

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS – DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Rhayssa Yuki Ishii Godoi

**Abordagem verde para obtenção de extratos de sementes de guaraná com potencial
antiproliferativo e antitumoral utilizando solventes eutéticos naturais profundos
(NADES)**

**Bauru
2024**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS – DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rhayssa Yuki Ishii Godoi

Abordagem verde para obtenção de extratos de sementes de guaraná com potencial antiproliferativo e antitumoral utilizando solventes eutéticos naturais profundos (NADES)

Trabalho de conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Ciência Biológicas; área de concentração Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Bauru
2024

G588a	<p>Godoi, Rhayssa Yuki Ishii</p> <p>Abordagem Verde para Obtenção de Extratos de Sementes de Guaraná com Potencial Antiproliferativo e Antitumoral Utilizando Solventes Eutéticos Naturais (Nades) / Rhayssa Yuki Ishii Godoi. -- , 2024</p> <p>46 p.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Orientador: Daniel Rinaldo</p> <p>1. Química Verde. 2. Plantas medicinais. 3. Farmacognosia. 4. NADES. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Rhayssa Yuki Ishii Godoi

Abordagem Verde para Obtenção de Extratos de Sementes de Guaraná com Potencial Antiproliferativo e Antitumoral Utilizando Solventes Eutéticos Naturais (Nades)

Trabalho de conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Ciência Biológicas; área de concentração Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Bauru, 12 de dezembro de 2023.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Rinaldo – UNESP Bauru

Profa. Dra. Veridiana de Lara Weiser Bramante – UNESP Bauru

Dr. Marina Alves Gavassi – UNESP Bauru

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UNESP e a FAPESP pela minha bolsa de iniciação científica (proc. 2022/09559-0) e ao INCT BioNat (CNPQ proc. 465637/2014-0, FAPESP proc. 2014/50926-0), que me proporcionaram a oportunidade de desenvolver a iniciação científica que resultou no presente trabalho.

Agradeço também ao meu orientador Dr. Daniel Rinaldo e a oportunidade de participar do GREENSEP e por toda confiança depositada na minha capacidade de desenvolver a pesquisa, pelos ensinamentos, pela paciência e grande prontidão. Não posso deixar de agradecer também aos meus colegas de laboratório, que também sempre estiveram dispostos a auxiliar, apoiar e enfrentar os desafios encontrados juntos.

Sou grata também ao Prof. Dr. Sérgio Stampar e a Prof^a Dra. Karina Alves de Toledo, que viram o potencial do projeto e não mediram esforços para ajudar na realização do mesmo.

Gostaria de agradecer aos meus pais, que muitas vezes mesmo sem entender como a graduação e a pesquisa funciona não só me permitiram estar aqui, mas me apoiaram e fizeram parte da construção da pessoa que eu sou hoje.

Não posso deixar de agradecer também ao Leonel, que mesmo estando na minha vida a pouco tempo, contribuiu não só para a realização desse trabalho, mas também demonstrou o seu infinito apoio em todas as minhas empreitadas.

Por fim, mas não menos importante, não poderia deixar de agradecer à família que a faculdade me trouxe: Júlia M, Júlia C, Helena, Larissa Samuel; e que carregarei no peito com imensa gratidão de poder ter compartilhado momentos inesquecíveis.

“Os que questionam são sempre os mais perigosos. Responder não é perigoso. Uma única pergunta pode ser mais explosiva do que mil respostas.”

- **O mundo de Sofia, Jostein Gaarder**

RESUMO

A semente de *Paullinia cupana* Kunth., popularmente conhecido como guaraná, é a parte utilizada pela indústria, principalmente para a produção de refrigerantes, mas também pode ser consumida em pó ou em cápsulas como neuroestimulante e é amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de dores musculares e como antioxidante. O guaraná possui um grande valor econômico no Brasil, sendo no ano de 2022 produzido 2.460 toneladas de sementes. O guaraná possui grande potencial para a indústria farmacêutica e biotecnológica devido aos diversos metabólitos secundários de interesse, como as catequinas e a cafeína. As extrações nestas indústrias são feitas utilizando solventes tóxicos, como soluções hirometanólicas ou hidroetanólicas, que devem ser evitados, pois a sua ingestão pode causar diversas complicações por serem tóxicos aos seres humanos e ao meio ambiente. Buscando solucionar os problemas apresentados e aumentar a biocompatibilidade e biodegradabilidade, o presente trabalho buscou o uso de um novo método que seja de baixa toxicidade e alta seletividade e eficiência como alternativa, os *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES), que associados ao desenvolvimento de métodos analíticos, são capazes de minimizar ou até anular a utilização de solventes tóxicos. Foram preparados 13 NADES e cinco extrações convencionais, a quantidade extraída de cafeína do pó de *P. cupana* de cada extração foi analisada por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com o objetivo de manter todo o processo dentro dos princípios da Química Analítica Verde. De forma a demonstrar a potencialidade dos extratos produzidos com NADES, foram realizados ensaios em culturas celulares, onde foi possível observar baixa toxicidade desses extratos, sendo o NADES de base cloreto de colina e glicerol (1:2, mol/mol) o de menor toxicidade nas culturas VERO. Contudo, quanto à capacidade antitumoral dos extratos com NADES, os resultados não foram efetivos.

Palavras chave: Química Verde; Plantas medicinais; Farmacognosia.

ABSTRACT

The seed of *Paullinia cupana* Kunth, popularly known as guaraná, is a part used by the industry, mainly for the production of soft drinks, but can also be consumed in powdered shape or in capsules as a neurostimulant and is widely used in traditional medicine for the treatment of muscular pains and as an antioxidant. Guaraná possesses a great economical value in Brazil, 2,460 tons in seeds were produced in the year 2022. Guaraná possesses great potential in the pharmaceutical and biotechnology industry due to many secondary interests in metabolites, such as catechins and caffeine. Extractions in these industries are done utilizing toxic solvents, including hydromethanolic or hydroethanolic, which should be avoided, because their ingestion can cause many different complications for being toxic to human beings and the environment. Searching to solve the presented problems and increase biocompatibility and biodegradability, the present work searched a use for a new method that has low toxicity and high selectivity and efficiency with alternatives, the Natural Deep Eutectic Solvent (NADES), that when associated with the development of analytical methods, are capable of minimizing or even canceling the utilization of toxic solvents. Thirteen NADES and five conventional extractions were produced, the quantity of extracted caffeine powder of *P. cupana* of each extraction was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (CLAE), with the objective of maintaining all of the process within the principles of Green Analytical Chemistry. In order to demonstrate the potentiality of extracts produced with NADES, trials in cell cultures were performed, where it was possible to observe low toxicity in these extracts, where the choline chloride and glycerol (1:2, mol/mol) NADES was the least toxic in the VERO cell lineages. However, concerning the antitumor capacity of the NADES extracts, the results were not effective.

Key words: Green Chemistry; Medicinal Plants; Pharmacognosy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alcalóides presentes na cafeína.....	15
Figura 2 : Métodos de extrações de referência.	20
Figura 3: Cromatograma e espectro UV da cafeína por CLAE-DAD. Condições cromatográficas descritas na seção 2.4.	26
Figura 4: Cromatograma e espectro UV, obtidos por CLAE-DAD, da banda identificada como cafeína no extrato obtido pela extração adaptada da Farmacopeia Brasileira (2019). Condições cromatográficas descritas na seção 3.7.	27
Figura 5: Cromatograma e espectro UV, obtidos por CLAE-DAD, da banda identificada como cafeína no extrato com NADES 2. Condições cromatográficas descritas na seção 3.7. 27	
Figura 6 : Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 1 (Farmacopeia Brasileira, 2019)	28
Figura 7: A: Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 2 (Roggia et al. 2020); B: Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 3 (Machado et al., 2018).	28
Figura 8: A: Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 4, percolação; B :Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 5, infusão.....	29
Figura 10: A: extração usando o NADES 3; B: Extração usando o NADES 4.	30
Figura 11: A: extração usando o NADES 5; B: Extração usando o NADES 6.	30
Figura 12: A: extração usando o NADES 7; B: Extração usando o NADES 8.	31
Figura 13: A: extração usando o NADES 9; B: Extração usando o NADES 10.	31
Figura 14: A: extração usando o NADES 11; B: Extração usando o NADES 12.	31
Figura 15: extração usando o NADES 13.....	32
Figura 16: A: Ensaios usando o NADES 2 (ChCl:Glicerol; 1:2); B: Ensaios usando o NADES 3 (ChCl:Ácido lático; 1:2). * A seta vermelha indica em qual diluição se iniciaram os ensaios usando as extrações realizadas a partir de cada NADES.....	33
Figura 17: Ensaios usando a extração utilizando o NADES 2 (ChCl:Glicerol, 1:2): A: cultura celular A549; B: cultura celular Caco; C: cultura celular HepG-2.....	34
Figura 18: Ensaios usando a extração utilizando o NADES 3 (ChCl:Ácido Lático, 1:2): A: cultura celular A549; B: cultura celular Caco; C: cultura celular HepG-2.....	35
Figura 19: Ensaios utilizando a extração adaptada da Farmacopeia Brasileira.	36
Figura 20: Ensaios usando a extração utilizando a extração da Farmacopeia Brasileira (2019): A: cultura celular A549; B: cultura celular Caco; C: cultura celular HepG-2.....	37
Figura 21: Pareto do Planejamento do Composto Central (CCD).	39
Figura 22: A: Superfície de resposta temperatura/razão; B: Superfície de resposta tempo/razão; C: Superfície de resposta tempo/temperatura.	40
Figura 23 : A: Pictograma da extração 1 (Farmacopeia Brasileira, 2010); B: Pictograma da extração 2 (Roggia, 2020); C: Pictograma da extração 3 (Machado, 2018).....	42
Figura 24: Pictograma do método de extração desenvolvido	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes combinações para a preparação dos NADES.....	21
Tabela 2: Relação das amostras enviadas	23
Tabela 3: Área das bandas das extrações de referência.	29
Tabela 4: Áreas do pico da cafeína obtidas nas extrações usando MAE-NADES.	32
Tabela 5: Planejamento de Composto Central.....	38
Tabela 6: Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estimado.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
C18	Fase estacionária de fase reversa do tipo Octadecilsilano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DES	<i>Deep Eutectic Solvent</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DoE	<i>Design of Experiments</i>
EtOH	Etanol
GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MAE	<i>Microwave-assisted extraction</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NADES	Natural Deep Eutectic Solvent
TFA	Ácido trifluoroacético
VERO	Linhagem celular controle
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O GUARANÁ E AS SUAS SEMENTES	13
1.2. APLICAÇÃO MEDICINAL DO GUARANÁ E A MEDICINA ALTERNATIVA. 14	
1.3. QUÍMICA VERDE E O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS METODOLOGIAS	15
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.2. MATERIAL VEGETAL	19
3.3. REAGENTES UTILIZADOS	19
3.4. PREPARAÇÃO DAS EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS DE REFERÊNCIA.....	19
3.5. PREPARAÇÃO DOS NADES.....	20
3.6. EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA DO GUARANÁ ASSISTIDA POR MICROONDAS (MAE).....	22
3.7. SISTEMA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIODOS (CLAE-DAD)	22
3.8. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. IDENTIFICAÇÃO E SELETIVIDADE DA CAFEÍNA NOS EXTRATOS.....	26
4.2. COMPARAÇÃO ENTRE AS EXTRAÇÕES CONVENCIONAIS	28
4.4. RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS	33
4.5. PLANEJAMENTO DO COMPOSTO CENTRAL (CCD)	38
4.6. CARÁTER VERDE DO NADES 2	41
5. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Guaraná e as suas sementes

A espécie *Paullinia cupana* Kunth., popularmente conhecida como guaraná é pertencente à família Sapindaceae. É muito utilizada na indústria alimentícia na produção de refrigerantes (Basile *et al.*, 2005) e estima-se que essa indústria consome cerca de 70% de toda a produção brasileira de guaraná (SEBRAE, 2013). O restante da produção é vendida em lojas de produtos naturais ou em drogarias como cápsulas e comprimidos, pó e em mistura com outros ingredientes (Ângelo *et al.*, 2008).

