

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ESTUDO DO APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE GUARANÁ
UTILIZANDO LIQUIDOS IÔNICOS E ADSORVENTES POLIMÉRICOS

Bolsista: Diego Castro Squinello, CNPq

MANAUS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL
PIB-E – 0058/2010
ESTUDO DO APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE GUARANÁ
UTILIZANDO LIQUIDOS IÔNICOS E ADSORVENTES POLIMÉRICOS

Bolsista: Diego Castro Squinello, CNPq
Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

MANAUS
2011

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Grupo de Pesquisa em Química de Biomoléculas da Amazônia – Q-BiomA e aos seus autores. Parte desse relatório só poderá ser utilizada para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa em Química de Biomoléculas da Amazônia – Q-BiomA

“Sem engenheiros não há desenvolvimento.”
Marcílio de Freitas

RESUMO

O guaraná, *Paullinia cupana* (Kunth) Var. *sorbilis* [(Mart.) Duke] é uma das mais utilizadas matérias-primas amazônicas ao redor da qual cresceu uma vasta indústria de refrigerante, suplementos energético, dietéticos e alimentares que gera anualmente toneladas de resíduo que além trazer problemas financeiros a quem o gera ainda causa problema ambiental caso disposto diretamente na natureza. Suspeita-se que nesse resíduo haja biomoléculas que uma vez extraídas e purificadas tem elevado valor de mercado, o objetivo deste trabalho foi investigar o resíduo de guaraná com foco em alcalóides e compostos fenólicos através de metodologias inovadoras, economicamente viáveis e amigáveis ao meio ambiente como é o caso dos líquidos iônicos, uma classe de solventes com características únicas como alta viscosidade e densidade, baixa pressão de vapor e estabilidade térmica e química que podem prontamente substituir os solventes orgânicos voláteis na extração e separação de matrizes orgânicas. Em paralelo também foi estudada a capacidade de adsorventes poliméricos para auxiliar na separação e/ou isolamento de substâncias orgânicas tendo a vantagem de um preço razoável uma vez que as resinas são recuperáveis e reutilizáveis e possibilidade de fácil aumento de escala, o que não acontece, por exemplo, com processos cromatográficos tradicionais onde o aumento de escala é problemático e nem sempre alcançado. Os resultados obtidos, embora preliminares, são bem promissores demonstrando um excelente comportamento dos líquidos iônicos utilizados em partições e elevada seletividade à biomolécula alvo, as resinas poliméricas apresentaram desempenho igualmente encorajadores a estudos mais aprofundados na área, tendo ainda a vantagem de serem utilizadas para separar moléculas de elevada polaridade que são difíceis de trabalhar com métodos clássicos, mas que são as preferidas das indústrias farmacêuticas graças a um longo histórico de atividades metabólicas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Guaraná	6
2.2. Líquidos Iônicos	7
3. MÉTODO	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	9
5. RREFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. INTRODUÇÃO

O guaraná, *Paullinia cupana* (Kunth) Var. *sorbilis* [(Mart.) Duke], é um arbusto da família *Sapindaceæ* originalmente endêmico da floresta Amazônica, principalmente na região do município de Maués no estado do Amazonas. O consumo desde tempos pré-colombianos por tribos indígenas como estimulante e, posteriormente, pela população em geral como suplemento dietético e estimulante das capacidades cognitivas fez crescer uma vasta indústria de bebidas em torno deste produto. Este caráter estimulante do guaraná é atribuído principalmente à cafeína presente no fruto, sendo um dos produtos com maior concentração desse alcalóide, de 2 a 8% em média.

A indústria de bebidas gera um grande volume de resíduo que ainda apresenta um potencial considerável para extração de produtos de interesse comercial como a própria cafeína, catequina, epi-catequina, entre outros e é justamente no estudo desses rejeitos que se baseia este trabalho, a fim de averiguar a viabilidade do seu aproveitamento para a obtenção de produtos de alto valor agregado a partir de uma matéria-prima abundante e barata.

