

## OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA EXTRAÇÃO DE 3-CAFEOLQUÍNICO DE RESÍDUO DA PODA DE COLHEITA DA ERVA-MATE

ALEXANDRE LORINI<sup>1</sup>; FERNANDA MATEUS DAMIN<sup>2</sup>, ROSANE LOPES CRIZEL<sup>1</sup>, FÁBIO CLASEN CHAVES<sup>1</sup>, ADRIANA DILLENBURG MEINHART<sup>1</sup>; VANESSA GALLI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – alexandrelorini@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* (também conhecida como erva mate) é uma planta bastante cultivada no Rio Grande do Sul. É empregada principalmente, na produção de chá mate, tererê e chimarrão. Diversos estudos vêm mostrando que as folhas da planta possuem elevada quantidade de ácido 3-cafeoilquínico (BALZAN et al., 2013; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; DE SOUZA et al., 2011), o qual apresenta várias atividades biológicas já comprovadas (ALI et al., 2017; BAEZA et al., 2016; CHO et al., 2010; EKBATAN et al., 2018; MATSUNAGA et al., 2002).

Durante a poda de colheita da erva-mate para a obtenção das folhas é necessário realizar uma poda para reduzir a altura do herbal a fim de facilitar a próxima colheita. Essa poda resulta na remoção de talos grossos da planta (maiores que 10 mm de diâmetro) os quais não são utilizados no fabrico dos produtos comerciais. Seu destino tem sido apenas a adubação ou produção de energia em caldeiras. O montante de resíduo gerado varia entre 2 e 5 toneladas por hectare (PAGLIOSA, 2009).

Considerando que as folhas de erva-mate são ricas em 3-cafeoilquínico é possível que o resíduo também inclua este composto na sua composição. Sabendo-se da elevada quantidade de resíduo gerado, torna-se necessário investigar melhor sua composição a fim de encontrar formas de empregar este recurso natural em produtos alimentícios e/ou farmacêuticos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença do ácido 3-cafeoilquínico no resíduo da poda de colheita da erva-mate e realizar a otimização multivariada para obter um extrato comestível rico neste composto.

### 2. METODOLOGIA

#### Amostragem

Para este estudo foram utilizadas amostras de folhas e resíduo obtidos em Machadinho, RS. A amostra de *Ilex paraguariensis* foi obtida da cultivar Cambona 4, em campo de cultivo desenvolvido em pleno sol. A amostragem foi aleatória em árvores plantadas na extensão de um hectare. As amostras foram aquecidas em estufa com circulação de ar à 180°C por 5 minutos para inativação enzimática. Em seguida, a parte externa do resíduo foi separado para parte interna. As folhas, a parte interna do resíduo e a parte externa foram liofilizados, moídos até 20 mesh e analisados.

#### Extração exaustiva

O método de preparo de amostra foi realizado conforme descrito por (THITIMUTA et al., 2017) com modificações. Foram pesados, em tubo falcon de

50 mL, 0.5 g de amostras seguido da adição de 10 mL de metanol:água (80:20). Os tubos foram mantidos em banho-maria sob temperatura de 30°C, por 15 minutos e agitação de 800 rpm. O solvente foi recolhido e o extrato sólido foi submetido ao mesmo processo por mais duas vezes. Os extratos líquidos foram juntados, o volume foi aferido, o extrato foi filtrado em membrana de nylon de porosidade de 0.22 µm e submetido a análise.

#### Otimização multivariada da obtenção de extrato comestível

Foi realizado um planejamento multivariado  $2^3$ , com pontos centrais e axiais, para otimização da extração de compostos fenólicos, onde avaliou-se os efeitos da proporção de solvente de extração (0 a 100% de etanol), tempo de extração (5 a 60 minutos) e temperatura de extração (30 a 85°C). Os dados foram analisados utilizando o software Statistica 6.0 da StatSoft (Tulsa, EUA).

#### Análise cromatográfica do ácido 3-cafeoilquínico

Para separação dos compostos foi empregado um cromatógrafo líquido de alta eficiência e a identificação dos compostos foi confirmada por um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo com ionização por eletrospray. O método foi validado seguindo as orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (BRASIL, 2017) e da International Union of Pure and Applied Chemistry (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Extração exaustiva

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de ácido 3-CQA encontrados nas folhas, parte externa e interna.

Tabela 1. Concentração de ácido 3-CQA nas partes da planta (g 100 g<sup>-1</sup>)

Folhas	Parte externa	Parte interna
5,5	4,6	0,015
5,8	3,9	0,014
5,6	4,6	0,013

As folhas apresentaram as maiores concentrações de ácido 3-CQA, contudo a parte externa do resíduo revelou ser uma fonte potencial, visto que as concentrações observadas é superior a 64 frutas (MEINHART et al., 2019) e 99 plantas comercializadas no Brasil (MEINHART et al., 2017). Considerando que a parte externa apresentou elevada quantidade, esta foi empregada para obter um extrato comestível rico em 3-CQA.

#### Otimização multivariada da obtenção de extrato comestível

A Tabela 2 apresenta os valores observados em cada uma das combinações do planejamento  $2^3$ . O comportamento das variáveis foi descrito adequadamente por um modelo quadrático, que apresentou ajuste adequado, regressão significativa e dispersão de resíduos aleatória. Na figura 1 estão apresentadas as superfícies de respostas que descrevem o comportamento das variáveis.