O guaranazeiro é encontrado em todos os países que estão na área que compreende a Amazônia Legal, que corresponde a aproximadamente 59% do território brasileiro e que se estende pelo território de oito países vizinhos do Brasil (IBGE, 2022) e é adaptado ao clima quente e úmido. Contudo, as plantações de guaraná no Brasil, ocupam diversos estados, se expandindo para a Bahia e Mato Grosso. A quantidade de sementes produzidas em todo território brasileiro no ano de 2022, foi de 2.460 toneladas, com um valor de produção de 45.779,00 (x1000) de reais e uma área destinada à colheita de 10.762 ha (IBGE, 2022).

O guaranazeiro apresenta plasticidade fenotípica e pode ser encontrado tanto na forma arbustiva quanto na forma de trepadeira e pode atingir até 12 metros de extensão se prendendo nas árvores vizinhas. A sua principal fonte de substâncias fitoterápicas se dá em suas sementes secas, que de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2019), contém, no mínimo 4,0% de taninos totais, 5,0% de metilxantinas e 3,5% de cafeína. Porém esses valores podem variar de acordo com a região de plantio, presença de contaminantes, método de plantio ou de secagem (Miranda; Metzner, 2015). Todas essas substâncias citadas, são encontradas no tegumento e no caroço da semente, mas em menor quantidade (Marques *et al.*, 2019).

O guaraná possui uma importância histórica e cultural muito grande e está intimamente ligado com os povos indígenas brasileiros, que além de fazerem o seu cultivo, utilizando como um fitoterápico ao fazer uma bebida que é possui propriedades diuréticas e eficaz contra dores musculares, dores de cabeça e febre (Marques *et al.*, 2019). O nome popular, “guaraná”, tem sua origem no tupi, que significa “o início de todo conhecimento”. Além disso, muitos povos indígenas, como os maués, um dos principais produtores de guaraná no estado do Amazonas, considera o guaraná uma planta sagrada (Miranda; Metzner, 2015).

1.2. Aplicação medicinal do guaraná e a medicina alternativa

A medicina por milênios teve como objetivo atender as necessidades das pessoas e proporcionar a cura física ou mental. Entretanto, mais de 80% das pessoas residentes de países em desenvolvimento não conseguem ter acesso aos procedimentos e medicamentos básicos. Fazendo com que muitas pessoas optem por práticas da medicina complementar alternativa (MCA) ou medicina alternativa (TM) (Debas *et al.*, 2006).

Visando essas práticas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o uso de plantas medicinais como um instrumento importante de assistência farmacêutica dentro da área de Atenção Primária à Saúde. No Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, que foi aprovada em 2006 e teve a sua segunda edição lançada em 2015, veio de forma a corroborar com as ideias da OMS e normatizar tais práticas. (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, 2015)

O uso do guaraná na medicina tradicional indígena e a descoberta dessas substâncias de interesse, despertou o interesse no uso do guaraná e seus derivados dentro da medicina, por meio da fitoterapia. Alguns estudos já mostram que o guaraná, por conta da cafeína, pode reduzir o risco de doenças neurodegenerativas (Costa, 2021). O extrato etanólico também apresentou atividade antibacteriana e antioxidante, que pode justificar o uso do guaraná contra casos de diarreia e disenteria além de ser uma alternativa ao uso dos antibióticos convencionais ou ainda pode ser utilizado como um antioxidante em alimentos (Basile *et al.*, 2005). Esses exemplos citados são apenas alguns estudos envolvendo as atividades farmacológicas do guaraná e mostram que as substâncias bioativas encontradas no guaraná são multifacetadas.

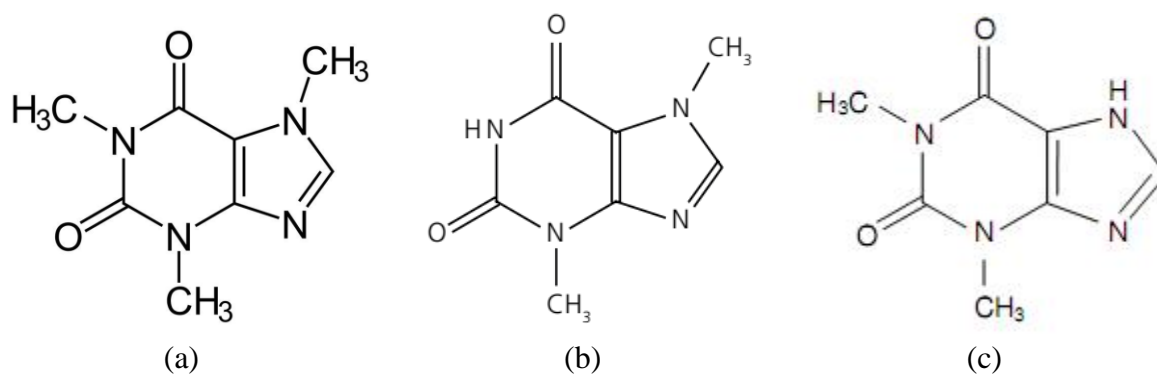
O pó de guaraná também já se mostrou eficaz como agente quimiopreventivo da carcinogênese, com efeitos antiproliferativos e antineoplásicos em células de melanoma B16 e de hepatocarcinogênese, em camundongos (Fukumasu *et al.*, 2006a, 2008a). Também se mostrou promissor na defesa do DNA de fígado de camundongos em relação às lesões induzidas por um carcinógeno químico (Fukumasu *et al.*, 2006b).

A cafeína também apresentou um promissor controle do processo metastático, uma vez que apresenta uma maior expressão de diversos genes relacionados à matriz extracelular, entre eles os genes: Fbln1, Bgn, Sparc, Fbn1, Loxl1, Col1a1, Col3a1, Col5a2, Col5a3, Col6a1, Col5a2 e Col6a3 (Yang *et al.*, 2005, Fukumasu, 2008b).

1.3. Química verde e o desenvolvimento de novas metodologias

Dos diversos estudos realizados com a semente de guaraná, os compostos que se destacam são os alcalóides do grupo das metilxantinas, sendo os principais componentes, a cafeína (1,3,7- trimetilxantina, Figura 1a), a teobromina (3,7 - dimetilxantina, Figura 1b) e a teofilina (1,3 - dimetilxantina, Figura 1c) que são derivados de purina e que podem se comportar como bases e ácidos fracos. Contudo, a cafeína é trimetilada e apresenta um caráter básico mais evidente do que teobromina e a teofilina que são dimetilxantinas (Simões *et al.*, 2017).

Figura 1: Alcalóides presentes na cafeína.



Fonte: O autor.

As metilxantinas possuem solubilidade em água, quente ou fria, soluções aquosas ácidas, etanol e metanol quente, soluções alcalinas e solventes orgânicos clorados. Entretanto, a cafeína, teofilina e teobromina apresentam diferentes solubilidades, temperatura de sublimação e faixas de fusão. Enquanto a cafeína e teofilina são bem solúveis em água quente a teobromina não é tão solúvel (Simões *et al.*, 2017).

Para as extrações de metilxantinas é comumente utilizado métodos convencionais como maceração por solução hidroetanólica (Farmacopeia Brasileira, 2010), solução hidrometanólica (Roggia *et al.*, 2020), métodos de extração de alcalóides (partições líquido-líquido com alterações no pH), métodos de sublimação (Simões *et al.*, 2017) ou por fluidos supercríticos (Santana *et al.*, 2019).

Uma abordagem verde e inovadora vem sendo avaliada para a extração de metilxantinas e outros compostos bioativos de plantas. Essa nova abordagem utiliza os chamados Solventes Eutéticos Naturais ou *Deep Eutectic Solvents*, também conhecidos como DES. Esses solventes são misturas eutéticas de dois ou mais compostos, em concentrações diferentes, onde um dos solventes terá o papel de doar ligações de hidrogênio e o outro será o receptor dessas ligações. Essa mistura eutética apresenta ponto de fusão inferior a cada um dos

componentes individuais (Pacheco-Fernández; Pino, 2019).

O uso de DES já foi empregado com sucesso para a extração de metilxantinas da borra de café (Fanali *et al.*, 2020). Isso fez com que as pesquisas envolvendo os DES crescessem dentro do contexto da química analítica verde. Contudo, a produção dos DES pode envolver alguns reagentes tóxicos, impossibilitando o seu uso na indústria farmacêutica e alimentícia (Dai *et al.*, 2013; Gomez *et al.*, 2018).

E como alternativa para a extração de bioativos, uma subclasse dos DES, os *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES) são misturas eutéticas de compostos orgânicos naturais, principalmente aqueles relacionados ao metabolismo primário de plantas, como: açúcares, ureia, cloreto de colina e ácidos orgânicos, como o ácido láctico (Choi *et al.*, 2011). Os NADES apresentam eficiência equivalente ou, dependendo da classes de compostos a serem extraídos, superior em extrações de compostos bioativos de plantas quando comparados com métodos de extrações que utilizam solventes convencionais e DES, além de serem mais baratos, biodegradáveis e de baixa toxicidade (Pacheco-Fernández; Pino, 2019). O ponto negativo quanto na utilização dos NADES é que são líquidos muito viscosos, no entanto a adição de água nas misturas até um limite de 20% (m/m), pode diminuir essa viscosidade da mistura sem descaracterizar a mistura eutética, ou seja sem romper as interações entre os outros componentes (Choi *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2013).

No entanto, pensar somente na eficiência não é suficiente para que o método possa ser considerado verde. Dessa forma, além da eficiência, parâmetros ambientais devem ser considerados no desenvolvimento do método. Para isso, deve-se levar em consideração os princípios da Química Analítica Verde (Green Analytical Chemistry, GAC) propostas por Galuszka, Migaszewki e Namiesnik (2013), a partir dos 12 princípios da Química Verde de Anastas e Warner (1998), que tem como objetivo estabelecer métodos laboratoriais unindo a química analítica à sustentabilidade. Esses princípios são:

1. Utilizar técnicas analíticas diretas, com o objetivo de evitar o tratamento de amostras.
2. O número de amostras utilizadas, assim como o seu tamanho devem ser minimizados.
3. Realizar medidas *in situ*.
4. Fazer a integração dos processos e operações analíticas a fim de reduzir o uso de solventes e energia.
5. Selecionar métodos miniaturizados e automatizados.

6. Evitar derivação.
7. Evitar a geração de grandes volumes de resíduos e deve-se providenciar métodos adequados para o seu tratamento.
8. Priorizar os métodos multiparamétricos ou multianalitos em relação aos métodos que utilizam um único analito por vez.
9. Minimizar o uso de energia.
10. Dar preferência aos reagentes obtidos de fontes renováveis.
11. Substituir ou eliminar os reagentes tóxicos.
12. Providenciar meios para que a segurança do pesquisador/operador seja aumentada.

Levando em consideração que a eficiência (extração/atividade) e os parâmetros ambientais possuem importâncias equivalentes, métodos para extração de compostos bioativos de plantas medicinais devem ser desenvolvidas a partir de uma perspectiva holística, em razão da complexidade da composição da matriz, e o uso de planejamento de experimentos (*Design of Experiments*, DoE) pode ser muito útil para se atingir tal objetivo (Dai *et al.*, 2013).

Em oposição a estudos univariados (ou ‘tentativa e erro’), DoE é uma abordagem multivariada visando uma avaliação sistematizada, simultânea e imparcial de variáveis de interesse no desenvolvimento de métodos de extração, além da obtenção de máxima informação dos dados experimentais com um número diminuto (porém, suficiente) de experimentos, reduzindo dispêndio de tempo e recursos. Além disso, DoE permite a identificação de interações entre as variáveis investigadas a construção de superfícies de resposta, ferramentas proveitosas para prever condições experimentais consideradas ótimas. Por fim, planejamentos experimentais são considerados procedimentos verdes para realização de análises, conforme os princípios da GAC (Souza *et al.*, 2022).

