

VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ERVA-MATE

HEITOR FLORES LIZARELLI ^{1*}, CAROLINE PLANSKI MARIA², DAVID
FERNANDO DOS SANTOS², VANIA ZANELLA PINTO³

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), é uma espécie vegetal de ocorrência nativa na América do Sul, pertence à família botânica Aquifoliaceae e comumente cultivada e comercializada na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. São elaborados chás, bebidas, e cosméticos a partir de suas folhas e talos finos processados. As bebidas são consumidas como infusão com água fria ou quente, denominadas de diferentes formas nos países onde é consumida (DARTORA et al., 2011; DELADINO et al., 2008).

Este vegetal se destaca por apresentar teores elevados de compostos fito-químicos de seu metabolismo secundário, como alcaloides (cafeína), flavonoides (rutina), terpenóides, xantinas, e principalmente ácidos fenólicos e ácidos clorogênicos, como ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 5-cafeoilquínico (5CQA), ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-DQA), ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DQA) e ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DQA) (BERTÉ; RUCKER; HOFFMANN-RIBANI, 2011).

Uma das técnicas que se destacam na química analítica por sua capacidade de analisar quantitativa e qualitativamente amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e de alimentos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), apresentando excelente precisão, exatidão e repetibilidade (RIBANI et al., 2004).

2 OBJETIVOS

Quantificar os compostos majoritários presentes no extrato de erva-mate para a validação do método cromatográfico empregado.

1 Graduando do curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul.

*E-mail para contato: heitor.lizarelli@outlook.com

2 Graduando (a) do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul.

3 Doutora, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul, **Orientadora**.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

A erva-mate foi obtida a partir de amostras comerciais tipo chimarrão, sem açúcar adquiridas no comércio local de Laranjeiras do Sul, Paraná. As folhas e ramos foram separadas em uma peneira de 20 mesh, selecionando apenas a porção com folhas para a produção do extrato de erva-mate.

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento e validação do método cromatográfico, foram metanol e ácido fórmico, ambos, grau HPLC e água ultrapura. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido (HPLC) acoplado a um detector de UV-VIS e um detector de massas com ionização por electrospray de quadrupolo simples (ESI) (SHIMADZU, Tóquio, Japão). Para a curva analítica, o ácido clorogênico (3-CQA) foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Co. St Louis, MO, USA.

3.2 Preparo do extrato

O extrato de erva mate foi obtido a partir de metodologia prévia (KNAPP et al., 2019) e mantido em conservação em frasco de cor âmbar em ambiente refrigerado a 4°C para imediata análise. Os extratos foram preparados em triplicata utilizando 100000 µL do solvente (água:etanol, 1:1, v/v) com massa aproximada de 12 g de erva-mate, seguido de maceração a 50 °C por 5h e filtrados em papel filtro de média porosidade. Os extratos foram filtrados novamente em filtro de membrana de PVDF com porosidade de 0,22 µm e previamente diluídos, homogeneizados e injetados no HPLC.

3.3 Preparo das amostras analíticas do extrato

Os limites de quantificação e detecção do método analítico foram determinados utilizando diferentes concentrações do extrato. As concentrações de 16666,6; 6666,6; 5000 e 3333,3 ppm foram analisadas.

3.4 Condições cromatográficas

A identificação e quantificação dos compostos majoritários presentes no extrato de erva-mate foi realizada empregando um cromatógrafo líquido (HPLC) (SHIMADZU, Tóquio, Japão) equipado com injetor automático, detector de arranjo de diodos, e detector de massas (MS-ESI) bomba binária e um injetor automático, localizado no laboratório de Central Analítica da UFFS-LS e utilizado com auxílio da equipe do *Biopack & Food Tech Lab*.

A separação dos compostos foi realizada através de uma coluna C18, de 25 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 μm de tamanho de partícula (NST, Santos, Brasil). A fase móvel foi composta por água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (B) em um sistema de eluição gradiente. A eluição foi conduzida por sistema de gradiente linear iniciando com 14% de B, seguido de 45% de B aos 16 min. 100% de B entre 16 e 17 min para limpeza da coluna. Dos 17 aos 22 minutos a coluna foi recondicionada com 14% B para a próxima injeção. O fluxo da fase móvel foi de $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ (PILATTI-RICCIO et al., 2019).

A identificação dos compostos foi realizada utilizando detector MS-ESI e por comparação com padrões através do tempo de retenção. A quantificação foi realizada pelo detector de arranjo de diodos (SPD-20^a/20AV, Shimadzu, Kyoto, Japan) em 325 nm. A quantificação dos isômeros 3-CQA, 4-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA foi realizada a partir da curva analítica padrão de 5-CQA (PILATTI-RICCIO et al., 2019). Os limites de detecção e quantificação da curva analítica foram determinados conforme Pilatti-Riccio et al., (2019), com 3 e 6 vezes a altura do ruído do sinal respectivamente.

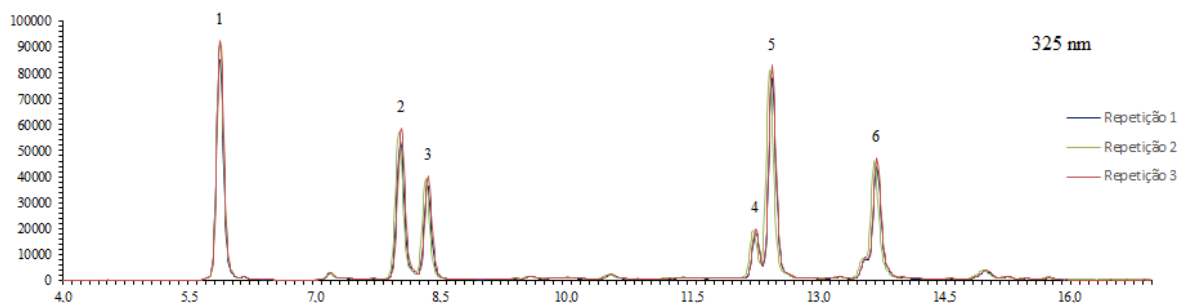
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da elaboração do extrato em triplicata e o estudo das diluições para apropriada quantificação de acordo com a curva padrão analítica previamente elaborada para análise por cromatografia líquida de alta eficiência foram encontrados picos próximos e abaixo da curva padrão. Desta forma, a diluição de 5000 ppm do extrato foi apropriada para a quantificação dos compostos.

