definido pela equação 1.

(1)

$$N = k^2 + 2k + pc$$

Onde  $k$  é o número de fatores a serem otimizados e  $pc$  é o número de experimentos adicionais no ponto central (NOVAES et al., 2017; TARLEY et al., 2009).

Figura 6 — Representação gráfica do planejamento composto central de três níveis.



Fonte: Tomado de Leardi, 2009.

O planejamento fatorial composto central é empregado para obter as melhores condições operacionais de um sistema em estudo, realizando-se um número menor de experimentos comparado com o processo univariado. Permite determinar que fatores têm

efeitos relevantes na resposta e medir as interações entre os diferentes fatores. A análise das interações é bastante importante nos processos de otimização. Quando planejamentos não são usados, as possíveis interações não são detectadas, isso dificulta a otimização e pode acarrear mais tempo para chegar à otimização máxima do sistema (BRITO; PINTO; BRUNO; AZEREDO, 2003).

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipamentos e material

Para a secagem de sementes de guaraná foram utilizadas estufa natural e agudá rotativo (equipamento alternativo desenvolvido pelos produtores do Baixo Sul da Bahia). Estufa com circulação e renovação de ar modelo CR/100 Sterilifer (São Paulo, Brasil) com controle digital de temperatura para a redução de umidade das sementes de guaraná. Para a trituração das amostras foi utilizado um moinho de bolas modelo TE-350 Tecnal (São Paulo, Brasil). Balança analítica modelo AUW 220-D Shimadzu (Quioto, Japão), utilizada para a pesagem das amostras. Para a extração das amostras foi utilizado um banho ultrassônico modelo Elmasonic P 30H Elma (Alemanha) equipado com controle de tempo, temperatura, potência e frequência. Espectrofotômetro UV-Vis modelo SP-2000UV Tecnal (São Paulo, Brasil), utilizado para medida de absorbância dos extratos. Para liofilização de uma das amostras de sementes foi utilizado um liofilizador modelo FreeZone 4.5 litros da Labconco.

### 4.2 Reagentes

Para o procedimento de extração dos carotenoides foi utilizada acetona P.A. da Synth. Para a reidratação das amostras de sementes de guaraná em pó e fase móvel água ultrapura com resistividade  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos os solventes constituintes da fase móvel foram filtrados em um sistema de filtração a vácuo contendo filtro de membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  e desgaseificados em um banho ultrassônico antes das análises.

### 4.3 Amostragem

As amostras foram coletadas diretamente em propriedades rurais produtoras de guaraná nos municípios de Nilo Peçanha/BA, Camamu/BA, Taperoá/BA e também em cooperativa de fomento agrícola, no município de Valença/BA, em janeiro de 2016. Foram adquiridas 27 amostras de guaraná em forma de sementes, previamente colhidas e submetidas a processo de secagem pelos próprios produtores (Tabela 2). Adicionalmente, para o desenvolvimento de experimento do efeito da temperatura de secagem foi adquirida uma

quantidade de frutos frescos de guaraná, no município de Taperoá/BA, no dia 13 de abril de 2017. Uma fração desses frutos foi passada na despulpadora para separar a casca e o arilo da semente. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos limpos e encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA-UESC).

Tabela 2 — Relação das amostras de guaraná coletadas nos municípios de Camamu, Nilo Peçanha, Taperoá e Valença

| Processamento Pós-colheita              | Origem <sup>a</sup> (Código) |                   |             |             | Total amostras |
|---|------------------------------|-------------------|-------------|-------------|----------------|
|   | Camamu (C)                   | Nilo Peçanha (NP) | Taperoá (T) | Valença (V) |                |
| Secagem em aguidá rotativo <sup>b</sup> | 3                            | 2                 | 1           | 3           | 9              |
| Secagem em estufa natural               | 1                            | 0                 | 5           | 3           | 9              |
| Secagem ao sol                          | 3                            | 3                 | 3           | 0           | 9              |

<sup>a</sup> Municípios da Região do Baixo Sul da Bahia.

<sup>b</sup> Equipamento alternativo desenvolvido pelos produtores do Baixo Sul da Bahia para a secagem de sementes de guaraná.

#### 4.4 Pré-tratamento das amostras

Para a avaliação dos métodos de secagem utilizados pelos produtores de guaraná as amostras de sementes foram inicialmente submetidas a um processo de secagem em estufa com circulação e renovação de ar, em temperatura de 50 °C durante 16 h para redução e padronização do teor de umidade. Posteriormente, foram trituradas em moinho de bolas por aproximadamente 3 min, transferidas para recipientes plásticos previamente descontaminados e armazenadas em dessecadores a temperatura ambiente e protegidos da luz.

Para o desenvolvimento do experimento de avaliação da temperatura de secagem, os frutos frescos coletados foram separados da fração de casca e arilo. As sementes foram lavadas e submetidas a secagem na sombra a temperatura ambiente durante 24 h para redução de teor de umidade. Após foram divididas em 11 partes iguais e uma das amostras foi liofilizada durante 96 h. As 10 amostras restantes foram secas em estufa de circulação e renovação de ar em diferentes temperaturas e tempos até atingir cerca de 7% de umidade, como mostrado na Tabela 3. Posteriormente, foram trituradas em moinho de bolas por

aproximadamente 5 min, transferidas para recipientes plásticos previamente descontaminados e armazenadas em dessecadores a temperatura ambiente e protegidos da luz.

Tabela 3 — Temperatura e tempo de secagem de amostras de sementes de guaraná

| <b>Amostra</b> | <b>Temperatura (°C)</b> | <b>Tempo (h)</b> |
|----------------|-------------------------|------------------|
| ES1            | Liofilizado             | 96               |
| ES2            | 40                      | 120              |
| ES3            | 50                      | 25               |
| ES4            | 60                      | 22               |
| ES5            | 80                      | 20               |
| ES6            | 100                     | 20               |
| ES7            | 120                     | 8                |
| ES8            | 140                     | 7                |
| ES9            | 160                     | 4                |
| ES10           | 180                     | 3                |
| ES11           | 200                     | 3                |

ES=Experimento de secagem

#### 4.5 Otimização da extração de carotenoides assistida por ultrassom

Para a extração de carotenoides foram otimizados os seguintes parâmetros simultaneamente: tempo, temperatura e potência do banho ultrassônico, usando uma amostra selecionada aleatoriamente. Foi proposto um delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>) com triplicata no ponto central, totalizando 17 experimentos. As variáveis tempo, variaram da seguinte forma 1 a 20 min, temperatura, de 30 a 50 °C e a potência de sonicação de 40 a 100% da potência máxima do equipamento (320 W) com frequência fixada em 80 kHz.

A extração dos carotenoides se baseou na metodologia proposta por Kimura e colaboradores (2007) com adaptações. Foram peneirados com uma malha de nylon (25-420 Mesh) aproximadamente 0,5000 g de cada amostra de guaraná em pó, a fim de torná-la mais homogênea. Posteriormente, foram pesados 0,4000 g de cada amostra em balança analítica. Com o intuito de permitir a penetração eficiente do solvente nos tecidos do guaraná, foi feita uma etapa de reidratação das amostras em temperatura controlada (20 °C), assim adicionou-se um volume de água ultrapura suficiente para cobri-la (cerca de 3 mL) e deixou-se em repouso

durante 5 minutos. Após, foram adicionados aproximadamente 22 mL de acetona e deixou-se em repouso novamente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram levadas para sonicação no banho ultrassônico nas condições experimentais do DCCR 2<sup>3</sup>. Os extratos foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL e o volume final completado com acetona. Os extratos foram filtrados em filtros Millex (PVDF) com tamanho de poro de 0,22 μm e analisados no espectrofotômetro UV-Vis, a resposta avaliada foi a concentração de carotenoides totais em fração de β-caroteno (μg g<sup>-1</sup>). Depois de definir as melhores condições de extração, foram realizados ensaios para definição da melhor razão massa/volume de solvente extrator. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória e em ambiente com iluminação reduzida.

#### 4.6 Determinação de carotenoides totais por espectrofotometria UV-Vis

A determinação de carotenoides totais por espectrofotometria foi aplicada para o total de 38 amostras objeto de estudo neste trabalho. Para a determinação de carotenoides totais em fração de β-caroteno, a absorbância dos extratos foi medida em comprimento de onda de 450 nm. A concentração foi calculada de acordo com as equações (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001):

$$x(\mu g) = \frac{A \times Y_{mL} \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times 100} \quad (2)$$

$$x(\mu g/g) = \frac{x_{\mu g}}{\text{Massa de amostra}} \quad (3)$$

Onde A corresponde à absorbância (abs), y volume total (mL) do extrato,  $A_{1cm}^{1\%}$  ao coeficiente de extinção ou absorvidade molar em um solvente específico (2620 para β-caroteno em acetona na faixa de 450 nm (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007)), x a massa ou concentração de carotenoides.