Portanto, a utilização de NADES como solventes extratores, planejamentos experimentais com estudos bioguiados são abordagens que tornam o desenvolvimento de métodos de extração mais racional, objetivo, eficiente e seguro.

2. OBJETIVO

Desenvolver de um método verde, eficiente e rápido para obtenção de extratos ricos em cafeína do pó de sementes de guaraná com potenciais atividades antiproliferativa e antineoplásica, utilizando NADES e Planejamento Experimental.

3. MATERIAI E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Síntese Orgânica e Processos na Faculdade de Ciências, UNESP, Câmpus Bauru e em colaboração com a Dra. Karina Alves de Toledo do Laboratório de Imunologia, UNESP, Câmpus Assis.

3.1. Revisão da literatura

Desde o início da realização do trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico de artigos científicos que envolvessem métodos de extração e análise da cafeína e seus derivados do pó de *P. cupana* por meio de CLAE nas mais diversas bases de dados e ensaios *in vivo* e *in vitro* que utilizam extratos de guaraná, como: Scielo, Web of Science, Google Scholar, SciFinder e Athena (base de dissertações e teses da UNESP).

3.2. Material Vegetal

O guaraná em pó foi adquirido de forma comercial na loja Empório Barres, CNPJ: 06.171.424/0001-03, na cidade de Bauru-SP, distribuído pela Distribuidora Reino Alimentos, CNPJ: 07.459.839/0001-31.

3.3. Reagentes utilizados

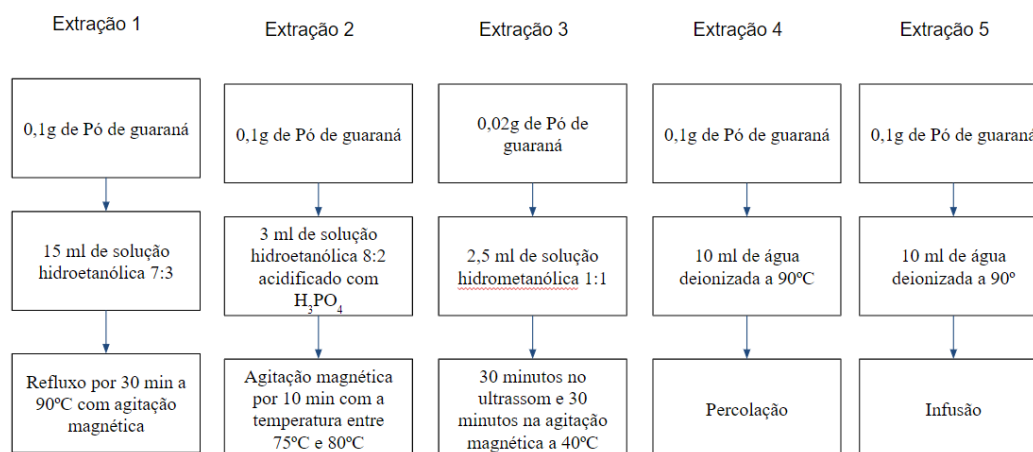
Solventes grau HPLC: metanol (MeOH, TEDIA®), acetonitrila (ACN, TEDIA®), água purificada em sistema Milli-Q e ácido trifluoroacético (TFA, TEDIA®).

Padrão de cafeína (Sigma Aldrich®, C1778-1VL).

3.4. Preparação das extrações convencionais de referência

Para a realização da comparação entre os métodos de extração de cafeína e de derivados do guaraná com maiores citações na literatura e a metodologia desenvolvida, foram preparados três extrações adaptadas da literatura (Farmacopeia Brasileira, 2010; Machado *et al.*, 2018; Roggia *et al.*, 2020). E mais outras duas técnicas de extração que são amplamente utilizadas na farmacognosia: a percolação e a infusão, em ambos os processos, foi utilizada água deionizada a 90°C por 10 minutos (Figura 2).

A principal adaptação feita foi a redução de materiais, por meio da realização de extrações em microescala.

Figura 2 : Métodos de extrações de referência.

Fonte: O autor.

Nas extrações foi utilizado um agitador magnético Heidolph® com temperatura controlada. Após cada extração, os extratos foram centrifugados em mini-centrífuga de velocidade 5000 RPM (BioPet®), o sobrenadante foi coletado e filtrado em microfiltro de PTFE de 0,45 m (Phenomenex®) em vials de 2 mL e analisadas no sistema CLAE-DAD com as condições descritas na seção 3.7, e os cromatogramas obtidos estão apresentados entre as Figuras 6 e 10.

3.5. Preparação dos NADES

Os NADES foram preparados a partir da mistura de duas ou mais substâncias naturais (Tabela 1), em combinações variadas, com o objetivo de obter misturas com diferentes polaridades e capacidade de solubilização. O método de preparação seguiu o desenvolvido por Gomez *et al.* (2018), que utiliza a irradiação por micro-ondas, variando no tempo de exposição, temperatura e potência. Contudo, no preparo dos NADES apresentados na Tabela 1 não foi necessário o uso da irradiação micro-ondas, pois os mesmos formaram um líquido transparente e homogêneo em temperatura ambiente. Após o preparo, esperou-se entre 5 a 7 dias para a constatação visual da formação ou não das misturas eutéticas, que para ser uma mistura eutética precisava se manter como um líquido transparente e homogêneo sem cristais.

Tabela 1: Diferentes combinações para a preparação dos NADES.

NADES	Componente	Componente	Componente	Razão Molar
	1	2	3	
1	Timol	Mentol		1:1
2	Cloreto de colina	Glicerol		1:2
3	Cloreto de colina	Ácido Lático		1:2
4	L-Prolina	Ácido Cítrico		1:2
5	L-Prolina	Ácido Oxálico		1:1
6	Cloreto de colina	Sorbitol		2:1
7	Cloreto de colina	Sorbitol	Ureia	2:1:1
8	Ácido Lático	Frutose		5:1
9	Cloreto de colina	Sacarose		4:1
10	Ácido Málico	L-Prolina		1:1
11	Ureia	Cloreto de colina		2:1
12	L-Prolina	Sacarose		4:1
13	L-Prolina	Cloreto de colina		1:1

Fonte: O autor.

3.6. Extração de cafeína do guaraná Assistida por Microondas (MAE)

Para realizar as extrações utilizando os 13 NADES preparados (Tabela 1) foi utilizado um digestor micro-ondas (Ethos Easy, Milestone SrL, Itália), utilizando a proporção de 1:20 (m/m) de material vegetal por solução extratora, em um tempo de 10 minutos (3 minutos de rampa para atingir a temperatura programada seguidos por 7 minutos de irradiação com a temperatura estável), a 50°C e 500W.

Por conta da alta viscosidade presente na maioria dos NADES, após a extração foi feita uma diluição utilizando 1ml de EtOH (1:1), depois foram centrifugados em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf, Olen, Brasil) utilizando a microcentrífuga (Biopet Technologies, Brasil) por 5 minutos em 5000 rpm, esse processo foi realizado duas vezes com o objetivo de obter um sobrenadante mais homogêneo. Ao final da centrifugação 500 µL de sobrenadante foram coletados, filtrados em microfiltro de 0,45 µm PTFE (Phenomenex, USA) e 50 µL injetados no sistema CLAE nas condições descritas na seção 3.7.

3.7. Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de fotoDiodos (CLAE-DAD)

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (mistura a baixa pressão) da marca Shimadzu (bomba LC-20AT, degaseificador DGU-20A5R, amostrador SIL-20HT, forno de coluna CTA-10AS VP e interface CBM-20A), equipado com uma coluna Luna (2) C₁₈ - Phenomenex (250x4.6m), e um detector de arranjo de fotodiodos (DAD, SPD-M20A), utilizando como fase móvel água + 0,1% de TFA e metanol, nos canais A e B respectivamente. As amostras foram analisadas em um sistema de gradiente exploratório com variação de B de 5% a 95% em 70 minutos, vazão de 1ml/min e temperatura da coluna de 30°C.

O principal fator a ser avaliado foi a área da banda cromatográfica que corresponde a cafeína.

3.7.1. Triagem e preparação para os ensaios biológicos

Os 13 extratos obtidos usando os NADES e analisados por CLAE-DAD passaram por uma triagem, que buscava encontrar os dois NADES com maior capacidade extratora por meio da área da banda referente a cafeína.

Após a triagem dos NADES, foram escolhidos os extratos com os seguintes NADES: (EX2) Cloreto de colina: Glicerol 1:2 e (EX3) Cloreto de colina: Ácido lático 1:2 (Tabela 2).

Além disso, foi preparada uma extração adaptada da Farmacopeia Brasileira (2019),

utilizando 0,2 mg do pó de guaraná para 30ml de solução hidroetanólica 70% (v/v) que foi submetida ao refluxo por 30 minutos a aproximadamente 90° C. Após preparada, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante filtrado em papel de filtro e submetido a evaporação rotativa para evaporação do solvente orgânico. Após a evaporação, a amostra foi separada em dois frascos rotulados como F1 e F2, congelada e liofilizada.

Os NADES puros (ND 2 e ND3), os extratos preparados com os NADES (EX2 e EX3) e extrato convencional baseado na Farmacopeia Brasileira (2019) foram submetidos aos ensaios biológicos (descrito no item 3.8).

Tabela 2: Relação das amostras enviadas

Identificação no Frasco	Composição	Quantidade
F1	Extração Farmacopeia	6mg de extrato (utilizado 200 mg de planta para 30 ml de solvente)
F2	Extração Farmacopeia	10mg de extrato (utilizado 200 mg de planta para 30 ml de solvente)
ND 2	Cloreto de Colina:Glicerol (1:2)	1 ml
ND 3	Cloreto de Colina: Ácido láctico (1:2)	1 ml
EX 2	Extração da cafeína utilizando ND 2	Solução (50mg de planta para 1 ml de solvente - NADES)
EX 3	Extração da cafeína utilizando ND 3	Solução (50mg de planta para 1 ml de solvente - NADES)

Fonte: O autor.

3.8. Avaliação da viabilidade celular

Os ensaios biológicos foram realizados utilizando a infraestrutura do Laboratório de

Imunologia Celular - UNESP -Câmpus Assis, sob supervisão da Prof.^a Dr^a Karina Alves de Toledo.

A abordagem utilizada foi com base no teste de MTT, que identifica as células viáveis e não-viáveis por meio da taxa metabólica de suas mitocôndrias. As diferentes culturas celulares escolhidas foram dispostas em uma placa de 96 poços e incubados por 24 horas à 37°C. A monocamada recebeu diferentes concentrações dos extratos enviados e a cultura foi mantida por 24h. Após esse período, o meio de cultivo foi substituído por 50µl de solução de MTT (1mg/ml) por poço, sendo mantido por 1h a 37°C. Os cristais de formazan gerados em células viáveis foram diluídos com a adição de DMSO (50µl/poço).

As placas foram analisadas em espectrofotômetro a 560 nm e a absorbância que foi obtida foi diretamente proporcional à viabilidade celular.

Para o controle, as células foram cultivadas apenas no meio de cultivo, sendo então consideradas 100% viáveis.

Os testes de viabilidade celular foram feitos nas seguintes linhagens celulares: VERO (MCF 10A, fibroblastos de tecido epitelial mamário de uma mulher), A549 (células tumorais pulmonares), Caco (células tumorais intestinais) e HepG-2 (células de hepatocarcinoma humano).

3.9. Otimização

Após a seleção do NADES de melhor eficiência, foi empregado um planejamento experimental (Composto Central) em que foram avaliados a proporção material vegetal/solvente extrator (X1); temperatura (X2) e tempo de extração (X3), visando estimar um modelo matemático que possibilite obter a condição experimental de melhor rendimento para a extração. Os fatores estudados possibilitam um ajuste fino das condições experimentais para a transferência de massas considerada ideal para a extração dos metabólitos de interesse.