O modelo foi empregado para prever a condição ótima de extração, encontrada quando as variáveis são combinadas da seguinte maneira: -1,27 (11,7 min), 0,87 (71,7°C) e -0,58 (32,7% etanol). Nesta condição é possível obter a extração de 4,2 g 100 g<sup>-1</sup>, valor significativamente superior ao observado para outras matrizes (MEINHART et al., 2017, 2019).

Tabela 2. Concentração de ácido 3-cafeoilquínico nos 17 níveis do planejamento multivariado 2<sup>3</sup> (g 100 g<sup>-1</sup>)

Tempo (min)	Temp. (°C)	Etanol (%)	Ácido 3-cafeoilquínico
1 (48,9)	1 (73,9)	1 (79,8)	3,2
1 (48,9)	1 (73,9)	-1 (20,2)	3,3
1 (48,9)	-1 (41,1)	1 (79,8)	2,9
1 (48,9)	-1 (41,1)	-1 (20,2)	2,0
-1 (16,1)	1 (73,9)	1 (79,8)	3,0
-1 (16,1)	1 (73,9)	-1 (20,2)	3,9
-1 (16,1)	-1 (41,1)	1 (79,8)	2,8
-1 (16,1)	-1 (41,1)	-1 (20,2)	2,6
1,68 (60)	0 (57,5)	0 (50)	3,3
-1,68 (5)	0 (57,5)	0 (50)	4,2
0 (32,5)	1,68 (85)	0 (50)	3,8
0 (32,5)	-1,68 (30)	0 (50)	3,2
0 (32,5)	0 (57,5)	1,68 (100)	0,8
0 (32,5)	0 (57,5)	-1,68 (0)	0,4
0 (32,5)	0 (57,5)	0 (50)	3,2
0 (32,5)	0 (57,5)	0 (50)	3,9
0 (32,5)	0 (57,5)	0 (50)	4,0

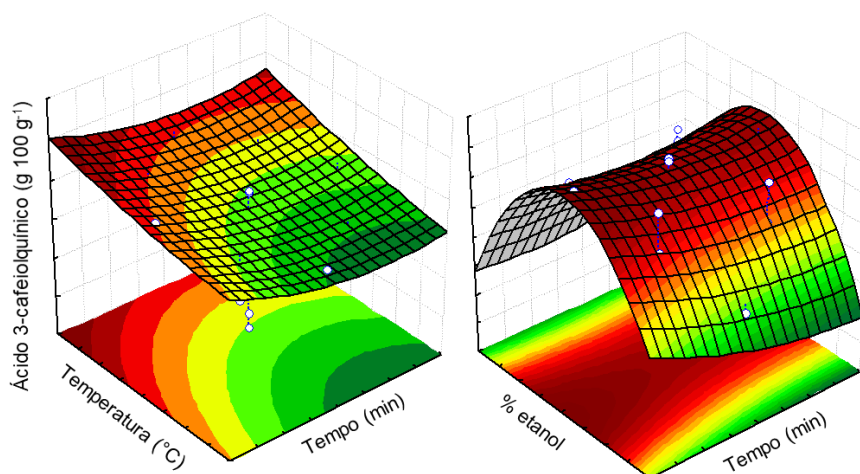


Figura 1. Superfície de resposta da combinação dos fatores em relação a concentração de ácido 3-cafeoilquínico.

#### 4. CONCLUSÕES

Com a otimização multivariada é possível preparar um extrato comestível com alta concentração do ácido 3-cafeoilquínico, fornecendo um produto viável de ser utilizável pela indústria de alimentos e/ou farmacêutica.

## 5. AGRADECIMENTOS, ASPECTOS ÉTICOS E CONFLITO DE INTERESSE

Este estudo foi realizado com apoio da CAPES, APROMATE e Barão Comercio e Industria de Erva Mate LTDA. Os autores declaram que não há conflito de interesse e não foram envolvidos experimentos com animais ou humanos. A pesquisa foi registrada no SISGEN sob nº AEEC386.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, N. et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. **Chemico-Biological Interactions**, v. 272, p. 80–91, 2017.
- BAEZA, G. et al. Dihydrocaffeic acid, a major microbial metabolite of chlorogenic acids, shows similar protective effect than a yerba mate phenolic extract against oxidative stress in HepG2 cells. **Food Research International**, v. 87, p. 25–33, 2016.
- BALZAN, S. et al. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, n. 1, p. 115–122, 2013.
- BRASIL. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Validação de métodos analíticos. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>.
- BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 393–405, 2007.
- CHO, A. S. et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937–943, 2010.
- DE SOUZA, L. M. 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.
- EKBATAN, S. S. et al. Chlorogenic acid and its microbial metabolites exert anti-proliferative effects, S-phase cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer caco-2 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 1–13, 2018.
- MATSUNAGA, K. et al. Inhibitory Effects of Chlorogenic Acid on Azoxymethane-induced Colon Carcinogenesis in Male F344 Rats. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 3, n. 2, p. 163–166, 2002.
- MEINHART, A. D. et al. Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brazil. **Food Research International**, 2017.
- MEINHART, A. D. et al. Chlorogenic and caffeic acids in 64 fruits consumed in Brazil. **Food Chemistry**, v. 8, n. 5, p. 55, 2019.
- PAGLIOSA, C. M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- THITIMUTA, S. et al. Camellia sinensis L. Extract and its potential beneficial effects in antioxidant, anti-inflammatory, anti-hepatotoxic, and anti-tyrosinase activities. **Molecules**, v. 22, n. 3, 2017.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)** Pure and Applied Chemistry, 2002.