As respostas obtidas foram submetidas a análise de variância ( $p < 0,05$ ) e teste de comparação de médias de Tukey utilizando o software Design Experto 10 (Stat-Easy).

#### 4.7 Validação

O procedimento de extração proposto foi validado a partir da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: precisão (repetibilidade) e precisão intermediária.

A repetibilidade foi estimada através do desvio padrão relativo (RSD) de dez extrações em um dia. A precisão intermediária foi analisada através do RSD de dez extrações, durante três dias, totalizando trinta extrações.

Como critério de aceitação foi utilizada a equação de Horwitz (Equação 4), quem deduziu uma expressão para prever o valor esperado para o RSD a partir da concentração do analito:

$$RSD_H = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (4)$$

Onde:  $C$  é a fração de massa expressa como exponencial de 10. O valor de RSD obtido é comparado com o predito por Horwitz ( $RSD_H$ ) baseado no parâmetro HorRat:

$$HorRat = \frac{RSD_r}{RSD_H} \quad (5)$$

Se o valor do parâmetro HorRat está entre 0,5-2,0 pode-se considerar que o método apresenta valores aceitáveis de precisão (Jurado, 2008; Paschoal et al., 2008).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização da extração assistida por ultrassom

Foi desenvolvido o planejamento composto central com as variáveis: temperatura, tempo de sonicação e potência do banho ultrassônico. As respostas foram calculadas utilizando as Equações 2 e 3, expostas no item 4.7. Na Tabela 4, são apresentadas todas as condições de extração propostas, esses dados foram inseridos no software Design Expert 10 (Stat-Easy) para o ajuste de um modelo matemático aprovado pela análise de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ) que explicasse a variação dos resultados.

Tabela 4 — Delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>) com as combinações dos fatores de operação do equipamento de ultrassom e seus respectivos valores de carotenoides extraídos em fração de  $\beta$ -caroteno

| Número do Experimento | Fatores          |             |  | Resposta  |
|-----------------------|------------------|-------------|--|---|
|                       | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Potência do ultrassom (% da potência máxima) | Carotenoides extraídos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |
| 1                     | -1 (35)          | -1 (4,9)    | -1 (50)                                      | 114,29  |
| 2                     | +1 (45)          | -1 (4,9)    | -1 (50)                                      | 129,59  |
| 3                     | -1 (35)          | +1 (16,1)   | -1 (50)                                      | 115,33  |
| 4                     | +1 (45)          | +1 (16,1)   | -1 (50)                                      | 130,70  |
| 5                     | -1 (35)          | -1 (4,9)    | +1 (90)                                      | 141,14  |
| 6                     | +1 (45)          | -1 (4,9)    | +1 (90)                                      | 137,27  |
| 7                     | -1 (35)          | +1 (16,1)   | +1 (90)                                      | 131,78  |
| 8                     | +1 (45)          | +1 (16,1)   | +1 (90)                                      | 136,64  |
| 9                     | 0 (40)           | 0 (10,5)    | 0 (70)                                       | 129,04  |
| 10                    | 0 (40)           | 0 (10,5)    | 0 (70)                                       | 122,53  |
| 11                    | 0 (40)           | 0 (10,5)    | 0 (70)                                       | 125,39  |
| 12                    | -1,68 (30)       | 0 (10,5)    | 0 (70)                                       | 108,85  |
| 13                    | +1,68 (50)       | 0 (10,5)    | 0 (70)                                       | 121,81  |
| 14                    | 0 (40)           | -1,68 (1)   | 0 (70)                                       | 110,18  |
| 15                    | 0 (40)           | +1,68 (20)  | 0 (70)                                       | 117,71  |
| 16                    | 0 (40)           | 0 (10,5)    | -1,68 (40)                                   | 137,49  |
| 17                    | 0 (40)           | 0 (10,5)    | +1,68 (100)                                  | 115,79  |

Foram avaliados os modelos linear, quadrático, cúbico e cúbico reduzido. A Tabela 5 mostra um resumo da ANOVA para cada modelo matemático avaliado, os resultados da distribuição de Fisher (teste F) e os valores de probabilidade ( $p < 0,05$ ) para a regressão e a falta de ajuste.

Tabela 5 — Resumo da análise de variância ANOVA para as respostas avaliadas

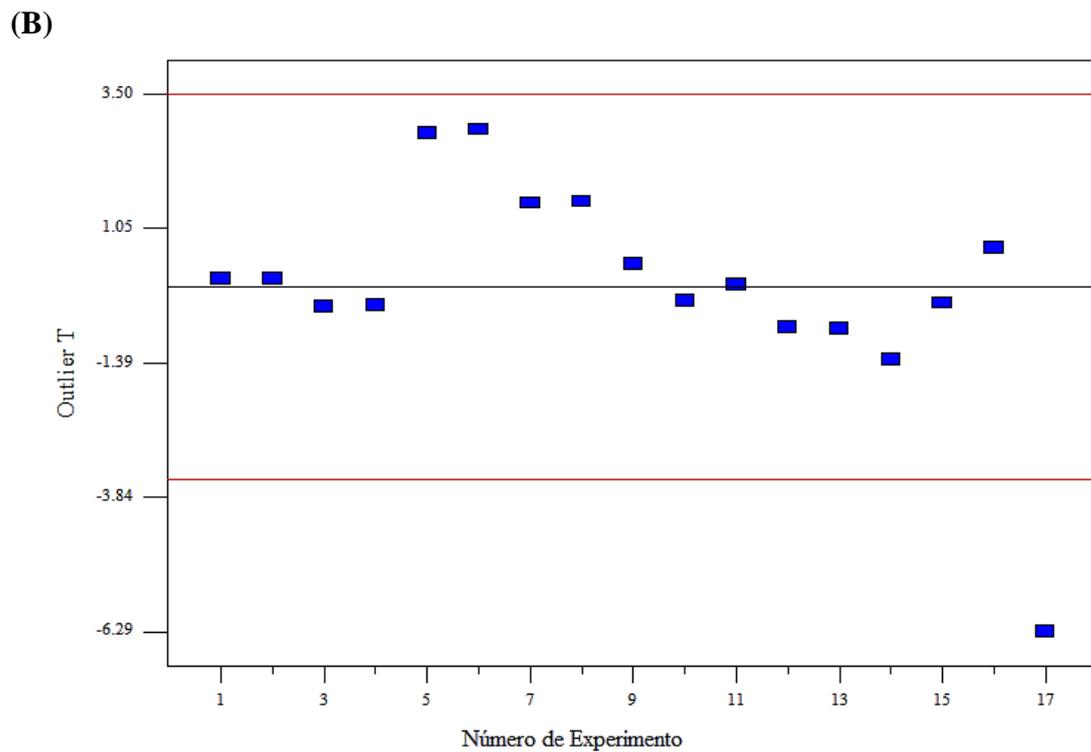
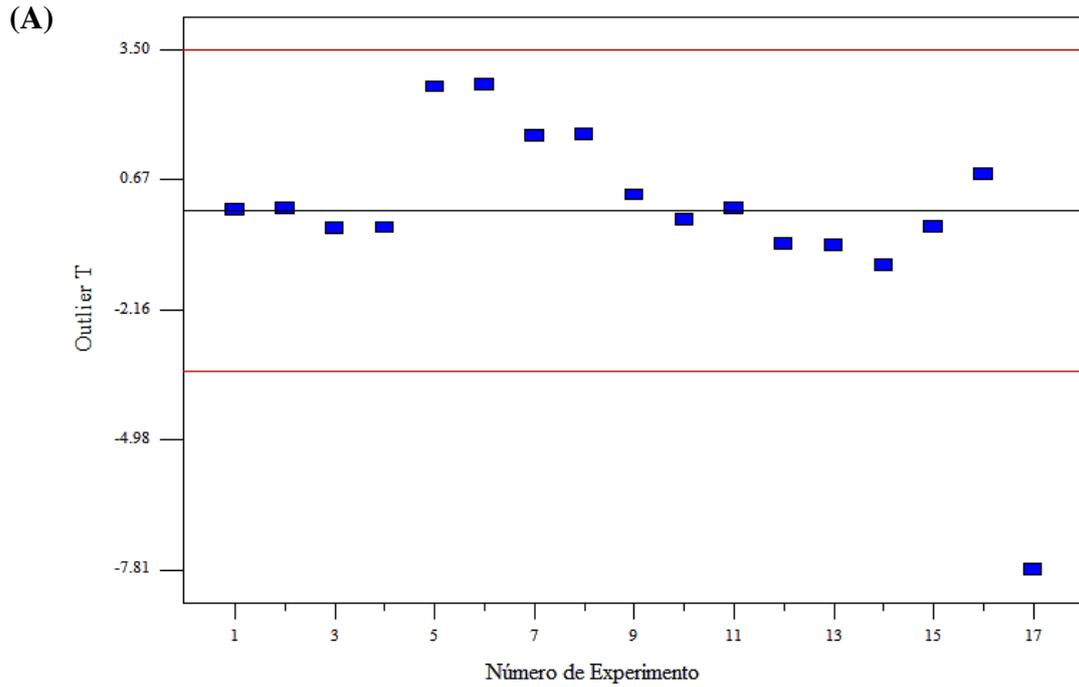
| Modelo          | Regressão |            | Falta de ajuste |            |
|-----------------|-----------|------------|-----------------|------------|
|                 | $F_{cal}$ | $p$ -valor | $F_{cal}$       | $p$ -valor |
| Linear          | 0,74      | 0,5485     | 11,97           | 0,0796     |
| Quadrático      | 0,36      | 0,7837     | 14,84           | 0,0647     |
| Cúbico          | 0,42      | 0,7468     | 20,08           | 0,0481     |
| Cúbico reduzido | 0,32      | 0,9437     | 24,88           | 0,0390     |