Após otimizadas todas as etapas de produção de extrato, o processo foi avaliado quanto ao seu caráter verde, utilizando a métrica AGREE (*Analytical GREenEss Metric*, Pena-Pereira, Wojnowski, Tobiszewski, 2020) para se quantificar o impacto ambiental do método desenvolvido e para estabelecer comparações com os métodos de referência da literatura. Essa métrica foi selecionada porque possibilita uma avaliação flexível, rápida e de fácil interpretação do impacto ambiental de processos. O critério de avaliação se baseia em critérios quantitativos baseados nos 12 princípios da Química Analítica Verde, os quais são transformados em uma escala que varia de 0 a 1. O resultado final é apresentado na forma de pictograma por um

software livre disponibilizado no material suplementar da referência original. O pictograma indica um *score* final e a performance do processo em cada um dos critérios avaliados (Pena-Pereira, Wojnowski, Tobiszewski, 2020).

3.10. Forma de análise dos resultados

A análise do modelo multivariado estimado para extração com NADES visando a sua otimização foi estimada em 95% de confiança pela Análise de Variância (ANOVA).

Os NADES foram comparados entre si com os solventes convencionais testados (métodos de referência), em relação a sua capacidade extratora e seu caráter verde, utilizando o teste t de Student, a 95% de confiança. Os parâmetros norteadores para mensurar a eficiência das extrações dos metabólitos secundários de interesse foram: a somatória das áreas das bandas referentes aos compostos-alvo e os resultados das atividades biológicas/farmacológicas.

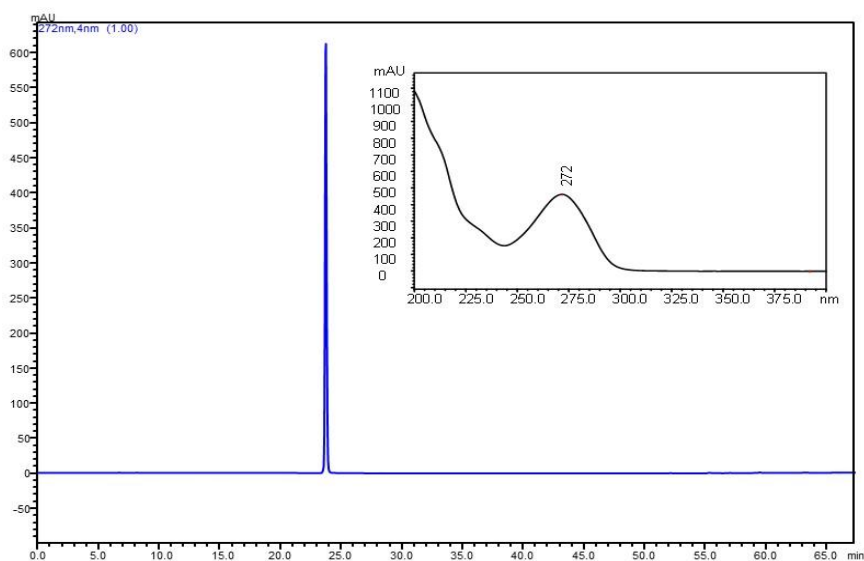
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação e seletividade da cafeína nos extratos

Uma das principais vantagens ao uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a sua alta seletividade na separação dos compostos presentes no material analisado. Isso permite, também, uma ótima capacidade de quantificação dos compostos presentes nas amostras avaliadas.

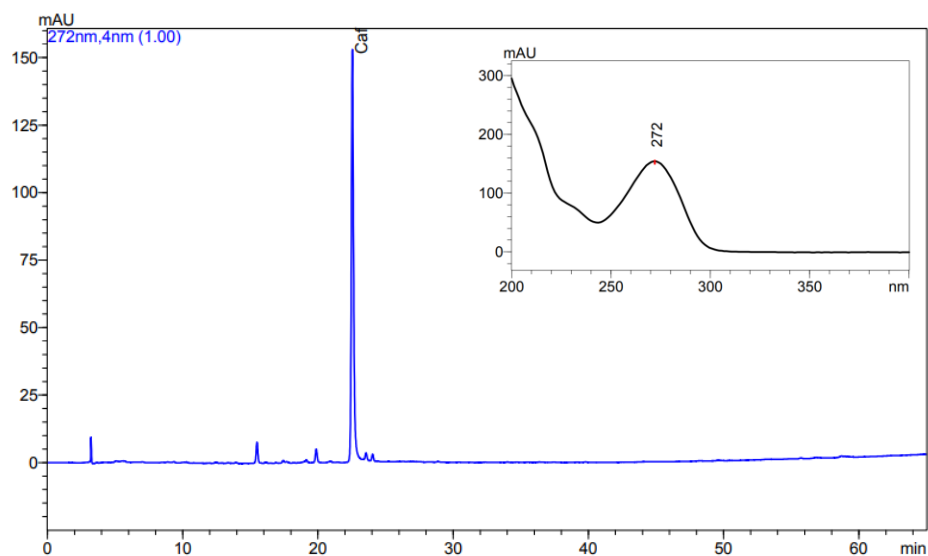
A identificação da cafeína nos extratos estudados foi realizada por comparação dos espectros UV e tempo de retenção do padrão autêntico (Figura 3) com os da banda cromatográfica presente nos perfis das amostras (Figura 4 e 5).

Figura 3: Cromatograma e espectro UV da cafeína por CLAE-DAD. Condições cromatográficas descritas na seção 2.4.



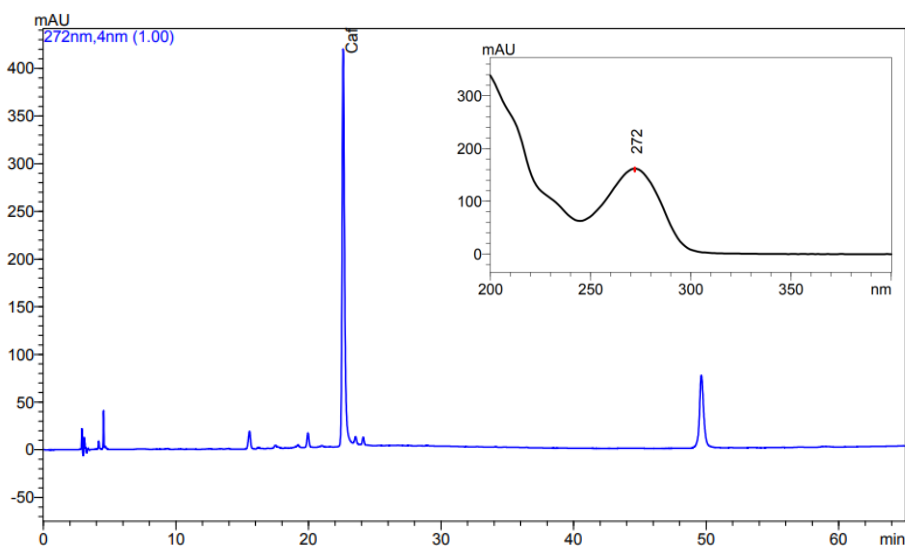
Fonte: O autor.

Figura 4: Cromatograma e espectro UV, obtidos por CLAE-DAD, da banda identificada como cafeína no extrato obtido pela extração adaptada da Farmacopeia Brasileira (2019). Condições cromatográficas descritas na seção 3.7.



Fonte: O autor.

Figura 5: Cromatograma e espectro UV, obtidos por CLAE-DAD, da banda identificada como cafeína no extrato com NADES 2. Condições cromatográficas descritas na seção 3.7.



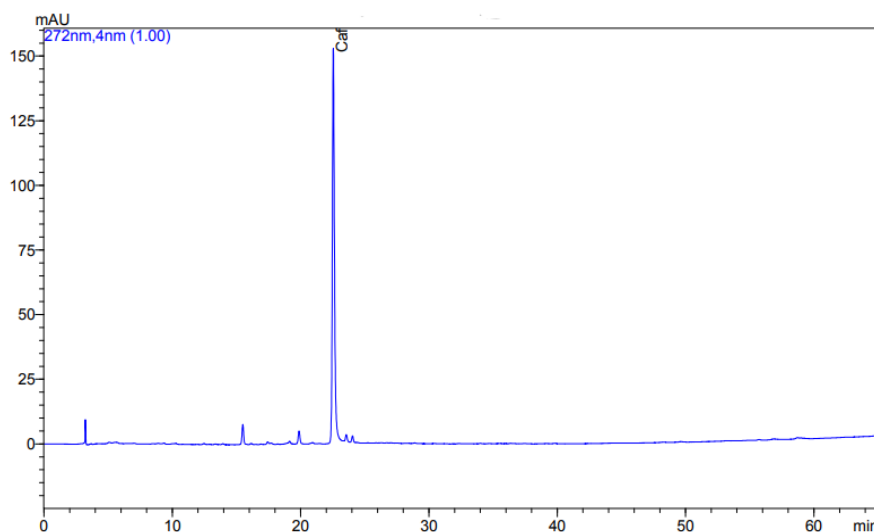
Fonte: O autor.

Como é possível observar na figura 3, o espectro UV da cafeína possui $\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$ e tempo de retenção de 22,7 min. Esses dados coincidem com os da banda cromatográfica identificada como cafeína nos perfis cromatográficos dos extratos estudados (Figura 4 e 5). Dessa forma, por meio da comparação, podemos concluir que o método CLAE-DAD, foi eficiente na seletividade e identificação da cafeína nas amostras analisadas.

4.2. Comparação entre as extrações convencionais

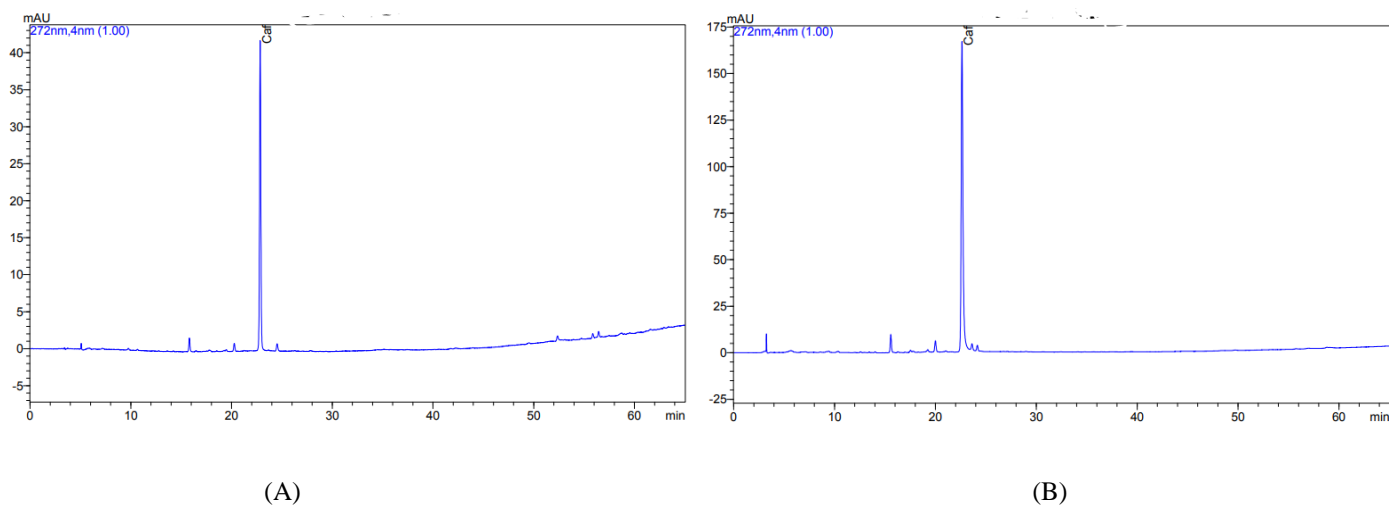
Após o preparo das cinco extrações convencionais descritas no item 3.4 e as análises por CLAE-DAD seguindo os parâmetros estabelecidos no item 3.7. Foram obtidos os seguintes cromatogramas:

Figura 6 : Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 1 (Farmacopeia Brasileira, 2019)



Fonte: O autor.

Figura 7: A: Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 2 (Roggia *et al.* 2020); B: Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 3 (Machado *et al.*, 2018).