Na Figura 1, é demonstrado o cromatograma dos picos das três repetições dos extratos em função do tempo de análise e consequente retenção dos compostos. A partir deste, é apresentado que as condições analíticas forneceram uma separação adequada dos isômeros do ácido clorogênicos, permitindo a adequada quantificação. Os compostos fenólicos que se destacaram no extrato de erva-mate realizado a partir da metodologia de Knapp et al. 2019, foram 3-CQA, 3,5-DQA, 5-CQA, 4,5-DQA, 4-CQA e 3,4-DQA, que estão de acordo com Da Silveira et al., (2016) e Pilatti-Riccio et al., (2019).

Figura 1 – Cromatograma dos principais compostos fenólicos do extrato de erva-mate em três repetições. Leituras de absorbância em 325 (nm). Compostos: 1: ácido 3-cafeoilquini-

co (3-CQA), 2: ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), 3: ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), 4: ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-DQA), 5: ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DQA) e 6: ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DQA).



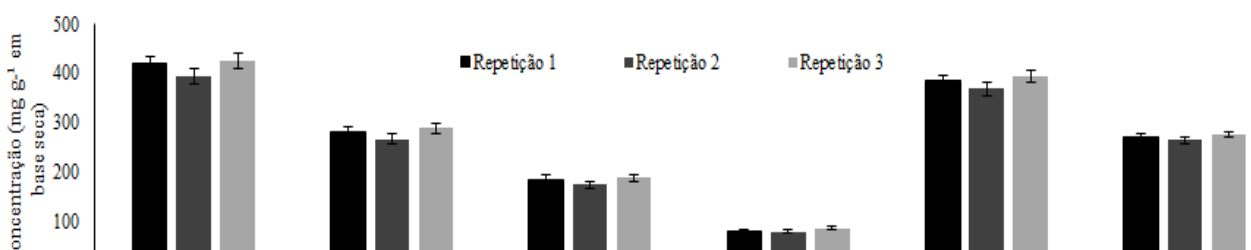
Fonte: os autores (2021)

Os compostos 3-CQA, 5-CQA, 4-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA foram identificados no extrato de erva-mate conforme descrito por Pilatti-Riccio et al., (2019) e apresentaram concentrações abaixo das descritas pelos autores. Este resultado ocorre pois os resultados de Pilatti-Riccio et al., (2019) estão expressos em g de extrato liofilizado enquanto os resultados deste trabalho estão expressos em g de erva-mate.

A utilização do solvente etanol:água para extratos de erva-mate, proporciona uma extração de compostos fenólicos mais eficiente que água pura ou etanol absoluto (PINTO et al., 2021). Assim, os compostos 5-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA apresentaram concentrações superiores quando comparados às concentrações encontradas por Da Silveira et al., (2016).

Na Figura 2, são demonstradas as concentrações dos principais compostos fenólicos presentes no extrato de erva-mate, de cada repetição individualmente. As maiores concentrações verificadas foram do composto ácido 3-cafeoilquínico seguido do dímero 3,5-dicafeoilquínico, o que também foi observado em outros estudos (PILATTI-RICCIO et al., 2019). Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as repetições dos extratos analisados para cada composto individualmente, demonstrando a precisão do método.

Figura 2 – Concentração dos compostos fenólicos de cada repetição das amostras do extrato de erva-mate, intervalo de confiança a 95% de confiança.





Fonte: os autores (2021)

5 CONCLUSÃO

Os compostos 5-CQA, 3-CQA, 4-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA foram identificados e quantificados no extrato de erva-mate produzidos com solvente etanol:água (1:1, v/v), demonstrando soma total de 16,09 mg.g⁻¹ de erva mate seca. Não houve diferença estatística entre nenhuma das repetições do extrato, o que demonstra precisão do método de extração e no analítico utilizado para a quantificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTÉ, K.; RUCKER, N.; HOFFMANN-RIBANI, R. **Yerba maté *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.** *Phytotherapie*, v. 9, n. 3, p. 180–184. 2011.

DA SILVEIRA, T. F. F. et al. Phenolic compounds from yerba mate based beverages - A multivariate optimisation. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1159–1167, 2016.

DARTORA, N. et al. **UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing.** *Food Chemistry*, v. 129, n. 4, p. 1453–1461. 2011.

DELADINO, L. et al. **Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*.** *Carbohydrate Polymers*, v. 71, n. 1, p. 126–134. 2008.

KNAPP, M. A. et al. **Yerba mate extract in active starch films: Mechanical and antioxidant properties.** *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 43, n. 3. 2019.

PILATTI-RICCIO, D. et al. Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. **Food Research International**, v. 125, n. July, p. 108600, 2019.

PINTO, V. Z. et al. Phytochemical composition of extracts from yerba mate chimarrão. **SN Applied Sciences**, v. 3, n. 3, 2021.

RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Quim. Nova*. [s.l: s.n.]. 2004

Palavras-chave: HPLC; erva-mate; *Ilex paraguariensis*; cromatografia líquida; quantificação.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2019-0247.

Financiamento: Fundação Araucária.