$F_{calc}$  = valor de F calculado pelo modelo matemático;  $p$ -valor =  $p < 0,05$

Os valores calculados para F, ou seja, a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos ( $MQ_R/MQ_r$ ) foram menores que os p-valor ao nível de probabilidade de 5% demonstrando que as regressões não são estatisticamente significativas para todos os modelos testados. Em relação à falta de ajuste, os valores calculados para F, ou seja, a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro ( $MQ_{faj}/MQ_{ep}$ ) foram maiores que os p-valor ao nível de probabilidade de 5%, mostrando que não houve significância de falta de ajuste aos modelos. Assim, pode-se concluir que os modelos testados não foram válidos para realizar previsões, isto por causa da presença de um experimento identificado como *outlier*, experimento 17, ( $t = -7,810$ ) como mostrado na Figura 7A. Os *outlier* (conhecidos como valores de “T”, *t-values* em inglês) são valores atipicamente grandes ou pequenos ( $t \pm 3,5$ ) que podem indicar um problema com o modelo matemático ou uma causa especial associada a essa observação particular, e, portanto, devem ser cuidadosamente examinados (KRABER; WHITCOMB; ANDERSON, 2005). Uma alternativa de tratamento de *outlier* é a proposta por Ferreira (2015), quem sugere substituir o valor anômalo pela média dos valores restantes na matriz de dados do planejamento, pois o novo valor não causaria alteração do modelo matemático por se tratar da média, e não se perderia esse grau de liberdade e região experimental, estratégia que foi adotada e conduziu à

redução no valor  $t = -6,382$ , contudo, o experimento continuou sendo reconhecido como *outlier* (Figura 7B) não fornecendo melhoras na significância do modelo.

Figura 7 — Gráfico de “*outlier T*” versus número do experimento para a concentração de carotenoides em fração de  $\beta$ -caroteno. (A) antes do tratamento do resíduo; (B) após o tratamento do resíduo



Considerando que a estratégia anterior não foi efetiva, procedeu-se com a análise de dados da Tabela 4 que mostraram experimentos semelhantes ao experimento 17 onde as variáveis temperatura e tempo são 40°C e 10,5 min respectivamente, com variações na potência do equipamento, como os experimentos N° 9, 10,11 (com 70% da potência), 16 (com 40%) e 17 (com 100%). As respostas desses experimentos apresentaram uma diminuição na média de 10,80  $\mu\text{g g}^{-1}$  com o aumento da potência, sendo o experimento 17 o que apresentou menor concentração na extração de carotenoides (115  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Este resultado sugere que nos 100% da potência a energia ocasionou o decréscimo na extração. Essa elevada potência se relaciona com uma alta amplitude vibracional, que produz um aumento na formação de bolhas de cavitação por unidade de área, fato que pode desfavorecer o crescimento e o colapso delas. Além disso, pode dificultar a propagação das ondas do ultrassom no meio, causando diminuição da energia liberada o que propicia uma diminuição na extração (SANTANA, 2013; SUN et al., 2011). Considerando que os carotenoides são susceptíveis ao ataque de espécies radicalares, outra possível causa é a exposição dos carotenoides a radicais livres, formados no processo de cavitação, devido ao aumento da energia no sistema (JÚNIOR; KRUG; KORN, 2006). Consequentemente, o experimento 17 foi excluído do planejamento - causando a perda dessa pequena região experimental- e os dados dos 16 experimentos restantes foram submetidos novamente à análise no software para construção do modelo matemático. Na Tabela 6, estão apresentados os resultados da distribuição de Fisher (teste F) e os valores de probabilidade ( $p < 0,05$ ) para a regressão e a falta de ajuste para os modelos avaliados.

Tabela 6 — Resumo da análise de variância ANOVA para as respostas dos 16 experimentos avaliados

| Modelo          | Regressão        |                  | Falta de ajuste  |                  |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                 | $F_{\text{cal}}$ | $p\text{-valor}$ | $F_{\text{cal}}$ | $p\text{-valor}$ |
| Linear          | 1,10             | 0,3864           | 11,40            | 0,0833           |
| Quadrático      | 10,83            | 0,0045           | 1,64             | 0,4120           |
| Cúbico          | 11,22            | 0,0847           | 0,89             | 0,4460           |
| Cúbico reduzido | 9,11             | 0,0124           | 1,90             | 0,3635           |

$F_{\text{calc}}$  = valor de F calculado pelo modelo matemático;  $p\text{-valor}$  =  $p < 0,05$

Os modelos que se mostraram como significativos foram os modelos quadrático e cúbico reduzido. No entanto, analisando os gráficos de valores preditos *versus* valores observados e os gráficos de resíduos *versus* valores preditos para os dois modelos, observou-se que para o modelo cúbico reduzido esses gráficos apresentaram um melhor ajuste do modelo com os dados experimentais (Figura 8A), e uma distribuição residual independente e aleatória (Figura 8B) respectivamente, do que os gráficos do modelo quadrático (Figura 9A e 9B), assim os gráficos do modelo cubico reduzido reafirmam o bom poder de previsão do mesmo, tornando-o apto para as previsões.

Figura 8 — Gráfico de valores observados  $x$  preditos (A) e Gráfico de resíduos (B) para o modelo cúbico reduzido para o planejamento composto central