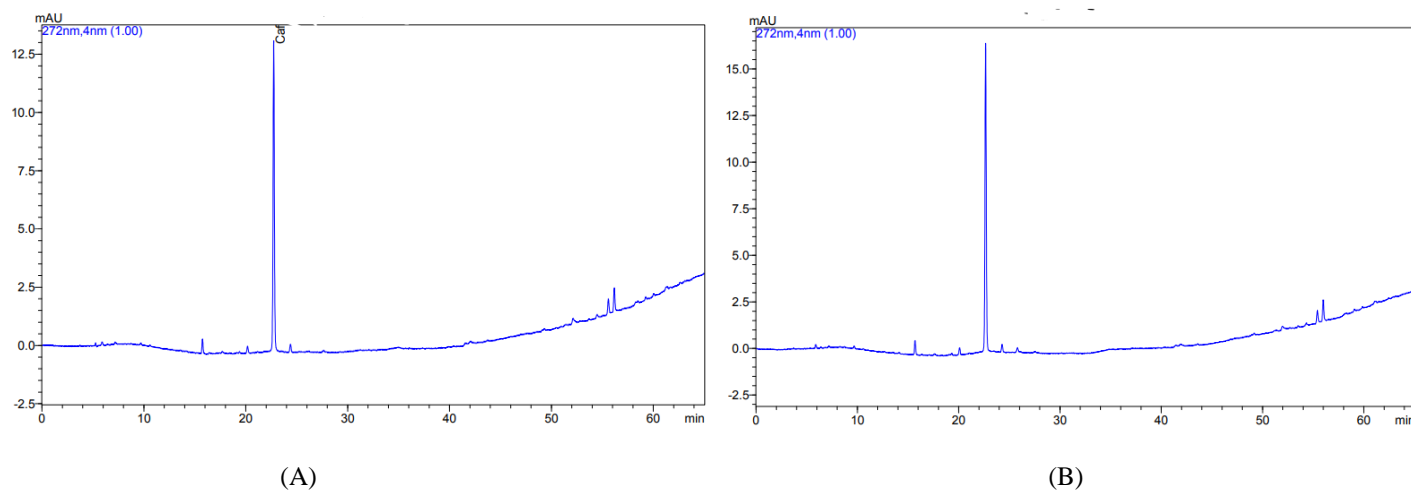


(A)

(B)

Fonte: O autor.

Figura 8: A: Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 4, percolação; B :Cromatograma da análise por CLAE-DAD da extração 5, infusão.



Fonte: O autor.

Porém, quando comparadas as áreas do pico correspondente à cafeína entre as diferentes extrações, a extração três foi a que apresentou maior área (Tabela 3) e, portanto, maior quantidade, sendo a mais eficiente.

Tabela 3: Área das bandas das extrações de referência.

Extração	Área do pico da cafeína
Extração 1*	1688445
Extração 2*	367443
Extração 3*	2020419
Extração 4*	115612
Extração 5*	143809

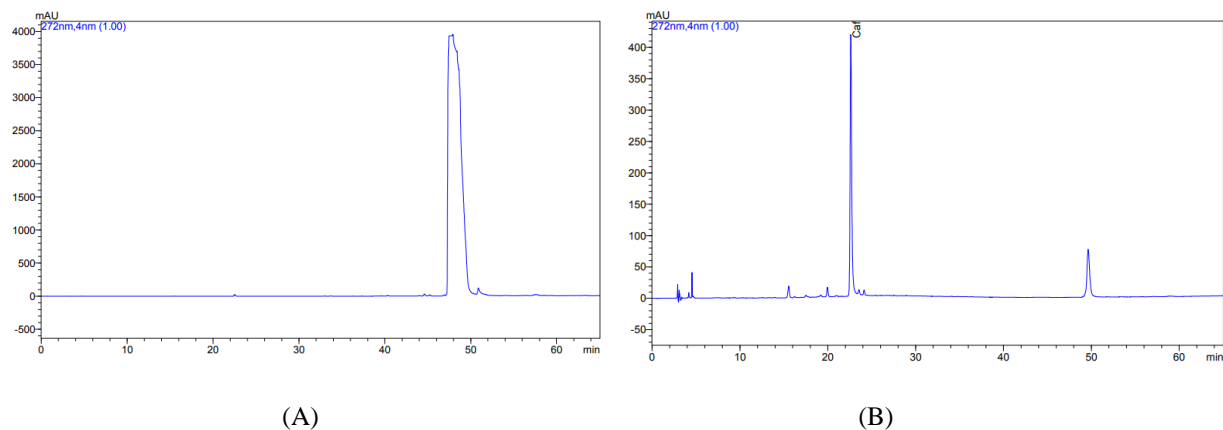
*1:Farmacopeia Brasileira, 2010; 2:Roggia *et al.* 2020; 3: Machado *et al.*, 2018; 4: percolação; 5: infusão

Fonte: O autor.

4.3. Comparação entre as extrações utilizando MAE-NADES

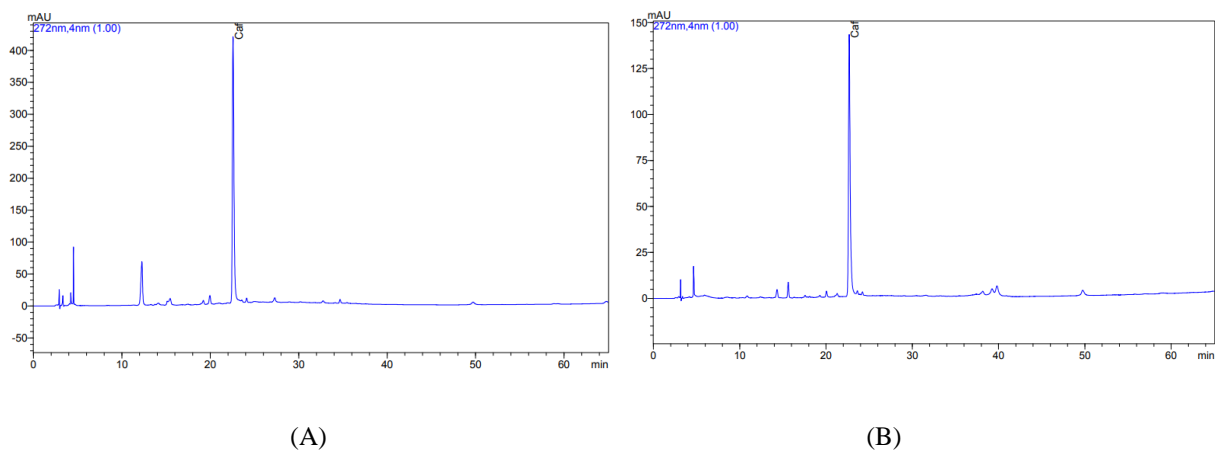
As extrações utilizando NADES como solventes extratores também foram comparadas pela área do pico correspondente à cafeína ($t_r = 23$ min, Figuras 9 a 15).

Figura 9: A: extração usando o NADES 1; B: Extração usando o NADES 2.



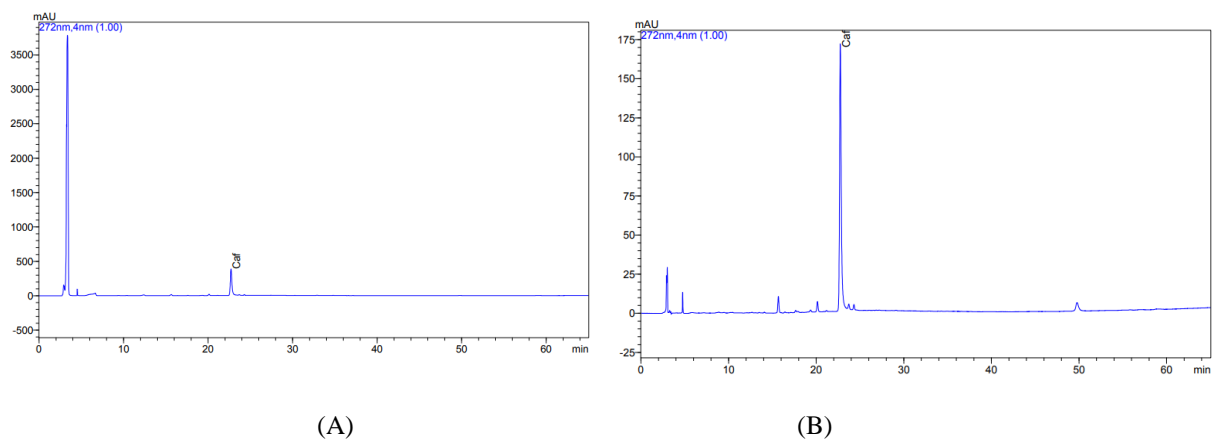
Fonte: O autor.

Figura 10: A: extração usando o NADES 3; B: Extração usando o NADES 4.

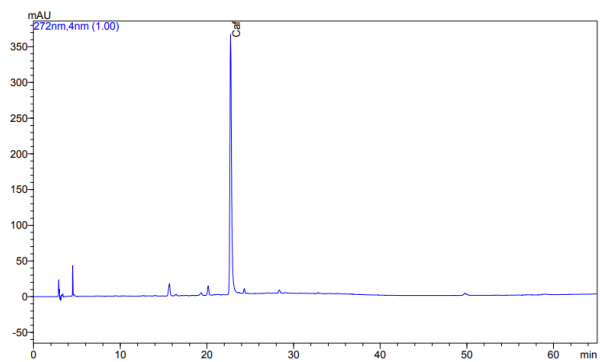


Fonte: O autor.

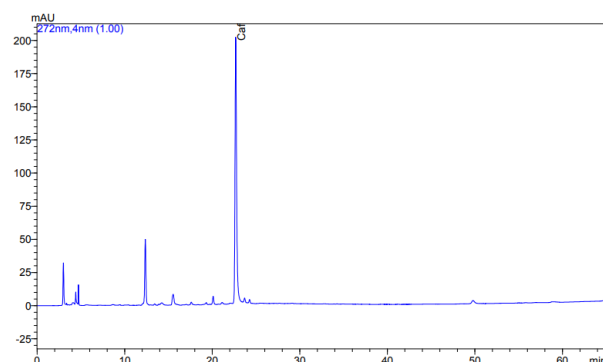
Figura 11: A: extração usando o NADES 5; B: Extração usando o NADES 6.



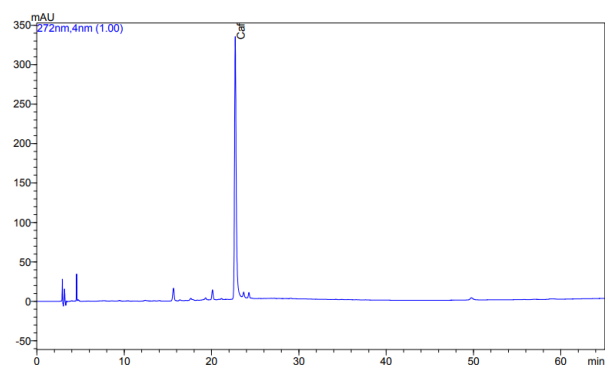
Fonte: O autor.

Figura 12: A: extração usando o NADES 7; B: Extração usando o NADES 8.

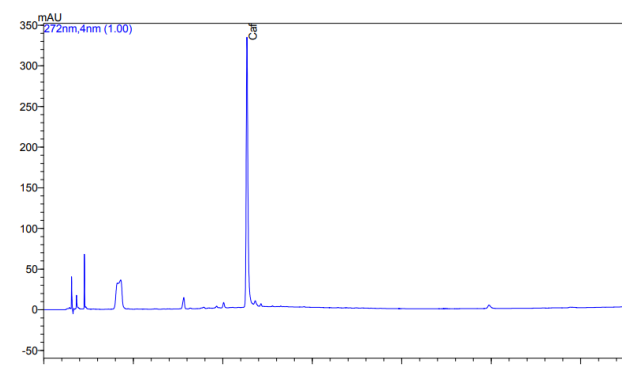
(A)



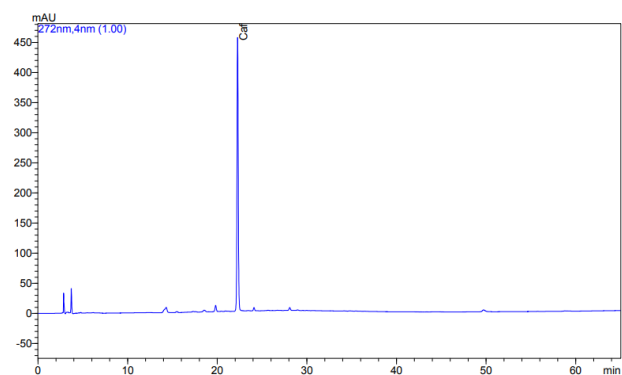
(B)

Fonte: O autor.**Figura 13:** A: extração usando o NADES 9; B: Extração usando o NADES 10.