Dentro deste contexto, o uso de líquidos iônicos (LI's), uma classe ainda pouco explorada de solventes que são caracterizados por sais de baixo ponto de fusão, no processo de extração dos produtos de interesse do resíduo de guaraná se apresenta como uma alternativa amigável ao meio ambiente, já que seu uso substitui o dos solventes orgânicos voláteis (SOV's) tradicionalmente utilizados e que causam grandes danos ao meio ambiente além de apresentarem potencial perigo à saúde de quem os manuseia.

As extrações até então desenvolvidas nesse trabalho se baseiam principalmente em sistemas bifásicos de partição, geralmente entre água e um LI ou um SOV, visando à obtenção principalmente de cafeína.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Guaraná

O guaranazeiro, *P. cupana* Var. *sorbilis*, é , como todas as espécies de seu gênero, uma liana tanto que seu nome deriva do termo indígena “*varana*” que significa árvore que sobe apoiada em outra, entretanto sob cultivo ele tende a se tornar um arbusto. Seus frutos crescem na forma de cachos de cápsulas deiscuentes de coloração vermelha contendo cada cápsula de uma a três sementes marrons³. As sementes são compostas principalmente por polissacarídeos, terpenos, compostos fenólicos, flavonóides, pectinas, traços de teofilina e teobromina e de 2 a 8% de cafeína⁴. É amplamente utilizado na medicina popular como estimulante, analgésico, antipirético, diurético, antioxidante, no combate à colesterolemia e a problemas digestivos^{5,6,7}. Devido a esse caráter estimulante uma ampla indústria de refrigerantes foi desenvolvida na região. Originalmente o guaraná é cultivado do estado do Amazonas, principalmente no município de Maués, onde a cultura é desenvolvida principalmente em pequenas propriedades caracterizando-se como importante fonte de renda às famílias da região, entretanto atualmente a Bahia é o maior produtor, embora a área plantada seja semelhante nos dois estados, a produtividade do guaraná baiano é bem superior à do amazonense^{5,6,8}.

2.2 Líquidos Iônicos

Em 1914 Paul Walden publicou no Boletim da Academia Imperial de Ciências de São Petersburgo um estudo sobre “a condutividade elétrica e, baseado na constante de capilaridade, o tamanho molecular de alguns sais orgânicos de amônio”⁹, onde ele discorreu principalmente sobre o nitrato de etilamônio, um sal produzido pela neutralização da etilamina com ácido nítrico concentrado e cujo ponto de fusão era aproximadamente 14°C, era o relato da descoberta de uma nova classe de líquidos¹⁰.

Originalmente definidos como qualquer sal com ponto de fusão inferior a 100°C¹¹, os líquidos iônicos são uma classe de solventes altamente polares constituídos inteiramente por íons, e com características muito específicas, como elevada densidade, desprezível pressão de vapor, alta estabilidade térmica e, em alguns casos, química, a maioria não é inflamável, salvo alguns compostos por anions nitrato e perclorato, e possuem uma ampla janela térmica¹². Na maioria dos casos são compostos por um cátion orgânico assimétrico substituído e contendo nitrogênio, como imidazólio, piridínio, pirrolidínio, e um ânion que pode ser orgânico, como nitratos e cloretos ou orgânico, que geralmente contém halogênios, como BF₄⁻, PF₆⁻, AlCl₄⁻, entretanto, devido à possível instabilidade e potencial toxicidade dos halogênios, vem sendo desenvolvidos LI's baseados em cátions livres deles¹³.

As propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos são influenciadas tanto pelo cátion quanto pelo ânion, o que gera uma infinidade de compostos diferentes com características especificamente planejadas, como densidade, miscibilidade em água ou em certos solventes orgânicos, sendo inclusive chamados de “solventes modeláveis”¹¹⁻¹³.