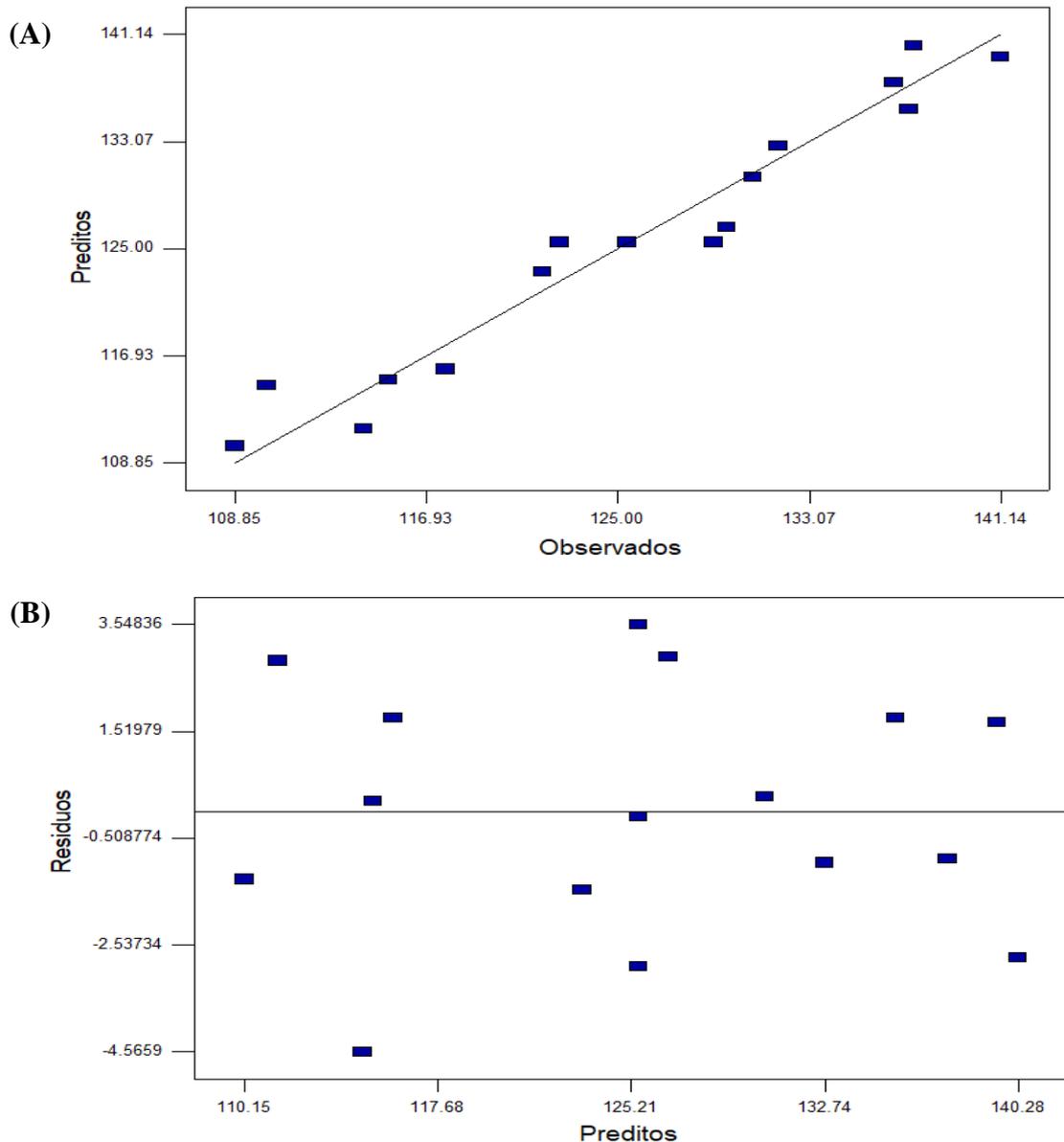
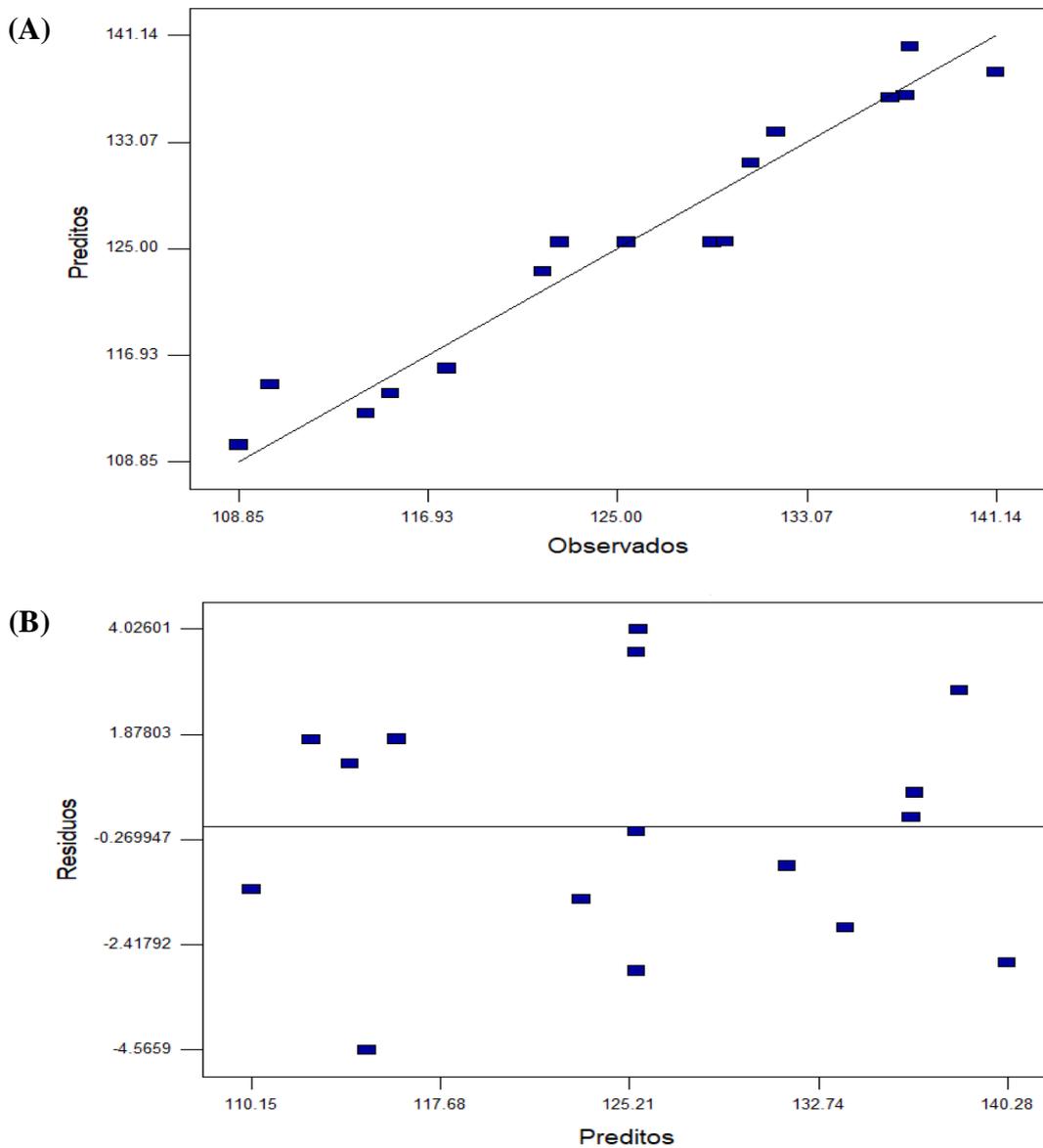


Figura 9 — Gráfico de valores observados  $x$  preditos (A) e Gráfico de resíduos (B) para o modelo quadrático para o planejamento composto central



A Tabela 7 mostra os resultados da ANOVA ( $p < 0,05$ ) para o modelo cúbico reduzido, observa-se que a variável tempo apresenta uma menor significância ( $p > 0,05$ ), assim como suas interações com “temperatura” e “potência”, as quais se vêm influenciadas como evidenciado nos  $p$ -valor correspondentes, no entanto, se fossem excluídas do modelo, poderia afetar negativamente o poder de previsão do mesmo, logo esses parâmetros não foram retirados.

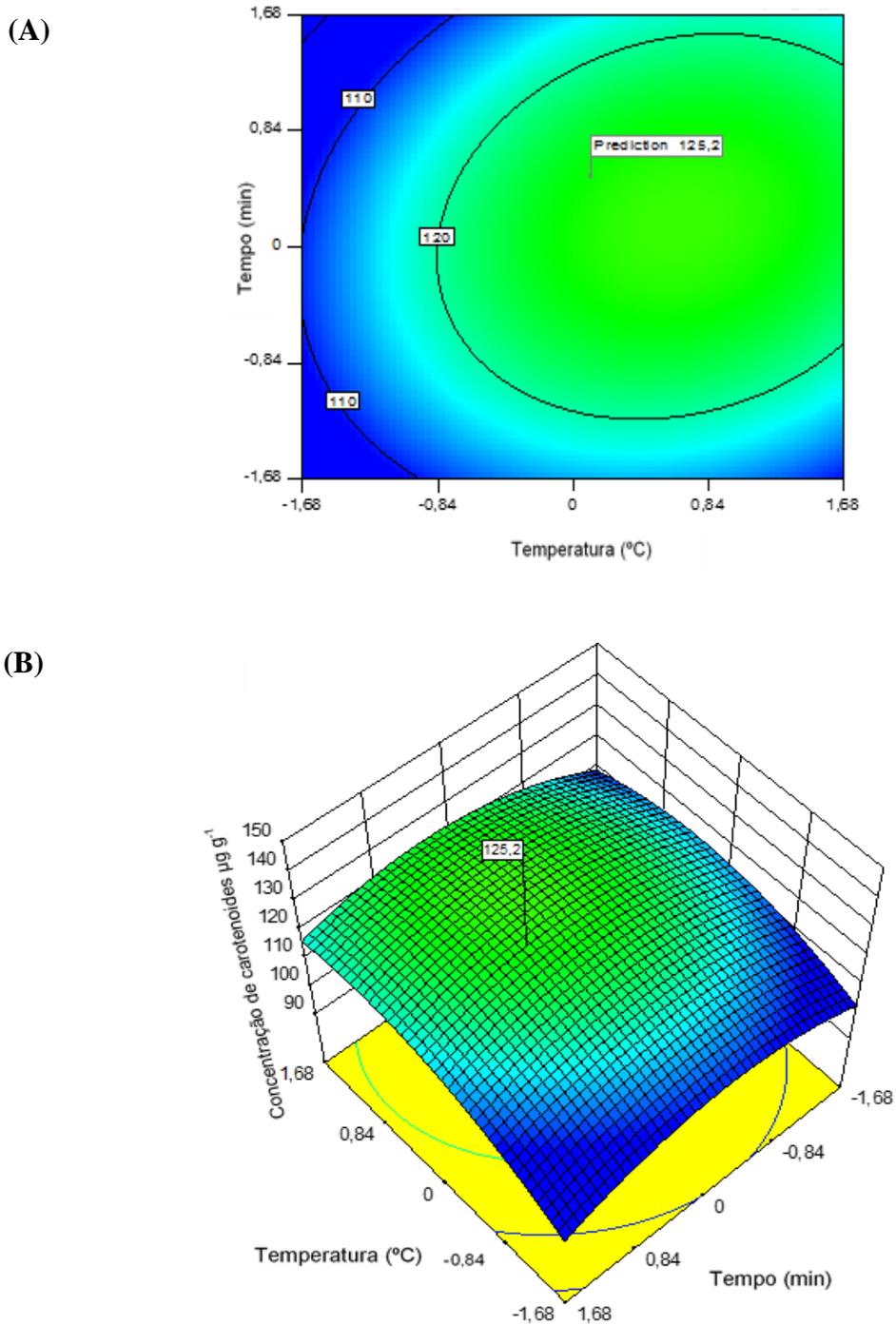
Tabela 7 — ANOVA para o modelo cúbico reduzido