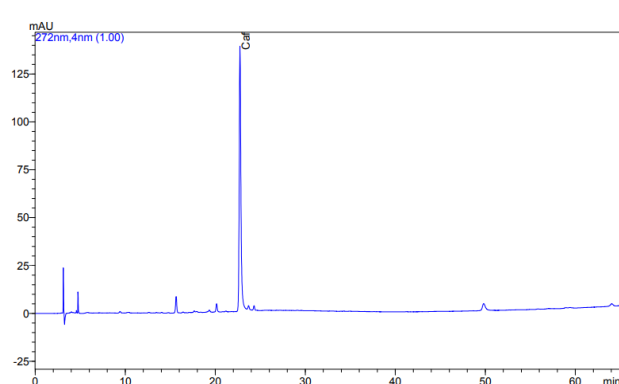
(A)



(B)

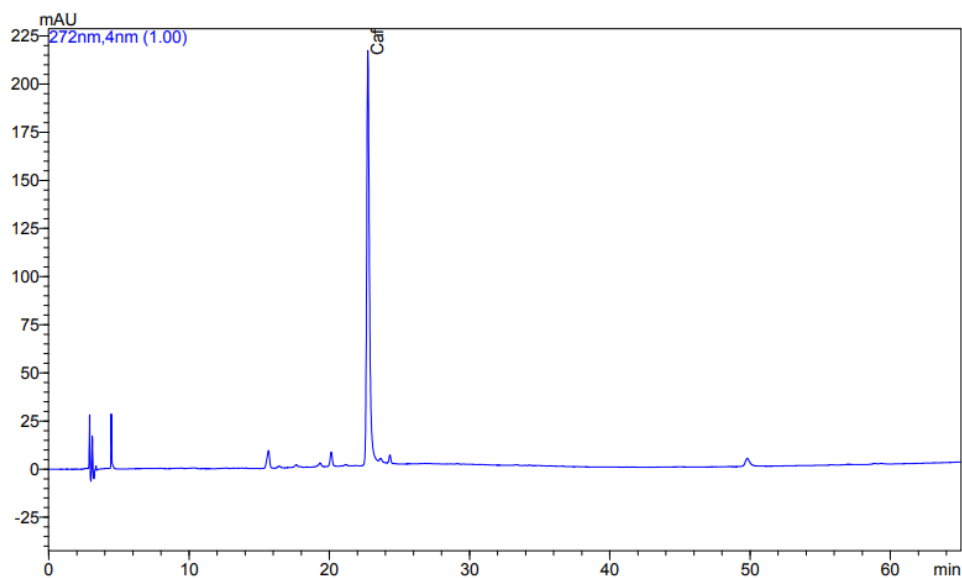
Fonte: O autor.**Figura 14:** A: extração usando o NADES 11; B: Extração usando o NADES 12.

(A)



(B)

Fonte: O autor.

Figura 15: extração usando o NADES 13

.Fonte: O autor.

Tabela 4: Áreas do pico da cafeína obtidas nas extrações usando MAE-NADES.

NADES	Área do pico da cafeína
1	Não foi possível calcular
2	5040010
3	4938072
4	1871623
5	4282287
6	2207593
7	4714816
8	2413650
9	4277862
10	4232122
11	4328580
12	1783628
13	2766052

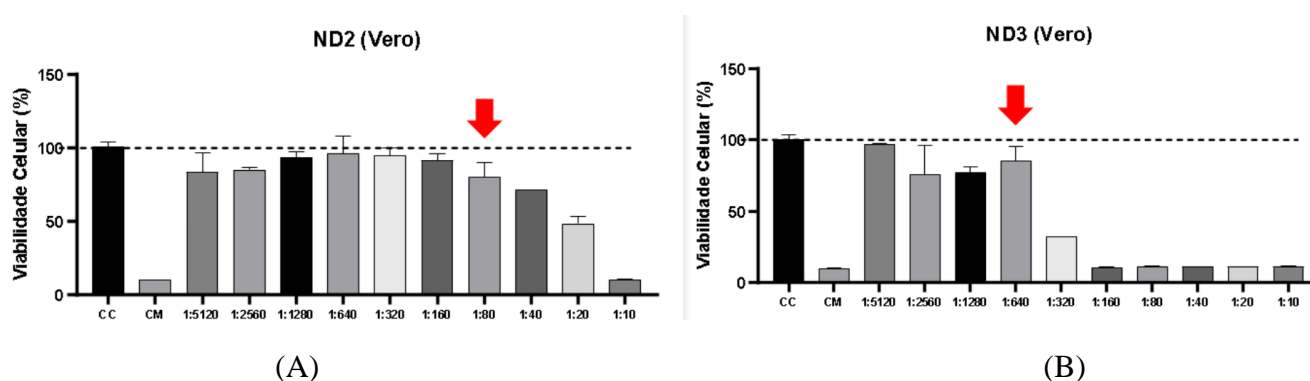
.Fonte: O autor.

Diante das extrações avaliadas, os NADES 2 e 3 foram as extrações que apresentaram maiores áreas do pico da cafeína quando analisadas por CLAE-DAD (Tabela 4) e, portanto, foram consideradas as mais eficientes.

4.4. Resultados dos ensaios biológicos

Os ensaios biológicos tiveram um resultado positivo, pois mostraram que os NADES e as extrações usando NADES não são tóxicas às culturas celulares saudáveis, isso corrobora as premissas da GAC e de que os NADES são uma alternativa menos tóxica para seres humanos e para o meio ambiente (Pacheco-Fernández; Pino, 2019), uma vez que não diminuíram a viabilidade celular da cultura controle (VERO) (Figura 16).

Figura 16: A: Ensaios usando o NADES 2 (ChCl:Glicerol; 1:2); B: Ensaios usando o NADES 3 (ChCl:Ácido láctico; 1:2). * **A seta vermelha indica em qual diluição se iniciaram os ensaios usando as extrações realizadas a partir de cada NADES.**

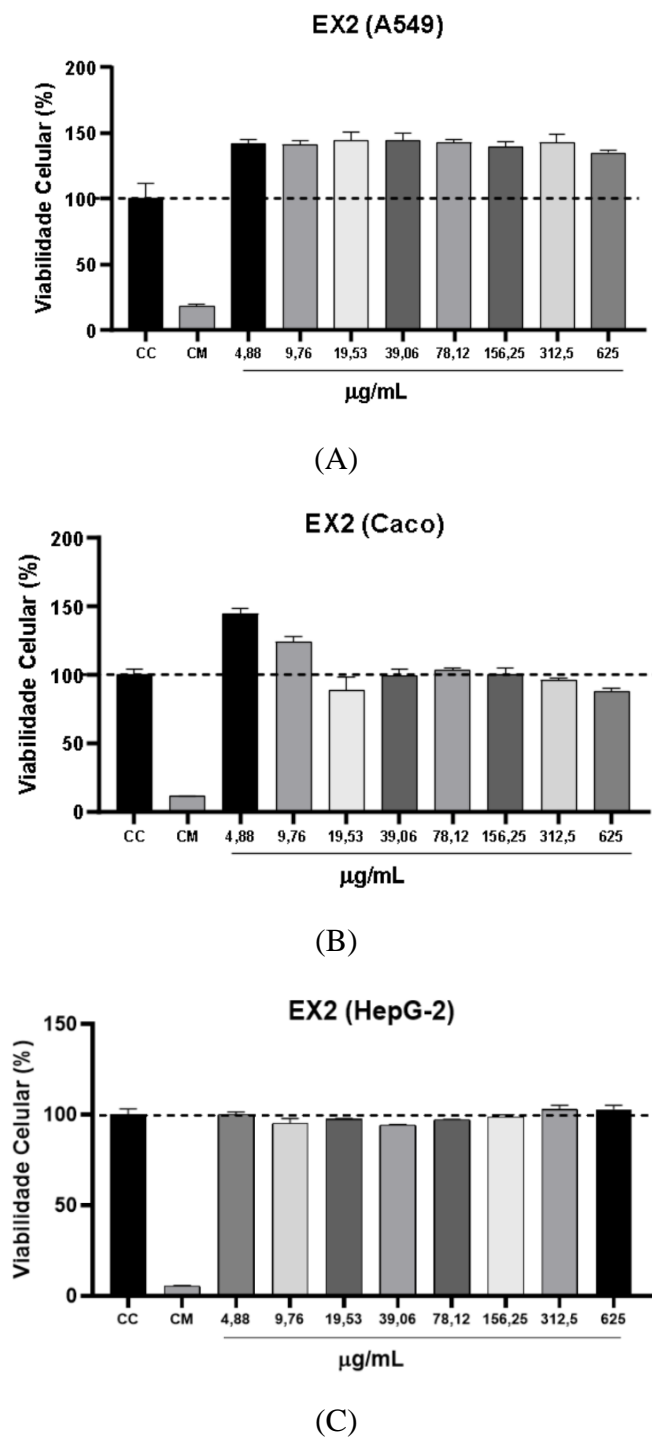


Fonte: O autor.

Os ensaios com o NADES 2 (ChCl:Glicerol, 1:2) se iniciaram a partir da diluição 1:80, que representa a concentração de 625 $\mu\text{g/ml}$, pois foi a diluição em que a toxicidade não foi mais significativa para as células Vero (Figura 16). Já para o NADES 3 (ChCl: Ácido láctico, 1:2), os ensaios começaram na diluição 1:640, que representa a diluição 78,12 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 16).

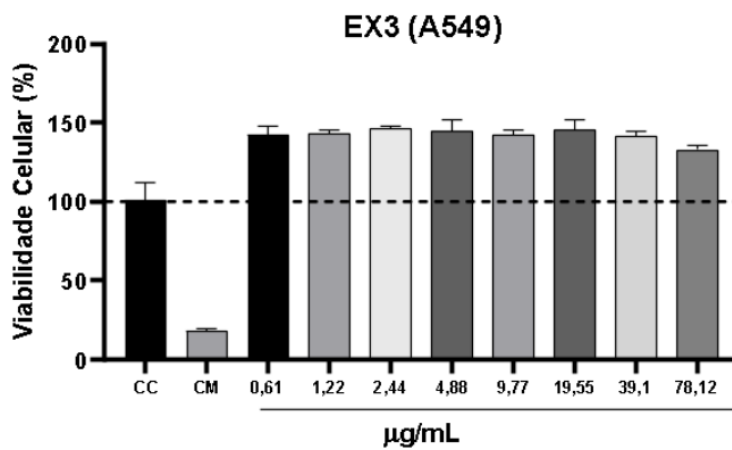
Quanto a capacidade antitumoral dos extratos com NADES, os resultados obtidos demonstram que eles não foram efetivos e, em certas concentrações, as extrações usando os NADES aumentaram a viabilidade das células nas culturas de células tumorais testadas (Figura 17 e 18), mas como foi algo presente na maioria dos ensaios e em diversas concentrações, o aumento da viabilidade celular não está relacionado com as extrações testadas.

Figura 17: Ensaios usando a extração utilizando o NADES 2 (ChCl:Glicerol, 1:2): A: cultura celular A549; B: cultura celular Caco; C: cultura celular HepG-2.