Devido a essas características peculiares os líquidos iônicos têm uma empregabilidade muito ampla. As primeiras aplicações relatadas foram como solvente para celulose e eletrólitos para baterias, não obtendo, contudo, grande aceitação para esses fins¹⁰. Industrialmente os principais usos são como meios reacionais ou catalisadores, lubrificantes, agentes dispersantes, entre muitas outras. Em análise são usados como fase estacionária em cromatografia gasosa e cromatografia líquida, aditivos para eletroforese capilar, solventes para análises espectrométricas¹⁰⁻¹³. Outra aplicação ainda pouco explorada desses notáveis solventes é a extração, principalmente através de extrações líquido-líquido e partições em sistemas bifásicos com água ou solventes orgânicos e é esta a principal aplicação dos líquidos iônicos neste trabalho.

2.3 Adsorventes Poliméricos

Dentre os principais métodos utilizados na separação de substâncias orgânicas aqueles baseados nos processos de adsorção e dessorção são os mais utilizados, sendo a cromatografia o mais amplo deles seja a adsorção feita em sílica ou em fases estacionárias funcionalizadas para operarem com maiores polaridades.

Um ramo ainda pouco explorado nesse sentido são as resinas adsorventes macroporosas, que são polímeros com elevado número de *cross-links*, não funcionalizados, isto é, não possuem características iônicas e possuem poros permanentes amplos, geralmente maiores que 50Å.¹⁶

A resina utilizada nesse trabalho foi o XAD-4, cuja estrutura e espectro infravermelho são apresentados abaixo.

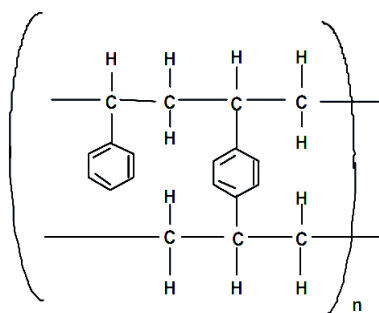


Figura 1: Estrutura do XAD-4

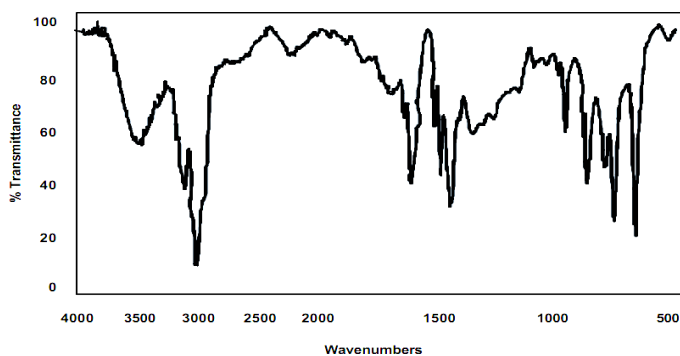


Figura 2: Espectro infravermelho do XAD-4

3. MÉTODO

As amostras foram coletadas na empresa Sulamérica Concentrados e caracterizam-se como resíduo 1, proveniente de extração sucessiva com etanol a 70% e a quente; resíduo 2, proveniente de extração sucessiva com etanol a 60% e material *in natura*, sementes de guaraná torradas. Os resíduos foram secos em estufa com circulação de ar forçada a 40°C por aproximadamente 12h para eliminar a umidade remanescente do processo extrativo industrial.

Os líquidos iônicos utilizados, a saber, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIMPF₆) e o tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIMBF₄), são sintetizados pelo Prof. Dr. Éder João Lenardão e seus colaboradores no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da Universidade Federal de Pelotas – LASOL/UFPEL.