|                        | <b>Soma Quadrática</b> | <b>GL</b> | <b>Quadrado médio</b> | <b>Valor F<sub>cal</sub></b> | <b>Prob &gt;F</b> |
|------------------------|------------------------|-----------|-----------------------|------------------------------|-------------------|
| Modelo                 | 1488,70                | 10        | 148,87                | 9,11                         | 0,0124            |
| A (Temperatura)        | 209,07                 | 1         | 209,07                | 12,80                        | 0,0159            |
| B (Tempo)              | 1,70                   | 1         | 1,70                  | 0,10                         | 0,7599            |
| C (Potência)           | 529,96                 | 1         | 529,96                | 32,45                        | 0,0023            |
| A <sup>2</sup>         | 103,78                 | 1         | 103,78                | 6,35                         | 0,0531            |
| B <sup>2</sup>         | 139,13                 | 1         | 139,13                | 8,52                         | 0,0331            |
| C <sup>2</sup>         | 703,50                 | 1         | 703,50                | 43,07                        | 0,0012            |
| AB                     | 9,69                   | 1         | 9,69                  | 0,59                         | 0,4760            |
| AC                     | 110,03                 | 1         | 110,03                | 6,74                         | 0,0485            |
| BC                     | 18,44                  | 1         | 18,44                 | 1,13                         | 0,3366            |
| ABC                    | 9,41                   | 1         | 9,41                  | 0,58                         | 0,4821            |
| <i>Resíduo</i>         | 81,67                  | 5         | 16,33                 |                              |                   |
| <i>Falta de ajuste</i> | 60,43                  | 3         | 20,14                 | 1,90                         | 0,3635            |
| <i>Erro puro</i>       | 21,24                  | 2         | 10,62                 |                              |                   |
| Total                  | 1570,37                | 15        |                       |                              |                   |

GL= graus de liberdade; F<sub>cal</sub>= valor de F calculado pelo modelo matemático.

Deste modo, o modelo cúbico reduzido foi definido como mais adequado para previsão do ponto ótimo e foi utilizado para a construção do gráfico de contorno e superfície de resposta a fim de visualizar melhor os resultados. A partir da análise da superfície de resposta (Figura 10) é possível verificar que uma maior eficiência de extração ocorre em temperaturas e tempo próximo aos valores do ponto central correspondentes. Assim, o ponto ótimo previsto pelo modelo matemático é: Tempo de extração de 13,4 min, temperatura de 40°C e 70% da potência total do banho ultrassônico, prevendo uma extração de 125,20  $\mu\text{g g}^{-1}$  de carotenoides em fração de  $\beta$ -caroteno. Com o propósito de avaliar essa condição teórica na prática, realizou-se em triplicata a extração de carotenoides da mesma amostra, obtendo uma concentração de carotenoides de  $133,22 \pm 5,01 \mu\text{g g}^{-1}$ , estes valores foram associados ao valor de “t” de 4,303, gerando um intervalo de confiança variando de aproximadamente 112 à 154  $\mu\text{g g}^{-1}$ , intervalo esse que engloba o valor predito.

Figura 10 — Gráfico de contorno (A) e gráfico de superfície de resposta (B) para o modelo cúbico reduzido para o delineamento composto central rotacional



Determinadas as melhores condições de operação do banho ultrassônico, foi otimizada a razão massa/volume de solvente extrator. Foram testadas extrações com a seguinte proporção: 0,008, 0,012, 0,016, 0,020 e 0,024 g mL<sup>-1</sup> e submetidas a análise no Teste Tukey ao nível de probabilidade de 5%. Os resultados mostraram que, as três primeiras relações

apresentaram maior rendimento e não diferiram estatisticamente entre elas, enquanto que as relações 0,020 e 0,024 g mL<sup>-1</sup> apresentam menor rendimento, mostrando um efeito de saturação de solvente extrator maior. Sendo assim, mesmo que as extrações testadas entre 0,008 e 0,016 g mL<sup>-1</sup> não indicaram diferenças significativas, extrações acima de 0,008 g mL<sup>-1</sup> apresentaram diminuição no rendimento, não obstante, foi determinado que a razão massa/solvente extrator ideal de trabalho foi a de 0,016 g mL<sup>-1</sup>, pensando em uma extração com uma quantidade suficiente para apresentar um sinal analítico sem dificuldade de detecção.

### 5.1.1 Validação

Com relação ao método de extração, foram conferidos os parâmetros de repetibilidade (10 extrações em um dia) e precisão intermediária (10 extrações durante 3 dias consecutivos), analisados através do desvio padrão relativo (RSD). Sua estimativa teve porcentagens de 6,76% e 9,92%, respectivamente. Estes valores foram relacionados com a equação de Horwitz (Equação 4), assim, o parâmetro HorRat (Equação 5), apresentou valores de 0,90% para repetibilidade e 1,33% para precisão intermediária. Portanto, pode-se considerar os achados como aceitáveis por estar na faixa indicada (0,5-2,0).

## 5.2 Determinação de carotenoides totais por espectrometria UV-Vis

### 5.2.1 Avaliação dos métodos de secagem

A determinação de carotenoides totais foi aplicada em 27 amostras de sementes de guaraná submetidas aos métodos de secagem pelos próprios produtores de guaraná de municípios da Região do Baixo Sul da Bahia. Na Tabela 8 é possível observar que os valores da média das concentrações de carotenoides para cada município apresentaram variações discretas. Estes resultados já eram esperados, considerando-se que os municípios de amostragem são todos vizinhos e, em consequência, apresentam características edafoclimáticas semelhantes.

Analisando os resultados em relação aos métodos de secagem para cada município, foram encontradas variações importantes na concentração de carotenoides em amostras secas em aguidá rotativo (amostras C-01, C-02 e C-03) produzidas no município de Camamu. Por outra parte, variações discretas foram encontradas para as NP-01 e NP-02 produzidas em Nilo

Peçanha e as amostras V-01, V-02 e V-03 produzidas em Valença, amostras secas também em aguidá rotativo. Porém, ao comparar as amostras de todos os municípios secas por esse método, pode-se evidenciar que há maiores diferenças, apresentando concentrações de carotenoides que variam desde  $44,703 \pm 5,07 \mu\text{g g}^{-1}$  (amostra NP-01) até  $198,65 \pm 13,29 \mu\text{g g}^{-1}$  (amostra V-03). Variações discretas na concentração de carotenoides foram encontradas para amostras secas ao sol e secas em estufa natural tanto produzidas no mesmo município quanto produzidas em municípios diferentes. Essas variações podem estar associadas à falta de padronização dos processos de secagem entre os diferentes produtores.

Para avaliar possíveis diferenças entre os métodos de secagem utilizados pelos produtores de guaraná na Bahia, os resultados experimentais foram submetidos a ANOVA e Teste Tukey ao nível de probabilidade de 5%. Na Tabela 8, apresentam-se os valores da média das concentrações de carotenoides para cada método de secagem. Pode-se descrever que as amostras submetidas a secagem ao sol apresentaram maior conteúdo de carotenoides totais ( $166,39 \pm 25,52 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Formulou-se a hipótese de que a luz solar, particularmente a radiação UV, poderia ter um efeito na degradação de carotenoides nas sementes de guaraná maior em comparação com a secagem em estufa natural e a secagem em aguidá. No entanto, os resultados obtidos neste estudo mostram que apesar da exposição direta ao sol as sementes secas por este método não apresentaram efeito negativo na concentração de carotenoides totais. Esses resultados podem ser atribuídos a danos causados pela radiação UV unicamente sobre a superfície das sementes e que não conseguiram penetrar o seu tecido interno, conservando assim a estrutura dos carotenoides contidos na parte interna das sementes.