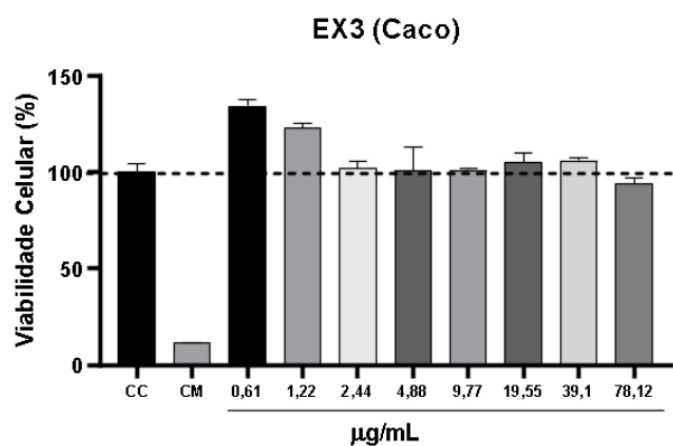


Fonte: O autor.

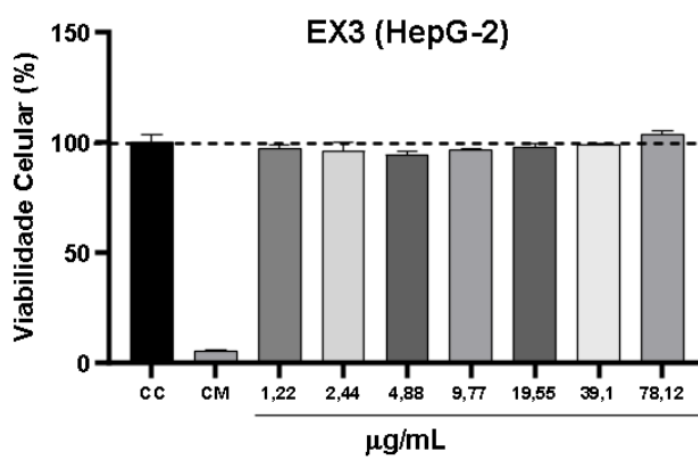
Figura 18: Ensaio usando a extração utilizando o NADES 3 (ChCl:Ácido Lático, 1:2): A: cultura celular A549; B: cultura celular Caco; C: cultura celular HepG-2.



(A)



(B)

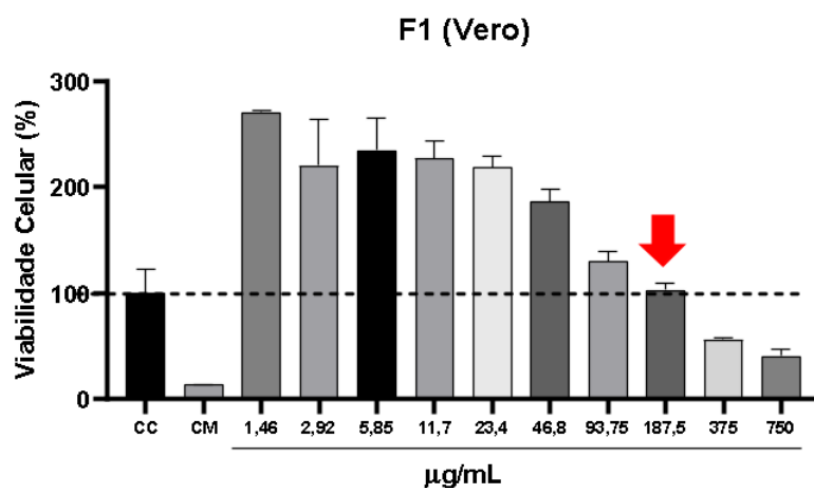


(C)

Fonte: O autor.

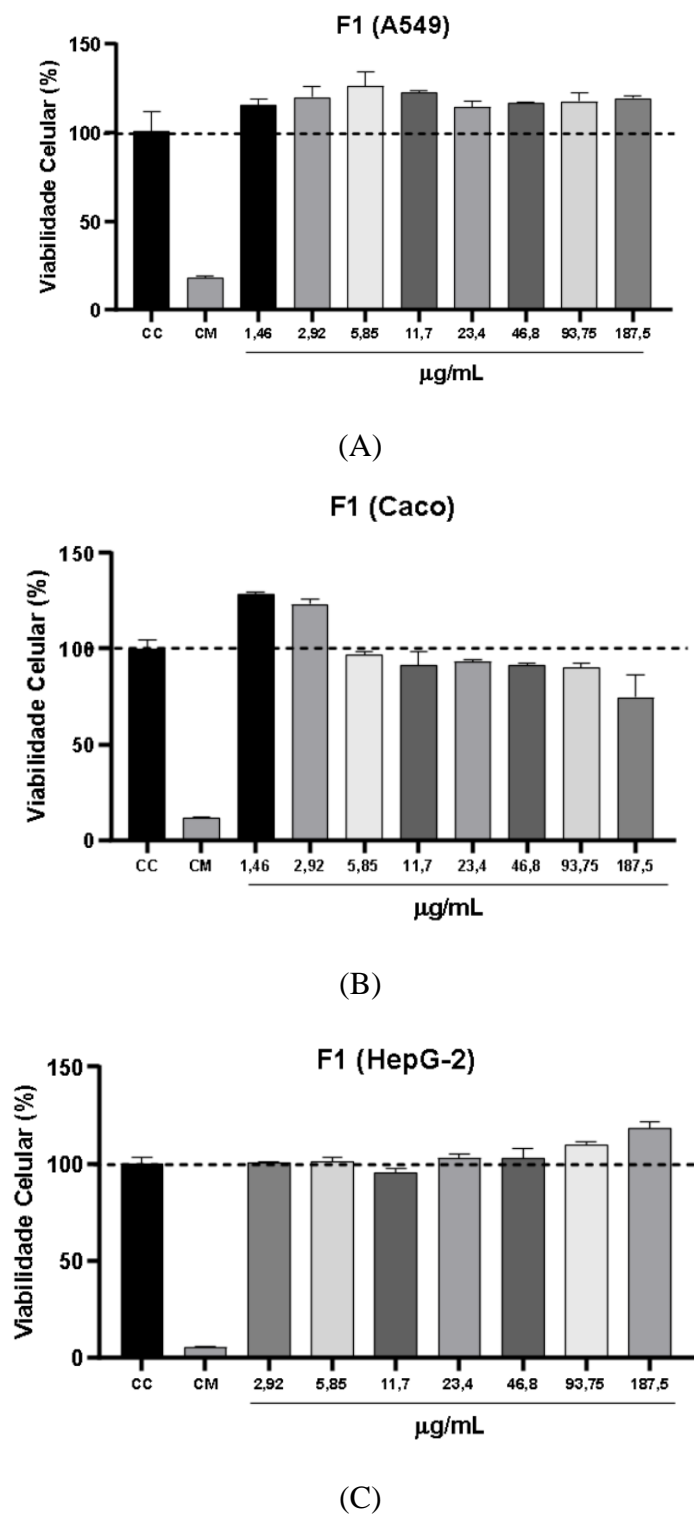
A extração adaptada da farmacopeia apresentou uma redução significativa na viabilidade das células Vero a partir de 375 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 19) e, por esse motivo, os ensaios seguintes foram iniciados com essa concentração. Nos ensaios com as culturas de células tumorais, os resultados foram mais interessantes nas células Caco, onde houve uma redução de 26% da viabilidade celular (Figura 20).

Figura 19: Ensaios utilizando a extração adaptada da Farmacopeia Brasileira. * A seta vermelha indica a concentração em que se iniciou os demais ensaios.



Fonte: O autor.

Figura 20: Ensaios usando a extração utilizando a extração da Farmacopeia Brasileira (2019): A: cultura celular A549; B: cultura celular Caco; C: cultura celular HepG-2



Fonte: O autor.

4.5. Planejamento do Composto Central (CCD)

Após a triagem, buscando o NADES com maior eficiência em extração e com os resultados dos ensaios biológicos, o NADES 2 foi o escolhido para a otimização do processo de extração por meio do Planejamento de Composto Central (CCD), com três variáveis independentes: razão material vegetal/NADES (m/m, onde: -1: 1:50; 0: 1:25; 1: 1:10); tempo de irradiação microondas (min, onde -1: 10 minutos; 0: 25 minutos; 1: 60 minutos); e temperatura (°C onde -1: 40°C ; 0: 50°C; 1: 60 °C) (Tabela 5).

Tabela 5: Planejamento de Composto Central.

Experimento	Variáveis Independentes			Média das áreas
	Razão de material vegetal: NADES (m/m)	Tempo de extração (min)	Temperatura (°C)	
1	1	-1	-1	8104557
2	-1	-1	-1	1588011
3	1	1	-1	3941659
4	-1	1	-1	2017075
5	1	-1	1	8287383
6	-1	-1	1	1933138
7	1	1	1	7702142
8	-1	1	1	1967795
PC1*	0	0	0	4122811
PC2*	0	0	0	3791479
PC3*	0	0	0	4230329
PC4*	0	0	0	4012762
PC5*	0	0	0	4330846

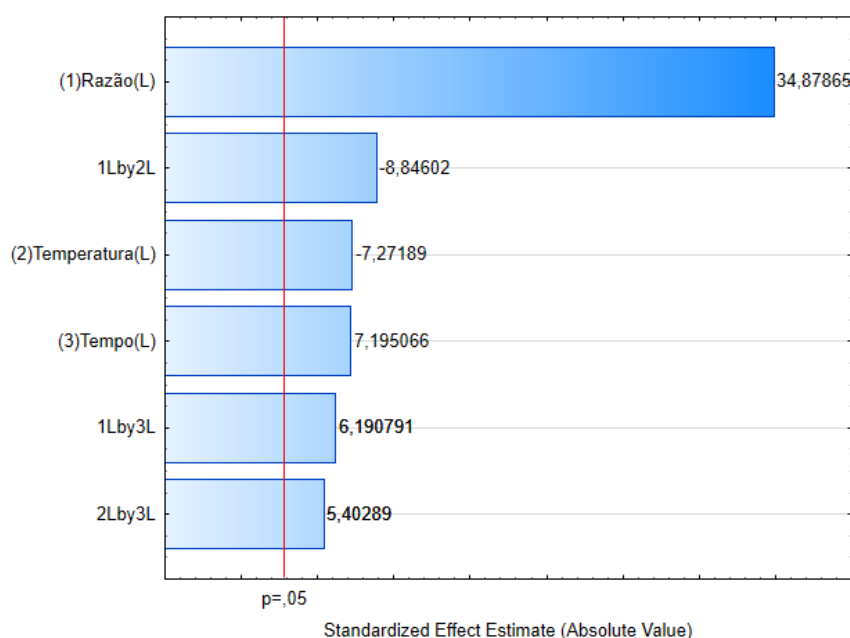
*Ponto central

Fonte: O autor.

A resposta das análises por CCD foi as áreas de picos referentes à cafeína presentes nos cromatogramas (Tabela 5), avaliada em um nível de significância de 95%.

Os resultados dos efeitos entre os parâmetros estudados mostraram um nível de confiança. E a ordem com a qual os fatores analisados afetam a extração são: razão de material vegetal/NADES (X1); temperatura (X3) e tempo (X2), também foram feitas integrações entre os três fatores analisados: razão de material vegetal/NADES e temperatura (1Lby2L); razão de material vegetal/NADES e tempo (1Lby3L); e temperatura e tempo (2Lby3L), conforme pode ser observado no Pareto do CCD (Figura 21).

Figura 21: Pareto do Planejamento do Composto Central (CCD).