Visando a extração de cafeína do resíduo de guaraná foram testadas as metodologias que utilizam solventes orgânicos voláteis descritas por: MITCHEL, SCOTT & WEST, 1974; BATTERSBY *et al.* 1974; WOLTER FILHO *et al.* 1985; DJILANI *et al.* 2006, uma metodologia encontrada sem autor definido utilizando CaCO₃ e duas extrações em soxhlet seguidas de partição para obtenção da fração alcaloídica totalizando sete extrações ao todo.

As sete frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) comparando-se o fator de retenção das amostras com o padrão de cafeína. para identificar qual a mais eficiente na extração seletiva da cafeína.

Com o material *in natura* procederam-se principalmente extrações utilizando-se LI, uma vez que o rendimento esperado para estas é maior. Os LI's são introduzidos nas partições substituindo os SOV's, em seguida a amostra é extraída do líquido iônico com uma solução fracamente ácida, obtendo-se ao final uma fração aquosa que pode ser concentrada por evaporação ou liofilização.

A metodologia empregada para a separação de flavonóides utilizando adsorventes poliméricos foi adaptada de LIANDA & CASTRO, 2008.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Rendimento das frações alcalóidicas obtidas por metodologias utilizando SOV's

Metodologia	1	2	3	4	5	6	7
Resíduo 1	0,04%	0,27%	0,35%	0,54%	-	-	-
Resíduo 2	-	-	0,58%	-	0,19%	0,53	0,20%

A metodologia de extração 1 rendeu uma fração aparentemente de pureza elevada entretanto o rendimento foi baixo, o extrato 3 se apresentou também bastante puro sendo que num teste para a mesma metodologia com o resíduo 2 o rendimento foi maior provavelmente devido à melhor execução do método e não necessariamente por este conter maior quantidade de cafeína que aquele.. A metodologia 4 apresentou o maior rendimento para as metodologias testadas no resíduo 1, entretanto o extrato final aparenta conter impurezas. As metodologias de 2 e de 5 a 7 apresentaram-se bastante seletivas apresentando produtos finais aparentemente de elevada pureza. Os resultados demandam ainda uma análise por métodos cromatográficos de melhor resolução como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por exemplo. Abaixo é mostrada a placa cromatográfica comparando o padrão de cafeína (P) com os resultados das 4 primeiras metodologias (1-4), o sistema de eluição foi clorofórmio/metanol 9:1 e o revelador foi o Reagente de Dragendorff.



Figura 3: CCD comparando resultados com o padrão de cafeína

As extrações que utilizam solventes voláteis, ainda que o fator ambiental não seja favorável se caracterizam como um importante resultado, haja vista que foi obtido de forma relativamente simples e fácil um produto de alto valor de mercado de uma matéria prima praticamente sem valor algum, entretanto a utilização de solventes halogenados que, além de serem caros, são extremamente nocivos ao meio ambiente e potencialmente danosos à

saúde daqueles que trabalham com eles, torna essa uma alternativa de destino aos resíduos de guaraná menos viável econômica e ecologicamente e, portanto, dificilmente praticável se forem levados em conta os custos de operação.

Dentre os líquidos iônicos disponíveis somente o BMIMPF₆ mostrou-se efetivo, pois o BMIMBF₄ é miscível em água e em solventes mais polares e uma vez que se parta de extratos aquosos partições com ele não são possíveis. Das extrações procedidas com líquido iônico uma foi derivada da metodologia descrita por MITCHEL, SCOTT & WEST, 1974 e obteve rendimento de 0,55%, que é considerado muito baixo, pois para o guaraná os rendimentos de cafeína esperados são acima de 2%. A outra metodologia testada foi a partir de um extrato etanólico e obteve um rendimento de 2,7% sendo este bastante satisfatório.

Foi possível verificar também o comportamento dos LI's em partições, devido à sua alta densidade e viscosidade as emulsões formadas durante a agitação se separam rapidamente e as perdas de material devido a esse fator são muito reduzidas, mesmo quando se trabalha em pH elevado, que usualmente formam emulsões de difícil separação. Fica assim comprovada a eficácia dos líquidos iônicos como extratores altamente seletivos e ainda por cima amigáveis ao meio ambiente.