Em relação à secagem em estufa natural e em aguidá rotativo, pode-se observar que as médias dos valores de concentração de carotenoides não apresentaram diferenças significativas entre si, porém, se comparados esses resultados com o resultado obtido na secagem ao sol, evidencia-se que as concentrações de carotenoides são menores. Esses valores são possivelmente decorrentes da falta de controle na temperatura em relação com o tempo de exposição as quais foram submetidas as sementes de guaraná para sua secagem, pois segundo informações dos produtores a secagem em estufa natural tem uma duração de 4-5 dias, e a secagem em aguidá rotativo é feita durante 3-4 horas, processos desenvolvidos em temperaturas maiores que a temperatura ambiente, e sem controle. A interação de altas temperaturas e grandes tempos de exposição a secagem comprometem os tecidos da matriz

gerando sua desintegração e por tanto diminuição na retenção dos carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Tabela 8 — Concentração de carotenoides totais em amostras de sementes de guaraná submetidas aos métodos de secagem em aguidá, estufa natural e ao sol

| Amostra  | Concentração de carotenoides* ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |                                 |                                 | Média ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) por município |
|--|--|---------------------------------|---------------------------------|--|
|  | Aguidá   | Estufa natural                  | Sol                             |  |
| C-01   | 177,78 $\pm$ 5,11                                      | -                               | -                               |  |
| C-02   | 103,68 $\pm$ 2,75                                      | -                               | -                               |  |
| C-03   | 51,791 $\pm$ 5,82                                      | -                               | -                               |  |
| C-04   | -  | 100,44 $\pm$ 4,74               | -                               | 132,96 $\pm$ 46,16**                         |
| C-05   | -  | -                               | 162,94 $\pm$ 20,88              |  |
| C-06   | -  | -                               | 169,56 $\pm$ 10,68              |  |
| C-07   | -  | -                               | 164,51 $\pm$ 7,19               |  |
| NP-01  | 44,703 $\pm$ 5,07                                      | -                               | -                               |  |
| NP-02  | 96,297 $\pm$ 6,96                                      | -                               | -                               |  |
| NP-03  | -  | -                               | 128,88 $\pm$ 13,52              | 113,93 $\pm$ 41,84***                        |
| NP-04  | -  | -                               | 152,02 $\pm$ 8,10               |  |
| NP-05  | -  | -                               | 147,77 $\pm$ 6,93               |  |
| T-01   | -  | 121,20 $\pm$ 11,22              | -                               |  |
| T-02   | -  | 191,07 $\pm$ 15,73              | -                               |  |
| T-03   | -  | 128,48 $\pm$ 8,75               | -                               |  |
| T-04   | -  | 122,61 $\pm$ 8,90               | -                               |  |
| T-05   | -  | 130,36 $\pm$ 10,88              | -                               | 145,86 $\pm$ 49,49****                       |
| T-06   | 47,121 $\pm$ 0,34                                      | -                               | -                               |  |
| T-07   | -  | -                               | 213,11 $\pm$ 21,52              |  |
| T-08   | -  | -                               | 180,29 $\pm$ 14,85              |  |
| T-09   | -  | -                               | 178,45 $\pm$ 10,99              |  |
| V-01   | 173,09 $\pm$ 8,47                                      | -                               | -                               |  |
| V-02   | 107,21 $\pm$ 5,92                                      | -                               | -                               |  |
| V-03   | 198,65 $\pm$ 13,29                                     | -                               | -                               | 146,76 $\pm$ 32,96*****                      |
| V-04   | -  | 123,36 $\pm$ 4,21               | -                               |  |
| V-05   | -  | 151,95 $\pm$ 4,45               | -                               |  |
| V-06   | -  | 126,32 $\pm$ 1,69               | -                               |  |
| <b>Média***<br/>(<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) por<br/>método</b> | 111,14 $\pm$ 57,39 <sup>b</sup>                        | 132,87 $\pm$ 25,59 <sup>b</sup> | 166,39 $\pm$ 25,52 <sup>a</sup> |  |

C=Camamu/BA; NP=Nilo Peçanha/BA; T=Taperoá/BA; V=Valença/BA; Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão sendo \*(n=3); \*\*(n=21); \*\*\* (n=15); \*\*\*\* (n=27); \*\*\*\*\* (n=18); Letras iguais, na mesma linha, indicam que não há diferença significativa entre si, ao nível de 5% de probabilidade no teste Tukey.

Em um estudo feito por Bechoff e colaboradores (2009) que avaliou o efeito da secagem (direta ao sol e coberta) e armazenamento na retenção total de carotenoides (estimativa da retenção de provitamina A) em batata doce de cor laranja cultivada em Uganda, os resultados mostraram que a retenção de carotenoides totais nessa classe de batata não depende do tipo de secagem, pois amostras secas ao sol apresentaram menor perda de carotenoides (média de 8,7%) que amostras secas ao sol em secadores solares cobertos com plásticos resistentes e não resistentes à radiação ultravioleta (9,01%). Embora a diferença na perda de carotenoides totais na secagem por estes diferentes métodos não seja significativa, perdas de cerca de 70% foram registradas nos resultados da avaliação do tempo de armazenamento a temperatura ambiente. Em relação com o tipo de secagem, a tendência dos resultados desse estudo é similar com os resultados encontrados no presente trabalho.

Rahman et al. (1995) avaliaram a retenção de  $\beta$ -caroteno em folhas de juta e espinafre vermelho as quais foram submetidas a secagem em forno e secagem ao sol. A melhor retenção obtida foi de 98% e 96% para folhas de juta e espinafre vermelho, respectivamente, secas em forno durante 12 horas. Os autores ressaltam que embora a porcentagem de retenção tenha sido alta esse método não é acessível para as comunidades rurais da zona de estudo. A maior redução de  $\beta$ -caroteno foi a observada nos vegetais secos ao sol durante 2 dias em recipientes descobertos, com retenção de 64% para folhas de juta e 66% para folhas de espinafre vermelho. Entretanto, folhas secas ao sol em recipiente coberto também durante 2 dias retiveram  $\beta$ -caroteno em 82% e 84% respectivamente. Este estudo mostra que processos de secagem em altas temperaturas e menores tempos contribuem na maior retenção de carotenoides totais do que processos mais longos e com exposição à radiação solar direta. Além disso, que a secagem de matrizes vegetais protegidas da luz é uma boa alternativa de secagem de alimentos quando não estão disponíveis equipamentos especializados que permitam otimizar esse processo e obter produtos de boa qualidade nutricional.

### 5.2.2 Avaliação influência da temperatura de secagem

Como exposto anteriormente, o conteúdo de carotenoides em matrizes vegetais depende do tempo e temperatura de processamento. A Tabela 9, mostra os valores médios de concentração de carotenoides extraídos para cada amostra submetidas ao processo de secagem por liofilização e secagem em estufa de circulação e renovação de ar, nos tempos correspondentes.

Com os resultados da Tabela 9, pode-se evidenciar que as amostras que apresentaram diferença significativa em relação com as demais foram as amostras ES1 e ES10. A amostra ES1, obtida por liofilização durante 96 horas, apresentou o menor conteúdo de carotenoides,  $29,133 \pm 2,65 \mu\text{g g}^{-1}$ , valor que é considerado baixo tendo em conta que a liofilização é um processo de desidratação caracterizado por manter a boa qualidade nutricional e sensorial do alimento. Apesar disso, a liofilização promove a degradação dos carotenoides no processo, pois a estrutura celular e os complexos contidos nos alimentos podem se romper, esse fator junto com o aumento da porosidade da matriz, gerado pela liofilização, facilita a exposição dos carotenoides ao oxigênio ao longo do tempo o que propicia sua destruição (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993; ALVES et al., 2008).

Tabela 9 — Valores médios de concentração de carotenoides totais para cada amostra

| Amostra | Temperatura (°C) | Tempo (h) | Concentração de carotenoides $\pm$ dp ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Grupo |
|---------|------------------|-----------|--|-------|
| ES1     | Liofilizado      | 96        | $29,133 \pm 2,65^e$  | 1     |
| ES2     | 40               | 120       | $153,98 \pm 13,8^d$  |       |
| ES3     | 50               | 25        | $144,60 \pm 9,03^d$  |       |
| ES4     | 60               | 22        | $149,72 \pm 8,01^d$  | 2     |
| ES5     | 80               | 20        | $145,14 \pm 10,8^d$  |       |
| ES6     | 100              | 20        | $143,87 \pm 8,51^d$  |       |
| ES7     | 120              | 8         | $174,80 \pm 4,63^c$  |       |
| ES8     | 140              | 7         | $201,09 \pm 2,68^b$  |       |
| ES9     | 160              | 4         | $204,89 \pm 1,21^b$  | 3     |
| ES10    | 180              | 3         | $254,77 \pm 4,85^a$  |       |
| ES11    | 200              | 3         | $219,18 \pm 6,83^b$  |       |

EF = experimento de secagem; dp= desvio padrão (n=3); Letras iguais, na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa entre as amostras, ao nível de 5% de probabilidade no teste Tukey.

Estudos realizados por Shofian e colaboradores (2006) sobre a influência da liofilização em compostos antioxidantes de amostras de frutas tropicais, mostraram que houve uma perda no conteúdo de  $\beta$ -caroteno de 26 e 43% após a liofilização de manga e melancia, respectivamente. Amostras de carambola e mamão também apresentaram perda no conteúdo de  $\beta$ -caroteno após a liofilização. No entanto, a diferença em relação às amostras frescas não foi considerada como estatisticamente significativa. Os autores atribuem esses resultados a

possível degradação do  $\beta$ -caroteno presente nas membranas lipídicas ou nos vacúolos plasmáticos das matrizes.