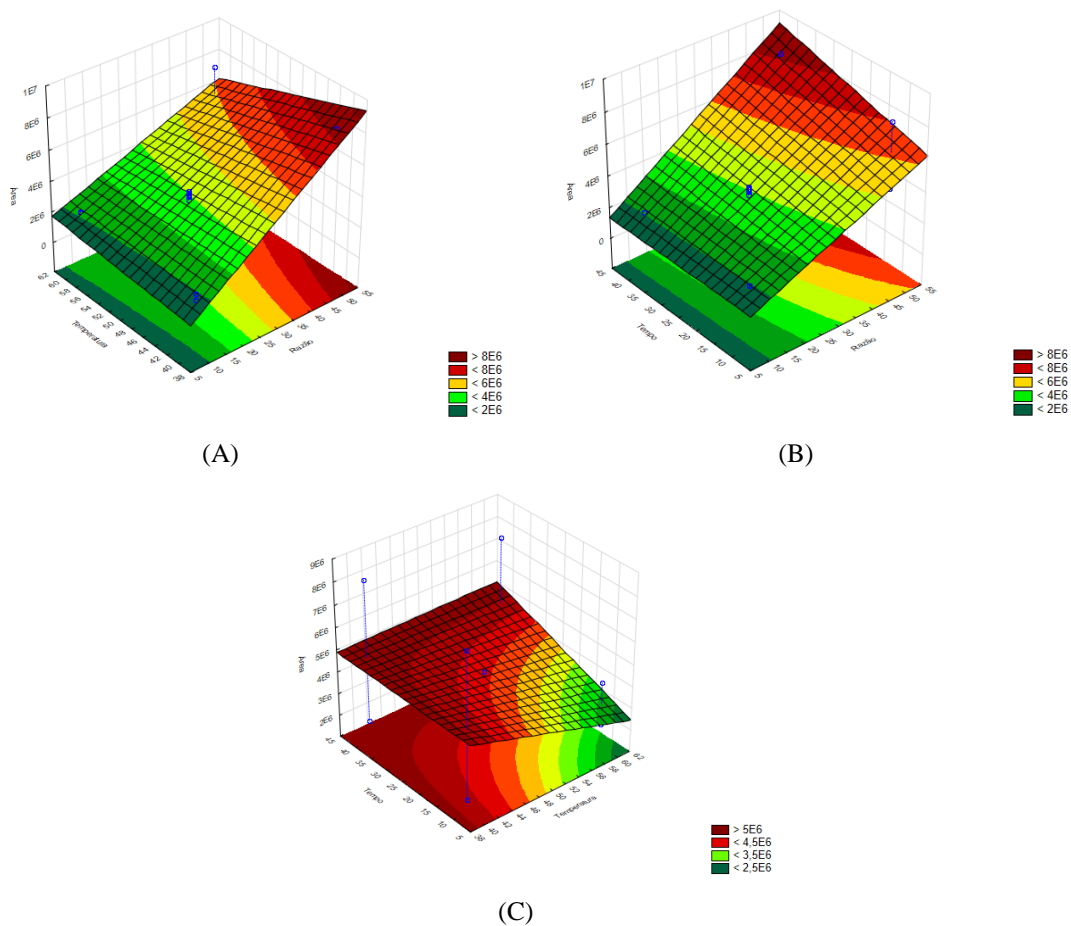


Fonte: O autor.

A partir do pareto, podemos afirmar que todos os fatores e suas integração são significativos para o desenvolvimento do CCD. O fator que mais influencia é a razão de material vegetal/NADES, seguida pela integração entre razão do material vegetal/NADES com a temperatura.

Deste modo, foi possível obter três superfícies de resposta (RSM) (Figura 22), onde é possível o início da curvatura para a chegada no ponto ótimo. Além disso, os gráficos conseguem mostrar os ajustes que ainda precisam ser feitos para encontrar o ponto ótimo, como aumentar a razão material vegetal/NADES e algumas leves alterações no tempo de extração.

Figura 22: A: Superfície de resposta temperatura/razão; B: Superfície de resposta tempo/razão; C: Superfície de resposta tempo/temperatura.



Fonte: O autor.

Tabela 6: Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estimado

Fonte de Variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F Calculado	F Tabelado	Teste	p-value	Teste
Regressão	65521750408	7	9360250058	86,68	4,88	Significativo	0,0001	Significativo
Resíduos	53995298895	5	1079905977					
Falta de Ajuste	36638916789	1	3663891678	8,44	7,71	Significativo	0,0439	Significativo
Erro Puro	17356382105	4	4339095526					
Total	66061703397	12						

Fonte: O autor.

Por meio da Análise de Variância (ANOVA), foi possível avaliar se o modelo calculado é realmente adequado para descrever os dados observados experimentalmente (Tabela 6). Além disso, a falta de ajuste ser significativa indica que a curvatura na superfície de resposta (Figura 22) precisa de mais ajustes e correções até atingir o ponto ótimo.

Por fim, o NADES 2, que foi escolhido para otimização, apresenta um grande potencial de se tornar um extrator ainda mais eficiente com alterações na razão material vegetal/NADES, tempo de extração e temperatura de extração.

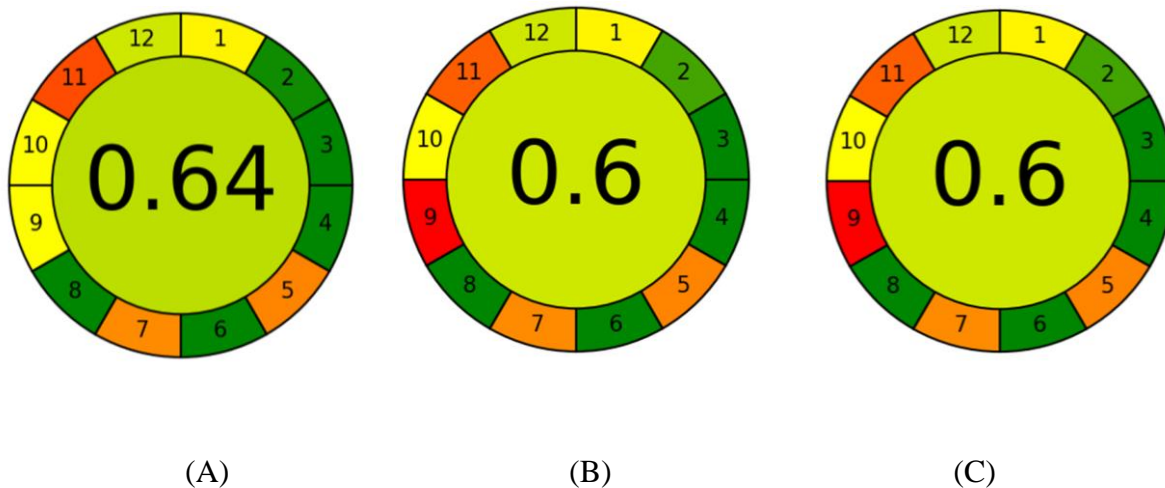
4.6. Caráter verde do NADES 2

O caráter verde do método desenvolvido foi avaliado por meio do AGREE (Analytical GREEnEss Metric, Pena-Pereira, Wojnowski, Tobiszewski, 2020), como foi citado na seção 3.9. Os 12 parâmetros analisados foram:

1. tratamento da amostra.
2. Tamanho das amostras.
3. Medições *in situ*.
4. Nº de etapas no preparo da amostra.
5. Nível de automação e miniaturização.
6. Derivação.
7. Gestão de resíduos.
8. Métodos multi-analíticos.
9. Uso de energia.
10. Reagentes utilizados.
11. Reagentes tóxicos.
12. Segurança do operador.

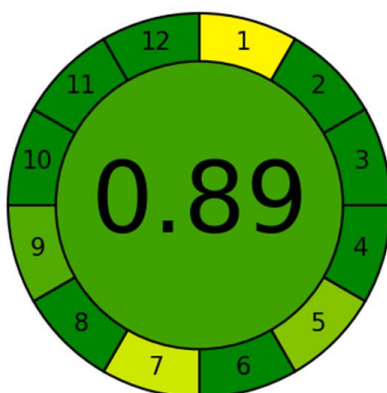
Após as análises, foram obtidos os seguintes pictogramas:

Figura 23 : A: Pictograma da extração 1 (Farmacopeia Brasileira, 2010); B: Pictograma da extração 2 (Roggia, 2020); C: Pictograma da extração 3 (Machado, 2018).



Fonte: O autor.

Figura 24: Pictograma do método de extração desenvolvido



Fonte: O autor.

Com a análise dos pictogramas é possível observar que o método de extração desenvolvido é bem mais sustentável, principalmente quando comparamos os parâmetros: cinco, sete, nove e onze, obtendo a pontuação final de 0,89. Enquanto os demais métodos variaram por volta dos 0,60.

5. CONCLUSÃO

Os NADES constituem um processo verde, eficiente e rápido para a obtenção de extratos ricos em cafeína do pó de semente de guaraná. Com destaque para o NADES produzido com Cloreto de Colina e Glicerol (1:2; mol/mol), que graças ao Planejamento de Composto Central pode ser otimizado para se tornar mais eficiente como um extrator. Também se mostram atóxico a linhagem VERO. E a partir das comparações feitas pelo AGREE, mostramos também que a metodologia desenvolvida é de baixo impacto ambiental em relação às outras metodologias testadas.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**, v.1, 5ª ed., Brasília, 2010.

ANASTAS, P. T., WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**, Oxford: Oxford University Press, 1998.

ÂNGELO, P. C. S. *et al.* Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 117–124, 2007.

BASILE, A. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32–36, out. 2005.

CHOI, Y. H. *et al.* Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? **Plant Physiology**, v. 156, n. 4, p. 1701–1705, 2011.

COSTA, G. N. O potencial neuroprotetor de frutos amazônicos: açaí (*Euterpe oleracea*) e guaraná (*Paullinia cupana*). **Ufsc.br**, 2021.

DAI, Y.; JAAP, S.; GEERT-JAN, W.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents as a new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**. v. 766, [s.n.], pp. 61-68, 2013.

DEBAS, H. T.; LAXMINARAYAN, R.; STRAUS, S. E. Complementary and Alternative Medicine. In: Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd ed. **World Bank**, Washington (DC); 2006.

FANALI, C. *et al.* Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 189, p. 113421, 2020.

FUKUMASU, H. *et al.* Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, n. 1, p. 158–164, 2006a.

FUKUMASU, H. *et al.* Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 862–867, 2006b.

FUKUMASU, H. *et al.* *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 305–310, 2008a.

FUKUMASU, H. Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008b.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 50, p. 78-84, 2013.

GOMEZ, F.J.V. *et al.* A Greener approach to prepare natural deep eutectic solvents. **ChemistrySelect**, v.3, n.22, pp.6122-6125, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola - lavoura permanente**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/0>>. Acesso em: 18 abr. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Amazônia Legal**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15819-amazonia-legal.html?=&t=sobre>>. Acesso em: 18. abr. 2022.

MACHADO, K. N. *et al.* A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). **Food Chemistry**, v. 239, p. 180–188, 2018.

MARQUES, L. L. M. *et al.* *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 77–110, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**, 2ª ed., Brasília, 2015.

MIRANDA, M. V.; METZNER, B. S. *Paullinia cupana*: revisão da matéria médica. **Revista de Homeopatia**, v. 73, n. 1/2, p. 1–17, 2015.

PACHECO-FERNÁNDEZ, I.; PINO, V. Green solvents in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 18, p. 42–50, 2019.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M.. AGREE—Analytical GREENess Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076-10082, 2020.

ROGGIA, I. *et al.* Guarana: stability-indicating RP-HPLC method and safety profile using microglial cells. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 94, p. 103629, 2020.

SANTANA, Á. L. *et al.* Pressurized liquid- and supercritical fluid extraction of crude and waste seeds of guarana (*Paullinia cupana*): Obtaining of bioactive compounds and mathematical modeling. **Food and Bioproducts Processing**, v. 117, p. 194–202, 2019.

SEBRAE. **O cultivo e o mercado do guaraná.** Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-guarana,969a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>>.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia.** Artmed. Grupo A, 2017.

SOUZA, O. A. *et al.* Combining natural deep eutectic solvent and microwave irradiation towards the eco-friendly and optimized extraction of bioactive phenolics from *Eugenia uniflora* L.. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 26, p. 100618, 2022.

YANG, H. *et al.* Caffeine suppresses metastasis in a transgenic mouse model: a prototype molecule for prophylaxis of metastasis. **Clinical e Experimental Metastasis**, v. 21, n. 8, p. 719–735, 2005.