A separação de flavonóides partiu de um extrato etanólico obtido em aparelho soxhlet e foram colhidas 7 frações pela eluição da coluna com amostra adsorvida em Amberlite® XAD-4 com os seguintes sistemas: solução ácida para remoção de açúcares e compostos de caráter básico, como a cafeína por exemplo, em seguida água destilada, etanol a 50%, metanol, acetona, etanol 100% e acetato de etila. As três últimas frações foram colhidas mais no sentido de ajudar na limpeza da coluna, uma vez que a resina é recuperável, do que de fato na separação da amostra e demandam estudos posteriores. Após a eluição a resina foi “desempacotada” da coluna e submetida a uma hora de ultrassom imersa em solução de KOH para ajudar também na limpeza e recuperação da mesma, a mistura foi filtrada e o filtrado foi recolhido para investigação posterior.

Abaixo é mostrada a placa cromatográfica com as 5 frações orgânicas na seguinte ordem: acetato de etila, etanol 100%, acetona, metanol, etanol 50%. A placa foi eluída em acetato de etila/metanol 1:1 e revelada em iodo e vanilina sulfúrica.

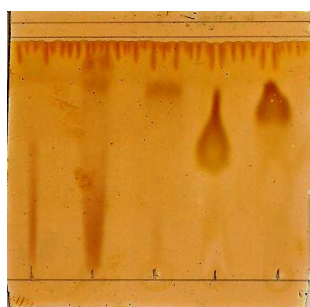


Figura 4: CCD revelada em iodo.

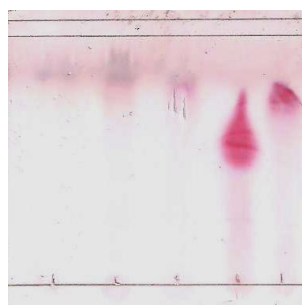


Figura 5: CCD revelada em vanilina sulfúrica.

As frações em etanol a 50% e metanol apresentaram *spots* parecidos então foi feita uma nova placa (figura 6) somente das duas e esta foi revelada em cloreto férrico que é um revelador específico para compostos fenólicos como são os flavonóides esperados no guaraná, e apresentam coloração azulada em caso positivo.



Figura 6: CCD revelada em cloreto férrico.

Como se pode observar nas placas a resina obteve sucesso na separação dos compostos fenólicos do extrato bruto, entretanto ainda é necessário investigar a identidade dos compostos separados.

5. CONCLUSÃO

A metodologia descrita no presente trabalho para a extração de alcalóides utilizando líquidos iônicos mostrou-se um sucesso, sobretudo no caso específico estudado uma vez que a extração mostrou-se seletiva à cafeína. Além disso, trata-se de um método que, quando comparado ao uso de SOV's principalmente o halogenados, é muito menos ofensivo ao meio ambiente e tem grande potencial econômico uma vez que o líquido iônico pode ser facilmente recuperado e reutilizado no mesmo processo ou até mesmo em processos diferentes enquanto os solventes halogenados, além de danosos ao ambiente, são caros e dificilmente podem ser reutilizados, somente em alguns casos em que se trate exatamente da mesma matéria-prima, mesmo método utilizado e mesmo produto objetivado.

Outrossim, o uso do adsorvente polimérico também mostrou resultados promissores apesar da incipiência das análises levadas a cabo. Trata-se de um material de custo razoável e que pode ser totalmente recuperado para utilizações posteriores nos mais variados processos, é de fácil conservação e armazenamento, possui uma ampla janela de condições de trabalho seja em temperatura, pH ou sistema de solvente. Além disso, as resinas são utilizadas principalmente na separação de compostos mais polares que são de grande interesse em ensaios farmacológicos e na indústria de cosméticos, mas que são pouco trabalhados na fitoquímica clássica devido à limitações metodológicas.