O conteúdo de carotenoides totais em amostras de pimenta rocoto “*in natura*” e liofilizadas com e sem semente, foram avaliadas por Caballero et al. (2017). Os resultados mostraram que as amostras liofilizadas apresentaram uma perda no conteúdo de carotenoides se comparadas com as amostras “*in natura*” com e sem semente. Os autores explicam que esses resultados podem ser decorrentes da degradação enzimática dos carotenoides que estão contidos nos vacúolos plasmáticos.

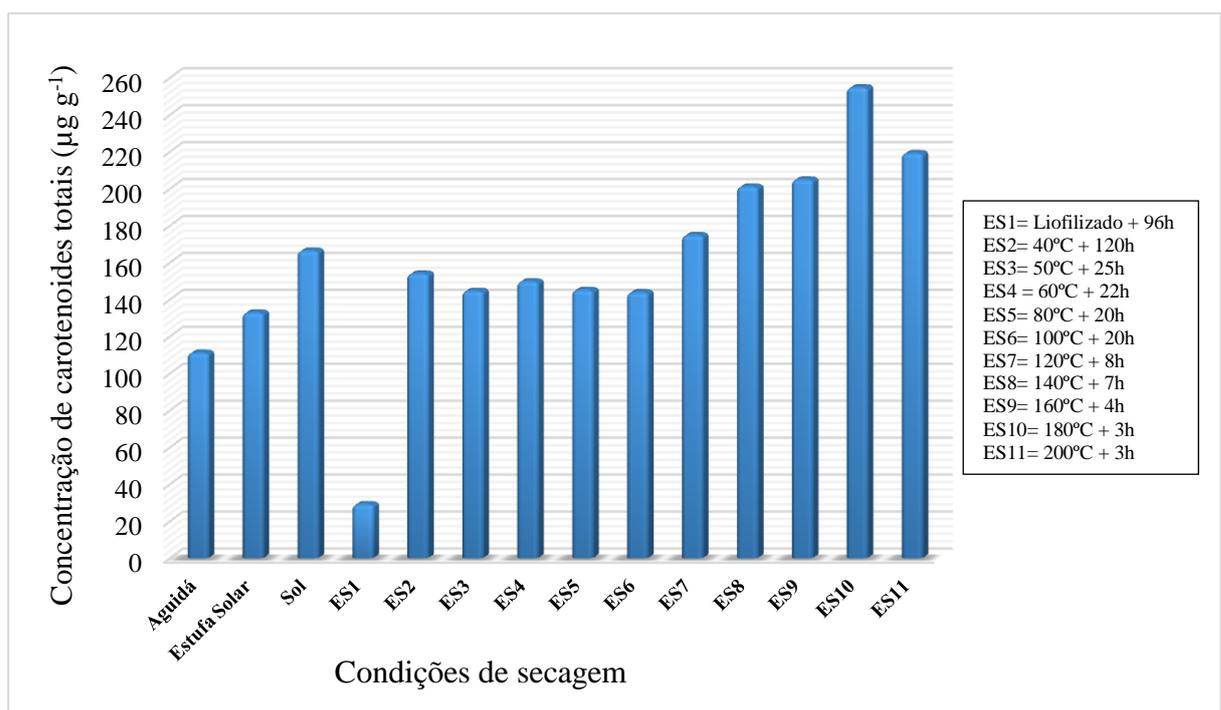
Em contrapartida, a amostra ES10 seca em estufa durante 3 horas a 180°C, apresentou a maior concentração de carotenoides  $254,77 \pm 4,85 \mu\text{g g}^{-1}$ . Pode-se evidenciar uma perda de 13,97% no conteúdo de carotenoides se comparada com a amostra ES11 seca durante o mesmo tempo, porém a 200°C. Por outra parte, grupos de amostras que não apresentaram diferenças significativas entre si como as amostras, ES8, ES9 e ES11 onde o processo de secagem foi feito em temperaturas  $\geq 140^\circ\text{C}$  em um período de tempo de 3 – 7 horas, comparadas as amostras do grupo 2 secas em temperaturas de 40 - 100°C, respectivamente, em tempos entre 20 e 120 horas, mostram que tempos menores de exposição a altas temperaturas de secagem favorecem, em média, a retenção de carotenoides na matriz, em 29,23% no caso do presente estudo. Em relação à amostra ES7, pode-se concluir que embora apresente diferenças estatisticamente significativas com as demais amostras em função do conteúdo de carotenoides ( $174,80 \pm 4,63 \mu\text{g g}^{-1}$ ), este experimento indica o início do aumento da concentração dos carotenoides em função do incremento de temperatura e redução de tempo de secagem. Esses resultados respondem à sugestão feita por Rodriguez-Amaya e colaboradores (2008) quem propõem como alternativa, processamentos rápidos a altas temperaturas para evitar a degradação dos tecidos da matriz e aumentar a retenção dos compostos.

Pérez-Gálvez e Fernández-Garrido (1997) avaliaram a termodegradação de carotenoides no pimentão durante a secagem em estufa e ausência de luz em temperaturas de 30 até 100 °C em um período de 7 dias, mostrando como resultado que em temperaturas de secagem  $\leq 60^\circ\text{C}$  não se apresentam diferenças significativas em função da concentração de carotenoides totais, no entanto, com o aumento da temperatura a partir de 70 °C se aprecia a perda de estabilidade dos carotenoides, evidenciada na diminuição no conteúdo de carotenoides totais. Considerando a relação entre o tempo e temperatura de secagem os

resultados confirmaram que quanto maior tempo de exposição à secagem a altas temperaturas, menor estabilidade dos carotenoides, o que se relaciona com os resultados encontrados na presente pesquisa.

Finalmente, na Figura 10 são apresentados os resultados obtidos tanto nos métodos de secagem utilizados pelos produtores de guaraná, quanto os obtidos na liofilização e secagem com estufa de circulação e renovação de ar. Observa-se que, de forma geral, os experimentos feitos no laboratório - em que a temperatura, o tempo e a exposição à luz foram controlados - as amostras apresentaram maior concentração de carotenoides totais. No que se refere, à média das concentrações desses compostos obtidos em amostras secas em agudá, estufa natural e ao sol, mostram-se mais relacionadas com os resultados obtidos para as amostras do grupo 2 onde os tempos de exposição foram longos (120 – 20 h) e as temperaturas ligeiramente altas (40– 100°C). Além disso, mostram-se significativamente menores em relação às amostras do grupo 3, as quais, como foi mencionado anteriormente, foram submetidas a secagem a temperaturas mais altas (120 – 200°C) e tempos menores (8 – 3 h). Assim, considerando os resultados obtidos no presente estudo, sugere-se a aplicação das condições do experimento ES10 (temperatura de 180°C, tempo 3 horas e proteção da luz) como padrão de secagem de sementes de guaraná, a fim de obter um produto rico em conteúdo de carotenoides.

Figura 11 — Gráfico de concentração de carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) vs. condições de secagem





## 6 CONCLUSÕES

A técnica de extração assistida por ultrassom mostrou-se adequada para a extração de carotenoides em amostras de guaraná, uma vez que permite ter controle das variáveis, tempo, temperatura e potência, as quais influenciam significativamente a eficiência de extração dos carotenoides da matriz.

A utilização do delineamento composto central permitiu estabelecer a combinação ideal entre as variáveis, que permitisse extrair uma concentração de carotenoides totais significativa,  $133,22 \pm 5,01 \mu\text{g g}^{-1}$ , empregando apenas 13,4 min, 40°C e o 70% da potência do banho ultrassônico, condições que podem limitar a degradação dos carotenoides no processo de extração. Assim como a temperatura, o excesso de potência se mostrou prejudicial para a extração dos carotenoides.

A determinação de carotenoides totais por espectrofotometria UV-Vis possibilitou o estudo da variação do conteúdo de carotenoides em amostras de guaraná, secas pelos três diferentes métodos usados pelos produtores de guaraná do Baixo Sul da Bahia. Concluiu-se que houve diferenças significativas entre as amostras secas ao sol e as amostras secas em estufa natural e em aguidá. Os menores valores de concentração de carotenoides totais foram obtidos para esses dois últimos métodos.

A partir do experimento de avaliação da temperatura de secagem foi possível identificar que altas temperaturas de secagem em tempos curtos de exposição, representam condições ótimas de processamento em termos de manutenção de carotenoides em amostras de guaraná.

A pesar de ser bastante reconhecido e consumido por seu alto conteúdo de flavonoides e metilxantinas, foi demonstrado que o guaraná é uma boa fonte de carotenoides, compostos essenciais para o organismo humano pois podem apresentar alta atividade provitamínica A, atividade antioxidante, imunomoduladora e anticancerígena. Este trabalho apresenta, pela primeira vez na literatura, dados sobre a presença de carotenoides em amostras de sementes de guaraná.

Os resultados apresentados na presente dissertação, fornecem dados importantes sobre a qualidade nutricional do guaraná da região do Baixo Sul da Bahia, os quais contribuem no processo de obtenção dos certificados da Indicação de Procedência (IP) e Denominação de

Origem (DO) que permitam alcançar a consolidação do “Guaraná da Mata Atlântica” e dessa maneira aumentar o valor comercial do produto da região.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Identificação e determinação do teor de carotenoides individuais das amostras de guaraná produzidas na região do Baixo Sul do estado da Bahia
  
- Estudo da maturação do fruto em termos da presença de carotenoides.
  
- Avaliação da composição e capacidade antioxidante das frações de casca, semente e arilo de amostras de guaraná produzidas na região do Baixo Sul do estado da Bahia.
  
- Avaliação do conteúdo de carotenoides em bebidas preparadas a base de guaraná.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. D. A. C. E S.; DE FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233–243, 2006.

ALVES, C.C.O.; RESENDE, J.V.; CRUVINEL, R.S.R.; PRADO, M.E.T. Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de óleos obtidos da polpa de pêssego (*Caryocarpus brasiliense* Camb) liofilizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 830-839, 2008.

ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.

BECHOFF, A.; WESTBY, A.; OWORI, C.; MENYA, G.; DHUIQUE-MAYER, C.; DUFOUR, D.; TOMLINS, K. (2009). Effect of drying and storage on the degradation of total carotenoids in orange-fleshed sweetpotato cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v, 90, p.622-629, 2010.

BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; BRUMO, L. M.; AZEREDO, H. M. C. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) na otimização de processos biológicos: A determinação dos valores de pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática. Embrapa Agroindústria Tropical, 2003.

CABALLERO, G. B. L.; MÁRQUEZ, C. C. J.; ROJANO, B. A. Efecto de la liofilización sobre las propiedades funcionales del ají rocoto (*Capsicum pubescens*). **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**. v. 20, n. 1, p. 111-119, 2017.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 240–248, 2003.

CEBALLOS-ORTIZ, E. M.; JIMENEZ-MUNGUÍA, M. T. Cambios en las propiedades de frutas y verduras durante la deshidratación con aire caliente y su susceptibilidad al deterioro microbiano. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, v. 6, n. 1, p. 98-110, 2012.

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Guaraná. Conjuntura mensal. Novembro (2016).

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Guaraná. Conjuntura mensal. Janeiro (2017).

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Proposta de preços mínimos: safra 2016/2017. Brasília, v. 2, n. 2, abr. 2017.

DALONSO, N. **Polissacarídeos das sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth): análises estruturais, reológicas e atividade antioxidante.** 2010. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

DEY, S.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 271–276, 2013.

DE OLIVEIRA, J. S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.).** xxii. 192 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2005.

Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA. Câmara Setorial do Guaraná da Bahia. Taperoá/BA, 2013.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às Técnicas de Planejamento de Experimentos.** Salvador: Vento Leste, 2015. 190 p.

GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos.** 2002. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Universidade de São Paulo. São Carlos, SP, 2002.

GONÇALVES, J. R. C. **A cultura do guaraná.** v 2. n 1. Belém: Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuarias do Norte, IPEAN, 1971, 24p. (Série: Culturas da Amazônia).

HORST, M. A.; MORENO, F. S. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: carotenoides. **International Life Sciences Institute (ILSI)**, Brasil, v. 6, p. 36, 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sistema de Recuperação Automática – SIDRA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/>> Acesso em 09 de setembro de 2017.

JÚNIOR, D. S.; KRUG, F. J.; KORN, M. **Extrações assistidas por ultrassom.** Workshop sobre preparo de amostras. Santa Maria: UFSM, p. 2086, 2006.

JURADO, J. M. **Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos.** Departamento de Química Analítica. Universidad de Sevilla, 2008.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; GODOY, H. T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. **Food Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 187–195, 1990.

KIMURA, M.; KOBORI, C. N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1734–1746, 2007.

KRABER, S.; WHITCOMB, P.; ANDERSON, M. **Handbook for Experimenters**. Version 6.8. Stat-Ease, Inc. Minneapolis: 2005. 90p.

KURI, C. M. B. The guaraná industry in Brazil. **International Business & Economics Research Journal**, v. 7, n. 5, p. 87-98, 2008.

KUSKOSKI, E. M.; ROSEANE, F.; GARCIA, A. A.; TRONCOSO, G. A. M. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, Medellín, Colombia, v. 12, n. 2, p. 45-52, 2005.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1-2, p. 161-172, 2009.

MALDONADE, I. R. **Produção de carotenoides por leveduras**. 2003. xxii. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências de alimentos). Universidad Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, p. 149-154, 2004.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1145-1150, 2007.

MORAES, M. L. L.; MICKEY, G. A.; FUJIYA, N. M.; TAVARES, M. F. M. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar. **Revista Analytica**, n. 5, p. 44-50, 2003.

Museu da Pessoa. **Saberes e fazeres: o guaraná de Maués**. 1 ed. São Paulo. 2007. 95 p. (Memoria dos Brasileiros).

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VELASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de métodos analíticos usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo Optimization. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017. No prelo.

OLIVEIRA, J. A. C.; OLIVEIRA, M. O. R.; LANDGRAF, M. D. Avaliação de solventes de extração assistida por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiencia para la determinação de hidrocarbonetos polícíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2026-2033, 2009.

OLMEDILLA-ALONSO, B.; GRANADO-LORENCIO, F.; BLANCO, I. N. **Carotenoides y**

**salud humana**. ed. Madrid: Fundación Española de la Nutrición, 2001. 64 p. (Serie de publicaciones, Nº 11).

OMENN, G. S. Chemoprevention of lung cancer: the rise and demise of Beta-carotene. **Annual Review of Public Health**, v. 19, n. 92, p. 73–99, 1998.

PASCHOAL, R.; J. A., RATH, S.; DA SILVA, P. F.; REYES, R. F. G. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PLACIDINA, L. L. **Estudo do ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. 1998. ix. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; FERNÁNDEZ-GARRIDO, J. Termodegradación de carotenoides en el pimentón. **Grasas y Aceites**, v. 48, n. 5, p. 290-296, 1997.

RAHMAN, M. M.; Wahed, M. A.; Mahalanabis, D.; Sack, R. B. 1995. **Preparing and preserving green leafy vegetables for poor communities in Bangladesh**. In Empowering Vitamin A Foods. Eds. E. Wasantwisut and G. A. Attig. Bangkok: Institute of Nutrition, 61-68.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis**. Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2004. 58 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide of carotenoid analysis in foods**. 2 ed. Washington D.C.: International Life Sciences Institute (ILSI) Press, 2011. 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de carotenóides**: Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília: Ministerio do Meio Ambiente, 2008. 100 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoides y preparación de alimentos: La retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados**. Washington DC: Usaid-Omni, impresión en español, 1999. 99 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Stability of carotenoids during the storage of foods**. Em: CHARALAMBOUS, F. (Ed.). Shelf life studies of foods and berages: chemical, biological, physical and nutritional aspects. Amsterdam: Elsevier Science, 1993.

SANTANA, T. S. **Extração de carotenoides totais e  $\beta$ -caroteno por ultrassom no resíduo de indústria de polpa de goiaba (*Psidium guajava* L.)**. 2013. 85 p Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóval, SE, 2013.

SANTOS, E. S.; OLIVEIRA, J.; MACHADO, A. V.; COSTA, R. O. **Secagem de Grãos e**

**Frutas:** Revisão Bibliográfica. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 5, n. 1, p. 19–23, 2015.

SANTOS, H. M. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de macro e microelementos em amostras de guaraná (*Paullinia cupana*) produzidas na Região do Sul da Bahia**. 2017. 97 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2017.

SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONÇALVES, J. F. C.; MAZZAFERA, P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14–31, 2013.

SHOFIAN, N. M.; HAMID, A. A.; OSMAN, A.; SAARI, N.; ANWAR, F.; DEK, M. S. P.; HAIRUDDIN, M. R. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. **International Journal of Molecular Sciences**. n. 12, p. 4678-4692, 2011.

Secretaria de Agricultura da Bahia- SEAGRI/BA. SEAGRI mostra trabalho da EBDA com produtores de guaraná na FENAGRO. 2011. Disponível em: <<http://www.bahiaja.com.br/economia/noticia/2011/11/30/seagri-mostra-trabalho-da-ebda-com-produtores-de-guarana-na-fenagro,42974,0.html>> Acesso em 09 de setembro de 2017.

Superintendência da Zona Franca de Manaus- SUFRAMA; Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior- MDICE. **Guaraná**. ed. Manaus: Instituto Superior de Administração e Economia (ISAE) - Fundação Getúlio Vargas (FGV), 2003. 28 p.

SUN, Y.; LIU, D.; CHEN, J.; YE, X.; YU, D. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-*trans*- $\beta$ -carotene from citrus peels. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 243–249, 2011.

TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; DOS SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; DA SILVA, E. G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L.C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, p. 58–67, 2009.

TAVARES, A. M.; PEREIRA, J. C. R. Cultura do guaranazeiro no Amazonas. 4 ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005, p. 40. (Sistemas de Produção 2).

USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; DE MELLO, J. C. P. Chemical and Microbiological Study of Extract from Seeds of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 5–9, 2007.