Apresentam-se a partir daqui oportunidades de aprofundamento no estudo dos resíduos industriais de guaraná, do qual se tem grandes volumes causando problemas ambientais e financeiros às empresas que os geram, utilizando-se metodologias inovadoras, economicamente viáveis e ecologicamente corretas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DALLWITZ, M.J. & WATSON, L. **The families of flowering plants: Sapindaceae Juss.** Disponível *on line* em: <http://delta-intkey.com/angio/www/sapindac.htm> Acesso em 22/01/2001.
2. WECKERLE, C.S.; STUTZ, M.A.; BAUMANN, T.W. **Purine Alkaloids in *Paullinia*.** *Phytochemistry* 64 (2003) 735-742.
3. ASTOLFI-FILHO, S.; ANGELO, P.C.S.; NUNES-SILVA, C.G.; BRÍGIDO, M.M. *et. Al.* **Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilbis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome.** *Plant Cell Reports* (2008) 27:117-124
4. RATES, S.M.K. **Metilxantinas.** in: SIMÕES, M.O. *et al.* **Farmacognosia, da planta ao medicamento** cap. 33 p. 723-738. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC, 1999.
5. CAVALCANTE, P.B. **Frutas Comestíveis da Amazônia.** 3 ed. Belém/PA: Insituto Nacional de Pesquisa do Amazonas, 1976. 166pp.
6. CRUZ, G.L. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil.** 5 ed. Rio de Janeiro/RJ: Bertrand, 1995. 600pp.
7. SILVA, G.W.; CORTESI, N.; ROVELLINI, P. **Il guarana dei Saterés Maués dell'Amazzonia brasiliana.** Nota I. caratterizzazione chimiche e fisiche. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 77 (2000) 31-36.
8. BERG, M.F. van den. **Plantas Medicinai na Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático.** Belém/PA: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PTU), 1982. 223pp.
9. WALDEN, P. *Bull. Acad. Impér. Sci. St. Pétesburg*, 1914, 8, 405-422.
10. PLETCHKOVA, N.V. & SEDDON, K.R. **Applications of ionic liquids in the chemical industry.** *Chemical Society Reviews*. 2008, 37, 123-150.

11. POOLE, C.F. & POOLE, S.K. **Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids.** Journal of Chromatography A. 1727 (2010) 2268-2286.
12. HAN, X. & ARMSTRONG, D.W. **Ionic Liquids in separations.** Accounts of Chemical Research. 2007, 40, 1079-1086.
13. LIU, R.; LIU, J.; YIN, Y.; HU, X.; JIANG, G. **Ionic liquids in sample preparation.** Anal. Bioanal. Chem. (2009) 393: 871-883.
14. MITCHEL, R.H.; SCOTT, W.A.; WEST P.R. **Extraction of caffeine from tea.** Journal of Chemical Education, vol. 51, #1, january 1974
15. BATTERSBY, A.R.; BRADBURY R.B.; HERBERT R.B.; MUNRO M.H.G.; RAMAGE, R. **1-Phenethylisoquinoline Alkaloids. Part IV. Isolation, structural elucidation and synthesis of c-Homoaporphines.** Journal of the Chemical Society Perkin I, 1974, p 1394-1399
16. LIANDA, Regina Lúcia Pelachim & CASTRO, Rosane Nora. **Isolamento e Identificação da Morina em Mel brasileiro de *Apis mellifera*.** Quím. Nova, Vol. 31, No.6, 1472-1475, 2008
17. LI, Jing & CHASE, Howard A. **Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources.** Nat.Prod.Rep.,2010, 27,1493–1510
18. Amberlite® XAD-4 Industrial Grade Polymeric Adsorbent Product Data Sheet by Rohm and Haas/Ion Exchange Resins - Philadelphia, Pa, USA. 2003

